

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA Y ANATOMÍA

**ESTUDIO DE MODELOS ANIMALES ENDOCRIADOS Y MANIPULADOS
GENÉTICAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DEL TRATAMIENTO DE CÁNCER
MAMARIO HUMANO USANDO METAANÁLISIS.**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

CLAUDIA ANDREA GÁLVEZ CHAPARRO
VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Dra. Viviana Bustos S.

PROFESOR COPATROCINANTE

Dr. Marcos Moreira E.

PROFESOR COLABORADOR

Dr. Gustavo Monti

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Alex Romero Z.

Dr. Rafael Burgos A.

FECHA DE APROBACIÓN:

15 de Enero de 2008.

*Con amor a mis
padres Humberto e Isabel
y a mi hermana Alejandra.*

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	13
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSIÓN.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA	43
8. ANEXOS	53
9. AGRADECIMIENTOS	68

1. RESUMEN

El cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor prevalencia y representa la segunda causa de muerte en mujeres, en todo el mundo. La complejidad y gran cantidad de factores de riesgo involucrados en la iniciación y desarrollo de la enfermedad, han generado una variedad de estrategias de investigación. A su vez, cada una de las estrategias produce uno o más tratamientos farmacológicos que deben ser probados en modelos animales.

Los tratamientos farmacológicos son evaluados en diferentes cepas de ratones (murinas) y líneas celulares, por lo tanto: los objetivos de este estudio fueron (i) determinar cuáles son las cepas de ratón y líneas celulares más utilizados en la evaluación de los tratamientos para el cáncer mamario, y (ii) determinar si la eficacia del tratamiento es independiente o no de la cepa de ratón y línea celular que se está utilizando.

Para evaluar la eficacia de los tratamientos propuestos en la literatura, se recopiló una muestra de 117 artículos de revistas publicados entre los años 2001 y 2005. Se realizó un metaanálisis con el programa estadístico Epidat 3.1. Para determinar si la eficacia del tratamiento cambia entre cepas de ratón y líneas celulares se realizaron varios análisis de regresión múltiple.

La mayor cantidad de publicaciones en la muestra se obtuvieron de las revistas Clinical Cancer Research y Cancer Research. El modelo de ratón más utilizado es el atómico desnudo. En cuanto a las líneas celulares, MCF-7 con inoculación subcutánea y MDA-MB-435 en el pániculo adiposo mamario son las más frecuentes. En relación a la eficacia del tratamiento, en 2 de 9 estudios se informó una reducción estadísticamente significativa en el volumen tumoral, en 1 de 16 se informó de una reducción de peso tumoral, y 39 de los 45 fueron efectivos en la reducción del volumen tumoral.

La reducción del peso y volumen tumoral relativo mostró diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de ratones y líneas celulares, mientras que no se detectó una diferencia estadísticamente significativa en el volumen tumoral absoluto

En resumen, los tratamientos examinados aquí fueron más efectivos en reducir el volumen que el peso o superficie tumoral. Adicionalmente, la respuesta al tratamiento depende de la línea celular y cepa de ratón utilizada en la evaluación. Por lo tanto, con el fin de comparar la eficacia del tratamiento sobre una base similar, la misma línea celular y cepa de ratón debe ser utilizada.

Palabras claves: Metaanálisis, tratamiento cáncer mamario, modelos murinos, líneas celulares.

2. SUMMARY

STUDY OF INBRED ANIMAL MODELS AND GENETICALLY ENGINEERED IN THE EVALUATION OF TREATMENTS FOR HUMAN MAMMARY CANCER USING META-ANALYSIS.

Breast cancer is one of the most prevalent diseases and it represents the second cause of women death worldwide. The complexity and large number of risk factors involved in the initiation and development of the disease have spawned a variety of research strategies. In turn, each strategy produces one or more drug treatments that need to be tested on animal models.

Drug treatments are tested on different mouse (murine) strains and cell lines: therefore, the objectives of this study were to (i) determine which are the mouse strain(s) and cell line(s) most frequently used in evaluating treatments for breast cancer, and (ii) determine whether the treatment effectiveness is independent or not from the mouse strain and cell line being used.

To assess the effectiveness of the treatments proposed in the literature, we collected a sample of 117 journal articles published between the years 2001 and 2005. A meta-analysis was then performed with the statistical software Epidat 3.1. To determine whether treatment effectiveness changes among mouse strains and cell lines, we run several multiple regression analyses.

Most of the publications in the sample were obtained from the journals Clinical Cancer Research and Cancer Research. The most frequently used mouse model was the athymic nude mouse. Regarding to cell lines, MCF-7 with subcutaneous inoculation and MDA-MB-435 in the mammary fat pad were the most recurrent. Concerning to treatment effectiveness, 2 out of 9 studies reported a statistically significant reduction in tumor area, 1 out of 16 reported a reduction in tumor weight, and 39 out of 45 were effective in reducing tumor volume.

The reduction in tumor weight and relative tumor volume showed statistical differences across cell lines and mouse strains, while no statistical differences were detected for the absolute tumor volume.

Summarizing, the treatments examined here were more effective in reducing tumor volume than tumor weight or area. Additionally, the response to treatment depends on the cell line and mouse strain used in the testing. Therefore, in order to compare treatment effectiveness on a similar basis, the same cell line and mouse strain must be used.

Keywords: Meta-analysis, breast-cancer treatment, mouse models, cell lines.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. CÁNCER MAMARIO

Se define como “el crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios y que tienen la capacidad de diseminarse a cualquier sitio del organismo” (MINSAL 2005). Siendo la forma más común de cáncer mamario humano el carcinoma ductal infiltrante (Blackshear 2001, Ye y col 2004).

El cáncer mamario es el segundo cáncer más común en la mujer (Tahtis y col 2001, Brady y col 2002, Knostman y col 2004, Ye y col 2004), y la causa más común de muerte en mujeres de 40 a 45 años (Hilger y col 2001), siendo las metástasis responsables por la mayoría de las muertes (Minn y col 2005). Esta enfermedad causa 4 % de mortalidad en mujeres norteamericanas, mientras que un 18 % de las muertes en mujeres alemanas, en 1995, fueron atribuidas a cáncer mamario (Hilger y col 2001). Los porcentajes de mortalidad han disminuido desde 1990, debido al aumento del uso de la mamografía. Desafortunadamente, en los últimos 5 años la proporción de sobrevivencia por enfermedades metastásicas es sólo 20,4 %, comparado con un 97,5 % para enfermedades localizadas (Liu y col 2005).

En Chile, en el año 2002, de las 19.146 defunciones por cáncer; 48,7% se producen en mujeres. El mismo año, el cáncer de mama ocupó el tercer lugar entre las causas de muertes por cáncer en la mujer, con una tasa de mortalidad en ascenso para la década de 11,7/100.000 (1992) con 802 casos a 13,3/100.000 (2002) con 1.049 casos. La incidencia en Chile en el año 1992 fue de 2.160 casos nuevos, alcanzando una tasa de 36,8 por 100.000 mujeres mayores de 15 años (MINSAL 2005).

La investigación mundial en cáncer de mama esta orientada básicamente a:

3.1.1. Factores de riesgo

El cáncer mamario es una enfermedad multicausal (Berg 1984, Dickson y col 1991, Blackshear 2001, Clancy Keen y Davidson 2003). Los factores pueden ser clasificados en genéticos, hormonales y medioambientales (Berg 1984, Dickson y col 1991).

3.1.1.1. Factores genéticos. El cáncer mamario es una enfermedad heterogénea que surge de múltiples cambios genéticos en oncogenes y genes supresores tumorales con roles esenciales en el control homeostático de proliferación, diferenciación y muerte de células epiteliales mamarias (Sutherland y Musgrove 2002). Alrededor de un 10 % de cáncer mamario es debido a predisposición genética (McPherson y col 2000).

La susceptibilidad a cáncer mamario, es generalmente heredada como dominante autosomal con penetración limitada. Esto significa que puede ser transmitida a través del sexo

y que algunos miembros de la familia pueden transmitir el gen anormal sin desarrollar cáncer ellos mismos. Dos genes de cáncer mamario, BRCA1 y BRCA2, los cuales están localizados en el brazo largo del cromosoma 17 y 13 respectivamente (McPherson y col 2000), han sido identificados en una importante proporción de cáncer mamario familiar (McPherson y col 2000, Greenblatt y col 2001, Sivaraman y Medina 2002, Chen y Hunter 2005), especialmente si ellos incluyen uno o más casos de cáncer ovárico (Antoniou y col 2003). BRCA1 y BRCA2 funcionan como genes supresores tumorales que juegan un rol en la reparación del ADN (Thull y Vogel 2004).

Numerosos oncogenes han sido descritos en cáncer humano, pero pocos son cruciales en la progresión del cáncer mamario (Elenbaas y col 2001). La amplificación y sobreexpresión de estos oncogenes y productos de oncogenes son los principales mecanismos a través de los cuales estos genes participan en la carcinogénesis (Osborne y col 2004).

Los genes supresores tumorales son aquellos que al perder su función resultan en la promoción de la malignidad. Usualmente son reguladores negativos de crecimiento u otras funciones que pueden afectar el potencial invasivo o metastásico (Osborne y col 2004).

El gen supresor tumoral p53 (TP53 en humanos o Trp53 en ratones) es crucial para inhibir el desarrollo tumoral en muchos tejidos (Blackburn y Jerry 2002). Las mutaciones en este gen ocurren en más de la mitad de todos los tumores humanos (Cui y Donehower 2000, Elenbaas y col 2001). Al parecer p53 es un agente decisivo en la protección del epitelio mamario contra la tumorigénesis (Blackburn y Jerry 2002).

3.1.1.2. Factores Ambientales. Los factores ambientales asociados con un aumento del riesgo para el desarrollo de cáncer mamario incluyen dieta alta en grasas, consumo de alcohol, exposición a radiación y exposición química (Blackshear 2001).

La obesidad está asociada con aumento del riesgo de cáncer mamario en mujeres postmenopáusicas (McPherson y col 2000, Morimoto y col 2002), y esa relación parece estar mediada por variaciones del metabolismo estrogénico asociado con la edad (Winchester 2001), mientras que entre mujeres premenopáusicas esta asociación presenta baja incidencia (McPherson y col 2000). En general, parece que el sobrepeso/obesidad está usualmente relacionado con cáncer mamario que responde a hormonas (Cleary y col 2004).

Varios estudios de cohorte han mostrado una asociación directa entre niveles moderados de consumo de alcohol y riesgo de cáncer de mama (Webster y col 1983, Schatzkin y col 1989, Nasca y col 1990, Henderson 1993, Boffetta y col 2006).

La exposición a la radiación ha mostrado inducir tumores primarios (Goss y Sierra 1998) en la glándula mamaria de mujeres prepuberales y puberales (Blackshear 2001). Las observaciones epidemiológicas indican que la exposición del tejido mamario a la radiación ionizante se asocia con un aumento del riesgo de cáncer de mama en mujeres jóvenes que habían sobrevivido a explosiones de bombas atómicas; en pacientes sometidas a fluoroscopías repetidas (por ejemplo, en casos de tuberculosis) y en pacientes tratadas con radiación por

mastitis puerperal, hipertrofia tímica y enfermedad de Hodgkin (Kelsey 1979, Winchester 2001).

3.1.1.3. Factores hormonales. Los factores reproductivos y endocrinos conocidos que aumentan el riesgo de una mujer para desarrollar cáncer mamario incluyen edad de menarquia temprana, nuliparidad, edad de primera preñez a término, y menopausia tardía (Kelsey 1979, Pike y col 1983, Berg 1984, Persky y col 1992, Henderson 1993, Beckmann y col 1997, Blackshear 2001, Clancy Keen y Davidson 2003, Colditz y col 2004, Clarke y col 2006, Rajkumar y col 2007). La terapia de reemplazo con estrógenos esteroidales y no esteroidales también está asociada con aumento en la incidencia de cáncer y aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad (Blackshear 2001, Rajkumar y col 2007).

Las hormonas, estrógeno y progesterona, tienen un amplio espectro de efectos biológicos en los tejidos (Brady y col 2002, Proietti y col 2005), y es bien sabido que tienen efectos proliferativos sobre el tejido mamario humano (Shoker y col 1999, Huang y col 2000, Winchester 2001, Bernstein 2002). La evidencia clínica, epidemiológica y biológica indica que los estrógenos participan en la iniciación y progresión del cáncer mamario (Paruthiyil y col 2004), y las progestinas por su parte están involucradas en la tumorigénesis mamaria de mujeres y modelos animales (Proietti y col 2005).

Las células que contienen receptores para estrógenos y progesterona (ER y PR, respectivamente) están localizados en el epitelio luminal de la estructura lobular y ductal (Clarke y col 2003). La distribución de ER y PR en la glándula mamaria madura es heterogénea en roedores y humanos donde entre 4 y 20 % de las células epiteliales lumbales son positivas a ER y alrededor del 50 % para PR (Novaro y col 2004).

Alrededor del 70 % de los tumores mamarios humanos son positivos a ER (Beckman y col 1997, List y col 2001, Brady y col 2002, Pratt y col 2003). Los ER son distintos estructural y funcionalmente (ER α y ER β) (Mishra y col 2003). ER α es la forma principal determinando la dependencia hormonal debido a que la expresión de ER β generalmente es baja en la mayoría de los cáncer mamario y ovárico (Rabbani y col 2005).

Por otro lado, se han realizado varios estudios para evaluar los efectos potenciales de los anticonceptivos orales y el riesgo subsiguiente de cáncer mamario, así como se ha evaluado la terapia de reemplazo de estrógeno en mujeres posmenopáusicas (Henderson 1993), los cuales se han visto dificultados por los cambios introducidos en la composición de estos fármacos con el transcurso de los años, y por las diferencias en el tiempo de uso entre distintos pacientes (Winchester 2001).

3.1.2. Tipos de cáncer mamario

Varios estudios sugieren que el desarrollo del cáncer mamario humano es un proceso de múltiples pasos, comenzando con una etapa benigna y progresando a través de etapas proliferativas intermedias histológicamente distintas de epitelio hiperplásico que finalmente resultan en cáncer invasivo (Namba y col 2004).

Las proliferaciones del epitelio glandular combinado con características celulares de malignidad pero sin infiltración son llamadas carcinoma *in situ*, distinguido por microscopía como ductal (DCIS) o lobular (LCIS) (Beckmann y col 1997). Esta proliferación se encuentra confinada por una membrana basal intacta al sistema ducto-lobular de la mama, y por tanto, no es causa de morbilidad importante a menos que se convierta en invasivo (Winchester 2001).

El carcinoma mamario invasivo (infiltrante) se puede clasificar en una categoría ductal y otra lobulillar, con varias variantes reconocidas de cada una de ellas. El carcinoma lobulillar infiltrante, representa hasta el 16 % del cáncer mamario invasivo (Winchester 2001).

Las metástasis surgen de la expansión del cáncer desde un sitio primario y la formación de nuevos tumores en órganos distantes (Chambers y col 2002). La localización del sitio metastásico depende del tipo particular de cáncer y de la etapa de la enfermedad (Brown y Ruoslahti 2004). Para colonizar exitosamente un sitio secundario la célula cancerígena debe completar una serie de pasos secuenciales antes de llegar a ser una lesión clínicamente detectable (Lancaster y col 2005). Algunos de estos pasos incluyen invasión a través de matriz extracelular, intravasación, sobrevivencia en la circulación, extravasación en un sitio distante, y crecimiento progresivo en el sitio metastásico (Fidler y Hart 1982, Chambers y col 2002, Minn y col 2005). El cáncer mamario se extiende primero a los pulmones e hígado y más tarde lo hace hacia el sistema nervioso central y huesos (Brown y Ruoslahti 2004).

3.1.3. Tratamiento

La meta en la terapia del cáncer es un régimen de tratamiento no tóxico que asegure la completa erradicación del tumor primario y el cáncer metastásico, produciendo una cura para esta enfermedad (Tobias 2004, Sarkar y col 2005). Sin embargo, lograr estos objetivos resulta difícil a pesar de los progresos en terapias para condiciones neoplásicas específicas (Sarkar y col 2005). Esto se debe fundamentalmente a la capacidad de las células tumorales para evadir la muerte por radio o quimioterapia, lo que sugiere que las células tumorales son intrínsecamente resistentes a la terapia o han adquirido la resistencia durante el tratamiento (Chin y col 2005). Por lo tanto, la resistencia a drogas constituye el principal obstáculo en el éxito del tratamiento (Ye y col 2004). Esto destaca la necesidad de modalidades alternativas de tratamiento, solas o en combinación, para manejar efectivamente las condiciones clínicas (Sarkar y col 2005).

El cáncer mamario es uno de los pocos cánceres que tiene varias modalidades activas disponibles para su tratamiento, como: cirugía, terapia hormonal, terapia citotóxica, y radiación (Baliga y col 2005).

3.1.3.1. Quimioterapia. La quimioprevención se ha definido tradicionalmente como la inhibición o inversión de la carcinogénesis, antes de la aparición de la malignidad franca (Winchester 2001), mediante el uso de agentes químicos específicos naturales o sintéticos (Vogel 2006).

La efectividad de la quimioterapia de tumores puede ser disminuida severamente por entrega limitada de la droga debido al bajo y heterogéneo flujo sanguíneo y por moléculas

grandes debido a elevada presión intratumoral. Por lo tanto, las drogas con alta eficiencia *in vitro* frecuentemente no exhiben suficiente actividad contra tumores sólidos *in vivo* debido a la ineficiente transferencia de la droga desde el plasma al intersticio tumoral. La farmacocinética de la droga dentro del ambiente tumoral depende de una combinación de parámetros fisiológicos y regulados por la droga, tales como grado de vascularización del tumor, eficiencia de la entrega de la droga por parte del flujo sanguíneo, y estabilidad de la droga durante el transporte hacia el ambiente fisiológico del tumor. El transporte de la droga entre las membranas celulares depende de las propiedades hidrófobas de la droga y, para moléculas de pequeña carga, en los gradientes de pH entre las membranas (Artemov y col 2001).

3.1.3.2. Hormonales. La terapia endocrina resulta en un mejoramiento significativo en la supervivencia libre de recurrencia, sobretodo en pacientes menores de 50 años de edad. Las terapias endocrinas incluyen supresión de la función ovárica por irradiación, cirugía, o agonistas del factor liberador de hormona luteinizante (LHRH) o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Esta es una opción para combinar ablación ovárica con otros tipos de terapia endocrina, incluyendo inhibidores de aromatasa y modificadores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs) (Boekhout y col 2006).

Los inhibidores de aromatasa han tenido un gran impacto en el tratamiento del cáncer mamario. Estos agentes fueron desarrollados para el tratamiento de mujeres en quienes la función ovárica ha cesado (naturalmente, debido a la menopausia o artificialmente, debido a la cirugía o la quimioterapia). Ellos inhiben la aromatasa, una enzima citocromo P450 que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos en los tejidos periféricos tales como la grasa corporal, hígado, mama y células musculares, y en el tejido tumoral mamario en sí mismo, de este modo reducen la síntesis y output de estrógenos en mujeres postmenopáusicas. En mujeres premenopáusicas, los ovarios son los sitios primarios de producción de estrógenos y los inhibidores de aromatasa no son capaces de bloquear completamente la producción de estrógenos ováricos (Tobias 2004).

Los SERMs son una clase de drogas estructuralmente diversas que se unen a los ER. Los SERMs pueden mantener alguno de los efectos positivos de los estrógenos mientras previenen algunos efectos adversos, a saber los efectos proliferativos en tejidos reproductivos. Y tienen el potencial de ser usados como primera, segunda, y tercera línea de tratamiento incluso en tumores hormonalmente refractarios. Tres drogas bien conocidas que pertenecen a la clase de drogas SERMs son tamoxifeno, toremifeno, y raloxifeno (Brady y col 2002).

