



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB  
CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS  
MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE  
RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL**

**Roser Esplugas Borràs**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN  
PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA.  
AVALUACIÓ *IN VIVO* I *IN VITRO* DE L'EXPRESSIÓ DELS  
miARNs-146a, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA  
ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I  
DISFUNCIÓ ENDOTELIAL.

TESI DOCTORAL  
2018

Roser Esplugas Borràs



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

Roser Esplugas Borràs

**Efectes del tractament amb radioteràpia en pacients amb  
càncer de mama. Avaluació in vivo i in vitro de l'expressió dels  
miARN-146a, -155, -221 i -222 i de la seva associació amb  
factors de risc cardiovasculars, resposta inflamatòria i  
disfunció endotelial**

TESI DOCTORAL

Dirigida per la Dra. Montserrat Bellés Mateu,  
la Dra. Victòria Linares Vidal i el Dr. Joan Carles Vallvé Torrente

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2018

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "Efectes del tractament amb radioteràpia en pacients amb càncer de mama. Avaluació in vivo i in vitro de l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222 i de la seva associació amb factors de risc cardiovasculars, resposta inflamatòria i disfunció endotelial", que presenta Roser Esplugas Borràs per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat.

Reus, 10 de setembre del 2018

El/s director/s de la tesi doctoral

Dra. Montserrat Bellés Mateu

Dra. Victòria Linares Vidal

Dr. Joan Carles Vallvé Torrente

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

A la meva família.

Papa, mama,

Josep Ramon, Mercè, David

i àvia,

us estimo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

# AGRAÏMENTS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

Roser Esplugas Borràs

En primer lloc, vull agrair als directors de tesi tota la seva dedicació, treball, temps i esforç. Gràcies per haver fet aquest camí fàcil, per haver estat pendents de mi i per tot allò que m'heu ensenyat.

En especial, vull donar les gràcies a la Noemí. Des del primer dia, m'has fet sentir com a casa. Les hores de laboratori amb aquell bon ambient s'han fet curtes. M'has donat sempre suport i he après molt de tu, personalment i professionalment.

També vull agrair a les companyes i companys de feina haver compartit amb mi aquests tres anys. Heu omplert aquesta etapa amb estones de felicitat, riure i afecte. Gràcies per la vostra ajuda i amistat.

Finalment, vull agrair als de casa, a tots els amics i amigues, i als tiets, tietes, cosines i cunyada, l'interès en la tesi, el suport i els ànims. Gràcies per ser-hi avui i sempre.

Gràcies a totes i tots!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs



ABREVIATURES .....	1
INTRODUCCIÓ .....	5
1. Aproximació al concepte <i>càncer</i> .....	5
1.1 Edpidemiologia del càncer .....	6
2. Càncer de mama .....	8
2.1 Epidemiologia del càncer de mama .....	8
2.2 Glàndula mamària .....	10
2.3 Factors de risc del càncer de mama .....	12
2.4 Tipus de càncer de mama .....	13
2.5 Tractament del càncer de mama .....	15
2.5.1 Radioteràpia en el càncer de mama .....	17
3. Malaltia cardiovascular associada a la radioteràpia .....	20
3.1 Factors de risc cardiovasculars .....	20
3.2 Tipus de malalties cardiovasculars associades a la radioteràpia .....	21
4. Aterosclerosi .....	22
4.1 Disfunció endotelial .....	22
4.1.1 Estrès oxidatiu .....	23
4.1.2 Molècules d'adhesió .....	25
4.1.3 Citocines .....	27

4.2 Placa ateroscleròtica .....	29
5. Disfunció endotelial derivada de la radioteràpia .....	30
6. miARN.....	31
6.1 miARN en sang.....	33
6.2 miARN-146a, -155, -221 i -222 .....	35
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	43
Hipòtesi .....	43
Objectius .....	44
TREBALL 1.....	49
TREBALL 2.....	75
TREBALL 3.....	97
DISCUSSIÓ GENERAL .....	121
CONCLUSIONS.....	133
REFERÈNCIES.....	137

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

# ABREVIATURES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

**Ago** – proteïna Argonaute

**AGTR1** – receptor de l'angiotensina del tipus I

**ARNm** – ARN missatger

**ATP** – trifosfat d'adenosina

**BCL6** – proteïna 6 del limfoma de cèl·lules B

**BRCA1** – gen càncer de mama 1

**BRCA2** – gen càncer de mama 2

**CARHSP1** – proteïna estable a la calor regulada per calci 1

**CML** – cèl·lules musculars llises

**ERK1** – proteïna quinasa regulada per senyals extracel·lulars 1

**ERK2** – proteïna quinasa regulada per senyals extracel·lulars 2

**HDL** – colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat

**HER2** – factor de creixement epidèrmic humà

**HUVEC** – cèl·lules endotelials de vena umbilical humana

**ICAM-1** – molècula d'adhesió intracelular-1

**ICAM-1s** – ICAM-1 soluble

**IFN** – interferó

**IL** – interleucina

**IRAK1** – quinasa associada al receptor d'IL-1

**LDH** – lactat deshidrogenasa

**LDL** – colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat

**LDLox** – LDL oxidades

**M-CSF 1** – factor estimulant de colònies de macròfags 1

**MCP-1** – proteïna quimiotàctica de monòcits-1

**MCV** – malalties cardiovasculars

**MCV-RT** – malaltia cardiovascular associada a la radioteràpia

**miARN** – microàcids ribonucleics

**MMP** – metaloproteases de la matriu

**MyD88** – resposta primària de diferenciació mioide 88

**NO** – òxid nítric

**NF- $\kappa$ B** – factor de transcripció nuclear kappa  $\beta$

**NK** – natural killers

**ORF** – marcs oberts de lectura

**pre-miARN** – miARN precursor

**pri-ARN** – miARN primaris

**RISC** – complex silenciador induït per ARN

**RT** – radioteràpia

**Selectina-Es** – selectina-E soluble

**SOCS1** – supressor de la senyalització de citocines 1

**TGF- $\beta$**  – factor de creixement tumoral  $\beta$

**TNF** – factor de necrosi tumoral

**TRAF6** – factor associat al receptor del TNF

**UTR** – regió no traduïda

**VCAM-1** – molècula d'adhesió de la cèl·lula vascular-1

**VCAM-1s** – VCAM-1 soluble

**ZO-1** – Zonula occludens-1

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL  
Roser Esplugas Borràs

# INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs



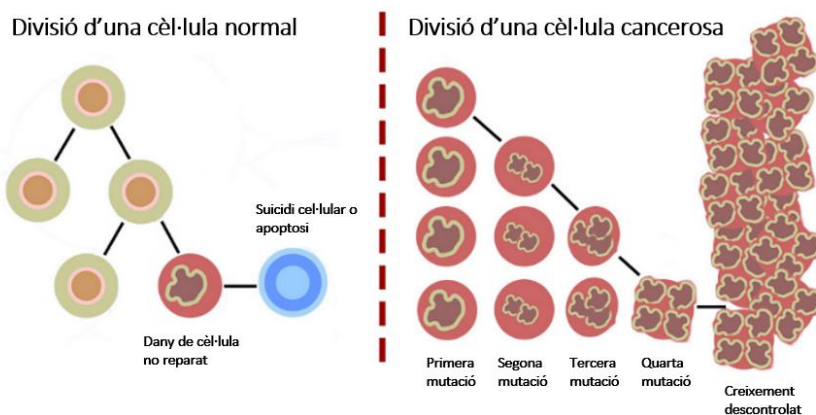
## 1. APROXIMACIÓ AL CONCEPTE CÀNCER

El càncer és un grup de malalties caracteritzades per un creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules que envaeixen i danyen els teixits i òrgans. Les cèl·lules danyades, que en condicions normals morien, sobreviuen i a més, es formen noves cèl·lules innecessàries (Figura 1). El càncer és resultat de dos processos successius: l'augment de la proliferació d'un grup de cèl·lules, anomenades *tumor* o *neoplàsia*, i la posterior adquisició de capacitat invasiva en aquestes cèl·lules, que les permeten escapar del lloc natural en l'organisme i colonitzar i proliferar en altres teixits o òrgans, procés conegut com a *metàstasi*. Ambdues alteracions són necessàries per definir un càncer. Si només té lloc l'augment del creixement d'un grup de cèl·lules en un lloc concret, es parla de *tumor benigne*. L'extirpació quirúrgica dels tumors benignes permeten la curació completa. Quan les cèl·lules tumorals són capaces d'envair els teixits circumdants o distants a través del torrent sanguini circulatori o limfàtic, és a dir, es forma metàstasi, es parla d'un *tumor maligne* o càncer. Les metàstasis són les responsables de la majoria de morts per càncer (1).

El càncer és considerat una malaltia genètica, és a dir, és causada per canvis en els gens anomenats *mutacions* que controlen les funcions cel·lulars, especialment el creixement i la divisió. Aquesta mutació confereix a la cèl·lula una major capacitat de proliferació. El càncer pot ser ocasionat per mutacions en una sola cèl·lula i pot tardar anys en formar un tumor. Les mutacions en els gens poden ser heretables, poden esdevenir-se casualment en el moment de la divisió cel·lular o com a conseqüència d'exposicions ambientals tals com el tabac o les radiacions. Per a que aquests canvis siguin heretables cal que les mutacions es produeixin en les cèl·lules de línia germinal (espermatozoides o òvuls). Per exemple, d'un 5% a 10% dels càncers de mama són heretables (2).

Els humans estem formats per trilions de cèl·lules, i el càncer pot iniciar-se en qualsevol part del cos. Hi ha més de cent tipus de càncer i reben el nom de l'òrgan o teixit en el qual s'ha format o bé del tipus de cèl·lula que els forma. Per exemple, un càncer de mama s'origina a les glàndules mamàries i un *carcinoma* és un càncer que s'origina en cèl·lules de la pell o altres teixits que cobreixen o revesteixen òrgans interns (3). El 90% dels tumors són carcinomes ja que les cèl·lules epitelials són les cèl·lules que es mantenen més temps amb capacitat de dividir-se al llarg de la vida de l'individu. A més, a causa de la seva localització, les cèl·lules epitelials estan exposades a l'acció d'agents tòxics de tot tipus que alteren el seu comportament. Altres tipus de càncer inclouen *sarcomes*, derivats de cèl·lules del teixit connectiu o muscular; *leucèmies*, *limfomes* i *mielomes*,

originats en leucòcits, limfòcits i cèl·lules de la medul·la òssia, respectivament; i *neuroblastomes* i *gliomes*, que deriven de neuroblasts i glies, respectivament (4).



**Figura 1. Diferències entre la divisió cel·lular d'una cèl·lula normal i una cèl·lula cancerosa.**

Adaptada de: Understanding Cancer, What is cancer [Internet]. Cancer National Institute [juliol 2018]. Disponible a: <http://ncinagpur.in/detail/understanding-cancer>

## 1.1 Epidemiologia del càncer

El càncer és una de les malalties més importants arreu del món. La detecció en fase avançada, així com la falta de diagnòstic i tractament (menys del 30% dels països amb ingressos baixos n'ofereixen), en són agreujants (5).

Tot i que la incidència en l'àmbit mundial és difícil de calcular, s'estima que al llarg del 2012 van generar-se 14,1 milions de casos nous. Així mateix, es creu que aquesta xifra arribarà als 23,6 milions anuals abans del 2030. Pel que fa a la prevalença, s'estima que el 2012 hi va haver 32,5 milions de persones diagnosticades en els 5 anys previs que van sobreviure l'any 2012 (6). A més, les estadístiques més recents constaten que representa una de les principals causes de mort arreu del món, després de la cardiopatia isquèmica, accidents cardiovasculars i malalties o infeccions de l'aparell respiratori (Figura 2). L'any 2015 el càncer va causar la mort d'1 de cada 6 persones. Els cinc tipus de càncer que van provocar més defuncions van ser el càncer pulmonar, hepàtic, colorectal, gàstric i mamari (Figura 3). Un terç del total dels 8,8 milions de morts per càncer són degudes a factors de risc conductuals i dietètics, tals com l'índex de massa corporal elevat, la ingesta reduïda de fruites i verdures, la manca d'activitat física i el consum de tabac i alcohol. La resta, són causades per infeccions oncogèniques com per exemple el virus de l'hepatitis o el

papil·loma humà. A més, sobre el 70% de les morts s'enregistren als països amb ingressos mitjans i baixos (5).

### Principals causes de mort al món (2016)

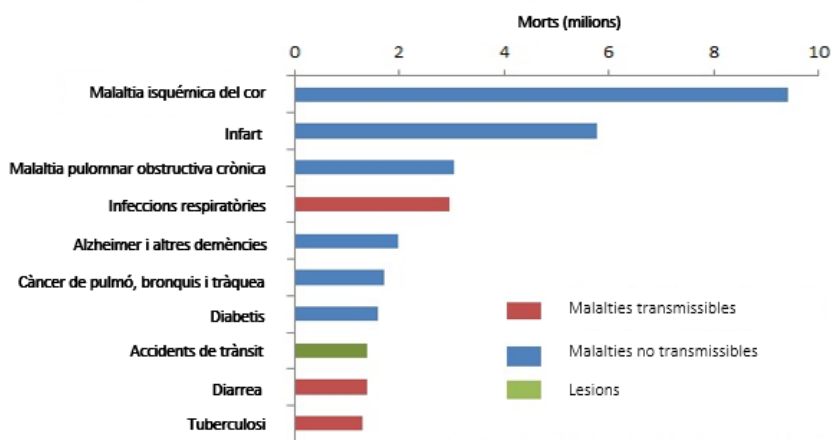


Figura 2. Principals causes de mort arreu del món (2016).

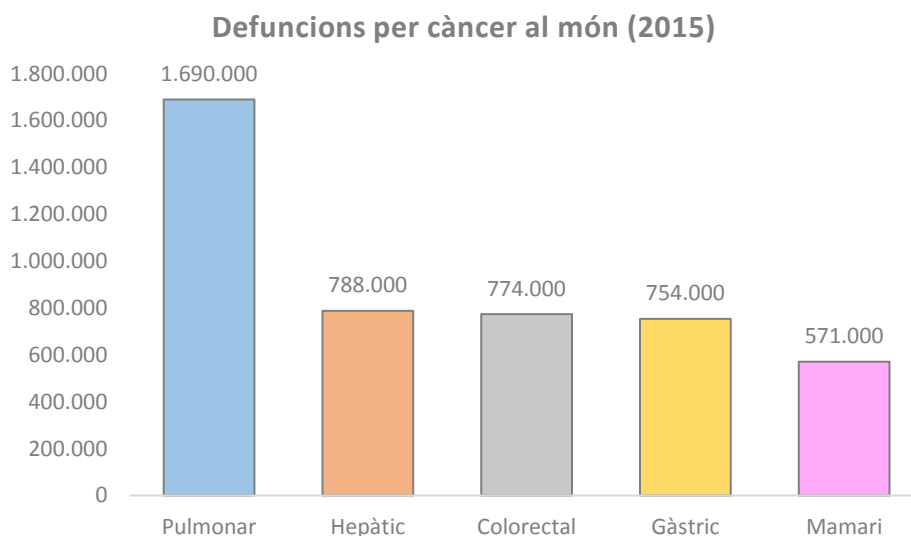
Adaptada de: The top 10 causes of death [Internet]. *World Health Organization* [juliol 2018].

Disponible a: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

A Espanya, l'any 2017 es van diagnosticar 228.482 casos nous. La prevalença és alta i varia segons els diversos tipus de càncer (7). D'acord amb el Centro Nacional de Epidemiologia del Instituto de Salud Carlos III, els tumors són la causa de mortalitat més freqüent en homes (65.014 morts), mentre que en són la segona causa en dones (41.020 morts) després de les malalties cardiovasculars. El 2015 un de cada tres homes i una de cada cinc dones a Espanya van morir de càncer (8).

A Catalunya, durant el període 2008-2012, es van diagnosticar anualment 48.171 nous casos de càncer; 27.352 en homes i 20.819 en dones. S'estima que 107.778 persones patien aquesta malaltia l'any 2012, la supervivència de les quals varia segons el tipus de càncer. Per exemple, és d'un 80% en pacients amb càncer de pròstata i mama, mentre que en representa un 50% aproximadament dels càncers de còlon i recte. D'altra banda, només entre 10% i un 18% dels malalts amb càncer de pulmó sobreviu. Anualment s'estima que a Catalunya moren aproximadament 16.554 persones de càncer (10.128 homes i 6.426 dones), i igual que a l'Estat espanyol, és la primera causa de mortalitat

en els homes i la segona en les dones (9). Un dels càncers més freqüents al món, i també a Catalunya, és el càncer de mama, el qual afecta principalment la població femenina (10).



**Figura 3. Principals defuncions causades pel càncer arreu del món (2015)**

Font: Càncer. Datos y cifras [Internet]. Organización Mundial de la Salud (OMS) [julio 2018]. Disponible a: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

## 2. CÀNCER DE MAMA

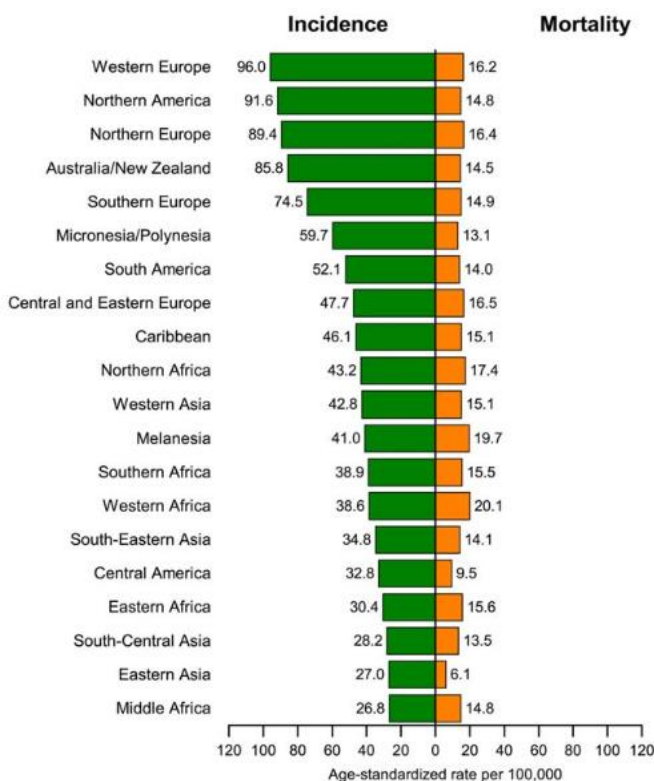
### 2.1 Epidemiologia del càncer de mama

El càncer de mama s'origina en el teixit mamari i, generalment, es presenta com a tumor maligne. Tanmateix, la majoria de tumors que estan localitzats a la mama són de caràcter benigne (5).