El tamoxifeno es, actualmente, la terapia hormonal más ampliamente utilizada para cáncer mamario (Dhingra 1999, Brady y col 2002), es un derivado no esteroideo del trifeniletieno, clasificado generalmente como antiestrógeno con actividad agonista parcial de los estrógenos en algunos tejidos (Winchester 2001, Altundag e Ibrahim 2006). El uso de tamoxifeno como adyuvante después de la cirugía primaria para el cáncer de mama precoz sensible a los estrógenos se ha asociado con prolongación de la supervivencia libre de enfermedad y reducción del riesgo de muerte del 20 a 30 % (Winchester 2001).

3.1.3.3. Nutricionales. Muchos compuestos nutricionales, han sido asociados con una acción quimiopreventiva, incluyendo soya, vitaminas, minerales y fibra. La quimiopreención a

través de cambios dietarios y nutricionales pueden, por consiguiente, ofrecer un intento por reducir significativamente la incidencia y progresión del cáncer mamario (Kavanaugh y Green 2003).

Los fitoestrógenos (estrógenos débiles de origen principalmente vegetal) (Horn-Ross 1995, Boekhout y col 2006, Rice y Whitehead 2006) se unen competitivamente a los ER en células cancerosas mamarias (Ronco y De Stefani 1999, Boekhout y col 2006). Esta unión competitiva puede bloquear la unión celular de estrógenos endógenos como el estradiol, resultando en un efecto antiestrogénico que puede inhibir el crecimiento y proliferación de las células cancerosas hormonodependientes. Los principales fitoestrógenos son las isoflavonas (daidzeína y genisteína), los coumestanos y los lignanos (enterolactona y enterodiol) (Ronco y De Stefani 1999).

Otro grupo de moléculas capaces de influir en muchas funciones biológicas, como la proliferación, la diferenciación y la inducción de apoptosis son los retinoides; familia de sustancias naturales y sintéticas relacionadas desde el punto de vista estructural con la vitamina A. (Winchester 2001).

3.2. MODELOS ANIMALES DE CÁNCER MAMARIO

Con la finalidad de dilucidar los procesos claves involucrados en la biología del desarrollo y progresión del cáncer mamario, han sido desarrollados numerosos modelos *in vivo* e *in vitro* de progresión de tumores mamarios (Ye y col 2004).

Los modelos animales son frecuentemente usados para probar la efectividad de una droga o procedimiento antes de proceder a los ensayos clínicos. Una razón para el uso de estos modelos es que ellos permiten a los investigadores enfocarse en un proceso patológico particular sin los efectos confusos de otras enfermedades o tratamientos (Roberts y col 2005). Por otra parte, los estudios en humanos son complicados por la gran heterogeneidad genética en la población humana. Adicionalmente, los ensayos clínicos requieren grandes cohortes, son bastante costosos, difíciles de llevar a cabo, e imprecisos cuando se trata de controlar el consumo dietario actual, registrando la ingesta diaria (Kavanaugh y Green 2003).

La abundancia de modelos animales de cáncer mamario proporciona a la comunidad científica muchas alternativas para dirigir preguntas experimentales. La expresión transgénica de genes particulares o mutantes puede proporcionar un modelo *in vivo* para evaluar componentes contra una molécula o vía específica. Algunos modelos pueden ser particularmente útiles para estudios de estados de progresión tumoral y estados-específicos de respuesta a componentes quimioterapéuticos o quimiopreventivos. Sin embargo, el valor de estos modelos animales para predecir la respuesta de compuestos en pacientes humanos es desconocida y no ha sido probada (Green y col 2004).

De un modelo animal para cáncer mamario se espera que refleje fehacientemente la enfermedad humana en varios niveles tales como etiología, patología y genética, que el cáncer

se origine sólo en la glándula mamaria, que la neoplasia ocurra con un 100% de incidencia en animales tratados o modificados, mientras que los animales controles no desarrollen tumores, y que la tumorigénesis debe tener una latencia relativamente corta (Wagner 2004).

Los roedores emergieron como el primer modelo biológico para cáncer mamario humano (Cardiff y Wellings 1999). Los modelos *in vivo* iniciales incluían cepas de ratones específicas, tales como A, GR, BR6, C3H, DBA y RIII, que están predispuestas a tumores mamarios espontáneos (Callahan y Smith 2000, Blackshear 2001). Las ventajas más importantes que ofrecen estos modelos y otros como los ratones transgénicos y knock-out, en contraposición a las líneas celulares tumorales (humanas), son (i) la posibilidad de estudiar el efecto de las mutaciones que predisponen al cáncer en un fondo genético uniforme y (ii) la posibilidad de llevar a cabo todo tipo de estudios básicos y ensayos terapéuticos *in vivo* (Benavides y Guénet 2003). Sin embargo, no hay un sólo modelo que refleje fehacientemente el proceso de desarrollo y progresión del cáncer mamario debido a la heterogeneidad y complejidad de esta enfermedad (Ye y col 2004).

Los modelos animales para cáncer mamario pueden ser categorizados en tres grupos principales: modelos de xenotransplante; inducidos; y manipulados genéticamente (GEM) tales como transgénicos y knock-out. Ciertos modelos cuentan con una combinación de técnicas usadas para generar estos tres principales tipos de modelos de cáncer (Wagner 2004).

3.2.1. Xenotransplante

El hecho que algunas líneas celulares de cáncer mamario humano forman tumores en ratones inmunodeficientes fue reportado por primera vez en 1962 por Isaacson y Cattanaach. Sin embargo, la complejidad de los procedimientos usados para producir ratones inmunodeficientes de tipo salvaje, con una combinación de cirugía (timectomía) radiación y/o tratamiento con drogas, significó que esta terapia no fuera ampliamente usada hasta la introducción de los ratones mutantes desnudos. Hoy en día, los ratones desnudos (*Foxn1*) y los ratones SCID (Severe Combined Immunodeficiency), los cuales naturalmente tienen mutaciones de genes únicos que afectan al sistema inmune, son los modelos de investigación más comúnmente usados en experimentos de xenotransplante. Los ratones desnudos tienen una mutación recesiva autosomal del cromosoma 11 que causa falla de crecimiento del pelo y otros defectos, incluyendo disgenesia tímica epitelial, la cual los hace deficientes en células T. Los ratones SCID tienen una mutación espontánea inactivando la proteína ADN quinasa resultando en pérdida de células T y B funcionales (Kim y col 2004).

El cáncer mamario humano es uno de los tumores más difíciles para transplantar directamente en animales experimentales, incluyendo ratones SCID y desnudos. El éxito reportado para cáncer mamario humano invasivo es de 7-20 %, con diferencias por sitio de implantación (siendo el mejor el ortotópico), la edad y cepa de ratones usados, y si fue usada la suplementación hormonal (los ratones desnudos tienen bajos niveles de estrógenos, comparado con los humanos) (Kim y col 2004).

Entre los modelos animales para cáncer mamario, el xenotransplante aún juega un rol dominante en los ensayos preclínicos. Las razones para esto son: (i) los modelos de

xenotransplante son relativamente poco costosos y fáciles de generar. (ii) las inyecciones subcutáneas u ortotópicas de células de cáncer mamario tumorigénicas tales como las células de adenocarcinoma mamario metastásico humano (MCF-7) o las células de carcinoma ductal mamario metastásico humano (T-47D) en receptores inmunocomprometidos resultan en la formación de tumores sólidos después de una latencia relativamente corta. (iii) los modelos de xenotransplante que utilizan líneas celulares positivas a ER son corrientemente indispensables para evaluación preclínica de inhibidores de señalización de receptores esteroideos y estudios de resistencia a drogas (Wagner 2004).

Hay muchos modelos de xenotransplantes humanos disponibles para uso en investigación de cáncer mamario, muchas derivadas de líneas celulares de cáncer establecidas o células epiteliales mamarias normales inmortalizadas manipuladas genéticamente. Entre las más comúnmente utilizadas están los sistemas MCF10AT y MCF-7, probablemente debido a su facilidad de uso y la abundancia de información previa disponible en estas líneas de estudios *in vitro* (Kim y col 2004). La línea MCF-7 es un prototipo ampliamente usado para cáncer mamario dependiente de estrógeno, estas células forman tumores en ratones desnudos en la presencia de 17 beta-estradiol circulante, y los tumores regresan rápidamente a través de un mecanismo apoptótico cuando la fuente de estrógenos es removida (Pratt y col 2003).

Otra línea celular de cáncer mamario comúnmente usada en modelos animales de xenotransplante es MDA-MB-231. Estas células originadas de una muestra de carcinoma ductal metastásico humano, son independientes de estrógeno, y exhiben crecimiento preferencial en el panículo adiposo mamario de ratones inmunocomprometidos. Las células MDA-MB-231 desarrollan tumores primarios que producen metástasis espontánea a nódulos linfáticos y micrometástasis a los pulmones (Jenkins y col 2005).

3.2.2. Inducidos

3.2.2.1. Tumores inducidos por carcinógenos: Entre los varios modelos que se han desarrollado podemos mencionar los tumores inducidos por metilnitrosurea (MNU) y dimetil benzantraceno (DMBA), los cuales inducen carcinomas mamarios en ratones tratados con progestágenos, aunque los tumores inducidos no responden a hormonas (Lanari y Molinolo 2003).

3.2.2.2. Tumores inducidos por la administración de hormonas: Hay muy pocos modelos en los cuales la administración de una hormona lleva a la aparición de carcinomas mamarios. En 1985, se inocularon ratones hembras de la cepa BALB/c de dos meses de edad (Bioterio de la Academia Nacional de Medicina) cada tres meses con 40 mg de medroxiprogesterona acetato de depósito subcutáneo en el flanco, y los ratones desarrollaron tumores mamarios con una incidencia actuarial de 80 % y una latencia de aparición de 52 semanas (Lanari y Molinolo 2003).

3.2.2.3. Tumores asociados a virus oncogénicos: Las cepas endocriadas de ratones como C3H poseen alta incidencia de tumores mamarios, debido esencialmente a la presencia del retrovirus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), los tumores en estas cepas suelen ser lobulillares y en general no expresan ER ni PR (Lanari y Molinolo 2003). El virus del tumor

mamario del ratón fue detectado como un agente oncogénico, llamado “agente de la leche” por personal del Jackson Laboratory (Cardiff y col 2002). Sin embargo, hoy se sabe que corresponde a un retrovirus y que actúa como mutágeno insercional (Callahan y Smith 2000, Dickson y col 2000,), produciendo lesiones premalignas y tumores malignos de la glándula mamaria (Callahan y Smith 2000). MMTV es transmitido verticalmente como un provirus integrado a la línea germinal u horizontalmente como virus exógeno transmitido por la leche (Buggiano y col 1999).

3.2.3. GEM (Manipulados genéticamente)

Cientos de modelos animales de cáncer mamario humano han sido desarrollados desde la primera demostración, en 1984, que la glándula mamaria del ratón puede ser dirigida molecularmente y usada para evaluar la oncogenicidad de genes humanos (Cardiff y Kenney 2007). Los modelos animales transgénicos han sido generados para imitar las enfermedades humanas a través de una variedad de mecanismos: sobreexpresión o activación de genes asociados con el desarrollo de cáncer humano (oncogen), eliminación de genes targets (supresor) vía genes knock-out y la generación de proteínas negativas dominantes para interrupción de genes reguladores (Kavanaugh y Green 2003).

Los GEM son diseñados para reproducir aspectos muy específicos de la formación y progresión del tumor, usualmente pero no invariablemente basados en el conocimiento de la genética de tumores humanos. Ejemplos de genes humanos que gatillan eventos moleculares similares en ratones incluyen un empalme variante de *erbB2* en humanos, los cuales imitan las mutaciones en el dominio transmembrana que activan el *c-erbB2* murino como el oncogen *neu*, así como también mutantes condicionales de los genes supresores tumorales *BRCA1* que producen tumores en la glándula mamaria en ratones. Estos modelos singeneicos y GEM han contribuido significativamente al entendimiento de los aspectos fundamentales de la genética del cáncer mamario, pero no proporcionan suficientes similitudes con los tumores humanos para evaluación preclínica de drogas (Kim y col 2004).

Las mutaciones dirigidas de genes en modelos animales han contribuido significativamente al conocimiento de la patogénesis del cáncer mamario humano. No hay un sólo modelo que imite mejor la patología y desregulación mecanística vistas en el cáncer mamario. Cada modelo proporciona una pequeña parte del puzzle, lo cual ayuda a clarificar la compleja interacción asociada con la población heterogénea de células en la glándula mamaria normal (Blackshear 2001).

Los modelos animales transgénicos dan a los investigadores la capacidad para introducir ADN extraño en el genoma del ratón para promover sobreexpresión tejido - específico de un oncogen para determinar los efectos en la tumorigénesis (Blackshear 2001).

Los efectos y expresiones fenotípicas de estas alteraciones moleculares en la tumorigénesis mamaria están influenciados por la cepa de fondo usada para crear el modelo y por el promotor. Los efectos de la genética de la cepa de fondo en el fenotipo han sido documentados en muchos modelos. La cepa de fondo del modelo es una variable importante que contribuye a diferencias en la morfología del tumor y latencia del tumor vistas en modelos

de tumores mamarios manipulados genéticamente. Los promotores usados para expresión dirigida de los transgenes a la glándula mamaria pueden también alterar la morfología del tumor y el fenotipo del modelo (Blackshear 2001).

Los tumores mamarios que surgen en modelos transgénicos son generalmente negativos a ER, los cuales los hacen atractivos para probar agentes contra tumores que no responden hormonalmente (Kavanaugh y Green 2003).

Los FVB/N son una cepa de ratones endocriados que frecuentemente es usada para crear animales transgénicos debido, en contraste a otras cepas, a que estos ratones tienen superfecundidad, gran pronúcleo en cigotos fertilizados, y sobrevivencia embrionaria favorable seguida de la inyección (Nieto y col 2003).

3.3. METAANÁLISIS

La enorme y creciente cantidad de información biomédica existente limita seriamente la posibilidad de los clínicos de mantenerse informados (Letelier y col 2005). El cáncer de mama es un tema ampliamente investigado, por lo tanto existen muchos artículos sobre el tema, pero más aún existen estudios con protocolos experimentales similares que arrojan resultados diferentes, lo que genera confusión sobretodo en las alternativas terapéuticas disponibles para tratar esta enfermedad. Es por esto, que en esta revisión se utilizó como herramienta estadística el metaanálisis, el cual se utiliza para resumir en un sólo valor numérico toda la evidencia relacionada a un tema, aumentando la potencia estadística y la precisión del estimador puntual (Letelier y col 2005).

3.4. HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos al evaluar un tratamiento experimental de cáncer mamario en modelos animales no se ven influenciados por la cepa de ratón utilizada.

3.5. OBJETIVOS

3.5.1. Objetivos Generales

- Determinar la cepa de ratón y línea celular más utilizadas en la investigación del tratamiento de cáncer de mama.
- Determinar si existe una relación estadísticamente significativa entre la eficacia del tratamiento, la cepa de ratón y/o línea celular utilizada.

3.5.2. Objetivos específicos

- Conocer la revista con mayor número de investigaciones, dentro del material recopilado.
- Conocer las variables vinculadas con el manejo de los animales para investigación de cáncer mamario.
- Conocer las distintas estrategias terapéuticas y las variables para analizar la eficacia de un tratamiento.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. BÚSQUEDA DE ARTÍCULOS

La recopilación de información se realizó mediante la búsqueda de artículos de revistas científicas publicadas entre los años 2001 y 2005, a través del uso de las siguientes bases de datos: ISI WEB OF SCIENCE, disponible en la biblioteca de la Universidad Austral de Chile, y en la base de datos MEDLINE disponible en la página de la Biblioteca Regional de Medicina (BIREME).

La búsqueda incluyó los artículos de revistas publicados en los siguientes idiomas: Inglés, Francés, Alemán, Español, Italiano y Portugués.

Para la obtención de los artículos en las bases de datos se emplearon las palabras claves más utilizadas para la búsqueda de este tipo de artículos, junto con sus respectivas combinaciones. Las palabras claves son las siguientes:

1. Para cáncer de mama, los siguientes términos en inglés: breast cancer, mammary gland tumor, breast neoplasm, mammary neoplasm, breast tumor, cancer of breast y human mammary carcinoma.
2. Para ratones: mouse, mice, murine y mouse model xenograft. Y en español; ratones transgénicos, virus del tumor mamario del ratón, ratones de cepas mutantes, ratones de cepas consanguíneas, ratones desnudos, ratones SCID.

4.2. DEFINICIÓN DE CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN

Debido a la gran cantidad de información obtenida sólo se incluyeron los artículos correspondientes a estudios de tratamiento (quimioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y nutricionales) de cáncer mamario humano usando modelos animales (*in vivo*) entre los años 2001-2005. A su vez fueron excluidos aquellos artículos en que sólo se realizaban bioensayos con líneas celulares murinas (*in vitro*), y aquellos estudios que sólo trataban de la enfermedad metastásica.

4.3. CONFECCIÓN DE UN LISTADO DE TRABAJOS INCLUIDOS

Una vez recopilada toda la información, esta fue tabulada en el programa Excel (Microsoft office XP) ordenada alfabéticamente por el primer apellido del autor principal, enumerándolas de modo correlativo. Aquellos artículos que incluían más de un protocolo experimental (distintos tratamientos, distintas cepas de ratones, y/o líneas celulares) fueron

separados por letra a, b, c según correspondiera incluyendo el número del autor, con el fin de facilitar el posterior análisis de los datos.

Los datos empleados para confeccionar la tabla principal fueron; el número de animales utilizados en cada investigación, línea celular y vía de administración de ésta, cepa de ratón y datos relacionados directamente con el modelo animal (sexo, edad, peso), datos de manejo del mismo (periodo de aclimatación, alimentación, tipo de alojamiento, status microbiológico, condiciones ambientales), tratamientos utilizados (fármaco, dosis), y respuesta al tratamiento. Y una vez ingresada toda la información, se realizaron tablas de frecuencia.

En cuanto a los tratamientos, estos fueron agrupados en quimioterapéuticos, inmunoterapia, hormonoterapia y nutricionales, y a su vez debido a la gran heterogeneidad de productos utilizados se reagruparon por características similares, lo cual se realizó gracias a la información obtenida en la base de datos CancerQuest.

Se tabularon por separado las investigaciones de acuerdo al fármaco y dosis utilizadas en cada línea celular y en cada cepa de ratón; obteniéndose un total de 561 protocolos experimentales, luego se separó la información pertinente al volumen, superficie y peso tumoral de los animales tratados y de sus controles, por ser los datos más relevantes para evaluar la eficacia del tratamiento.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El metaanálisis de la eficacia de tratamientos de acuerdo a la reducción de superficie, peso, y volumen tumoral fue realizado con el programa estadístico Epidat 3.1. El potencial efecto de la heterogeneidad fue evaluada con el fin de determinar hasta que punto los resultados provenientes de los distintos estudios podían ser resumidos en una única medida, por lo cual, las pruebas estadísticas que se utilizan se basan en la hipótesis de que la variabilidad entre – estudios es nula. La heterogeneidad fue evaluada mediante la prueba Q de Dersimonian y Laird's, estadísticos de heterogeneidad. Debido a la poca potencia de las pruebas estadísticas existentes, éstas se complementaron con gráficos de Galbraith y L'Abbé. El gráfico de Galbraith representa la precisión de cada estudio frente al efecto estandarizado; asimismo, representa la línea de regresión ajustada a estos puntos y una banda de confianza. Los estudios que caen fuera de esta banda son los que más contribuyen a la heterogeneidad. Y por otro lado, el gráfico de L'Abbé representa la tasa de eventos del grupo tratamiento frente a la tasa del grupo control, por tanto, este gráfico sólo se presenta cuando la variable respuesta es binaria.