En l'àmbit mundial s'estima que l'any 2012 el càncer de mama va ser el segon càncer més freqüent entre la població, després del de pulmó, i el més estès en la població femenina. Es van diagnosticar 1,7 milions de casos nous al món, que representen aproximadament un 12% dels casos nous de càncer, i un 25% del total de càncers en dones. La incidència i mortalitat d'aquesta malaltia varia segons el país (Figura 4). És freqüent en països desenvolupats i Àfrica i Àsia són els continents on el càncer de mama té menor incidència. A més, s'estima que van sobreviure 6,2 milions de persones

diagnosticades en els 5 anys previs, i en va causar la mort de mig milió en el mateix any (10), així com també l'any 2015; és el cinquè càncer més mortal arreu del món (5).

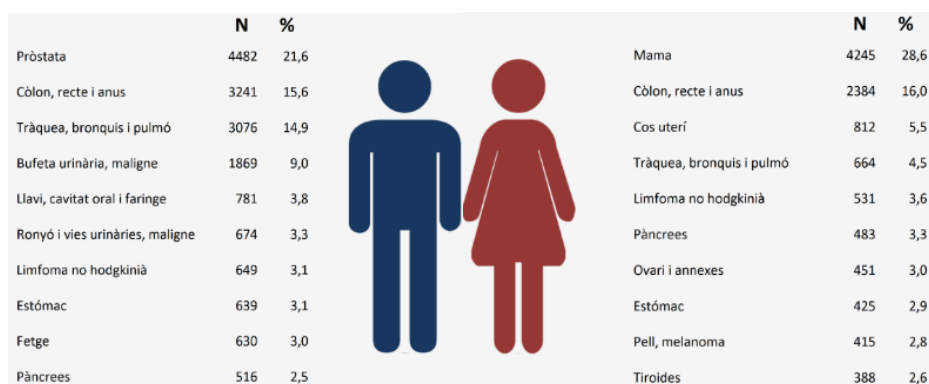
A Espanya, una de cada 8 dones es veu afectada per aquesta malaltia al llarg de la seva vida. Segons la Sociedad Española de Oncología Médica, la seva incidència és de 22.747 nous casos de càncer (2015), per darrere dels càncers colorectals, de pròstata i pulmó. La prevalença d'aquesta malaltia va ser d'uns 900 per cada 100.000 en 5 anys (2012). Així mateix, va provocar la mort de 6.213 persones el 2014 (7). La incidència en homes és molt baixa, representa un 1% del total dels pacients. L'any 2015 cap home va ser diagnosticat de càncer de mama.



**Figura 4. Incidència i mortalitat estimada del càncer de mama arreu del món (2012).**

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015 Mar;65(2):87-108

A Catalunya, el càncer més prevalent en els homes és el de pròstata, mentre que en les dones és el càncer de mama (Figura 5). L'any 2017 es van diagnosticar 4.563 casos i van morir 979 pacients a causa de la malaltia, i es va mostrar una supervivència relativa del 86,5%. En aquell any, cap home va ser diagnosticat ni va morir a causa d'aquest tipus de tumor (9).



**Figura 5. Casos de càncer incidents anuals i freqüència relativa de les 10 localitzacions més freqüents a Catalunya (2008-2012).**

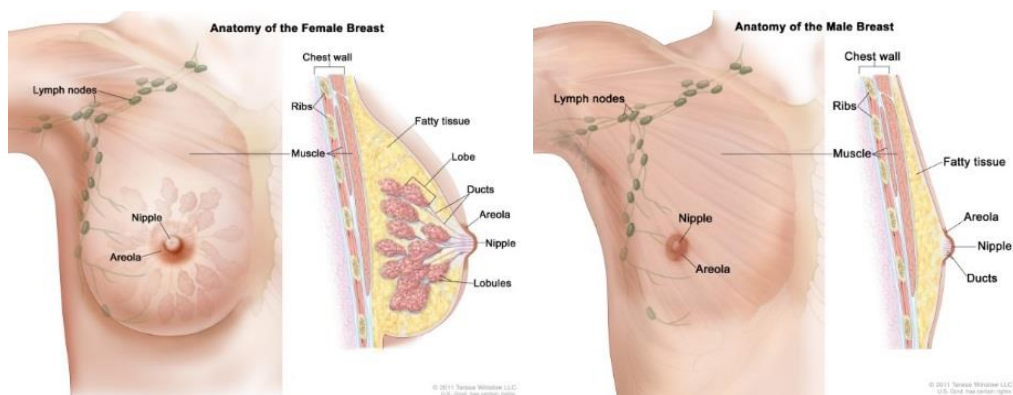
El Càncer a Catalunya. MONOGRAFIA 2016. Registre del Càncer de Catalunya. Pla Director d'Oncologia [Internet]. Gencat [juliol 2018]. Disponible a:  
<http://cancer.gencat.cat/web/ca/professionals/estadistiques/MONO-FINAL.pdf>

## 2.2 Glàndula mamària

La glàndula mamària o mama és un òrgan glandular ubicat al pit, entre la segona i sisena costella en l'eix vertical i entre l'estern i la línia mitja axil·lar en l'eix horitzontal. La part externa de la mama està formada pel mugró i l'arèola i la composició de la part interna varia entre homes i dones. La mama femenina és l'encarregada de la formació de la llet durant la lactància. Està constituïda per 10-20 lòbuls, cadascun dels quals consta d'un sistema extens de conductes secretors i lobulets que es troben inclosos en un teixit conjuntiu lax. La morfologia dels lobulets depèn de si la glàndula és lactant o no. En la no lactant, els lobulets són petits i estan compostos per unitats estructurals estretes, els alvèols. En la glàndula lactant, els lobulets són grans i estan format per alvèols amplis. L'epiteli dels alvèols produeix la llet, que conté majoritàriament proteïnes, lactosa i greixos. Els greixos se secreten per un mecanisme apocrí i els carbohidrats abandonen les cèl·lules per exocitosi. Els lòbuls estan connectats a uns conductes anomenats ductes, els quals condueixen la llet fins al mugró. Lòbuls i ductes estan rodejats per teixit fibrós i adipós, que conformen la massa

principal de la mama, i vasos sanguinis, vasos limfàtics i fibroblasts. L'estructura de la mama masculina és gairebé idèntica a la de la mama femenina, tret que la mama masculina no conté ni els ductes ni els lòbuls especialitzats en la producció de llet (11) (Figura 6).

La glàndula mamària està subjecta a regulació hormonal. Per al desenvolupament normal de la glàndula mamària femenina, es requereix d'*estrògens*, *progesterona* i factors de creixement. L'estrògen és una hormona alliberada pels ovaris que s'encarrega de l'estimulació del creixement cel·lular i elongació durant la morfogènesi dels ductes. A més, durant l'embaràs participa en el creixement i manteniment de les cèl·lules alveolars. La progesterona es produeix principalment en els ovaris i durant l'embaràs en la placenta. Aquesta hormona és l'encarregada de promoure el creixement dels alvèols requerits per a la lactància. Durant l'embaràs els estrògens i la progesterona actuen conjuntament amb la *prolactina*. La prolactina és una hormona produïda majoritàriament per la glàndula pituïtària i per l'epiteli mamari. S'encarrega, juntament amb la progesterona, de la diferenciació dels alvèols. A més, regula la producció de progesterona dels ovaris. Durant la lactància, la prolactina estimula sobretot la producció làctia. Els factors de creixement, com el seu nom indica, són substàncies, la majoria proteïnes, que participen en el creixement cel·lular. Els factors de creixement epidèrmics potencien els efectes proliferatius de la progesterona i dels estrògens incrementant la formació de ductes induïda per estrògens i la ramificació induïda per progesterona (12).



**Figura 6. Estructura anatòmica de la glàndula mamària femenina i masculina.**

Diccionario de càncer. Glàndula mamària [Internet]. Institut Nacional del Càncer [juliol 2018]. Disponible a:

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/glandula-mamaria>

### 2.3 Factors de risc del càncer de mama

Existeixen alguns factors de risc que augmenten la probabilitat de desenvolupar càncer de mama. Només entre el 5% i el 10% és ocasionat per factors hereditaris (predisposició genètica), la resta s'origina de manera esporàdica. Els gens anomenats *càncer de mama 1* (BRCA1) i *càncer de mama 2* (BRCA2) són gens supressors de tumors. Tal com indica el nom, la seva funció és evitar que les cèl·lules creixin fora de control per impedir la formació de càncer. Mutacions en aquests gens alteren aquesta activitat i poden ser heretables de pares a fills. Els gens BRCA1 i BRCA2 estan vinculats especialment al desenvolupament de càncer de mama i ovari. També existeixen altres alteracions genètiques relacionades amb càncer de mama de manera menys freqüent, tals com, per exemple, els gens MLH1 i MLH2; que codifiquen per a proteïnes reparadores del ADN. Per això, els antecedents familiars de càncer de mama o ovari en representen un factor de risc. Tanmateix, els antecedents personals de càncer de mama o ovari, és a dir, si un pacient n'ha presentat prèviament, també augmenten la probabilitat de desenvolupar la malaltia (13).