Además, se evaluaron tablas de resultados individuales y combinados, por el modelo de efectos fijos y aleatorios, y gráficos de meta-análisis. La medida del efecto de los estudios que se metaanalizaron fue la diferencia estandarizada de medias con sus respectivos intervalos de confianza con un nivel de error del 5%. La figura que contiene los resultados del metaanálisis, consta de dos áreas separadas por una línea, hacia un lado se encuentran los valores positivos que en este caso indican que el tratamiento produjo aumento de las variables

estudiadas (superficie, peso y volumen), por lo tanto serian inefectivos. Por otro lado, los valores negativos indicarían que el tratamiento tuvo efecto en la reducción de las variables analizadas. La línea ubicada en el centro de la figura corresponde al valor cero y los estudios ubicados en ésta concuerdan con la hipótesis nula del metaanálisis, lo que significa que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y los controles respectivos.

Se evaluó el sesgo de publicación mediante las pruebas de Begg y Egger, y sus gráficos correspondientes. Las pruebas de Begg y Egger, contrastan la hipótesis nula de ausencia de sesgo de publicación.

Los estudios también fueron sometidos a un análisis de sensibilidad, el que pretende estudiar la influencia de cada uno de los estudios en la estimación global del efecto y, por lo tanto, la estabilidad de la medida final obtenida. Esto se llevaba a cabo repitiendo el meta – análisis tantas veces como estudios utilizados, omitiendo cada vez un estudio, combinándose los restantes.

Para comprobar si existe relación entre los tratamientos utilizados para la reducción del volumen (absoluta y relativa) y el peso postratamiento con las líneas celulares, cepas de ratones o tipos de tratamientos investigados, se utilizó el programa estadístico STATA versión 10, con un modelo de regresión múltiple, el cual utiliza varias variables independientes para predecir o explicar los valores de una respuesta numérica simple.

En el caso del volumen tumoral se calculó la reducción absoluta y relativa de los animales tratados, y posteriormente debido a la gran cantidad de tratamientos utilizados; estos fueron reagrupados en las siguientes categorías: quimioterapéuticos, hormonales, nutricionales, inmunosupresores, inhibidores específicos y anticuerpo monoclonales. Para el caso del peso tumoral se utilizaron los datos de los pesos postratamiento e igualmente se realizó la reagrupación de tratamientos.

Se utilizaron las mismas tablas que para el metaanálisis, pero en los resultados sólo se tabulan las variables consideradas de interés en este estudio (línea celular, cepa de ratón, y tipo de tratamiento). La variable dependiente (Y) corresponde a la reducción del volumen tumoral (absoluta y relativa) y al peso postratamiento. Además, en cada variable independiente (X), ya sea línea celular, cepa de ratón y tipo de tratamiento, se excluye un nivel, normalmente el más repetido. Por lo que el análisis se hace comparando los niveles restantes con el excluido en cada variable.

5. RESULTADOS

5.1. METAANÁLISIS CUALITATIVO

Se recopiló información de 255 artículos que concordaban con los criterios de inclusión; pero por motivos de costos, relacionados con la obtención de los originales no se incluyeron todos los artículos resultantes de la búsqueda. Por lo que el metaanálisis fue realizado con 117 artículos publicados entre los años 2001 y 2005, sobre estudios que utilizaban modelos murinos como reactivo biológico para evaluar el tratamiento de cáncer mamario. De estos 117 artículos se obtuvo información referente a las cepas de ratones utilizadas, líneas celulares, manejo del modelo animal, y tratamiento realizado para el cáncer de mama. Debido a que en algunos estudios se realizaba más de una investigación; la información de dichos estudios fue tabulada por separado para facilitar el procesamiento de datos, sumando un total de 149 investigaciones.

5.1.1. Publicaciones:

Dentro de los artículos recopilados la revista con mayor número de publicaciones corresponde a Clinical Cancer Research, seguido de Cancer Research (Tabla N° 1), con 25 y 23 artículos respectivamente (41,03 % del total de artículos revisados). Además se aprecia que en los años 2004 y 2005 se concentra el mayor número de publicaciones analizadas, siendo de 29 y 30 artículos respectivamente.

Tabla N° 1. Número de artículos analizados por revista y por año.

Revistas	2001	2002	2003	2004	2005	Total por revista	%
Clinical Cancer Research	3	2	6	8	6	25	21,37
Cancer Research	3	7	3	2	8	23	19,66
Molecular Cancer Therapeutics		2	5	2	2	11	9,40
Journal of the Nacional Cancer Institute		2	3	2		7	5,98
Breast Cancer Research					6	6	5,13
Oncogene	1		1	2	2	6	5,13
The Journal of Nutrition	1	1		2	1	5	4,27
Breast Cancer Research and Treatment	1		1	2	1	5	4,27
Nutrition and Cancer		3				3	2,56
Internacional Journal of Oncology		1		1	1	3	2,56
Cancer Gene Therapy	1			1		2	1,71
Cancer Epidemiology, Biomarkers &		1	1			2	1,71

Prevention							
British Journal of Cancer	1			1		2	1,71
Gene Therapy			1			1	0,85
Proceedings of the Nacional Academy of Science USA	1					1	0,85
Molecular Cancer Research				1		1	0,85
Cancer Biology & Therapy					1	1	0,85
Oncology Reports				1		1	0,85
The British Journal of Surgery	1					1	0,85
The Faseb Journal				1		1	0,85
Journal of Nuclear Medicine					1	1	0,85
Anticancer Research				1		1	0,85
Free Radic Biology & Medicine					1	1	0,85
Cancer			1			1	0,85
Investigational New Drugs			1			1	0,85
Journal of Experimental Therapeutics & Oncology			1			1	0,85
Oncology		1				1	0,85
Annals of Surgical Oncology				1		1	0,85
Endocrine-Related Cancer	1					1	0,85
Anticancer Drugs				1		1	0,85
total por año	14	20	24	29	30	117	100
%	11,97	17,09	20,51	24,79	25,64		100

5.1.2. Animales

5.1.2.1. Fuente: Las cepas de ratones más utilizadas en el estudio de cáncer mamario (Tabla N° 2), correspondieron a los ratones atímicos desnudos y atímicos desnudos con fondo genético BALB/c, con 33 y 31 ratones respectivamente, constituyendo ambas el 41,02 % del total de cepas utilizadas. En cuanto al genotipo de los ratones utilizados se puede observar que en su mayoría corresponden a ratones manipulados genéticamente (GEM).

* El total es superior al número de estudios analizados ya que en algunos de estos se utilizó más de una cepa murina para la evaluación del mismo fármaco.

Tabla N° 2. Número de ratones utilizados por cepa murina y genotipo.

Cepa de ratones	N°	%	Genotipo
Atímicos nu/un	33	21,15	Mutantes
BALB/c Atímicos nu/un	31	19,87	Inmunodeficiente
BALB/c	18	11,54	Endocriados
SCID	10	6,41	Mutante
NCR nu/un	10	6,41	Mutante espontáneo
BALB-neuT	5	3,21	GEM
SCID beige	4	2,56	Congénico
FVB/N-TgN (MMTVneu)202 Mul	4	2,56	GEM (transgénico)
SCID Rag 2M	3	1,92	Inmunodeficiente
NIH Swiss un/un	3	1,92	Inmunodeficiente
C57BL/6J	2	1,28	Endocriados
FVB/N	2	1,28	Endocriados
ICR-SCID	2	1,28	Mutante espontáneo
CD-1 MMTVneu Tg	2	1,28	GEM
Neu-N Tg	2	1,28	GEM
MMTVPyVT	1	0,64	GEM
MMTV-v-Ha-ras	1	0,64	GEM
MF1	1	0,64	Outbred
MTag	1	0,64	
BLRB	1	0,64	Endocriado
CD2F1	1	0,64	Híbrido
ICR	1	0,64	Outbred
BALB/cAnNCrIBR	1	0,64	Endocriado
MMTV.f.huHER2	1	0,64	GEM
CD-1 atímicos nu/un	1	0,64	Outbred Inmunodeficientes
C3(1) Tag (fondo FVB)	1	0,64	GEM
MMTV-c-neu Tg	1	0,64	GEM
HER-2/neu (+/+)	1	0,64	GEM
Transgénico	1	0,64	GEM
FVB/TgN (MMTV - neu)	1	0,64	GEM
NeuYD	1	0,64	GEM
BALB/c SCID	1	0,64	Inmunodeficiente
GR	1	0,64	Endocriados
BALBc/ByJ	1	0,64	Endocriados
C3(1)-SV40 Tg	1	0,64	GEM
TCR-Tg	1	0,64	GEM
NMRI-nu/un	1	0,64	Inmunodeficiente
MMTV-erbB2 Tg	1	0,64	GEM
B6D2F1	1	0,64	Híbrido
NeuYD x VEGF	1	0,64	GEM
TOTAL	156	100,00	

Las principales fuentes de obtención de cepas murinas en los estudios analizados fueron Charles River Laboratories y National Cancer Institute (Tabla N° 3), con 21 y 20 estudios respectivamente (27% del total). En 41 estudios (27 %) no se proporcionaba información referente a la fuente de obtención de las cepas murinas.

Tabla N° 3. Laboratorios de obtención de cepas de ratones.

Fuente	N°	%
Sin información	41	27,0
Charles River Breeding Laboratorios	21	13,8
Nacional Cancer Institute	20	13,2
Harlan	17	11,2
Jackson Laboratorios	12	7,9
Taconic	12	7,9
Iffa Credo	4	2,6
Frederick Cancer Research and Development Center	3	2,0
CLEA Japon	2	1,3
Inst de biología y med exp animal facility, Buenos Aires	2	1,3
Dr Elizabeth Jaffe en el centro del cáncer del Johns Hopkins	2	1,3
M & B	1	0,7
National Academy of medicine, BA, Argentina	1	0,7
Harold von Boehmer	1	0,7
Shanghai Institute de Materia Medica	1	0,7
Sandra Gendled	1	0,7
Sankyo Laboratory Service.	1	0,7
SLC japon	1	0,7
BC Cancer Agency Joint Animal Facility	1	0,7
Dukey University	1	0,7
Simosen Laboratorios	1	0,7
National Taiwan University Animal Center	1	0,7
MDS Panlabs	1	0,7
Dr WJ Muller (McGill University)	1	0,7
NxGen Biosciences Inc.	1	0,7
BRL- Fullinsdorf	1	0,7
Paterson Institute from Cancer Research	1	0,7
TOTAL	152	100,0

De acuerdo al sexo de los animales (Tabla N° 4), un total de 143 estudios (94,7 %) señalaron utilizar hembras, 4 estudios no presentaban información al respecto y 4 estudios realizaban sus investigaciones utilizando ratones machos. De los 143 estudios que utilizaban hembras sólo 23 señalaban el estado reproductivo de éstas (16 ovariectomizadas y 7 vírgenes).

Tabla N° 4. Sexo de los animales utilizados.

Sexo	N°	%
Machos	4	2,6
Sin información	4	2,6
Hembras	143	94,7
Total	151	100

En cuanto a la edad de los animales utilizados (Tabla N° 5), 54 animales (36,2 %) utilizados en los estudios se encuentran entre la edad de 3 y 6 semanas. Por otro lado, 51 investigaciones (34,2 %) no entregan información acerca de la edad de los animales utilizados.

Tabla N° 5. Edad de los animales en estudio.

Edad	N°	%
3 - 6 semanas	54	36,2
6 - 8 semanas	27	18,1
> 8 semanas	17	11,4
Sin información	51	34,2
Total	149	100

De los estudios analizados, 139 investigaciones (93,3 %) no proporciona información acerca del peso de los animales utilizados (Tabla N° 6), por otro lado 7 estudios señalan que el peso de los animales varía entre 15 y 20 gramos y 3 investigaciones (2,0 %) utilizaron modelos murinos con pesos que fluctuaban entre 20 y 30 gramos.

Tabla N° 6. Peso de los animales en estudio.

Peso	N°	%
Sin información	139	93,3
15 - 20 gramos	7	4,7
20 - 30 gramos	3	2,0
Total	149	100

5.1.2.2. Periodo de aclimatación: 134 estudios (89,9 %) no entregan información sobre el periodo de aclimatación de los ratones utilizados (Tabla N° 7), y en general el periodo de aclimatación era alrededor de una semana.

Tabla N° 7. Periodo de aclimatación de los animales utilizados.

Aclimatación	N°	%
Sin información	134	89,9
< 1 semana	5	3,4
1 semana	9	6,0
> 1 semana	1	0,7
Total	149	100

5.1.2.3. Status Microbiológico: (Tabla N° 8) 35 estudios señalaron utilizar ratones libres de patógenos (23,5 % del total), y por otra parte 108 estudios (72,5 %) no entregan información al respecto.

Tabla N° 8. Status microbiológico de los animales utilizados.

Status microbiológico	N°	%
Sin información	108	72,5
Libre de patógenos	35	23,5
Condiciones asépticas	6	4,0
Total	149	100

5.1.3. Ambiente: En cuanto a las condiciones ambientales en las cuales los animales fueron mantenidos durante el periodo de estudio (Tabla N° 9), 31 estudios (20,8 %) señalaron haber utilizado un ambiente controlado, mientras que un estudio (0,7 %) utilizó sólo aire filtrado.

Tabla N° 9. Condiciones ambientales del estudio.

Cond. Ambientales	N°	%
Sin información	117	78,5
Ambiente controlado	31	20,8
Aire filtrado	1	0,7
Total	149	100

5.1.3.1. Alojamiento: (Tabla N° 10), 10 artículos (6,7 %) señalaron alojar de 3 a 6 ratones por jaula, mientras que 139 artículos (93,3 %) no proporcionan información al respecto.

Tabla N° 10. Número de animales por jaula.

N° animales/jaula	N°	%
Sin información	139	93,3
de 3 a 6	10	6,7
Total	149	100

133 estudios de un total de 149, no proporcionaron información acerca del tipo de alojamiento de los animales. 8 estudios (5,4 %) utilizaban jaulas micro aisladas (Tabla N° 11)

Tabla N° 11. Tipo de alojamiento.

Tipo alojamiento	N°	%
Sin información	133	89,3
Jaulas micro aisladas	8	5,4
Jaulas filter top	2	1,3
Jaula esterilizada	2	1,3
Jaulas rack ventiladas	1	0,7
Jaula individual de acero inoxidable	1	0,7
Jaulas APEC	1	0,7
Cajas plásticas	1	0,7
Total	149	100,0

5.1.3.2. Dieta. En cuanto al tipo de alimento utilizado (Tabla N° 12), la dieta AIN-93 y la dieta AIN-76A son las más utilizadas, con 7 y 6 estudios respectivamente. Por otro lado, cabe mencionar que 114 estudios de un total de 149 (76,5 %), no proporcionaban información al respecto.

Tabla N° 12. Tipo de dieta utilizada en los animales en estudio.

Dieta (tipo)	N°	%
Sin información	114	76,5
AIN-93	7	4,7
AIN-76	6	4,0
Esterilizada	3	2,0
Alimento irradiado	3	2,0
Autoclavaza	3	2,0
Purina Mouse chow	3	2,0
Basada en isoflavonas	2	1,3
Standard 1320 y 1431	1	0,7
Rodent 5010	1	0,7
Standard 5001	1	0,7
En estudio	1	0,7
Balanceada	1	0,7
Standard lab (Harlan)	1	0,7
Deficiente Vitamina D	1	0,7
Tekland LM-486	1	0,7
Total	149	100

Y en cuanto a la cantidad de alimento suministrado, en 27 estudios (18,1 %) se señaló que los animales tenían acceso al alimento *ad libitum*, mientras que los 122 estudios restantes (81,9 % del total) no poseían información al respecto (Tabla N° 13).

Tabla N° 13. Cantidad de alimento suministrado a los ratones en estudio.

Dieta (cantidad)	N°	%
Sin información	122	81,9
Ad libitum	27	18,1
Total	149	100

5.1.3.3. Agua. 138 estudios (92,6 %) no contaban con información respecto al agua de bebida suministrada a los animales durante el periodo en estudio, mientras que 5 estudios (3,4 %) utilizaron agua esterilizada (Tabla N° 14).

Tabla N° 14. Tipo de agua suministrada a los animales en estudio.

Agua	N°	%
Sin información	138	92,6
Esterilizada	5	3,4
Acidificada (pH 4)	2	1,3
Acidificada (pH 2,5 - 3,0)	1	0,7
Filtrada	1	0,7
Autoclavada	1	0,7
Destilada esterilizada	1	0,7
Total	149	100

En cuanto a la cantidad de agua suministrada (Tabla N° 15), 116 estudios (77,9 %) no proporcionaban información al respecto, mientras que en 33 estudios (22,1 %) los animales tenían libre acceso al agua (*Ad libitum*).

Tabla N° 15. Cantidad de agua suministrada a los animales en estudio.

Agua (cantidad)	N°	%
Sin información	116	77,9
Ad libitum	33	22,1
Total	149	100

5.1.4. Líneas celulares:

Las dos líneas celulares más frecuentemente utilizadas corresponden a la MCF-7 y sus derivados y la MDA-MB-435 y sus derivados (Tabla N° 16), constituyendo ambas un 33,7 % del total de líneas inoculadas. La vía de inoculación predilecta para la línea celular MCF-7 fue la subcutánea, utilizada en 22 de las 41 investigaciones, por otro lado la vía predilecta para

inoculación de la línea celular MDA-MB-435 fue el panículo adiposo mamario, utilizada en 11 de 20 investigaciones.

En cuanto a las vías de inoculación más utilizadas, en todas las líneas celulares, se encuentra la vía subcutánea con 87 investigaciones (48,1 %) y en segundo lugar la inoculación a través del panículo adiposo mamario con 30 investigaciones (16,6 %).

Por otro lado, 30 investigaciones (17,1 %), no proporcionan información acerca de la línea celular utilizada para inducir tumores en los modelos murinos y 58 investigaciones (32 %) no entregan información de la vía de inoculación utilizada.

Tabla N° 16. Líneas celulares y vías de inoculación utilizadas para inducir cáncer mamario en los modelos murinos.

Línea celular	SI	SC	MFP	IC	EV	Total
MCF-7 y derivados	11	22	8			41
Sin información	30	1				31
MDA-MB-435 y derivados	2	4	11	2	1	20
MDA-MB-231 y derivados	3	10	3		1	17
MX-1	1	5				6
4T1	1	4				5
MDA-MB-468	2	3				5
TUBO		5				5
3366 y derivados		4				4
DA-3	2	1				3
B16F10		1			1	2
MGC80-3	1	1				2
4134		2				2
4586		2				2
C4-HD		2				2
66.3			1		1	2
A2L2	1					1
ZR-75-30	1					1
EMT6		1				1
EF43.fgf.4		1				1
TSU		1				1
LCC6	1					1
MIN-O			1			1
HBL-100		1				1
SUM149			1			1
SK-BR-3		1				1
MT909		1				1
MCF-10		1				1

BT-474		1				1
JYGMCA(A)		1				1
4296		1				1
4151		1				1
4898		1				1
4000		1				1
KPL-4			1			1
HC11-NeuT	1					1
NT-2		1				1
LTLT Ca		1				1
MPHAS			1			1
MD22			1			1
MVB9			1			1
CDDP-54			1			1
59-2-HI		1				1
32-2-HI		1				1
C7-2-HI		1				1
CC4-HI		1				1
66cl-4-GFP	1					1
MT-1		1				1
TOTAL	58	87	30	2	4	181
%	32,0	48,1	16,6	1,1	2,2	100

* *SI = Sin información.*

SC = Subcutánea.

MFP = Pániculo adiposo mamario.

IC = Intracardiaca.

EV = Endovenosa.

5.1.5. Tratamientos Utilizados:

66 tratamientos de un total de 277 (23,9 %) utilizaban quimioterapia, constituyendo el tratamiento más utilizado (Tabla N° 17). 51 tratamientos correspondieron a terapia hormonal (18,41 %). El término “otros” hace referencia a aquellos agentes y/o fármacos que no clasificaban en ninguna de las otras categorías.

El detalle de agentes utilizados y sus categorías se encuentran en el Anexo N° 2.

Tabla N° 17. Clasificación de los tratamientos utilizados según tipo.

Tipo	N°	%
Quimioterapia	66	23,83
Otros	51	18,41
Hormonales	49	17,69
Inhibidores Específicos	41	14,80
Nutricionales	38	13,72
Anticuerpos Monoclonales	12	4,33
Vacunas	8	2,89
Inmunosupresores	8	2,89
Terapia Modificadora de la Respuesta Biológica	4	1,44
Total	277	100

5.2. METAANÁLISIS CUANTITATIVO

5.2.1. Eficacia del tratamiento para cáncer mamario en la reducción de la superficie tumoral

Los resultados de las pruebas de heterogeneidad, sesgo de publicación y análisis de sensibilidad se muestran en el Anexo N° 3.

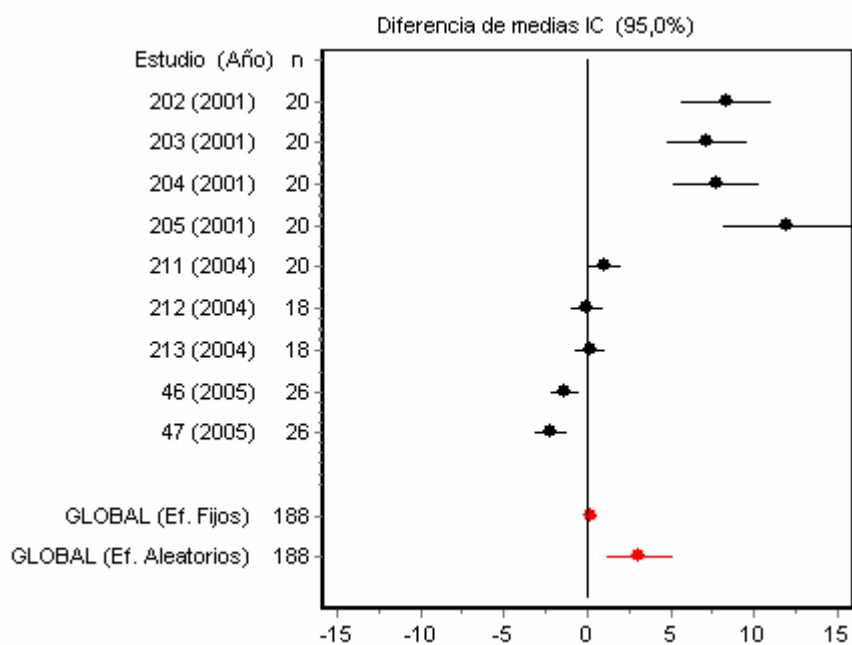


Figura 1. Diferencia estandarizada de medias de la reducción de la superficie tumoral (mm²).

Se analizaron 9 estudios, dentro de los cuales, 2 (22 %), resultaron ser eficientes en la reducción de la superficie tumoral, mientras que 4 de los estudios presentaron mayor superficie tumoral en los ratones tratados que en los ratones controles. Por otro lado, 3 de los estudios presentan un resultado compatible con la hipótesis nula de que no existe diferencia entre los ratones tratados y los controles. En el análisis combinado, la diferencia estandarizada de medias no proporciona un efecto significativo de la reducción de la superficie tumoral postratamiento ($d = 3,15$; intervalo de confianza (IC) del 95 % de 1,17 a 5,12) que sugiere que no existe efecto en la disminución de la superficie tumoral. Los estudios con mayor influencia en el metaanálisis fueron el 205 y el 47, donde la eliminación del primero de ellos produce un incremento del efecto del 28,2 % ($d = 2,26$; IC del 95 % de 0,396 a 4,12), mientras que la eliminación del estudio 47, produce una disminución del efecto de un 23,75 % ($d = 3,89$; IC del 95 % de 1,746 a 6,039).

La Tabla N° 18 presenta las diferencias estandarizadas de medias (d), junto con los intervalos de confianza para cada estudio. En este análisis se encuentran 7 estudios con tratamiento nutricional, 1 con quimioterapia y una combinación de quimioterapia más otro agente. Los dos estudios que producen una reducción significativa de la superficie tumoral en los animales tratados versus los controles fueron el 46 y 47, en el primero de los cuales se utilizó epirubicina (agente quimioterapéutico), y en el segundo se utilizó este mismo agente más valorfin, el cual muestra una mayor reducción de la superficie tumoral que la administración de epirubicina sola.

Tabla N° 18. Resultados individuales del tratamiento de ratones en la reducción de la superficie tumoral.

Estudio	Autor	N	Tratamiento	d	IC	
202	Ju YH	20	Genisteína (125 µg/kg)	8,33	5,6	11
203	Ju YH	20	Genisteína (250 µg/kg)	7,16	4,78	9,55
204	Ju Yh	20	Genisteína (500 µg/kg)	7,73	5,18	10,28
205	Ju YH	20	Genisteína (1000 µg/kg)	11,99	8,17	15,81
211	Ju YH	20	b-sitosterol (9,8g/kg dieta)	1,1	0,16	2,04
212	Ju YH	18	b-sitosterol glucósido (0,2g/kg dieta)	0	-0,92	0,92
213	Ju YH	18	BS + BSG (1g/kg dieta)	0,18	-0,74	1,1
46	Blishchenko EY	26	Epirubicina (25 mg/m ²)	-2,15	-3,12	-1,18
47	Blishchenko EY	26	Epirubicina + Valorfin	-1,3	-2,15	-45
Efecto Fijo				0,27	-0,13	0,66
Efecto Aleatorio				3,15	1,17	5,12

5.2.2. Eficiencia del tratamiento de ratones con cáncer mamario en la reducción del peso tumoral.

Los resultados de las pruebas de heterogeneidad, sesgo de publicación y análisis de sensibilidad se muestran en el Anexo N° 4.

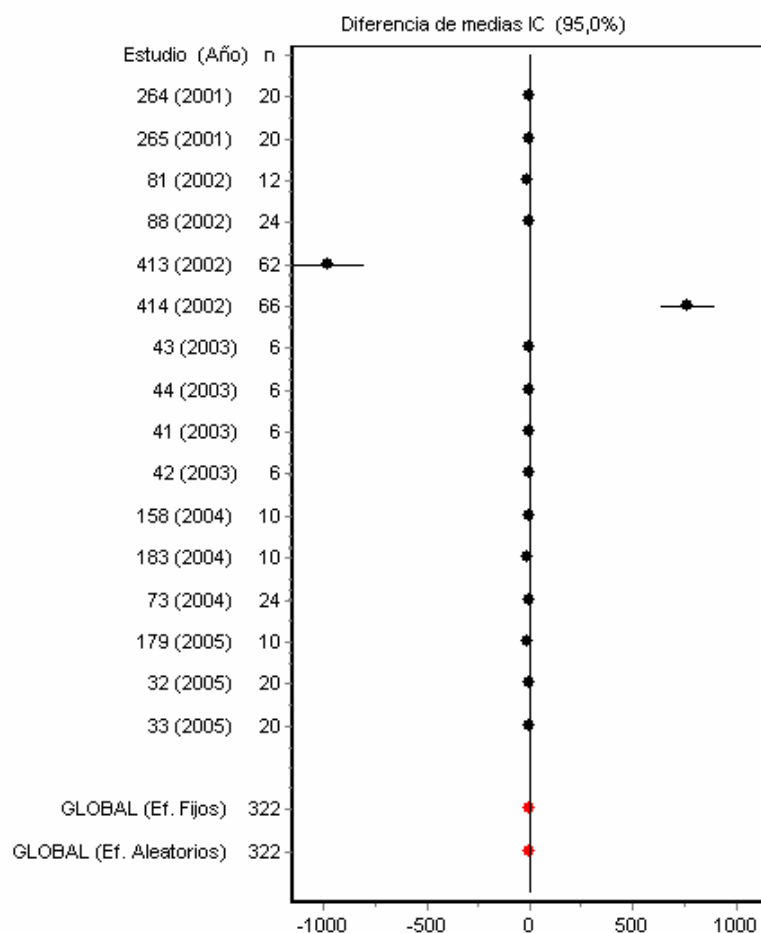


Figura 2. Diferencia estandarizada de medias de la reducción del peso tumoral (miligramos).

Se analizaron 16 estudios, de los cuales, 14 no presentan una diferencia estadísticamente significativa de reducción de peso tumoral en los ratones tratados versus los controles, mientras que 1 estudio tiene un efecto significativo de reducción de peso tumoral en los animales tratados y 1 estudio presenta una disminución de peso tumoral significativa en ratones controles. La diferencia estandarizada de medias demuestra que existe una leve reducción del peso tumoral en los ratones postratamiento ($d = -3,18$; IC del 95 % de $-5,17$ a $-1,19$). Los estudios con mayor influencia en el metaanálisis resultaron ser el 73 y el 179. La eliminación del 73 resultó en un incremento del efecto del 8,39 % ($d = -3,44$; IC del 95 % de -

5,68 a -1,20), Mientras que la eliminación del 179 produjo una disminución del efecto de un 10,3 % (d = -2,85; IC del 95 % de -4,89 a -0,82).

En la Tabla N° 19, se presentan las diferencias estandarizadas de medias y sus intervalos de confianza para todos los estudios analizados, además del tratamiento utilizado en cada estudio; donde se puede apreciar que 7 de los estudios corresponden a tratamientos nutricionales, 5 a tratamiento hormonal, 2 a vacunas y 2 a otros tratamientos. El estudio que presenta una reducción significativa del peso tumoral en los animales tratados corresponde a un estudio nutricional de restricción dietaria intermitente, y por otro lado, la restricción dietaria crónica presentó un aumento estadísticamente significativo del peso tumoral en los animales tratados.

Tabla N° 19. Resultados individuales del tratamiento de ratones en la disminución del peso tumoral (mg).

Estudio	Autor	N	Tratamiento	D	IC	
264	Lachman L	20	Elvis neu (100 µg)	-3,5	-4,9	-2,1
265	Lachman L	20	Elvis neu (100 µg)	-3,7	-5,1	-2,3
81	Chang WH	12	FSP (10 mg/ml)	-5,8	-8,4	-3,2
88	Chen J	24	Flaxseed (10 %)	-1,2	-2,1	-0,3
413	Pape-Ansorage K	62	Rest dietaria intermitente	-976,3	-1148,1	-804,4
414	Pape-Ansorage K	66	Rest dietaria crónica	764,8	634,4	895,3
43	Beck MT	6	Endostatina (2,5 mg/kg)	-2,6	-4,8	-0,4
44	Beck MT	6	G129R + endostatina (2,5 mg/kg)	-2,6	-4,7	-0,4
41	Beck MT	6	G129R (2,5 mg/kg)	-1,6	-3,5	0,2
42	Beck MT	6	G129R-endostatina (5 mg/kg)	-3,7	-6,4	-1,1
158	Hashiguchi N	10	TZT-1027 (1 mg/kg)	-1,3	-2,7	0,0
183	Jelovac D	10	Letrozole (10µ/d)	-7,4	-10,9	-3,9
73	Cai H	24	Tricina (0,2 %)	-0,1	-0,9	0,7
179	Jelovac D	10	Letrozole + Fulvestrant	-8,3	-12,1	-4,5
32	Baliga M	20	Té verde (0,2 %)	-3,7	-5,1	-2,2
33	Baliga M	20	Té verde (0,5 %)	-1,7	-2,7	-0,6
Efecto Fijo				-1,9	-2,3	-1,5
Efecto Aleatorio				-3,2	-5,2	-1,2

5.2.3. Eficiencia del tratamiento de ratones con cáncer mamario en la disminución del volumen tumoral (mm³)

Los resultados de las pruebas de heterogeneidad, sesgo de publicación y análisis de sensibilidad se muestran en el Anexo N° 5.

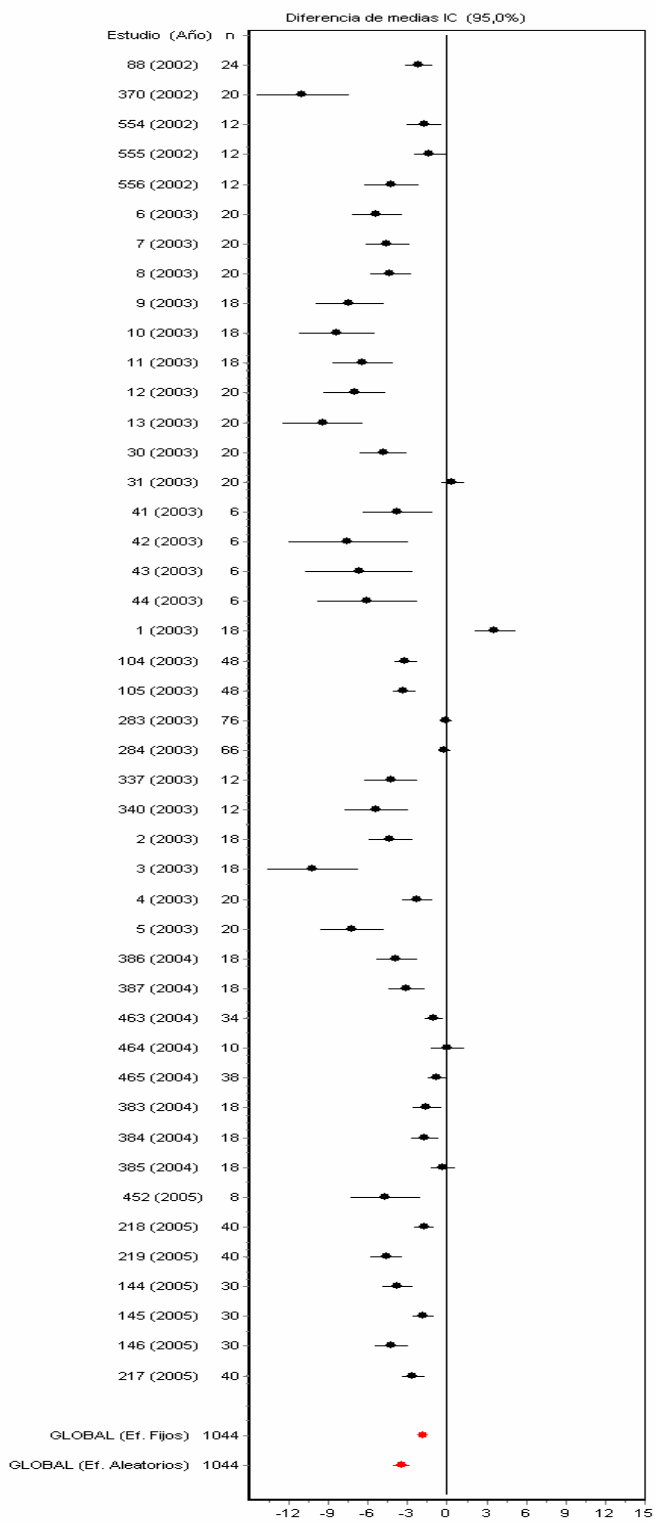


Figura 3. Diferencia estandarizada de medias de la disminución del volumen tumoral (mm³).

El 86 % (39 de los 45 estudios analizados) muestran una reducción estadísticamente significativa del volumen tumoral en los animales tratados versus los controles, 2 estudios mostraron no tener efecto sobre la reducción del volumen mientras que 4 estudios concuerdan con la hipótesis nula de que no existe diferencia entre el volumen tumoral de los animales tratados versus los controles. La diferencia estandarizada de la media demuestra que existe una disminución del volumen tumoral en los ratones postratamiento ($d = -3,40$; IC del 95 % de -4,03 a -2,76). Por otro lado, los estudios que resultaron ser más influyentes en el análisis fueron el 370 y el 1, ambos influyendo levemente. La eliminación del primero produjo una disminución del efecto del 3,75 % ($d = -3,27$; IC del 95 % de -3,89 a -2,64), mientras que la eliminación del estudio número 1 en este análisis produjo un aumento del efecto de 4,22 % ($d = -3,54$; IC del 95 % de -4,16 a -2,92).

En la Tabla N° 20 se muestran las diferencias estandarizadas de medias para cada estudio junto con sus respectivos intervalos de confianza, además se presentan en detalle los tratamientos utilizados; donde se puede observar que los tratamientos que resultaron ser más efectivos en la reducción del volumen tumoral fueron pectina cítrica modificada (nutricional), docetaxel (quimioterapéutico), y las combinaciones entre el inhibidor específico SU11248 y los agentes quimioterapéuticos docetaxel y doxorubicina.

Tabla N° 20. Resultados individuales del tratamiento de ratones en la disminución del volumen (mm³).

Estudio	Autor	n	Tratamiento	d	IC	
88	Chen J	24	Flaxseed (10 %)	-2,1	-3,2	-1,1
370	Nangia-Makker P	20	Pectina cítrica modificada (1%)	-10,9	-14,4	-7,4
554	Zhang G	12	G129R-IL2 (100 µg/ratón)	-1,7	-3,0	-0,4
555	Zhang G	12	G129R (200 µg/ratón)	-1,3	-2,5	0,0
556	Zhang G	12	G129R-IL2 (100 µg/ratón)	-4,2	-6,2	-2,2
6	Abrams TJ	20	Doxorubicina (4 mg/kg)	-5,3	-7,2	-3,4
7	Abrams TJ	20	SU11248 (40 mg/kg)	-4,5	-6,2	-2,9
8	Abrams TJ	20	5-FU (100 mg/kg)	-4,3	-5,8	-2,7
9	Abrams TJ	18	SU11248 + Docetaxel (5 mg/kg)	-7,4	-10,0	-4,8
10	Abrams TJ	18	SU11248 + Docetaxel (10mg/kg)	-8,3	-11,2	-5,5
11	Abrams TJ	18	SU11248 + Docetaxel (15 mg/kg)	-6,4	-8,7	-4,1
12	Abrams TJ	20	SU11248 + 5 - FU (100 mg/kg)	-7,0	-9,3	-4,6
13	Abrams TJ	20	SU11248+Doxorubicina(4mg/kg)	-9,4	-12,5	-6,4
30	Bajo A	20	AN-152 (3 mg/kg)	-4,8	-6,6	-3,1
31	Bajo A	20	Doxorubicina (3 mg/kg)	0,4	-0,4	1,3
41	Beck MT	6	G129R (2,5 mg/kg)	-3,7	-6,4	-1,1
42	Beck MT	6	G129R - Endostatina(5 mg/kg)	-7,5	-12,0	-3,0

43	Beck MT	6	Endostatina (2,5 mg/kg)	-6,6	-10,7	-2,6
44	Beck MT	6	G129R + Endostatina (2,5 mg/kg)	-6,1	-9,9	-2,3
1	Abrams TJ	18	Docetaxel (5 mg/kg)	3,7	2,1	5,2
104	Detre S	48	E2 + Tamoxifeno (20 mg/kg)	-3,1	-4,0	-2,3
105	Detre S	48	E2 + Arzoxifeno (20 mg/kg)	-3,2	-4,1	-2,4
283	Lanza-Jacoby S	76	Celecoxib (900 ppm)	0,0	-0,5	0,4
284	Lanza-Jacoby S	66	SC-560 (64 ppm)	-0,2	-0,6	0,3
337	Lopes de Menezes	12	Doxorubicina (5 mg/kg)	-4,2	-6,2	-2,2
340	Lopes de Menezes	12	Doxorubicina + PSC833(5mg/kg)	-5,3	-7,8	-2,9
2	Abrams TJ	18	Docetaxel (10 mg/kg)	-4,3	-6,0	-2,6
3	Abrams TJ	18	Docetaxel (15 mg/kg)	-10,2	-13,7	-6,7
4	Abrams TJ	20	SU11248 (40 mg/kg)	-2,2	-3,3	-1,1
5	Abrams TJ	20	SU11248 (40 mg/kg)	-7,2	-9,6	-4,8
386	Nukatsuka M	18	Paclitaxel + S-1	-3,8	-5,3	-2,2
387	Nukatsuka M	18	Paclitaxel + Capecitabine	-3,0	-4,4	-1,7
463	Song S	34	Paclitaxel	-1,0	-1,7	-0,3
464	Song S	10	Suramin	0,0	-1,2	1,3
465	Song S	38	Paclitaxel + Suramin	-0,8	-1,4	-0,1
383	Nukatsuka M	18	Paclitaxel (50 mg/kg)	-1,5	-2,5	-0,5
384	Nukatsuka M	18	S-1 (8,3 mg/kg)	-1,7	-2,7	-0,6
385	Nukatsuka M	18	Capecitabine (360 mg/kg)	-0,3	-1,2	0,6
452	Sartippour M	8	Rabsodia rubescens (60 mg/kg)	-4,6	-7,3	-2,0
218	Kasukabe T	40	Cotilenin -A (100µg/ratón)	-1,7	-2,4	-1,0
219	Kasukabe T	40	Rapamicina + Cotilen -A	-4,6	-5,7	-3,4
144	Friess T	30	Erlotinib (50 mg/kg)	-3,7	-4,9	-2,5
145	Friess T	30	Pertuzumab (12 mg/kg)	-1,8	-2,6	-0,9
146	Friess T	30	Erlotinib + Pertuzumab (6 mg/kg)	-4,2	-5,5	-2,9
217	Kasukabe T	40	Rapamicina (0,1µg/ratón)	-2,5	-3,4	-1,7
Efecto Fijo				-1,7	-1,9	-1,6
Efecto Aleatorio				-3,4	-4,0	-2,8

5.2.4. Análisis de regresión

5.2.4.1. Análisis regresión peso postratamiento

Se realizó un análisis de regresión, donde la variable dependiente (Y) fue el peso postratamiento y las variables independientes (X), fueron todos los datos tabulados para el metaanálisis, mostrándose sólo las variables independientes de interés (línea celular, cepa de ratón , tipo tratamiento).