Les cèl·lules canceroses de mama, igual que les cèl·lules sanes, poden utilitzar els estrògens, progesterona i factors de creixement hormonals per al seu creixement i desenvolupament. És per aquest motiu que els elevats nivells d'aquestes hormones són un factor de risc per al desenvolupament del càncer de mama. Les dones tenen una incidència 100 vegades més gran que els homes, perquè en presenten concentracions més elevades. L'edat també representa un factor de risc ja que la majoria de pacients desenvolupen la malaltia passats els 50 anys. Tot i que en la menopausa disminueix la producció de tals hormones, l'exposició perllongada a les cèl·lules de la mama al llarg de la vida n'és un factor de risc. Així mateix, també tenen un risc més gran de desenvolupar càncer de mama les dones que tenen per primera vegada la regla abans dels 12 anys o que tenen la menopausa després dels 55. Per contra, l'embaràs i la lactància protegeixen contra aquest tipus de càncer perquè promouen la disminució dels nivells d'estrògens. Tenen menor risc les dones que tenen fills més aviat, en tenen més o donen el pit de manera perllongada (14). S'ha constatat que les dones que utilitzen pastilles anticonceptives, les quals combinen l'administració d'estrògens i progestina (un sintètic que actua mimetitzant la progesterona), durant un període llarg de temps, 30 anys aproximadament, tenen una major probabilitat de desenvolupar càncer de mama; tot i que el risc és petit. A més, les teràpies de reemplaçament hormonal, dirigides a millorar la qualitat de vida de les dones durant la menopausa, estan associades amb una major incidència del càncer de mama (13) (Figura 7).



S'ha observat que l'origen ètnic pot influir en el desenvolupament del càncer de mama. Les dones caucàsiques presenten més risc, mentre que les asiàtiques i africanes en presenten menys. Tot i que se'n desconeix la raó, es considera que pot ser degut al diferent estil de vida. Per exemple, les dones caucàsiques tenen fills a edats més avançades que les dones asiàtiques i africanes (14).



**Figura 7. Alguns dels factors de risc del càncer de mama.**

Adaptada de: Factores de riesgo. Càncer de mama [Internet]. Oncology Health [juliol 2018]. Disponible a:

<http://oncologyhealth.blogspot.com/2016/11/factores-de-riesgo-un-factor-de-riesgo.html>

## 2.4 Tipus de càncer de mama

Dues maneres de classificar els càncers de mama són segons la histologia o en funció de les característiques moleculars dels tumors. Pel que fa a la histologia, tots els tipus de càncer de mama són carcinomes. Es classifiquen els carcinomes de mama segons el seu lloc d'origen i agressivitat. Pel que fa a l'origen, el carcinoma ductal comença dins dels conductes, el carcinoma lobular als lòbuls i el carcinoma cribiforme s'origina al teixit fibrós de la mama i crea formacions semblants a nius entre els conductes i els lòbuls. A la vegada, i pel que fa a l'agressivitat, aquests carcinomes poden trobar-se in situ, ser invasius o inflamatoris. Un carcinoma in situ està localitzat i no dissemina cap a fora, per la qual cosa quasi sempre es pot curar amb tractament. Contràriament, el tipus invasiu dissemina pels teixits circumdants i, per tant, és més agressiu. En el càncer de mama

inflamatori, les cèl·lules canceroses bloquegen els vasos limfàtics i provoquen l'envermelliment i la inflamació de la mama. El càncer de mama més freqüent, sobre el 80%, és el carcinoma ductal invasiu. Existeixen, a la vegada, subtipus del carcinoma ductal invasiu anomenats *tubular*, *medul·lar*, *mucinos* i *papil·lar* (15, 16) (Figura 8).

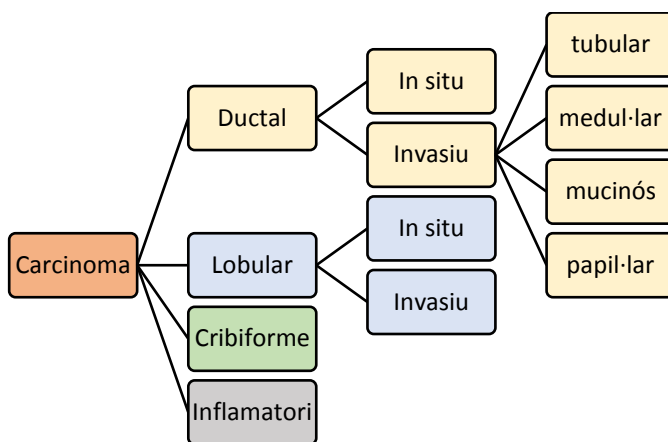


Figura 8. Classificació histològica del càncer de mama.

Les característiques moleculars dels tumors són importants, ja que contribueixen a la determinació d'un o altre tipus de tractament. Els càncers de mama es classifiquen molecularment segons la presència de receptors hormonals en els tumors tals com receptors d'estrògens, de progesterona i del *receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà* (HER2); així com també l'índex de proliferació Ki-67. Si el tumor presenta receptors per a estrògens i progesterona, aquest les utilitzarà per créixer. Així mateix, els tumors de mama poden presentar grans quantitats d'HER2, la funció del qual és estimular el creixement i la divisió de les cèl·lules canceroses. Per tant, els tumors poden ser positius (presència) per a receptors d'estrogen, progesterona i/o HER2; o bé negatius (absència). D'altra banda, existeix una proteïna anomenada Ki-67 que s'encarrega de preparar la cèl·lula per a la divisió. Com més cèl·lules positives per a aquesta proteïna, més gran és l'índex de proliferació Ki-67 i més ràpida és la divisió cel·lular. Així doncs, avaluant la presència d'aquests receptors i de la proteïna Ki-67, els càncers de mama es diferencien en tipus *Luminal A*, *Luminal B*, *HER2 positiu* i *triple negatiu*. Els càncers Luminal són positius per als receptors d'estrogen i progesterona. Els Luminal A tenen un Ki-67 menor del 14%, i els Luminal B per sobre. A més, aquests

últims també poden tenir certa expressió d'HER2. Tant en pacients Luminal A com B, el pronòstic es considera bo. Són HER2 positius els càncers que presenten HER2, però a la vegada són negatius per als receptors d'estrogen i progesterona. L'índex de proliferació és elevat i presenten mal pronòstic. Finalment, en els triple negatiu no hi ha presència de cap dels receptors, i el seu Ki-67 també és elevat; és el més agressiu (17) (Figura 9).

Subtipus	Receptors hormonals	Expressió HER2	Índex de proliferació Ki-67	Pronòstic
Luminal A	ER i PR positius	Negatiu	Baix (<14%)	Bo
Luminal B	ER i PR positius	Negatiu/Baixa expressió	Alt (>14%)	Bo
HER2 positiu	ER i PR negatius	Alta expressió	Alt	Dolent
Triple Negatiu	ER i PR negatius	Negatiu	Alt	Molt dolent

**Figura 9. Classificació molecular del càncer de mama.**

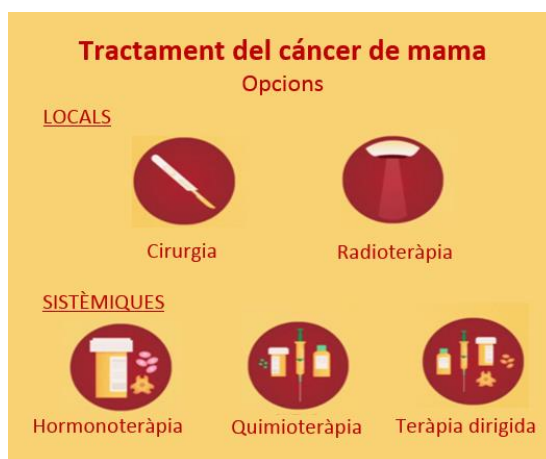
Adaptada de: Álvarez C, Vich P, Brusint B, Cuadrado C, Díaz N, Robles Díaz L. [Update of breast cancer in Primary Care (III/V)]. *Semergen*. 2014;40(8):460-72. Epub 2014 Jun 18.

## 2.5 Tractament del càncer de mama

El tractament del càncer de mama inclou teràpies locals i sistèmiques. Les teràpies locals engloben la cirurgia i la radioteràpia (RT), i les sistèmiques; la quimioteràpia, l'hormonoteràpia i la teràpia dirigida (Figura 10). El pla de tractament, és a dir, la tria d'una o d'algunes d'aquestes teràpies depèn de diversos factors; incloent els propis del pacient tals com l'edat, estat de salut o estat de menopausa del pacient, presència de mutacions en gens relacionats amb el càncer de mama (com els BRCA1 o BRCA2); o els característics del tumor com el tipus molecular, mida, ubicació i/o estadi (18).