Se evaluaron 16 investigaciones por ser las únicas que contaban con todos los datos para ser tabulados.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla N° 21), para la línea celular se observan diferencias significativas en todas las líneas celulares respecto al nivel dejado fuera, que en este caso fue la línea 4T1. Para las cepas de ratones se observaron diferencias significativas en las cepas Balb/c e ICR Scid respecto al nivel dejado fuera (ratones atímicos desnudos). Y en cuanto a los tratamientos utilizados, se observan diferencias estadísticamente significativas sólo con el tratamiento nutricional con respecto al nivel dejado fuera que en este caso fue el tipo de tratamiento “otros”.

Tabla N° 21. Análisis de regresión entre el peso tumoral postratamiento y las líneas celulares, cepas de ratones y tipo de tratamiento.

Variables		Coef.	Error	z	P>z	95% intervalo confianza	
Línea celular	A2L2	-1398,951	1,087	-1287.55	0,000	-1401,080	-1396,821
	MB 435	2509,028	2,900	865.19	0,000	2503,344	2514,712
	MB 468	2505,018	3,024	828.49	0,000	2499,092	2510,944
	MCF-7	-400,626	0,600	-667.28	0,000	-401,803	-399,449
Cepa ratón	Balb/c	2907,367	3,141	925.68	0,000	2901,211	2913,522
	Balb/c atimicos n u/n u	0,076	0,528	0.14	0,886	-0,959	1,110
	ICR scid	4104,282	4,238	968.53	0,000	4095,976	4112,587
Tipo tratamiento	Hormonal	-0,118	0,193	-0.61	0,542	-0,497	0,261
	Nutricional	-4303,976	4,280	-1005.53	0,000	-4312,365	-4295,586

5.2.4.2. Análisis de regresión volumen tumoral absoluto

Con el fin de determinar la relación entre la reducción del volumen tumoral y las distintas variables se analizaron 24 investigaciones, ya que sólo estas contaban con toda la información para ser tabuladas, y las variables independientes (X), fueron todos los datos tabulados para el metaanálisis, mostrándose sólo las variables independientes de interés (línea celular, cepa de ratón , tipo tratamiento).

En el caso de la reducción absoluta la variable dependiente (Y) está dada por la diferencia entre el volumen postratamiento y el volumen inicial (volumen con el cual se comenzó el experimento), donde de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla N° 22), no hay ningún dato estadísticamente significativo.

Tabla N° 22. Análisis de regresión entre la reducción absoluta del volumen tumoral y las líneas celulares, cepas de ratones y tipo de tratamiento.

Variables		Coef.	Error	z	P>z	95% intervalo confianza	
Línea celular	MB 435 D	-44,49	3070,45	-0,01	0,99	-6062,47	5973,49
	MCF-7	-5155,19	5071,72	-1,02	0,31	-15095,58	4785,19
	MX-1	1744,81	2976,54	0,59	0,56	-4089,10	7578,72
Cepa ratón	NCR nu/nu	1401,28	5677,10	0,25	0,81	-9725,63	12528,18
	SCID	-602,26	771,64	-0,78	0,44	-2114,65	910,12
Tipo tratamiento	Anticuerpo monoclonal	-64,17	291,23	-0,22	0,83	-634,96	506,62
	Hormona	1960,97	1030,33	1,9	0,06	-58,44	3980,38
	Inh. Específico	-30,51	162,35	-0,19	0,85	-348,71	287,68
	Inmunosupresor	-352,49	377,27	-0,93	0,35	-1091,92	386,94
	Otro	-509,83	428,89	-1,19	0,24	-1350,45	330,78

5.2.4.3. Análisis de regresión volumen tumoral relativo.

Del mismo modo se evaluó la relación entre la reducción relativa del volumen tumoral, con una muestra constituida por 24 investigaciones, utilizando las mismas variables independientes que para el volumen absoluto y sus respectivos puntos de comparación. Para este caso la variable dependiente (Y) fue la reducción del volumen tumoral relativo; $(V_{pt} - V_i) / (V_c - V_i)$, donde V_{pt} corresponde al volumen postratamiento, V_i es el volumen inicial (volumen con el cual se comenzó el experimento) y V_c es el volumen de los controles.

La Tabla N° 23 muestra que dentro de las líneas celulares analizadas MCF-7 tiene diferencias estadísticamente significativas con el nivel dejado fuera (KPL 4). Y en las cepas de ratones la cepa Scid beige comparado con el nivel dejado fuera (atímicos desnudos), muestra diferencias estadísticamente significativas. En el caso de los tipos de tratamiento, utilizando la quimioterapia como nivel excluido, el tratamiento hormonal y los anticuerpos monoclonales mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla N° 23. Análisis de regresión entre la reducción relativa del volumen tumoral y las líneas celulares, cepas de ratones y tipo de tratamiento.

Variables		Coef.	Error	z	P>z	95% IC	
Línea celular	MCF-7	-2,01	0,21	-9,71	0,00	-2,41	-1,60
	Cepa ratón	SCID beige	1,18	0,08	15,56	0,00	1,03
Tipo tratamiento	Anticuerpo monoclonal	0,22	0,06	3,78	0,00	0,10	0,33
	Hormonal	2,48	0,10	23,71	0,00	2,28	2,69
	Inh específico	-0,02	0,03	-0,72	0,47	-0,07	0,03

6. DISCUSIÓN

El metaanálisis es un proceso de combinación de resultados de estudios para extraer conclusiones o planificar investigaciones ulteriores (L'Abbé y col 1994). En este caso, dada la gran cantidad de publicaciones existentes, con respecto a la terapéutica del cáncer mamario, considerando un periodo entre los años 2001 – 2005, se determinó que la mejor herramienta para evaluar la eficiencia de los tratamientos e influencia de las cepas de ratón usadas como modelo animal, es el metaanálisis.

El cáncer de mama se considera uno de los cánceres más importantes, dentro de los 10 con mayor prevalencia en las mujeres, en todo el mundo, y a pesar del creciente aumento en la detección de la patología, ésta sigue siendo un grave problema de salud pública debido a su complejidad y a la enorme cantidad de factores de riesgo involucrados en la iniciación y progresión de la enfermedad, por lo cual se siguen investigando distintas estrategias de tratamiento, las cuales son previamente evaluadas en modelos animales.

6.1. METAANÁLISIS CUALITATIVO

6.1.1. Análisis de publicaciones

Por lo anteriormente señalado, en este trabajo, se analizaron artículos de revistas en que se investigara el tratamiento del cáncer de mama humano en ratones; donde del total de investigaciones analizadas, el 41% fueron obtenidas de las revistas *Clinical Cancer Research* y *Cancer Research* (Tabla N° 1), las cuales poseían un factor de impacto para el año 2005 de 5,715 y 7,616 respectivamente, siendo ambas revistas publicadas en Estados Unidos. Cabe mencionar, que el ranking de factor de impacto de las revistas analizadas va de 15,571 para *Journal of the National Cancer Institute* (Estados Unidos) hasta 1,572 para *Oncology Report*, publicada en Grecia.

6.1.2. Modelos murinos para tratamiento de cáncer de mama

Los modelos animales son usados para probar la efectividad de una droga o procedimiento *in vivo* antes de iniciar ensayos clínicos en humanos. El ratón (*Mus musculus*) constituye el modelo animal más ampliamente utilizado para la investigación de cáncer mamario, dadas las características de la especie que lo hacen un modelo predilecto para la investigación de esta patología. Según Cardiff (2001), para validar el modelo animal utilizado, es necesario establecer características similares al cáncer de mama humano a través de varios parámetros que incluyen la histopatología, la historia natural de la progresión de la enfermedad, alteraciones genómicas, sensibilidad a hormonas, y metástasis. Esto concuerda con lo señalado por otros autores como Kavanaugh y col (2002), Fargiano y col (2003).

Los ratones manipulados genéticamente (GEM) constituyen el genotipo más utilizado para estudiar el cáncer de mama (Tabla N° 2), esto como señala Blackshear (2001), puede

deberse a que los modelos animales con carcinogénesis mamaria espontánea o inducida químicamente no imitan completamente la patología producida en el humano, por lo que se han debido crear modelos manipulados genéticamente basados en las alteraciones genéticas encontradas en tumores mamarios humanos. En cuanto, al fenotipo de los ratones utilizados (Tabla N° 2), las mayores frecuencias fueron obtenidas para la cepa de ratón atímico desnudo, los cuales poseen una mutación espontánea simple, denominada *nude* (*nu*). Este alelo mutante apareció por primera vez en el año 1966 en una colonia exocriada de ratones en un laboratorio en Glasgow, Escocia. Dos años más tarde, se descubre que el ratón *nude* homocigoto, además de presentar su fenotipo sin pelo, carecía de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos alo y xenotransplantados (Carbone y Maschi 2006). El segundo fenotipo más frecuentemente usado es el de los ratones atímicos desnudos con fondo genético Balb/c.

Generalmente el cáncer mamario es asociado a mujeres, sin embargo, la enfermedad también se presenta en hombres, aunque escasamente, por lo cual la mayoría de los aspectos que se conocen acerca de la enfermedad en varones han sido extrapolados de las mujeres (Ford y col 2004, Fentiman y col 2006). Debido a lo anteriormente señalado, no es extraño que dentro de los animales utilizados para la investigación de cáncer mamario también se incluyan, en un bajo porcentaje, ratones machos (Tabla N° 4).

6.1.3. Manejo de los animales utilizados para investigación de cáncer de mama

La información sobre manejo animal en una investigación científica, es sumamente importante para obtener de los experimentos datos confiables y resultados repetibles que puedan ser extrapolados a la población humana. Un ejemplo concreto sobre la importancia del manejo animal es el de los ratones desnudos, que son los más utilizados en la investigación de cáncer de mama, estos ratones son altamente susceptibles a enfermedades infecciosas (Sharkey y Fogh 1984), por ser inmunodeficientes, debido a esto deberían permanecer obligatoriamente en ambientes en los que se hayan instalado barreras sanitarias estrictas. La categoría microbiológica de los ratones desnudos debe ser la de animales SPF (Carbone y Maschi 2006), de lo contrario los resultados de las investigaciones pueden ser afectadas negativamente (Sharkey y Fogh 1984). Sin embargo, en muchas investigaciones es escasa la información referente al manejo de los animales utilizados, lo que queda demostrado con las Tablas N° 7 a la N° 15. Esto puede deberse a que se basan en normativas nacionales existentes para el uso de animales de laboratorio, o en la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio publicada por el National Research Council en 1996.

6.1.4. Líneas celulares humanas para inducción de cáncer mamario en ratones

La forma más utilizada, actualmente, de producir modelos de cáncer mamario es el xenoinjerto, en la cual células tumorales mamarias humanas son inyectadas en ratones. Existen cerca de 50 – 70 líneas celulares de cáncer mamario que han sido descritas en publicaciones pero sólo 20 han sido adecuadamente caracterizadas y ampliamente utilizadas (Gazdar y col 1998). En este estudio, la línea celular más utilizada para la investigación de cáncer mamario resultó ser la MCF-7 (Tabla N° 16). Esta línea celular fue obtenida en el Michigan Cancer Foundation (de donde proviene su nombre), en 1973, de una efusión pleural (Burdall y col 2003). La MCF-7 corresponde a un carcinoma ductal invasivo con receptores positivos de

estrógeno y progesterona (Lacroix y Leclercq 2004). Otras dos líneas celulares con alta frecuencia de utilización corresponden a la MDA-MB-435 y MDA-MB-231, ambas corresponden a un carcinoma ductal invasivo, y fueron obtenidas de una efusión pleural y poseen receptores negativos para estrógeno y progesterona (Lacroix y Leclercq 2004).

El sitio de implantación de las células tumorales para inducción de cáncer mamario en ratones es una variable importante, y como se muestra en la Tabla N° 16 los sitios con mayores frecuencias de utilización resultaron ser en primer lugar la vía subcutánea y en segundo lugar el panículo adiposo mamario (MFP). Esto concuerda con Kelland (2004), quien señala que muchos experimentos utilizan la implantación subcutánea (donde es más fácil medir los efectos antitumorales mediante la utilización de un calipers para determinar el diámetro/volumen tumoral), sin embargo Clarke (1996) y Lacroix y Leclercq (2004) señalan que el sitio más apropiado para la implantación es el panículo adiposo mamario, fundamentalmente debido a que la transplatación ortotópica puede aumentar la tasa de muchos tumores, y ocasionalmente facilitar la carga metastásica que podría no ocurrir desde una transplatación subcutánea .

6.1.5. Tratamientos utilizados para cáncer de mama

Según señala Gould (1995), los modelos murinos son importantes para desarrollar y evaluar estrategias para el tratamiento y la prevención del cáncer prevalente. Para lo cual existe un amplio rango de agentes citostáticos y hormonales, radioterapia, cirugía, entre otros, sin embargo la selección de la modalidad de terapia adyuvante es dependiente de las características biológicas tumorales combinado con la edad del paciente, la condición general y la preferencia del médico tratante (Bergh y col 2001).

6.2. METAANÁLISIS CUANTITATIVO

En este trabajo, se evaluó la eficacia de los tratamientos utilizados en ratones inoculados con líneas celulares de cáncer mamario humano en la reducción de la superficie, peso y volumen tumoral. Además de evaluar si los resultados obtenidos en dichos estudios tienen relación con la línea celular o ratón utilizado en cada investigación.

6.2.1. Eficacia del tratamiento para cáncer mamario en la reducción de la superficie tumoral

Se analizó la información obtenida de 9 investigaciones sobre la reducción de la superficie de tumores mamaros en ratones inoculados con líneas de cáncer mamario humano.

De las investigaciones analizadas, cuatro correspondían a ratones tratados con genisteína, un fitoestrógeno con estructura similar al estrógeno esterooidal y con la capacidad de comportarse como un estrógeno en varios tejidos (Bouker y Hilakivi-Clarke 2000). Genisteína fue administrado en distintas dosis (125; 250; 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{día}$ respectivamente). Autores como Kim y col (1998), señalan que la soya contiene grandes cantidades de las isoflavonas genisteína y daidzeína, y se ha reportado que estas isoflavonas se unen a los receptores de estrógeno α y β , y previenen el crecimiento de células de cáncer mamario

(Morito y col 2001). Setchell (1998), afirma que modelos clásicos de cáncer mamario inducido químicamente muestran que una dieta conteniendo proteína de soya redujo significativamente la formación de tumores y que estos efectos se perdieron cuando las isoflavonas fueron removidas de la proteína de soya. Sin embargo, en este caso, no se obtuvo reducción de la superficie tumoral con ninguna de las dosis utilizadas, mas aún su efecto fue menor a mayores dosis de genisteína, esto puede deberse como señala Hsieh y col (1998), que genisteína en bajas concentraciones (200nM), *in vitro*, estimula el crecimiento de cultivos de células de cáncer mamario (MCF-7) y aumenta la expresión del gen pS2 que responde a estrógenos. A la inversa, altas concentraciones de genisteína (sobre 200nM) inhiben el crecimiento de células de cáncer mamario humano dependientes de estrógeno *in vitro*, por lo que su efecto sería estrogénico o antiestrogénico dependiendo de la dosis administrada. Esto concuerda con lo reportado por Brzezinski y Debi en 1999.

Por otro lado, se analizaron 3 investigaciones, en las cuales los animales fueron tratados con beta sitosterol, beta sitosterol glucósido y una combinación de ambos. El beta sitosterol corresponde como señala Bradford y Awad (2007), a uno de los fitoesteroles más comunes en la dieta humana, junto con campesterol y stigmasterol. Los fitoesteroles son la contraparte del colesterol en productos animales (Awad y Fink 2000). Estas 3 investigaciones concordaron con la hipótesis nula de que no existe diferencia entre los animales tratados y los controles. Sin embargo, un estudio realizado por Awad y col en el 2000, reportó que ratones SCID cuya dieta fue suplementada con 2% de fitoesteroles, 2% colesterol y luego inyectada con MDA-MB-231 (línea celular de cáncer mamario humano), el tamaño tumoral en ratones alimentados con fitoesteroles fue 33% más pequeño que aquellos en animales alimentados con la dieta colesterol control, a las 8 semanas.

El tratamiento de tumores mamaros de ratones con epirubicina mostró una disminución en la superficie tumoral. Ormrod y col (1999), describen a epirubicina como un antibiótico antraciclina, 4'-epímero de doxorubicina (adriamicina®), Gluck (2002) señala que en dosis equimolares, regímenes basados en epirubicina han mostrado ser igualmente eficaces y menos tóxicos que regímenes basados en doxorubicina en ensayos clínico. Se piensa que su actividad resulta de la intercalación entre pares de bases de ADN y estabilización del complejo topoisomerasa II-ADN, llevando a un rompimiento irreversible de ADN. La citotoxicidad de epirubicina aumenta exponencialmente con la concentración de la droga y duración de la exposición en una variedad de líneas celulares *in vitro* (Ormrod y col 1999). Sin embargo la combinación de epirubicina con valorfín un fragmento de hemoglobina tipo opióide, con la capacidad de inducir citólisis de células tumorales (Blishchenko y col 1997), resultó ser el tratamiento más efectivo para reducir la superficie tumoral en dichos ratones.

6.2.2. Eficacia del tratamiento para cáncer mamario en la reducción del peso tumoral

Para evaluar la reducción del peso tumoral en ratones inoculados con células de cáncer mamario humano, se analizaron 16 investigaciones, de las cuales 14 no tuvieron resultados estadísticamente significativos entre los animales tratados y los controles (Figura N° 2). La restricción dietaria intermitente mostró la mayor reducción del peso tumoral en estos ratones. En 1975, Carroll ya había señalado que la restricción calórica inhibe la formación de tumores mamaros espontáneos en ratones, simplemente debido a la pérdida de energía disponible o

metabolitos requeridos para el proceso tumorigénico. Fernandes y col (1995), señalan que la restricción de alimento disminuye la incidencia de tumores espontáneos en roedores y reduce la incidencia de tumores mamarios en ratones C3H/Bi, C3H/He, and C3H/Ou. La inhibición de tumores mamarios espontáneos podría ser resultado de una producción disminuida de estrógeno y/o una disminución de la respuesta del tejido mamario a estrógeno (Carroll 1975). Más aún, varios estudios de protección contra carcinogénesis por restricción calórica han mostrado ser directamente proporcionales al grado de restricción calórica impuesta. Tales hallazgos han llevado a la hipótesis que los efectos de la restricción calórica no son específicos y están unidos a una limitación de energía disponible para el crecimiento de células tumorales (Zhu y col 1997). Willett (1995), señala que en estudios animales, un 20% de restricción en la ingesta de energía causan un 70% de reducción en la ocurrencia de tumores mamarios.