Quan una teràpia s'administra abans de la cirurgia per tal de reduir la mida del tumor, s'anomena *neoadjuvant*. D'altra banda, la teràpia adjuvant és la que s'aplica postcirurgia i intenta reduir el risc de recurrència (18). A la majoria de pacients se'ls practica cirurgia amb la finalitat d'extirpar el

càncer de mama. La *lumpectomia* és la cirurgia en què s'extreu el tumor i una petita quantitat del teixit que l'envolta. En canvi, en la *mastectomia* s'elimina tot el teixit mamari i es practica quan el càncer està molt estès. Si, juntament amb la mama, també s'extreuen els ganglis limfàtics perquè estan afectats, llavors es diu que s'ha fet una *mastectomia radical modificada* (19).



**Figura 10. Pla de tractament del càncer de mama.**

Adaptada de: Cancer Treatment. What You Need To Know About Breast Cancer Treatment [Internet]. University Cancer Center [juliol 2018]. Disponible a: <https://medigence.com/blog/breast-cancer-treatment-cost-guide-top-hospitals/>

La quimioteràpia és l'ús de substàncies químiques per bloquejar diverses etapes del cicle cel·lular, per impedir que creixin o es divideixin. Aquests fàrmacs no distingeixen entre cèl·lules sanes o canceroses. Com que les canceroses es divideixen més ràpidament, la quimioteràpia actua principalment sobre aquestes cèl·lules. Generalment, aquest tractament és sistèmic, és a dir, actua per tot el cos, i destrueix qualsevol cèl·lula cancerosa que hagi fet metàstasi, a més de les que se situen en el mateix tumor. Alguns exemples són les antraciclina, taxans, 5-fluorouracil, ciclofosfamida o carboplatí (20).

L'hormonoteràpia s'aplica quan les cèl·lules del càncer de mama presenten receptors hormonals, d'èstrogen i progesterona, és a dir, en els tipus de càncer de mama Luminal A i B. Aquest tractament impedeix que les cèl·lules canceroses utilitzin aquestes hormones per créixer. Per exemple, el tamoxifè bloqueja els receptors d'èstrogen; i els inhibidors d'aromatasa disminueixen els nivells

d'estrogen del cos per impedir que l'enzim aromatassa converteixi l'hormona androgen en estrogen. L'anastrozole, el letrozole i el exemestà són tipus d'inhibidors d'aromatassa (21).

La teràpia dirigida és un tractament que ataca gens o proteïnes específiques de cèl·lules canceroses o cèl·lules del teixit que contribueixen al creixement o supervivència del càncer. Aquesta teràpia ataca cèl·lules cancerígenes sense danyar les normals. Un exemple de teràpia dirigida és el fàrmac Trastuzumab, que bloqueja les proteïnes HER2 i atura el creixement del càncer. S'aplica en pacients amb el tipus de càncer de mama HER2 i als Luminal B que siguin positius per a aquests receptors (22).

La RT és un tipus de tractament fonamentada en l'ús de partícules amb alta potència que s'encarreguen de destruir les cèl·lules canceroses del lloc on s'aplica la radiació (tractament local). La meitat dels pacients amb càncer de mama reben RT i és un tractament molt efectiu ja que redueix el risc de recurrència i mortalitat (23).

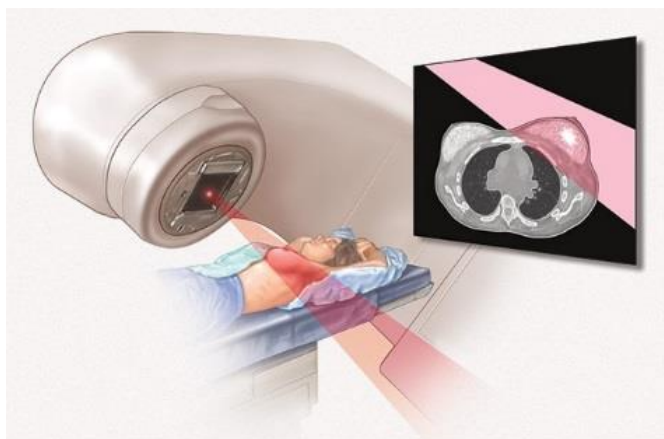
### 2.5.1 Radioteràpia en el càncer de mama

L'objectiu terapèutic de la RT consisteix en irradiar de forma uniforme la zona del cos on es troba situat el càncer, procurant afectar mínimament els teixits normals de la vora. La RT danya el teixit tumoral que sol ser més sensible a la radiació i té menys capacitat per reparar els danys produïts per la radiació que els teixits normals (24).

Hi ha dos tipus de RT per al tractament del càncer de mama: externa o interna. La RT externa és la més comuna i només s'omet en pocs pacients amb baix risc. S'administra des d'una màquina d'alta precisió de gran mida anomenada *accelerador lineal*. La radiació s'emet des de múltiples direccions a l'àrea afectada pel càncer. S'utilitzen 3 tipus de partícules en la RT externa:  *fotons, protons i electrons*. Els fotons, definits com a partícules portadores d'energia electromagnètica, s'utilitzen en la majoria d'acceleradors lineals. Els fotons dispersen fragments petits de radiació en la seva trajectòria i poden arribar a zones profundes del cos. Els protons són partícules de càrrega positiva que no dispersen la radiació en la trajectòria i s'aturen quan arriben al tumor. Les seves propietats físiques permeten que la RT estigui més dirigida i que la dosi de radiació sigui més petita. Tot i que l'ús d'aquesta RT redueix la quantitat de radiació exposada al teixit normal, el seu alt cost i mida de les màquines en limiten el seu ús. Els electrons són partícules de càrrega negativa i el seu ús en la

RT és molt reduït ja que no pot arribar a zones llunyanes del cos, per la qual cosa només s'utilitza quan el tumor és molt proper a la superfície (24) (Figura 11).

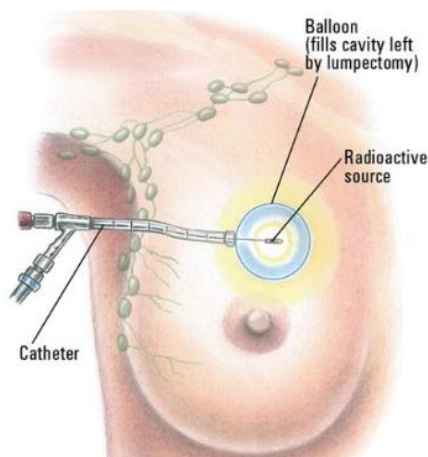
Els tipus de RT externa que utilitzen raigs X com a fotons són, entre altres, la RT d'intensitat modulada i la parcial. En la RT d'intensitat modulada, s'apliquen molts feixos de radiació de mida petita sobre la mama i se'n modifica la intensitat per tal d'apuntar amb més precisió al tumor i, a la vegada, distribuir la radiació de manera més uniforme. La RT parcial de la mama s'aplica directament a l'àrea del tumor, quan és petit i poc agressiu, en lloc de fer-ho a la mama sencera; així permet reduir el temps d'exposició a la radiació (24).



**Figura 11. RT externa en càncer de mama.**

Radiation therapy for breast cancer [Internet]. Mayo Foundation for Medical Education and Research [juliol 2018]. Disponible a:  
<https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/radiation-therapy-for-breast-cancer/about/pac-20384940>

En la RT interna, anomenada també *braquiteràpia*, es col·loquen fonts radioactives dins el cos, al lloc del tumor de la mama. Les fonts de radiació poden ser líquides o sòlides. La braquiteràpia més freqüent és la braquiteràpia intracavitària, en la qual es col·loca un dispositiu en la mama que sobresurt pel pit per on s'introdueixen una o diverses fonts de radiació durant un cert temps. D'altra banda, en la braquiteràpia intersticial s'insereixen catèters al pit, pels quals s'introdueixen partícules radioactives i es treuen al cap d'uns quants dies (25) (Figura 12).



**Figura 12. Braquiteràpia intersticial en càncer de mama.**

Breast Cancer. Treatment Options [Internet].

Patient Resource [juliol 2018]. Disponible a:

[https://www.patientresource.com/Breast\\_Cancer\\_Treatment.aspx](https://www.patientresource.com/Breast_Cancer_Treatment.aspx)

La RT no destrueix immediatament les cèl·lules canceroses, és per això que es requereixen dies o setmanes de tractament. La RT s'aplica en varies sessions durant un cert període de temps que varien, conjuntament de la dosi, en funció de les característiques del pacient i del tumor. En el fraccionament accelerat, s'administren dosis altes aplicades diàriament o setmanalment amb la finalitat de reduir el número de setmanes de tractament. En l'hiperfraccionament, la dosi és més petita i s'aplica més d'una vegada al dia. Contràriament, en l'hipofraccionament les dosis són més grans i s'administren una vegada al dia amb l'objectiu de reduir el nombre de tractaments (26).

La RT, sobretot externa, aplicada a pacients amb càncer de mama pot donar lloc a efectes secundaris, ja que aquest tractament implica l'exposició a radiacions de la zona toràcica i regions properes a ganglis limfàtics i coll. Els principals efectes secundaris són lesions a la pell (envermelliment, descamació i enfosquiment), inflamació del pit i cansament. D'altra banda, també poden derivar-se efectes secundaris a llarg termini, tals com canvis en l'estructura del pit, problemes de lactància, plexopatia braquial (dany al *plex braquial*, estructura nerviosa situada a la base del coll i aixella, responsable de la innervació muscular i cutània del membre superior), limfedema (dany als ganglis limfàtics), problemes pulmonars o malaltia cardiovascular associada a la RT (MCV-RT) (26).