En respuesta a la restricción dietaria ocurren varios cambios fisiológicos, tales como cambios en las hormonas derivadas de la hipófisis y disminución en el crecimiento hormonal, insulina y factor de crecimiento insulínico tipo I. Se ha demostrado que los niveles séricos de IGF-I son significativamente reducidos en ratas tratadas con restricción dietaria concomitante con una disminución en la incidencia de cáncer. IGF-I es conocido por inhibir la apoptosis y también por estimular la proliferación (Dunn y col 1997).

Sin embargo, a toda la evidencia anteriormente señalada, los resultados obtenidos en el estudio de restricción dietaria crónica, muestran aumento del peso tumoral en los animales tratados versus los controles, lo que podría deberse a una adaptación y/o mutación de la célula cancerígena, la cual eventualmente podría adaptarse a un ambiente bajo en energía y continuar su proliferación.

Dentro de este análisis se encuentran 5 estudios (Flaxseed, G129R, endostatina, G129R + endostatina y una fusión de G129R con endostatina), los cuales no tuvieron efecto en la reducción del peso tumoral, sin embargo, al ser incluidos en el análisis de reducción de volumen tumoral mostraron reducción estadísticamente significativa comparada con los controles.

6.2.3. Eficacia del tratamiento para cáncer mamario en la reducción del volumen tumoral

Se analizaron 45 estudios para determinar los agentes más efectivos en la reducción del volumen tumoral (Figura N° 3). La mayoría de ellos (86%), mostró reducción en el volumen tumoral en animales tratados versus los controles. Hubo 4 estudios que mostraron la mayor disminución ($d = -8,3$ a $-10,9$). Uno de estos estudios incluyó la administración de varias dosis de docetaxel, un taxano citotóxico, agente antimicrotúbulo que principalmente ejerce su actividad citotóxica al perturbar la red microtubular en las células que son esenciales para las funciones celulares mitóticas y de interfase (Lyseng-Williamson y Fenton 2005). Las dosis evaluadas fueron 5, 10 y 15 mg/kg, siendo más efectiva la dosis de 15 mg/kg, en este estudio también se administró docetaxel en las mismas dosis anteriores más SU11248 (40 mg/kg), pequeña molécula que inhibe miembros de la familia de receptores del dominio de tirosina quinasa, incluyendo los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFRs) tipo 1 y 2 (Chow y Eckhardt 2007). Obteniéndose mejores resultados con la combinación de

SU11248 y docetaxel (10 mg/kg). Se puede notar que al combinar SU11248 con las dosis de 5 y 10 mg/kg se obtiene un efecto farmacológico sinérgico, sin embargo, el efecto de docetaxel (15 mg/kg) disminuye al ser administrado junto con SU11248.

Además se combinó SU11248 (40 mg/kg) con doxorubicina (4mg/kg) obteniéndose uno de los resultados mas significativos en la reducción de volumen, doxorubicina es una de las primeras antraciclinas aisladas de *Streptomyces peucetius* (Minotti y col 2004). Crown y col (2002), lo describen como la primera línea de quimioterapia para cáncer mamario metastásico.

El estudio que mostró el resultado más significativo en la reducción del volumen tumoral fue el realizado con pectina cítrica modificada (MCP). Pectina es un complejo polisacárido natural presente en las plantas en las paredes celulares y consecuentemente, es un componente dietario de todas las frutas y vegetales. La pectina tiene múltiples papeles en el crecimiento de la planta, desarrollo, y resistencia a enfermedades. Se cree que pectina se puede unir a la superficie de células cancerígenas e interfiere con la adhesión célula – célula o matriz – célula, inhibiendo las lesiones metastásicas (Jackson y col 2007). En un estudio realizado por Platt y Raz en 1992, demostró que la inyección de MCP a ratones tratados con células de melanoma B16 - F1 resulta en una reducción estadísticamente significativa en la colonización pulmonar, lo que sugiere que MCP interfiere con galectina- 3 dependiente de la embolización tumoral en la circulación, que llevan a una reducción de la metástasis.

Además, se quiso determinar si las diferencias en los resultados de los tratamientos, ya sea reducción absoluta y relativa del volumen y peso final de los tumores en los animales tratados, tienen relación con variables como la cepa de ratones, la línea celular utilizada y tipo de tratamiento en cada investigación.

6.2.4. Análisis regresión

6.2.4.1. Análisis regresión peso postratamiento

En este análisis que incluyó 16 estudios (Tabla N° 21) se obtuvieron diferencias significativas en todas las líneas celulares utilizadas. En este caso, el nivel excluido, línea celular 4T1, corresponde a una sublínea celular derivada de la línea 410.4, la cual fue aislada de un tumor mamario espontáneo en ratones Balb/cfC3H (Heppner y col 2000). Las líneas celulares A2L2 y MCF-7 mostraron una disminución del peso tumoral comparado con el nivel excluido (4T1) de 1398,95 y 400 mg respectivamente. Como ya se mencionó anteriormente MCF-7 corresponde a un carcinoma ductal invasivo con receptores positivos de estrógeno y progesterona, mientras que A2L2 es una línea murina metastásica de cáncer mamario, la cual expresa altos niveles de HER2/ neu de rata, y fue derivada de la línea celular 66.3 (Wang y col 2005). Por otro lado, las líneas celulares MDA-MB-435 y MDA-MB-468 mostraron aumento del peso postratamiento comparadas con la línea excluida de 2509 y 2505 mg respectivamente. Lacroix y Leclercq (2004), señalan que MDA-MB-435 corresponde a un carcinoma ductal invasivo y MDA-MB-468 a un adenocarcinoma, ambas poseen receptores negativos para estrógenos y progesterona.

En cuanto a las cepas de ratones incluidas en el análisis, las cepas Balb/c e ICR Scid, mostraron diferencias estadísticamente significativas, con aumento del peso postratamiento en 2907,3 y 4104,2 mg respectivamente, al utilizar estas cepas comparadas con el nivel dejado fuera (ratones atímicos desnudos), tanto los ratones ICR Scid (inmunodeficiencia combinada severa) como los atímicos desnudos tienen mutaciones que afectan su sistema inmune, la diferencia es que los atímicos desnudos son deficientes en células T, mientras que los Scid carecen de células T y B funcionales (Kim y col 2004). Por otro lado, los ratones Balb/c corresponden a una cepa endocriada, estas cepas son consanguíneas y naturalmente pueden desarrollar tumores.

Para el análisis de regresión del peso postratamiento se dejó como nivel excluido el tipo de tratamiento denominado “otros”, que como se había mencionado previamente corresponde a los tratamientos que no correspondían a las demás categorías. Mostrando una diferencia estadísticamente significativa de disminución del peso postratamiento el tipo de tratamiento hormonal, con una disminución de 4303 mg, comparado con el nivel excluido.

6.2.4.2. Análisis regresión volumen tumoral absoluto

La reducción del volumen tumoral es la variable más importante para determinar la eficacia, por lo cual se analizó la reducción absoluta y relativa del volumen tumoral respecto a las líneas celulares, cepas de ratones y tipos de tratamientos. Para el caso del volumen absoluto, fueron analizados 24 estudios (Tabla N° 22), las variables analizadas corresponden a las líneas celulares, cepa de ratón, y tipo de tratamiento. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las distintas variables independientes y sus respectivos niveles incluidos, lo que puede deberse a la gran dispersión de las variables observada en el intervalo de confianza.

6.2.4.2. Análisis regresión volumen tumoral relativo

Para el volumen tumoral relativo, se analizaron 24 estudios, los mismos que para el volumen tumoral absoluto. En cuanto a las líneas celulares, el nivel excluido fue la línea KPL4, la cual corresponde a un carcinoma ductal invasivo, derivado de una efusión pleural, con receptores de estrógeno y progesterona negativos (Lacroix y Leclercq 2004). Y la línea que mostró una diferencia estadísticamente significativa con esta fue la MCF-7, disminuyendo el volumen en 2,01 mm³ respecto a KPL4. MCF-7 tiene receptores positivos de estrógeno y progesterona, estos receptores han sido utilizados y estudiados ampliamente como indicadores de pronóstico, la importancia clínica del receptor de estrógenos se relaciona con el hecho de que su presencia identifica tumores que son sensibles al tratamiento hormonal con el antagonista correspondiente (Poblete 2001).

En cuanto a la cepa de ratón, el nivel excluido fue la cepa atímicos desnudos, y la cepa Scid beige mostró una diferencia estadísticamente significativa, con aumento del volumen tumoral de 1,18 mm³ con respecto a los atímicos desnudos. Los ratones Scid beige carecen de células T, B y NK funcionales.

Para el análisis de regresión del volumen tumoral relativo, el nivel excluido fue la quimioterapia. En este caso, los anticuerpos monoclonales y el tratamiento hormonal

mostraron una diferencia significativa con respecto al nivel excluido, con aumento del volumen de 0,22 y 2,48 mm³ respectivamente.

En resumen, podríamos decir que las líneas celulares tienen relación con la respuesta al tratamiento fundamentalmente por el tipo de receptor de estrógeno que posean, y en cuanto a los modelos, las cepas de ratones inmunodeficientes son las que presentan mayor relación con los resultados obtenidos. Estas relaciones también son encontradas en humanos, donde el éxito de una terapia antitumoral dependerá del tipo de tumores, presencia o ausencia de receptores de hormonas esteroideas y variaciones individuales.

6.3. CONCLUSIONES

A pesar del desarrollo de la investigación en el tratamiento del cáncer mamario, esta enfermedad sigue representando la segunda causa de muerte en mujeres. De acuerdo al análisis realizado, se puede concluir que:

La cepa de ratón más utilizada en los artículos analizados de tratamiento de cáncer mamario corresponde a los ratones atímicos desnudos, ya que al ser inmunodeficientes no rechazan las líneas celulares inoculadas, y por otro lado la línea celular más utilizada es la MCF-7, la cual representa el tipo de tumor más frecuentemente encontrado en mujeres (carcinoma ductal invasivo)

Los tratamientos analizados resultaron ser más eficaces en reducir el volumen que el peso y superficie tumoral.

La respuesta al tratamiento depende de la línea celular y cepa de ratón utilizada en la evaluación. Por lo tanto, con el fin de evaluar la eficacia de los fármacos debería realizarse un estudio intra-grupos, vale decir la misma línea celular, cepa de ratón con distintos fármacos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Altundag K, N Ibrahim. 2006. Aromatase inhibitors in breast cancer: an overview. *Oncologist* 11, 553-562.
- Antoniou A, P Pharoah, S Narod, HA Risch, JE Eyfjord, JL Hopper, N Loman, H Olsson, O Johannsson, A Borg, B Pasini, P Radice, S Manoukian, DM Eccles, N Tang, E Olah, H Anton-Culver, E Warner, J Lubinski, J Gronwald, B Gorski, H Tulinius, S Thorlacius, H Eerola, H Nevanlinna, K Syrjäkoski, OP Kallioniemi, D Thompson, C Evans, J Peto, F Lalloo, DG Evans, DF Easton. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72, 1117-1130.
- Artemov D, M Solaiyappan, Z Bhujwalla. 2001. Magnetic resonance pharmacoangiography to detect and predict chemotherapy delivery to solid tumors. *Cancer Res* 61, 3039-3044.
- Awad A, A Downie, CF Fink, U Kim. 2000. Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Res* 20, 821-824.
- Awad A, C Fink. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *J Nutr* 130, 2127-2130.
- Baliga M, S Meleth, S Katiyar. 2005. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells *in vitro* and *in vivo* systems. *Clin cancer Res* 11, 1918-1927.
- Beckmann M, D Niederacher, HG Schnürch, B Gusterson, H Bender. 1997. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 75, 429-439.
- Benavides F, JL Guénet. 2003. *Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones*. Pp 85-94. Universidad de Alcalá. Madrid.
- Berg J. 1984. Clinical implications of risk factors for breast cancer. *Cancer* 53, 589-591.
- Bergh J, PE Jönsson, B Glimelius, P Nygren. 2001. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer. *Acta Oncol* 40, 253-281.

- Bernstein L. 2002. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 3-15.
- Blackburn AC, DJ Jerry. 2002. Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer?. *Breast Cancer Res* 4, 101-111.
- Blackshear P. 2001. Genetically engineered rodent models of mammary gland carcinogenesis: an overview. *Toxicol Pathol* 29, 105-116.
- Blishchenko E, O Mernenko, I Mirkina, D Satpaev, V Ivanov, L Tchikin, A Ostrovsky, A Karelin, V Ivanov. 1997. Tumor cell cytolysis mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin β -chain. *Peptides* 18, 79-85.
- Boekhout A, JH Beijnen, J Schellens. 2006. Symptoms and treatment in cancer therapy-induced early menopause. *Oncologist* 11, 641-654.
- Boffetta P, M Hashibe, C La Vecchia, W Zatonski, J Rehm. 2006. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer* 119, 884-887.
- Bouker K, L Hilakivi-Clarke. 2000. Genistein: does it prevent or promote breast cancer? *Environ Health Perspect* 108, 701-708.
- Bradford P, A Awad. 2007. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 51, 161-170.
- Brady H, S Desai, L Gayo-Fung, S Khammungkhune, J McKie, E O'Leary, L Pascasio, MK Sutherland, D Anderson, S Bhagwat, B Stein. 2002. Effects of SP500263, a novel, potent antiestrogen, on breast cancer cells and in xenograft models. *Cancer Res* 62, 1439-1442.
- Brown D, E Ruoslahti. 2004. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* 5, 365-374.
- Brzezinski A, A Debi. 1999. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators?. *Eur J Obstet Gynecol* 85, 47-51.
- Buggiano V, A Goldman, I Nepomnaschy, P Bekinschtein, P Berguer, G Lombardi, A Deroche, MV Francisco, I Piazzon. 1999. Characterization of two infectious mouse mammary tumour viruses: Superantigenicity and tumorigenicity. *Scand J Immunol* 49, 269-277.
- Burdall S, A Hanby, M Lansdown, V Speirs. 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe?. *Breast Cancer Res* 5, 89-95.

- Callahan R, G Smith. 2000. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene* 19, 992-1001.
- Carbone C, F Maschi. 2006. El ratón *nude* (*nu/nu*) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Quimica Viva* 5, 19-23.
- Cardiff R. 2001. Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: comparative pathology. *Micros Res Tech* 52, 224-230.
- Cardiff R, HA Bern, LJ Faulkin, CW Daniel, GH Smith, LJ Young, D Medina, MB Gardner, SR Wellings, G Shyamala, RC Guzman, L Rajkumar, J Yang, G Thordarson, S Nandi, CL MacLeod, RG Oshima, AK Man, ET Sawai, JP Gregg, AT Cheung, DH Lau. 2002. Contributions of mouse biology to breast cancer research. *Comp Med* 52, 12-31.
- Cardiff R, N Kenney. 2007. Mouse mammary tumor biology: a short history. *Adv Cancer Res* 98, 53-116.
- Cardiff R, S Wellings. 1999. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 105-122.
- Carroll K. 1975. Experimental evidence of dietary factors and hormone-dependent cancer. *Cancer Res* 35, 3374-3383.
- Chambers A, A Groom, I MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev Cancer* 2, 563-572.
- Chen YC, D Hunter. 2005. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin* 55, 45-54.
- Chin KV, L Alabanza, K Fujii, K Kudoh, T Kita, Y Kikuchi, Z Selvanayagam, Y Fu Wong, Y Lin, W Chung Shih. 2005. Application of expression genomics for predicting treatment response in cancer. *Ann NY Acad Sci* 1058, 186-195.
- Chow L, SG Eckhardt. 2007. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 25, 884-896.
- Clancy Keen J, N Davidson. 2003. The biology of breast carcinoma. *Cancer* 97, 825-833.
- Clarke C, D Purdie, S Glaser. 2006. Population attributable risk of breast cancer in white women associated with immediately modifiable risk factors. *BMC Cancer* 6, 170-180.
- Clarke R. 1996. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer - The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell line. *Breast Cancer Res Treat* 39, 69-86.

- Clarke R, E Anderson, A Howell, C Potten. 2003. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 36, 45-58.
- Cleary M, J Grande, S Juneja, N Maihle. 2004. Diet-induced obesity and mammary tumor development in MMTV-neu female mice. *Nutr Cancer* 50, 174-180.
- Colditz G, B Rosner, W Chen, M Holmes, S Hankinson. 2004. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* 96, 218-228.
- Crown J, V Diéras, M Kaufmann, G von Minckwitz, S Kaye, R Leonard, M Marty, JL Misset, B Osterwalder, M Piccart. 2002. Chemotherapy for metastatic breast cancer-report of a European expert panel. *Lancet Oncol* 3, 719-726.
- Cui XS, L Donehower. 2000. Differential gene expression in mouse mammary adenocarcinomas in the presence and absence of wild type p53. *Oncogene* 19, 5988-5996.
- Dhingra K. 1999. Antiestrogen – tamoxifen, SERMs and beyond. *Invest New Drugs* 17, 285-311.
- Dickson C, A Creer, V Fantl. 2000. Mammary gland oncogenes as indicators of pathways important in mammary gland development. *Oncogene* 19, 1097-1101.
- Dickson RB, MM Gottardis, GT Merlino. 1991. Molecular insight into breast cancer from transgenic mouse models. *Bioessays* 13, 591-596.
- Dunn S, F Kari, J French, J Leininger, G Travios, R Wilson, JC Barrett. 1997. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res* 57, 4667-4672.
- Elenbaas B, L Spirio, F Koerner, M Fleming, D Zimonjic, J Liu Donaher, N Popescu, W Hahn, R Weinberg. 2001. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15, 50-65.
- Fargiano A, K Desai, J Green. 2003. Interrogating mouse mammary cancer models: Insights from gene expression profiling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 321-334.
- Fentiman I, A Fourquet, G Hortobagyi. 2006. Male breast cancer. *Lancet* 367, 595-604.
- Fernandes G, B Chandrasekar, D Troyer, J Venkatraman, R Goods. 1995. Dietary lipids and caloric restriction affect mammary tumor incidence and gene expression in mouse mammary tumor virus/v-Ha-ras transgenic mice. *Proc natl Acad Sci USA* 92, 6494-6498.

- Fidler I, I Hart. 1982. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217, 998-1003.
- Ford C, M Faedo, R Crouch, J Lawson, W Rawlinson. 2004. Progression from normal breast pathology to breast cancer is associated with increasing prevalence of mouse mammary tumor virus-like sequences in men and women. *Cancer Res* 64, 4755-4759.
- Gazdar A, V Kurvari, A Virmani, L Gollahon, M Sakaguchi, M Westerfield, D Kodagoda, V Stasny, HT Cunningham, I Wistuba, G Tomlinson, V Tonk, R ashfaq, M Leitch, J Minna, J Shay. 1998. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 78, 766-774.
- Gluck S. 2002. The expanding role of epirubicin in the treatment of breast cancer. *Cancer Control* 9, 16-27.
- Goss P, S Sierra. 1998. Current perspectives on radiation-induced breast cancer. *J Clin Oncol* 16, 338-347.
- Gould M. 1995. Rodent models for the study of etiology, prevention and treatment of breast cancer. *Semin Cancer Biol* 6, 147-152.
- Green J, K Desai, Y Ye, C Kavanaugh, A Calvo, JI Huh. 2004. Genomic approaches to understanding mammary tumor progression in transgenic mice and responses to therapy. *Clin Cancer Res* 10, 385-390.
- Greenblatt M, P Chappuis, J Bond, N Hamel, W Foulkes. 2001. *TP53* mutations in breast cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res* 61, 4092-4097.
- Henderson I. 1993. Risk factors for breast cancer development. *Cancer* 71, 2127-2140.
- Heppner G, F Miller, PV Malathy Shekhar. 2000. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2, 331-334.
- Hilger I, W Andra, R Hergt, R Hiergeist, H Schubert, WA Kaiser. 2001. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: *in vitro* and *in vivo* studies in human cadavers and mice. *Radiology* 218, 570-575.
- Horn-Ross P. 1995. Phytoestrogens, body composition, and breast cancer. *Cancer Causes Control* 6, 567-573.
- Hsieh CY, R Santell, S Haslam, W Helferich. 1998. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 58, 3833-3838.

- Huang WY, B Newman, R Millikan, M Schell, B Hulka, P Moorman. 2000. Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status. *Am J Epidemiol* 151, 703-714.
- Jackson C, T Dreaden, L Theobald, N Tran, T Beal, M Eid, MY Gao, R Shirley, M Stoffel, MV Kumar, D Mohnen. 2007. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology* 17, 805-819.
- Jenkins D, Y Hornig, Y Oei, J Dusich, T Purchio. 2005. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive *in vivo* detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* 7, 444-454.
- Kavanaugh CJ, KV Desai, A Calvo, PH Brown, C Couldrey, R Lubet, JE Green. 2002. Pre-clinical applications of transgenic mouse mammary cancer models. *Transgenic Res* 11, 617-633.
- Kavanaugh C, J Green. 2003. The use of genetically altered mice for breast cancer prevention studies. *J Nutr* 133, 2404-2409.
- Kelland LR. 2004. "Of mice and men": values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40, 827-836.
- Kelsey J. 1979. A review of the epidemiology of human breast cancer. *Epidemiology Rev* 1, 74-109.
- Kim J, M O'Hare, R Stein. 2004. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future?. *Breast Cancer Res* 6, 22-30.
- Kim H, TG Peterson, S Barnes. 1998. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor b signaling pathways. *Am J Clin Nutr* 68,1418-1425.
- Knostman K, JY Cho, KY Ryu, X Lin, J McCubrey, T Hla, C Liu, E Di Carlo, R Keri, M Zhang, D Hwang, W Kisseberth, C Capen, S Jhiang. 2004. Signaling through 3,5-cyclic adenosine monophosphate and phosphoinositide-3 kinase induces sodium/iodide symporter expression in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metabolism* 89, 5196-5203.
- L'Abbé K, A Detsky, K O'rourke. 1994. El metaanálisis en la investigación clínica. *Bol Of Sanit Panam* 116, 226-244.
- Lacroix M, G Leclercq. 2004. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83, 249-289.

- Lanari C, A Molinolo. 2003. Progestágenos y cáncer de mama. *Química Viva* 2, versión electrónica.
- Lancaster M, J Rouse, KW Hunter. 2005. Modifiers of mammary tumor progression and metastasis on mouse chromosomes 7, 9, and 17. *Mamm Genome* 16, 120-126.
- Letelier L, J Manríquez, G Rada. 2005. Revisión sistemática y metaanálisis: ¿son la mejor evidencia?. *Rev Med Chile* 133, 246-249.
- List HJ, K Lauritsen, R Reiter, C Powers, A Wellstein, A Riegel. 2001. Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 276, 23763-23768.
- Liu R, S Varghese, S Rabkin. 2005. Oncolytic herpes simplex virus vector therapy of breast cancer in C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mice. *Cancer Res* 65, 1532-1540.
- Lyseng-Williamson K, C Fenton. 2005. Docetaxel a review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs* 65, 2513-2531.
- McPherson K, CM Steel, JM Dixon. 2000. ABC of breast diseases breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 321, 624-628.
- Minn A, Y Kang, I Serganova, G Gupta, D Giri, M Doubrovin, V Ponomarev, W Gerald, R Blasberg, J Massagué. 2005. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 115, 44-55.
- Minotti G, P Menna, E Salvatorelli, G Cairo, L Gianni. 2004. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185-229.
- MINSAL. 2005. *Guía clínica cáncer de mama en personas de 15 años y más*.
- Mishra S, A Mazumdar, R Vadlamudi, F Li, RA Wang, W Yu, VC Jordan, R Santen, R Kumar. 2003. MICoA, a novel metastasis-associated protein 1 (MTA1) interacting protein coactivator, regulates estrogen receptor- α transactivation functions. *J Biol Chem* 278, 19209-19219.
- Morimoto L, E White, Z Chen, R Chlebowski, J Hays, L Kuller, AM Lopez, J Manson, K Margolis, P Muti, M Stefanick, A McTiernan. 2002. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the women's health initiative (United States). *Cancer Causes Control* 13, 741-751.

- Morito K, T Hirose, J Kinjo, T Hirakawa, M Okawa, T Nohara, S Ogawa, S Inoue, M Muramatsu, Y Masamune. 2001. Interaction of Phytoestrogens with estrogen receptors α and β . *Biol Pharm Bull* 24, 351-356.
- Namba R, J Maglione, L Young, A Borowsky, R Cardiff, C MacLeod, J Gregg. 2004. Molecular characterization of the transition to malignancy in a genetically engineered mouse-based model of ductal carcinoma *in situ*. *Mol Cancer Res* 2, 453-463.
- Nasca P, M Baptiste, N Field, B Metzger, M Black, CS Kwon, H Jacobson. 1990. An epidemiological case-control study of breast cancer and alcohol consumption. *Int J Epidemiol* 19, 532-538.
- Nieto AL, G Shyamala, JJ Galvez, G Thordarson, LM Wakefield, RD Cardiff. 2003. Persistent mammary hyperplasia in FVB/N mice. *Comp Med* 53, 433-438.
- Novaro V, D Radisky, N Ramos Castro, A Weisz, M Bissell. 2004. Malignant mammary cells acquire independence from extracellular context for regulation of estrogen receptor α . *Clin Cancer Res* 10, 402-409.
- Ormrod D, K Holm, K Goa, C Spencer. 1999. Epirubicin a review of its efficacy as adjuvant therapy and in the treatment of metastatic disease in breast cancer. *Drugs & Aging* 15, 389-416.
- Osborne C, P Wilson, D Tripathy. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9, 361-377.
- Paruthiyil S, H Parmar, V Kerekatte, G Cunha, G Firestone, D Leitman. 2004. Estrogen receptor β inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 64, 423-428.
- Persky V, R Chatterton, L Van Horn, M Grant, P Langenberg, J Marvin. 1992. Hormone levels in vegetarian and nonvegetarian teenage girls: potential implications for breast cancer risk. *Cancer Res* 52, 578-583.
- Pike M, M Krailo, B Henderson, J Casagrande, D Hoel. 1983. Hormonal risk factor, breast tissue age and the age-incidence of breast cancer. *Nature* 303, 767-770.
- Platt D, Raz A. 1992. Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. *J Natl Cancer Inst* 84, 438-442.
- Poblete M. 2001. Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuad Cir* 15, 74-79.

- Pratt C, T Bishop, D White, G Yasvinski, M Ménard, MY Niu, R Clarke. 2003. Estrogen withdrawal-induced NF- κ B activity and Bcl-3 expression in breast cancer cells: roles in growth and hormone independence. *Mol Cell Biol* 23, 6887-6900.
- Proietti C, M Salatino, C Rosembliit, R Carnevale, A Pecci, A Kornblihtt, A Molinolo, I Frahm, E Charreau, R Schillaci, P Elizalde. 2005. Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 25, 4826-4840.
- Rabbani SA, P Khalili, A Arakelian, H Pizzi, G Chen, D Goltzman. 2005. Regulation of parathyroid hormone-related peptide by estradiol: effect on tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 146, 2885-2894.
- Rajkumar L, F Kittrell, R Guzman, P Brown, S Nandi, D Medina. 2007. Hormone-induced protection of mammary tumorigenesis in genetically engineered mouse models. *Breast Cancer Res* 9, 12-22.
- Rice S, S Whitehead. 2006. Phytoestrogens and breast cancer – promoters or protectors?. *Endocr Relat Cancer* 13, 995-1015.
- Roberts I, I Kwan, P Evans, S Haig. 2005. Does animal experimentation inform human healthcare? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation. *Br Med J* 324, 474-476.
- Ronco A, E De Stefani. 1999. Fitoestrógenos y riesgo de cáncer mamario: un estudio caso – control. *Rev Med Uruguay* 15, 94-102.
- Sarkar D, ZZ Su, N Vozhilla, E Sook Park, P Gupta, P Fisher. 2005. Dual cancer-specific targeting strategy cures primary and distant breast carcinomas in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14034-14039.
- Schatzkin A, S Piantadosi, M Miccozzi, D Barteel. 1989. Alcohol consumption and breast cancer: a cross-national correlation study. *Int J Epidemiol* 18, 28-31.
- Setchell K. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68, 1333-1346.
- Sharkey F, J Fogh. 1984. Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 3, 341-360.
- Shoker B, C Jarvis, R Clarke, E Anderson, J Hewlett, M Davies, D Ross Sibson, J Sloane. 1999. Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *Am J Pathol* 155, 1811-1815.

- Sivaraman L, D Medina. 2002. Hormone-induced protection against breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 77-92.
- Sutherland R, E Musgrove. 2002. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Res* 4, 14-17.
- Tahtis K, FT Lee, F Smyth, B Power, C Renner, M Brechbiel, L Old, P Hudson, A Scott. 2001. Biodistribution properties of ¹¹¹Indium-labeled C functionalized *trans*-cyclohexyl diethylenetriaminepentaacetic acid humanized 3S193 diabody and F(ab')₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 7, 1061-1072.
- Thull D, V Vogel. 2004. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist* 9, 13-24.
- Tobias JS. 2004. Recent advances in endocrine therapy for postmenopausal women with early breast cancer: implications for treatment and prevention. *Ann Oncol* 15, 1738-1747.
- Vogel V. 2006. Recent results from clinical trials using SERMs to reduce the risk of breast cancer. *Ann NY Acad Sci* 1089, 127-142.
- Wagner KU. 2004. Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling?. *Breast Cancer Res* 6, 31-38.
- Wang X, JP Wang, XM Rao, J Price, H Zhou, L Lachman. 2005. Prime–boost vaccination with plasmid and adenovirus gene vaccines control HER2/*neu*+ metastatic breast cancer in mice. *Breast Cancer Res* 7, 580-588.
- Webster L, P Wingo, P Layde, H Ory. 1983. Alcohol consumption and risk of breast cancer. *Lancet* 2, 724-726.
- Willett W. 1995. Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Perspect* 103, 165-170.
- Winchester D. 2001. *Cáncer de mama*. Pp 1-34. Harcourt. Madrid.
- Ye Y, T Hu Qiu, C Kavanaugh, J Green. 2004. Molecular mechanisms of breast cancer progression: lessons from mouse mammary cancer models and gene expression profiling. *Breast Dis* 19, 69-82.
- Zhu Z, A Haegle, H Thompson. 1997. Effect of caloric restriction on pre-malignant and malignant stages of mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18, 1007-1012.

8. ANEXOS

Anexo 1. Estudios incluidos en el metaanálisis.

Autor	Revista	Año	Vol.	Nº	1º Pág.
Abrams TJ	Molecular Cancer Therapeutics	2003	2		1011
Albright CD	Journal of Nutrition	2004	134		1139
Alli P	Oncogene	2005	24		39
Azuma H	Cancer Research	2002	62		1410
Bajo A	Clinical Cancer Research	2003	9		3742
Baliga M	Clinical Cancer Research	2005	11		1918
Basu G	Molecular Cancer Research	2004	2	11	632
Basu G	Breast Cancer Research	2005	7	4	R422
Beck M	Cancer Research	2003	63	13	3598
Blishchenko E	Cancer Biology & Therapy	2005	4	1	118
Blumenthal R	Clinical Cancer Research	2001	7	10	3178
Boulikas T	Oncology Reports	2004	12	1	3
Bradshaw T	Molecular Cancer Therapeutics	2002	1		239
Brandt R	Oncogene	2001	20		5459
Buchsbaum D	Clinical Cancer Research	2003	9		3731
Cai H	British Journal of Cancer	2004	91	7	1364
Chan KC	British Journal of Surgery	2001	88	3	412
Chan KC	Cancer Research	2002	62	1	122
Chang WH	Nutrition and Cancer	2002	43	2	214
Chen J	Clinical Cancer Research	2004	10	22	7703
Chen J	Nutrition and Cancer	2002	43	2	187
Cho HM	Molecular Cancer Therapeutics	2005	4	6	956
Chu I	Cancer Research	2005	65	1	18
Connor C	Cancer Research	2001	61		2917
De Lorenzo C	Cancer Research	2004	64	14	4870
De Moreno A	Breast Cancer Research	2005	7	4	R477
Detre S	Cancer Research	2003	63	19	6516
Devy L	The FASEB Journal	2004	18	3	565
Di Benedetto M	British Journal of Cancer	2001	85	6	917

Faridi J	Clinical Cancer Research	2003	9		2933
Fichtner I	Breast Cancer Research and Treatment	2004	87	1	97
Finkle D	Clinical Cancer Research	2004	10		2499
Friess T	Clinical Cancer Research	2005	11	14	5300
Gangloff A	Journal of Nuclear Medicine	2005	46	11	1866
Han GZ	Cancer Research	2005	65	2	387
Hardman WE	Clinical Cancer Research	2001	7	7	2041
Hashiguchi N	Anticancer Research	2004	24	4	2201
Hoke E	Free Radical Biology & Medicine	2005	39	3	403
Howe L	Cancer Research	2002	62		5405
Huang X	Cancer Research	2005	65	10	4408
Huang X	Cancer Research	2002	62		5727
Huh JI	Oncogene	2005	24		790
Jelovac D	Cancer Research	2005	65	12	5439
Jelovac D	Clinical Cancer Research	2004	10		7375
Jelovac D	Cancer Research	2005	65	12	5380
Jin Z	Journal of Nutrition	2002	132		3186
Ju Y	Journal of Nutrition	2001	131		2957
Ju Y	Cancer Research	2002	62	9	2474
Ju Y	Journal of Nutrition	2004	134		1145
Kasukabe T	Breast Cancer Research	2005	7	6	R1097
Kelland L	Clinical Cancer Research	2001	7	11	3544
Klement G	Clinical Cancer Research	2002	8		221
Klos K	Cancer	2003	98	7	1377
Kraus L	Investigative New Drugs	2003	21	3	259
Lachman L	Cancer Gene Therapy	2001	8		259
Lamb C	Breast Cancer Research and Treatment	2003	79	1	25
Lamb C	Breast Cancer Research	2005	7	6	R1111
Lang JY	Clin Cancer Research	2005	11	9	3455
Lanza-Jacoby S	Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention	2003	12		1486
Lawson K	Molecular Cancer Therapeutics	2003	2		437
Lee S	Cancer Research	2002	62	20	5703
Li M	Oncogene	2003	22		2568
Liao Y	Cancer Gene Therapy	2004	11	9	594
Liu B	Cancer Research	2005	65	3	879
Liu H	Journal of the National Cancer Institute	2003	95		1586
Liu M	Cancer Research	2005	65	12	5325

Loaiza-Perez	Molecular Cancer Therapeutics	2004	3	6	715
Long B	Journal of the National Cancer Institute	2004	96		456
Lopes de Menezes D	Journal of Experimental Therapeutics & Oncology	2003	3		72
Lu C	Journal of the National Cancer Institute	2003	95		1825
Man S	Cancer Research	2002	62		2731
Matsumoto G	Clinical Cancer Research	2005	11		1287
Mizunuma H	The Oncology	2002	62	1	78
Mondesire W	Clinical Cancer Research	2004	10		7031
Namba R	Breast Cancer Research	2005	7		R881
Nangia-Makker P	Journal of the National Cancer Institute	2002	94		1854
Narayanan K	Journal of the National Cancer Institute	2004	96		1388
Ng B	Cancer Research	2001	61	7	2996
Nukatsuka M	International Journal of Oncology	2004	25	6	1531
Nuñez N	Clinical Cancer Research	2004	10	16	5375
O'regan R	Journal of the National Cancer Institute	2002	94		274
Osipo C	Journal of the National Cancer Institute	2003	95		1597
Pan Q	Molecular Cancer Therapeutics	2003	2		617
Pape-Ansorge K	Nutrition and Cancer	2002	44	2	161
Plum S	Clinical Cancer Research	2003	9		4619
Punj V	Oncogene	2004	23		2367
Rakhmievich A	Molecular Cancer Therapeutics	2004	3	8	969
Richert M	Breast cancer Research	2005	7	5	R819
Sabel M	Annals of Surgical Oncology	2004	11	2	147
Sacco MG	Gene Therapy	2003	10	22	1903
Sakai Y	Cancer Research	2004	64		8022
Salatino M	Oncogene	2004	23		5161
Sartippour M	International Journal of Oncology	2005	26	1	121
Scrivens PJ	Molecular Cancer Therapeutics	2003	2		1053
Singh T	Cancer Research	2003	63	17	5390
Song S	Clinical Cancer Research	2004	10	18	6058
Spadaro M	Clinical Cancer Research	2005	11		1941
Sundaram S	Clinical Cancer Research	2003	9		2350
Sutherland T	Clinical Cancer Research	2005	11		1722
Takahashi N	Cancer Research	2002	62	23	6909
Trouet A	Cancer Research	2001	61	7	2843
Vantighem S	Cancer Research	2005	65	8	3396
Visscher D	Breast Cancer Research and Treatment	2001	65	1	41

Wang CX	Breast Cancer Research and Treatment	2005	92	3	251
Wang H	Internacional Journal of Oncology	2002	21	1	73
Wang H	Clinical Cancer Research	2004	10	5	1633
Warburton C	Clinical Cancer Research	2004	10	7	2512
Wu K	Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention	2002	11		467
Yang S	Molecular Cancer Thererapeutics	2003	2	1	65
Yee L	Journal of Nutrition	2005	135		983
Yen WC	Molecular Cancer Therapeutics	2005	4	5	824
Yi M	Proceedings of the National Academy of Sciences USA	2001	98	2	620
Yu B	Clinical Cancer Research	2003	9		285
Yu K	Endocrine- Related Cancer	2001	8	3	249
Zeisig R	Anticancer Drugs	2004	15	7	707
Zhang G	Clinical Cancer Research	2002	8	4	1196
Zhang S	Breast Cancer Research and Treatment	2004	87	2	111

Anexo 2. Tipos de tratamientos utilizados.

Anticuerpos Monoclonales.

Anticuerpos Monoclonales	N°
Trastuzumab	6
3G4	2
IgG rhu	1
TRA - 8	1
Pertuzumab	1
DC 101 mab	1
Total	12

Vacunas.

Vacuna	N°
DC Ad.Neu	2
ELVIS – Neu	2
Mammaglobin A	2
DC Ad.Null	1
B7.2 – IgG	1
Total	8

Hormonal.

Tipo	Agente	N°	Total
Moduladores selectivos de receptores de estrógeno	Tamoxifeno	16	21
	Raloxifeno	2	
	4-HT (hidroxitamoxifeno)	1	
	Ospemifene	1	
	GW5638	1	
Estrógeno y Metabolitos	2MEO	4	8
	Estrógeno	4	
Inh. de Aromatasa	Letrozole	5	6
	Exemestano	1	
Antagonista prolactina	G129R	3	5
	G129R endostatina	2	
Antagonista receptor de estrógeno	Fulvestrant	4	4
Antagonista Progesterona	ZK299	1	2
	RU486	1	
Ant. LRH	AN-152	1	1
Otras Hormonas	MPA	1	2
	Andrógeno	1	
Total			49

Inmunosupresores.

Inmunosupresores	
Tipo	N°
Rapamicina	3
Ciclosporin A	2
PSC 833	1
CCI – 779	1
FTY720	1
Total	8

Quimioterapia.

Tipo quimioterapia		Agente	N°	Total
Genotóxicos	Intercalantes	Doxorubicina	21	29
		ST9905	4	
		ST9802	4	
	Alquilantes	Cisplatino	4	9
		Lipoplatina	2	
		Ciclofosfamida	1	
		Mitomicina	1	
	Inh. Enzimas	Carboplatina	1	5
		Topotecano	2	
		Etoposide	2	
Intercalante e Inh. Ez.	Irinotecano	1	1	
Antimetabolito	Antagonista Pirimidina	Epirubicina	1	1
		5-FU	1	3
		Capecitabina	1	
Inhibidores Huso mitótico		Gemcitabina	1	
		Paclitaxel	12	
		Docetaxel	5	
		Vinblastina	1	
			Vinorelbina	1
Total				66

Terapia Modificadora de la Respuesta Biológica.