### 3. MALALTIA CARDIOVASCULAR ASSOCIADA A LA RADIOTERÀPIA

Les malalties cardiovasculars (MCV) són les malalties relacionades amb problemes del cor i vasos sanguinis. Durant el tractament amb RT en pacients amb càncer de mama, a causa de la proximitat amb la mama, s'irradien cor, artèries, venes i capil·lars. Tot i que actualment s'apliquen noves tècniques que permeten focalitzar millor els raigs, no eviten completament l'exposició del sistema cardiovascular a la radiació, per la qual cosa persisteix el desenvolupament de MCV-RT (27-32). De fet, les MCV-RT representen la principal causa de mort després del mateix càncer en aquests pacients (33). S'ha determinat, a més, que les dones que tenen càncer de mama al pit esquerre, presenten més cardiotoxicitat que les que el tenen al pit dret, com a conseqüència de la proximitat entre la radiació i el cor i l'artèria coronària (34-36). Investigacions científiques van constatar que el risc de cardiopatia coronària i RT està relacionat de manera dosiddependent (34). A més, en una metanàlisi que incloïa 1.191.371 pacients de 39 estudis, van determinar que el risc de patir MCV-RT començava 10 anys post-RT, mentre que la mortalitat coronària incrementava en la segona i tercera dècada després (29). A més, els factors de risc cardiovasculars de cadascun dels pacients intervenen en l'evolució de les MCV-RT.

#### 3.1 Factors de risc cardiovasculars

Els factors de risc cardiovasculars es poden classificar en modificables i no modificables. Els factors modificables inclouen la dislipèmia, l'obesitat, la inactivitat física i el consum de tabac. La dislipèmia és una desregulació en els nivells en la sang de lípids, incloent triglicèrids, colesterol i/o fosfolípids. L'augment del colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) en la sang o *hipercolesterolemia* contribueix a la progressió de MCV. L'obesitat està relacionada amb una major acumulació de lípids a les artèries. A més, augmenta la probabilitat de desenvolupar diabetis i/o hipertensió. Una manera de prevenir l'obesitat és practicant exercici físic ja que afavoreix la disminució dels nivells de colesterol LDL i triglicèrids, augmenta el colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) (el qual protegeix del desenvolupament de MCV) i evita la hipertensió. Els fumadors tenen tres vegades més risc cardiovascular que la resta de la població. La possibilitat de desenvolupar un MCV és proporcional a la quantitat de cigarretes fumades al dia i els anys durant els quals s'ha mantingut l'hàbit. El tabac està associat amb elevats nivells de lípids en sang, hipertensió i diabetis (37).



Els factors de risc cardiovasculars no modificables fan referència a l'història familiar de MCV. Per exemple, si algun familiar ha patit un infart abans dels 55 anys, si algun familiar té diabetis o bé si es presenta hipercolesterolèmia hereditària. En la diabetis, els nivells elevats de glucosa en sang s'associen amb problemes d'hipertensió, dislipèmia i obesitat. A més, la presència d'algunes patologies poden contribuir al desenvolupament de MCV. Per exemple, els pacients amb hipotiroïdisme presenten una major predisposició degut al descontrol de les *hormones tiroïdals* que controlen l'homeòstasi del sistema cardiovascular. Altres factors de risc inclouen l'edat, el sexe i l'estat socioeconòmic. L'edat promou el desenvolupament de MCV. S'ha descrit que el risc d'accident cerebrovascular es duplica cada dècada després dels 55 anys. A més, els homes presenten més risc cardiovascular que les dones premenopàusiques. En canvi, aquest risc s'assimila quan la dona és menopàusica, ja que s'ha constatat que els estrògens tenen un paper protector envers les MCV. La manca de recursos econòmics, patir estrès, l'aïllament social, l'ansietat o la depressió també promouen el desenvolupament d'aquestes malalties (37).

### 3.2 Tipus de malalties cardiovasculars associades a la radioteràpia

Existeixen diversos tipus d'MCV tals com la malaltia de les vàlvules cardíques, cardiopatia coronària, arteriopatia perifèrica, hipertensió, accident cerebrovascular o cardiopatia congènita. La RT aplicada en pacients amb càncer de mama es relaciona amb la malaltia de les vàlvules cardíques i principalment amb la cardiopatia coronària (29-31). La malaltia de les vàlvules cardíques té lloc quan alguna de les quatre vàlvules del cor funciona incorrectament, i la sang pot regurgitar, és a dir, filtrar-se a través de la mateixa vàlvula en sentit contrari o, si la vàlvula no és capaç d'obrir-se suficient, es pot bloquejar el flux sanguini. El símptoma més comú és el buf cardíac (38).

La cardiopatia coronària és l'estrenyiment dels petits vasos sanguinis que es comuniquen amb el cor, i ocasiona la manca de subministrament de sang i oxigen. Aquesta manca d'irrigació pot donar lloc a un atac cardíac o debilitar el miocardi, la qual cosa pot provocar insuficiència cardíaca o arítmies. La insuficiència cardíaca té lloc quan el miocardi es torna rígid o dèbil i, per tant, el cor no pot bombejar suficient sang oxigenada. D'altra banda, l'arítmia és una afectació de la freqüència o ritmes cardíacs a causa d'un mal funcionament del sistema elèctric del cor, el qual bateja massa ràpid, lent o de forma irregular. L'estrenyiment dels vasos sanguinis és causat per una afecció anomenada *ateroesclerosi* (39).

## 4. ATEROESCLEROSI

L'ateroesclerosi és una afecció de la paret arterial que es caracteritza per la formació d'una lesió anomenada *placa ateroescleròtica*. L'ateroesclerosi es va desenvolupant lentament al llarg de la vida i es mostra asimptomàtica fins que es manifesta clínicament amb un episodi cardiovascular. Afecta principalment artèries de gran mida, tals com artèries coronàries, cerebrals, perifèriques o l'artèria aorta. La placa ateroescleròtica pot causar la disminució del diàmetre del vas sanguini i donar lloc a la reducció i/o obstrucció del flux sanguini. També pot produir l'engruiximent i la pèrdua d'elasticitat de la paret del vas (Figura 13). El primer esdeveniment de l'ateroesclerosi que té lloc que ocasiona la formació de la placa ateroescleròtica és la disfunció de l'endoteli vascular o *disfunció endotelial* (40).

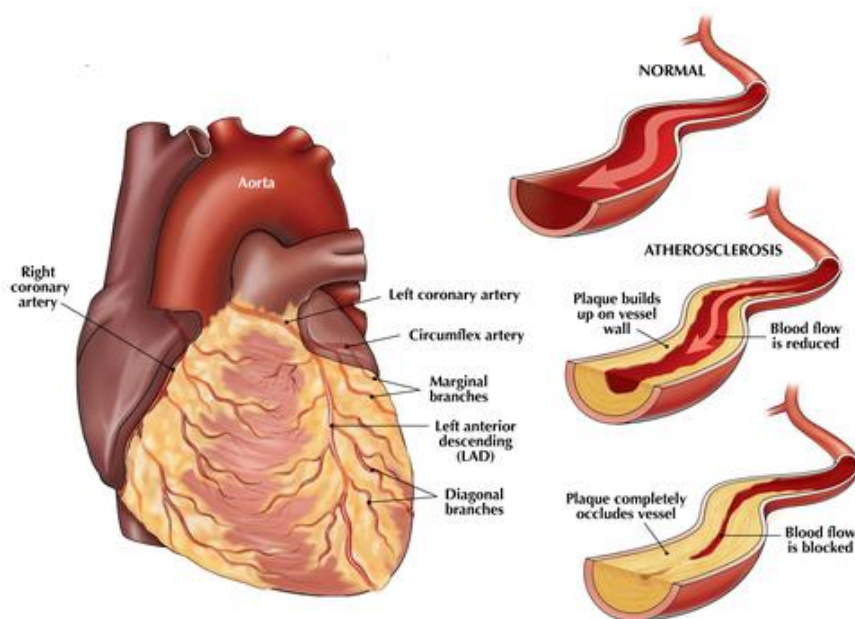


Figura 13. Representació del cor, vas sanguini normal i vas sanguini amb aterosclerosi.

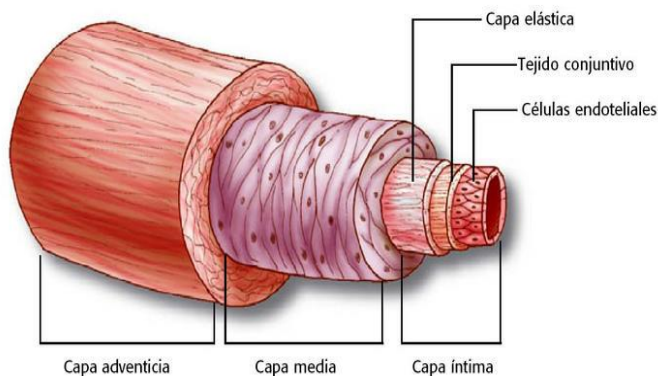
What Is Atherosclerosis? [Internet]. Health Life Media [juliol 2018]. Disponible a:

<http://healthlifemedia.com/healthy/what-is-atherosclerosis/>

### 4.1 Disfunció endotelial

La paret vascular del cor i vasos sanguinis, tals com venes, artèries i capil·lars, està formada per les capes adventícia, mitjana i íntima. L'adventícia és la capa més externa formada per fibroblasts, teixit nerviós. En artèries grans, a més, l'adventícia conté vasos sanguinis petits que nodreixen tals artèries anomenats *vasa vasorum*. La mitjana és una capa intermèdia formada per un nombre

variable de capes de cèl·lules musculars llises (CML) encarregades de regular el to muscular i elasticitat del vas. L'íntima és una monocapa activa de cèl·lules endotelials interconnectades, que són sostingudes per teixit conjuntiu i elàstic (41) (Figura 14).