Terapia modificadora de la respuesta biológica	
Tipo	N°
IL – 12	3
IFN-alpha	1
Total	4

Inhibidores específicos.

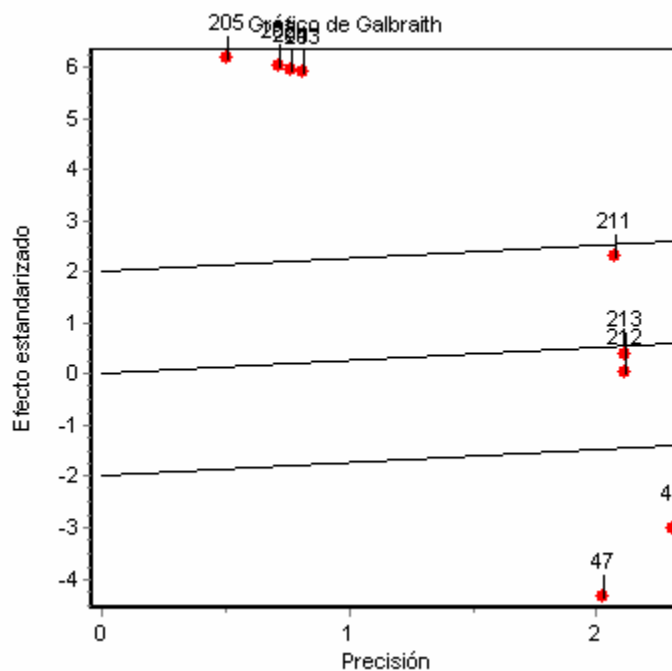
Inh Específicos	Agente	N°	Total
Inhibidor Ciclooxigenasa	Celecoxib	7	8
	SC560	1	
Inhibidores de Quinasa	Gefitinib	6	7
	Erlotinib	1	
Inh Angiogénesis y Tirosina Quinasa	SU6668	1	5
	GW654652	1	
	SU11248	3	
Oligonucleótidos Antisentido	RP ODNs	1	5
	G3139	1	
	Oligo GEM231	1	
	fosfotiolato ODNs	1	
	AS (S)ODN	1	
Inh Sintesis Ac Grasos	C75	3	4
	C247	1	
Inh Ornitina Descarboxilasa	DFMO	4	4
Antagonista Receptores Específicos	Bexarotene	2	2
Inh Farnesyl Transferasa	R115777	1	2
	PK1166	1	
Inh Metaloproteinasa	TIMP-2	1	1
Inh Topoisomerasa II	Salvicine	1	1
Inh FNKB	DHEMQ	1	1
Inh TFOS	bpV (Me2 Phen)	1	1
Total			41

Nutricionales.

Tipo		Agente	N°	Total
Flavonas		Genisteina	3	11
		Daidzeina	2	
		FSP	2	
		Aminoflavonas	1	
		Tricina	1	
		Te verde	1	
		Biochanin A	1	
Terpenos		Triptolide	4	4
Aceite vegetal		Flaxseed	2	3
		Aceite de maíz	1	
Esteroles		b-sitosterol	1	2
		b sitosterol glucósido	1	
Dietas especiales	Bajos niveles isoflavonas	Purina 5K96	1	3
		RD D11243	1	
		RD D11247	1	
	Altos niveles isoflavonas	Purina 5001	1	2
		RD D2061301	1	
	dieta 5% CO		1	1
	Dieta 3%FOC y 2%CO		1	1
	Leche fermentada por Lh R389		1	1
	Leche fermentada por Lh L89		1	1
	Restricción dietaria		1	1
	Dieta con depleción de antioxidantes		1	1
Polisacárido	MCP	1	1	
Aceite animal	Aceite de pescado	1	1	
Alcaloides	Camptothecina	1	1	
Ac retinoico	TTNPB	1	1	
Análogo Vit E	Alfa - TEA	1	1	
Análogo Vit D	EB 1089	1	1	
Planta Herbal	Rabsodia rubescens	1	1	
Total				38

Anexo N° 3. Pruebas adicionales realizadas a las investigaciones analizadas para evaluar la reducción de superficie tumoral en ratones tratados contra cáncer de mama.

Análisis de heterogeneidad.



Sesgo de publicación.

Prueba de Begg

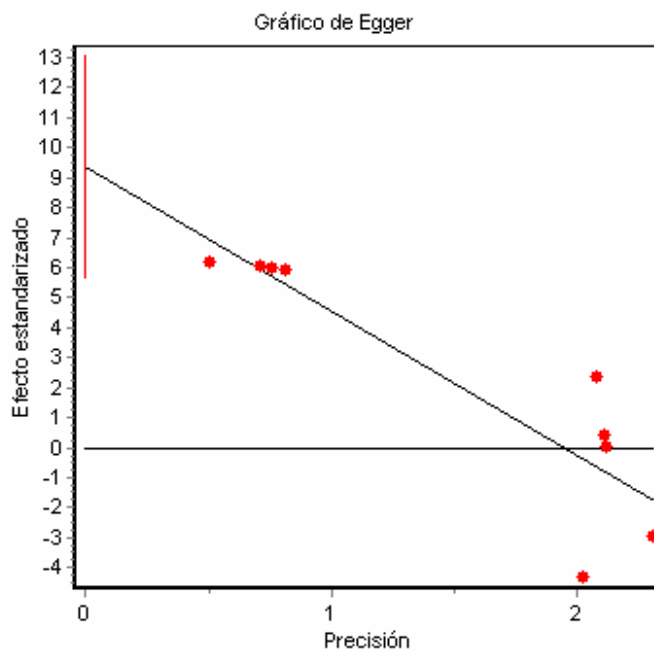
Estadístico Z Valor p

----- -----
 2,8149 0,0049

Prueba de Egger

Estadístico t gl Valor p

----- ----- -----
 5,9346 7 0,0006

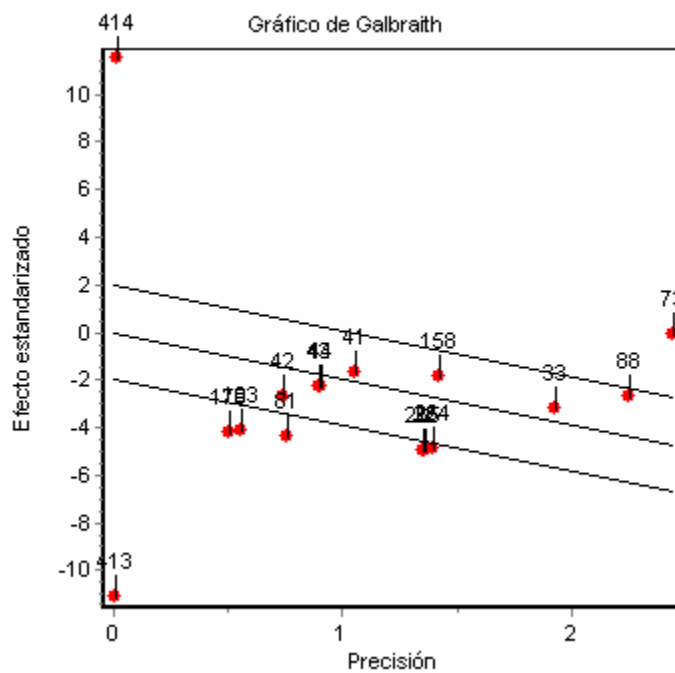


Análisis de sensibilidad

Estudio omitido	Año	n	IC(95,0%)		L. Superior	Cambio relativo (%)
			d	L. Inferior		
202	2001	168	2,4811	0,5737	4,3885	-21,13
203	2001	168	2,5901	0,6607	4,5195	-17,66
204	2001	168	2,5343	0,6163	4,4522	-19,44
205	2001	168	2,2586	0,3965	4,1207	-28,20
211	2004	168	3,5221	1,1971	5,8471	11,96
212	2004	170	3,6829	1,3283	6,0374	17,08
213	2004	170	3,6588	1,3030	6,0146	16,31
46	2005	162	3,8378	1,5510	6,1246	22,00
47	2005	162	3,8930	1,7465	6,0395	23,75
GLOBAL		188	3,1457	1,1717	5,1198	

Anexo 4. Pruebas adicionales realizadas a las investigaciones analizadas para evaluar la reducción de peso tumoral en ratones tratados contra cáncer de mama.

Análisis de heterogeneidad.



Sesgo de publicación.

Prueba de Begg

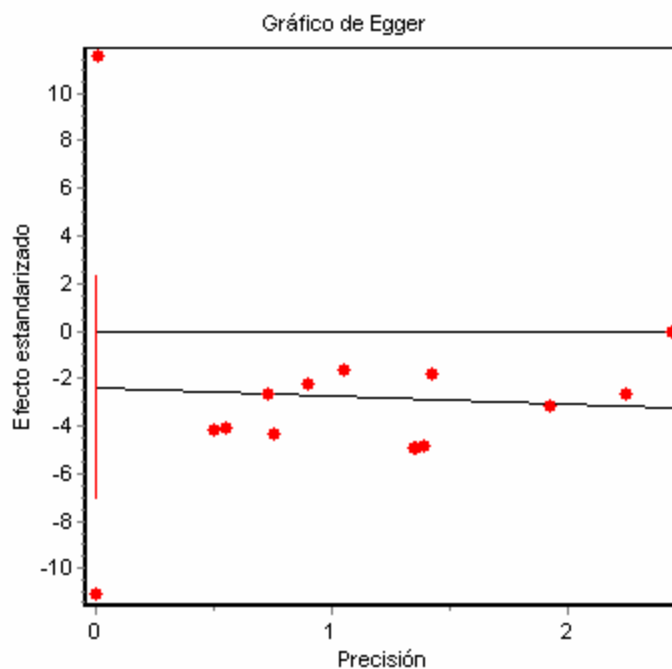
Estadístico Z Valor p

----- -----
 2,8364 0,0046

Prueba de Egger

Estadístico t gl Valor p

----- ----- -----
 -1,0809 14 0,2980

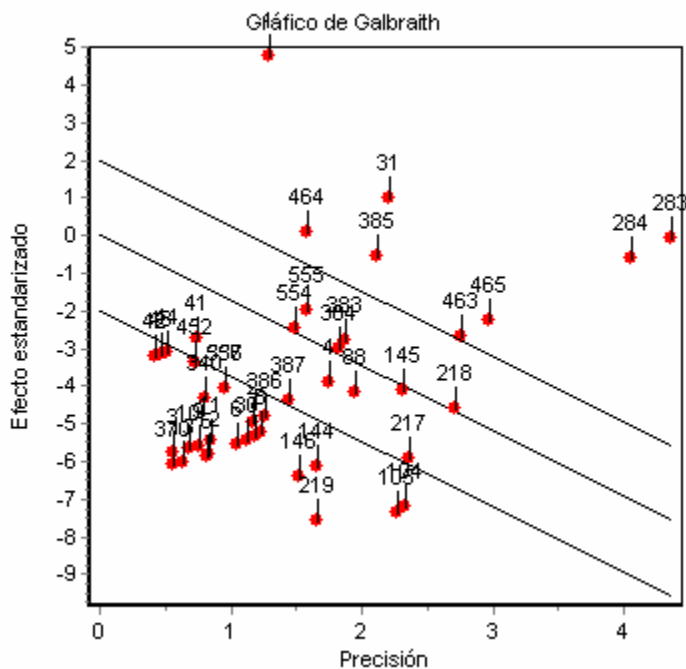


Análisis de sensibilidad.

Estudio omitido	Año	n	d	IC(95,0%)		Cambio relativo (%)
				L. Inferior	L. Superior	
264	2001	302	-3,1588	-5,3043	-1,0134	-0,71
265	2001	302	-3,1457	-5,2838	-1,0076	-1,12
81	2002	310	-2,9900	-5,0549	-0,9250	-6,01
88	2002	298	-3,3565	-5,6468	-1,0661	5,51
413	2002	260	-3,0462	-4,6348	-1,4576	-4,25
414	2002	256	-3,2312	-4,7855	-1,6770	1,57
43	2003	316	-3,2300	-5,3351	-1,1249	1,53
44	2003	316	-3,2321	-5,3377	-1,1265	1,60
41	2003	316	-3,3072	-5,4294	-1,1850	3,96
42	2003	316	-3,1427	-5,2275	-1,0578	-1,21
158	2004	312	-3,3359	-5,5007	-1,1712	4,86
183	2004	312	-2,8980	-4,9417	-0,8542	-8,91
73	2004	298	-3,4482	-5,6883	-1,2081	8,39
179	2005	312	-2,8536	-4,8889	-0,8184	-10,30
32	2005	302	-3,1478	-5,2871	-1,0085	-1,05
33	2005	302	-3,3171	-5,5608	-1,0735	4,27
GLOBAL		322	-3,1813	-5,1720	-1,1905	

Anexo N° 5. Pruebas adicionales realizadas a las investigaciones analizadas para evaluar la reducción de volumen tumoral en ratones tratados contra cáncer de mama.

Prueba de Heterogeneidad.



Sesgo de publicación

Prueba de Begg

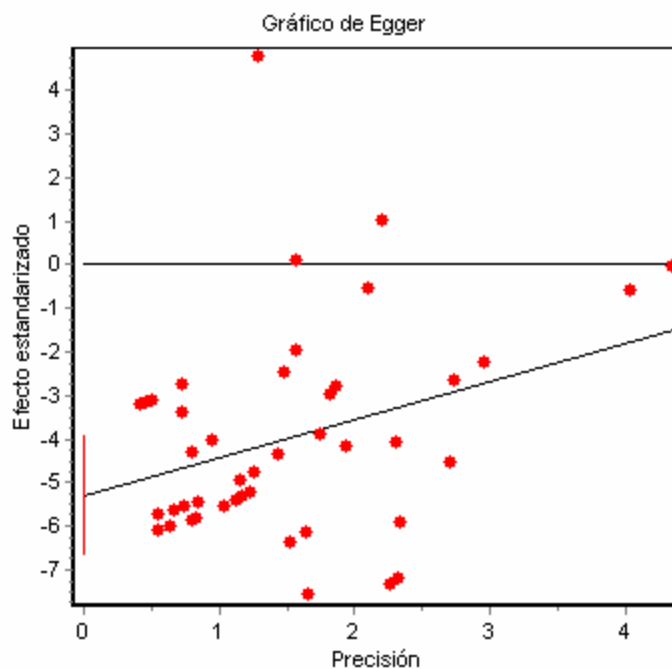
Estadístico Z Valor p

4,4510	0,0000
--------	--------

Prueba de Egger

Estadístico t gl Valor p

-7,6732	43	0,0000
---------	----	--------



Análisis de sensibilidad.

Estudio omitido	Año	n	d	IC(95,0%)		Cambio relativo (%)
				L. Inferior	L. Superior	
88	2002	1020	-3,4376	-4,0888	-2,7865	1,23
370	2002	1024	-3,2686	-3,8947	-2,6426	-3,75
554	2002	1032	-3,4443	-4,0919	-2,7966	1,43
555	2002	1032	-3,4556	-4,1037	-2,8076	1,76
556	2002	1032	-3,3775	-4,0183	-2,7367	-0,54
6	2003	1024	-3,3478	-3,9846	-2,7109	-1,42
7	2003	1024	-3,3669	-4,0065	-2,7274	-0,85
8	2003	1024	-3,3738	-4,0143	-2,7332	-0,65
9	2003	1026	-3,3107	-3,9430	-2,6784	-2,51
10	2003	1026	-3,2983	-3,9289	-2,6676	-2,87
11	2003	1026	-3,3268	-3,9612	-2,6925	-2,03
12	2003	1024	-3,3138	-3,9462	-2,6815	-2,41
13	2003	1024	-3,2812	-3,9092	-2,6532	-3,38
30	2003	1024	-3,3591	-3,9976	-2,7207	-1,08
31	2003	1024	-3,4952	-4,1359	-2,8544	2,93
41	2003	1038	-3,3901	-4,0311	-2,7492	-0,17
42	2003	1038	-3,3461	-3,9818	-2,7104	-1,47
43	2003	1038	-3,3518	-3,9884	-2,7152	-1,30
44	2003	1038	-3,3568	-3,9941	-2,7195	-1,15

1	2003	1026	-3,5392	-4,1582	-2,9202	4,22
104	2003	996	-3,4106	-4,0599	-2,7613	0,44
105	2003	996	-3,4053	-4,0532	-2,7575	0,28
283	2003	968	-3,4906	-4,1353	-2,8459	2,79
284	2003	978	-3,4935	-4,1447	-2,8423	2,88
337	2003	1032	-3,3774	-4,0182	-2,7367	-0,54
340	2003	1032	-3,3541	-3,9922	-2,7161	-1,23
2	2003	1026	-3,3736	-4,0141	-2,7331	-0,66
3	2003	1026	-3,2805	-3,9085	-2,6525	-3,40
4	2003	1024	-3,4335	-4,0829	-2,7841	1,11
5	2003	1024	-3,3099	-3,9418	-2,6780	-2,53
386	2004	1026	-3,3867	-4,0290	-2,7443	-0,27
387	2004	1026	-3,4083	-4,0537	-2,7629	0,37
463	2004	1010	-3,4765	-4,1338	-2,8192	2,38
464	2004	1034	-3,4843	-4,1283	-2,8402	2,60
465	2004	1006	-3,4828	-4,1405	-2,8251	2,56
383	2004	1026	-3,4538	-4,1045	-2,8031	1,71
384	2004	1026	-3,4494	-4,0998	-2,7990	1,58
385	2004	1026	-3,4833	-4,1309	-2,8356	2,57
452	2005	1036	-3,3719	-4,0116	-2,7323	-0,70
218	2005	1004	-3,4595	-4,1188	-2,8001	1,87
219	2005	1004	-3,3593	-3,9960	-2,7226	-1,08
144	2005	1014	-3,3880	-4,0309	-2,7450	-0,23
145	2005	1014	-3,4522	-4,1073	-2,7972	1,66
146	2005	1014	-3,3731	-4,0133	-2,7330	-0,67
217	2005	1004	-3,4305	-4,0839	-2,7770	1,02
-----			-----	-----	-----	-----
GLOBAL		1044	-3,3958	-4,0303	-2,7614	

9. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de manera muy especial a:

- A mis padres, Humberto e Isabel, por todo el cariño, y apoyo entregado, no sólo en esta etapa sino que durante toda mi vida, especialmente a mi mamá por los consejos, por su amistad, y a mi papá por siempre creer en mí y por alentarme a seguir adelante. A los dos los quiero mucho.
- A mi hermana, Alejandra, una de las personas que más admiro. Ale, gracias por ser mi amiga, por cuidarme, escucharme, apoyarme y por todo el cariño que me entregas.
- A mi familia, pero muy en especial, a mi tía Angela, por el apoyo a la distancia y por siempre estar pendiente de mí, por su cariño y por esas entretenidas y alentadoras conversaciones.
- A la Dra. Viviana Bustos, por su confianza, y apoyo, por nunca dejarme bajar los brazos, y por esas largas conversaciones que entregan muchos más conocimientos que los de una sala de clases.
- Al Dr. Marcos Moreira, por su buena disposición siempre y por ayudarme con las correcciones de la tesis.
- Al Dr. Gustavo Monti y a Paula Gadicke, por su ayuda en la parte estadística.
- A la Sra. Mireya Farias, encargada Biblioteca Medicina, por su buena disposición para ayudarme a realizar la búsqueda de artículos.
- A mis amigos, por el cariño, por entenderme y apoyarme. Por todos esos buenos momentos compartidos; que espero no terminen acá, gracias a aquellos que me apoyaron desde lejos y a los que siempre han estado a mi lado.