**Figura 14. Estructura de la paret vascular.**

Tortora GJ, Reynolds Grabowski S. Principios de Anatomía y Fisiología. Oxford.México.2003; 21(2):26

Les cèl·lules endotelials de l'íntima, és a dir, l'endoteli vascular, separen la paret vascular de la sang circulant, i exerceixen un important rol en el manteniment de l'homeòstasi vascular regulant la vasodilatació i vasoconstricció. D'un banda, actuen com a barrera física selectiva que controla la permeabilitat vascular, és a dir, controla el pas de molècules entre la sang i la paret vascular. D'altra banda, alliberen nombroses substàncies vasoactives, tals com l'òxid nítric (NO), que regulen el to vascular, la pressió i el flux sanguinis, així com també la remodelació de la paret dels vasos (42-44). A més, controlen els processos de coagulació, fibrinòlisi, reaccions inflamatòries i immunològiques (41). L'estructura i funció de l'endoteli es pot veure alterada, és a dir, es produeix disfunció endotelial. La hipertensió, l'estrès oxidatiu i/o quan els nivells de LDL promouen el desenvolupament de la disfunció endotelial (41).

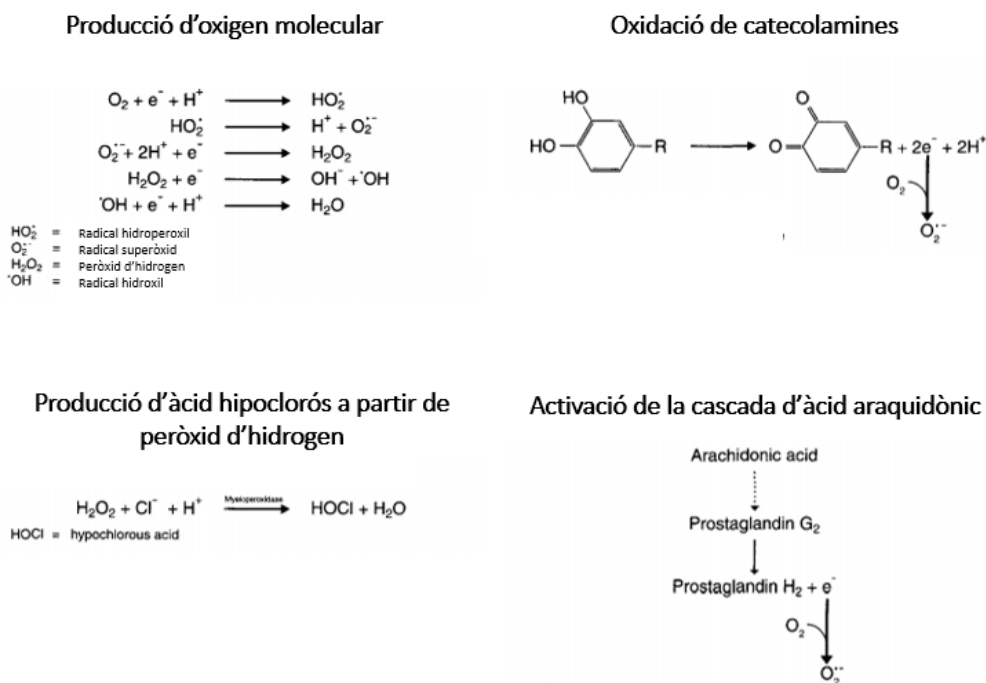
### .1.1 Estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu és definit com el desequilibri en el balanç entre la producció d'espècies reactives d'oxigen, o també anomenats *radicals lliures*, i les defenses antioxidants. Els radicals lliures són molècules generades en grans quantitats com subproductes de processos bioquímics o poden ser

produïdes, entre altres, per l'exposició ambiental a la radiació. Els processos bioquímics inclouen la reducció de l'oxigen durant la respiració aeròbica generant els radicals *superòxid* i *hidroxil*, l'oxidació de catecolamines i l'activació de la cascada d'àcid araquidònic que produeixen electrons que poden reduir l'oxigen a *superòxid*, la producció de *peròxid* i *àcid hipoclorós* pels fagòcits, i la producció d'NO per les cèl·lules endotelials (Figura 15). Els radicals lliures són molècules inestables per la presència d'electrons desaparellats que les fan altament reactives, és a dir, accepten o donen electrons a altres molècules amb la finalitat d'aconseguir un estat estable. La major part de les reaccions es produeixen amb molècules no radicals tals com lípids, proteïnes, àcids nucleics i carbohidrats; els quals es converteixen en nous radicals i poden reaccionar amb altres molècules. Exemples destacables són la peroxidació de lípids i el dany als àcids nucleics. L'extensiva peroxidació de lípids de les membranes cel·lulars pot causar canvis en la fluïdesa, un augment de la permeabilitat, un descens del potencial de membrana i eventualment el trencament de la membrana. El dany als àcids nucleics, per exemple per l'addició de grups carbonils, fan que les proteïnes siguin susceptibles a la proteòlisi i/o que es produeixin trencaments en les cadenes simples i dobles de l'ADN (45).

Els mecanismes antioxidants s'encarreguen de la defensa envers l'atac dels radicals lliures. Els antioxidants cel·lulars inclouen els enzims *dismutasa*, *peroxidasa* i *catalasa*. La superòxid dismutasa catalitza la dismutació del superòxid a peròxid d'hidrogen, compost menys oxidant i estable, i oxigen en el citosol i en les mitocondries. Els enzims glutatió peroxidasa, presents en el citosol i mitocondries, eliminen el peròxid d'hidrogen generant hidrogen i oxigen. Altres antioxidants, com la vitamina E, el  $\beta$ -carotè i el coenzim Q són presents en les membranes cel·lulars. La vitamina E, per exemple, interromp la peroxidació de lípids eliminant els radials peròxils i generant radicals tocoferols, menys reactius, que es converteixen posteriorment en  $\alpha$ -tocoferols, molècules estables, per efecte de la vitamina C (45).

En condicions d'estrès oxidatiu, els mecanismes antioxidants no poden protegir les cèl·lules de l'atac dels radicals lliures. En l'endoteli, l'estrès oxidatiu provoca la disfunció endotelial, definida com la pèrdua de la integritat i el desequilibri de la biodisponibilitat de substàncies actives d'origen endotelial, tals com el NO, les *molècules d'adhesió* i/o les *citocines*. Aquest desequilibri comporta la vasoconstricció, l'increment de la permeabilitat vascular i la inflamació (46).



**Figura 15. Exemples de la producció de radicals lliures per diferents processos bioquímics.**

Adaptada de: Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8. Review. PubMed PMID: 10693912.

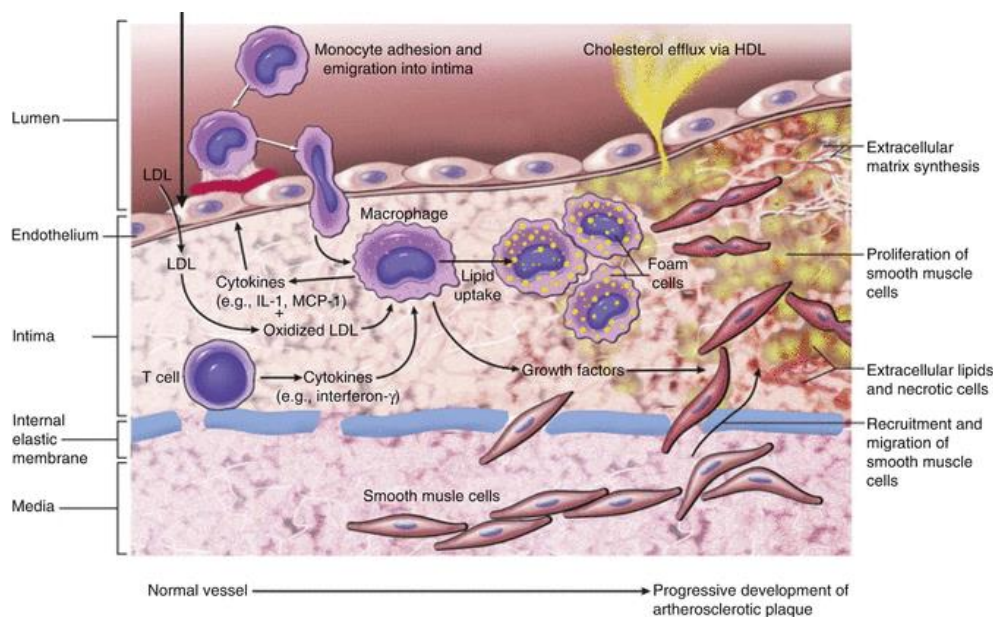
#### 4.1.2 Molècules d'adhesió

Les molècules d'adhesió són glucoproteïnes que es troben en la superfície de la majoria de cèl·lules i que participen en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular. Hi ha 4 tipus de famílies: *integrines*, *immunoglobulines*, *selectines* i *cadherines*.

En la disfunció endotelial augmenta l'expressió de les molècules d'adhesió tals com la Selectina-E, la molècula d'adhesió intracelular-1 (ICAM-1) i la molècula d'adhesió de la cèl·lula vascular-1 (VCAM-1) (41, 47). Les ICAM-1 i VCAM-1 pertanyen la superfamília de les immunoglobulines i són expressades constitutivament per les cèl·lules endotelials, entre altres. Els leucòcits contenen uns lligands anomenats integrines CD11/CD18 i CD49d/CD29 que s'uneixen a ICAM-1 i VCAM-1, respectivament. Aquestes molècules d'adhesió poden ser alliberades a la circulació, ICAM-1 soluble (ICAM-1s) i VCAM-1 soluble (VCAM-1s), quan s'activa l'endoteli per escissió proteolítica o *splicing* alternatiu (48). D'altra banda, la Selectina-E pertany a la família de les selectines i també

s'encarrega de l'adhesió de *leucòcits* (cèl·lules amb capacitat fagocítica que participen en la resposta inflamatòria) a les cèl·lules endotelials via unió dels lligands CD15s i CD162. La Selectina-E pot ser alliberada a la circulació en forma soluble, Selectina-Es. S'ha observat que les formes solubles d'aquestes molècules d'adhesió augmenten en la circulació de pacients amb MCV (49, 50).

En condicions de disfunció endotelial i quan els nivells circulants de LDL son elevats, les LDL són captades per l'endoteli i poden ser oxidades pels radicals lliures. Aleshores esdevenen LDL oxidades (LDLox). Les LDLox modifiquen la permeabilitat de la membrana cel·lular de l'endoteli, i faciliten l'entrada passiva de més LDL a l'íntima. L'augment de molècules d'adhesió en la superfície endotelial promouen el reclutament i la unió de leucòcits, especialment *monòcits*, i *limfòcits* tals com les *cèl·lules T* (41). Quan els monòcits arriben a l'íntima, capten les LDLox i es transformen en macròfags, aleshores originen un fenotip lipídic anomenat *cèl·lula escumosa* (51). Els macròfags activats i les cèl·lules escumoses alliberen més molècules d'adhesió, com la *proteïna quimiotàctica de monòcits-1* (MCP-1) el *factor estimulant de colònies de macròfags 1* (M-CSF 1), i citocines. Les molècules d'adhesió indueixen el reclutament de nous monòcits i limfòcits; i també promouen la migració i proliferació de CML de la mitjana a l'íntima vascular. A més, els macròfags activats alliberen espècies reactives derivades de l'oxigen amb capacitat per oxidar més LDL (Figura 16). El cúmul elevat de macròfags a l'íntima causa una distorsió mecànica de l'endoteli ja que erosionen la superfície endotelial i poden causar microúlceres. Aquest fet, permet l'adhesió de plaquetes a la paret arterial, i promou una major migració i proliferació de CML. A més, les citocines alliberades per l'endoteli, entre altres cèl·lules, promouen la resposta inflamatòria (52, 53).



**Figura 16.** Procés derivat de la disfunció endotelial.

Vascular Disease Definitions [Internet]. Cardiovascular – Pathology [Juliol 2018]. Disponible a:

<https://www.memorangapp.com/flashcards/40187/Vascular+Disease+DEFINITIONS/>

### 4.1.3 Citocines

Les citocines són petites proteïnes que exerceixen funcions d'interacció i comunicació intercel·lular, normalment es produeixen en cascada i actuen en seqüència, formant part d'un gran complex coordinat. Dins el grup de les citocines s'inclouen les *interleucines* (IL), *interferons* (IFN), *quimosines*, *limfocines* i el *factor de necrosi tumoral* (TNF). Poden ser secretades per diversos tipus cel·lulars: mastòcits i fibroblasts, ambdues pertanyents al teixit conjuntiu, cèl·lules endotelials i leucòcits tals com neutròfils i monòcits. Les citocines participen en la resposta inflamatòria exhibint accions proinflamatòries, antiinflamatòries o ambdues. La resposta inflamatòria és un tipus de defensa no específica, desencadenada després d'un dany cel·lular (54).

En la disfunció endotelial, les cèl·lules endotelials alteren la producció de citocines tals com la IL-6, la IL-8, el TNF- $\alpha$  i el factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF), entre altres. La IL-6 promou l'activació i diferenciació de cèl·lules T, la diferenciació de monòcits, la maduració de cèl·lules B i la secreció d'immunoglobulines. S'ha observat que també pot exercir una funció antiinflamatòria inhibint els efectes del TNF, IL-1 i activant IL-10. Aquesta IL també pot ser secretada per fagòcits, cèl·lules T, B i fibroblasts. La IL-8 indueix el reclutament i activació de neutròfils,

participa en la migració i activació de monòcits i cèl·lules T i promou l'angiogènesi de les cèl·lules endotelials. La IL-8 és la citocina proinflamatòria més estudiada i és sintetitzada també per macròfags i CML. El TNF- $\alpha$  és un potent mediador inflamatori i immune que regula l'activació de neutròfils, la migració de leucòcits, l'angiogènesi i l'expressió de molècules d'adhesió de l'endoteli. A més, participa en múltiples processos tals com diferenciació cel·lular, necrosi i apoptosi. És secretat principalment, a més, per macròfags, monòcits i cèl·lules T. El GM-CSF és una glicoproteïna que funciona com una citocina i actua sobre cèl·lules mare estimulants la producció de leucòcits i, a més, promou la maduració dels monòcits a macròfags. També és secretada per macròfags, limfòcits T, mastòcits i *Natural Killers* (NK) (55-57).

L'alteració en la producció de les citocines endotelials comporta l'activació de l'alliberació de diverses citocines en diferents tipus cel·lulars. S'estimula, per exemple, la secreció per part dels macròfags de citocines amb accions proinflamatòries com la IL-1 $\beta$ , la IL-6, el TNF- $\alpha$  i la IL-12; i d'altres amb accions antiinflamatòries tals com la IL-10. La IL-1 $\beta$  és captada per fibroblasts, cèl·lules endotelials, monòcits i neutròfils, i en promou la proliferació. Així mateix, estimula la secreció de col·lagenasa i IL-6 en fibroblasts, l'alliberació de TNF- $\alpha$  i l'expressió de molècules d'adhesió en cèl·lules endotelials, la secreció d'immunoglobulines per cèl·lules T i B, i la secreció de citocines tals com IL-8 i IL-1 per monòcits i neutròfils. La IL-1 $\beta$  també és sintetitzada per monòcits i neutròfils. La IL-12 regula la diferenciació de cèl·lules T, estimula la producció d'IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  de cèl·lules T i NK i presenta accions antiangiogèniques. També és produïda per macròfags, neutròfils i cèl·lules B. Per altra banda, la IL-10 inhibeix l'expressió de citocines alliberades per cèl·lules T i macròfags. També pot ser produïda per monòcits i limfòcits (58).

Les cèl·lules T activades en la resposta inflamatòria secreten les citocines IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Aquestes citocines participen en la resposta inflamatòria i la resposta immune. La IL-2 promou la proliferació i activació de les cèl·lules T, B i NK. És secretada, a més, per NK i mastòcits. La IL-4 indueix la proliferació i estimula la producció d'immunoglobulines de cèl·lules T, B i macròfags. L'IFN- $\gamma$  pertany al subtipus de citocines IFN i activa macròfags, neutròfils i monòcits (58).

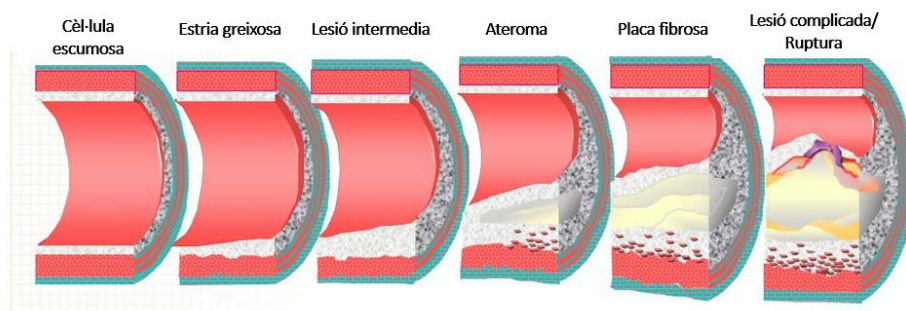
La repetició continuada del procés desencadenat per la disfunció endotelial (Figura 16), juntament amb la resposta inflamatòria provocada, pot donar lloc a la formació de la placa ateroscleròtica (59).



## 4.2 Placa ateroscleròtica

La placa ateroscleròtica pot evolucionar en quatre etapes: formació de l'*estria greixosa*, formació d'*ateromes*, formació de la *placa fibrosa* i lesió complicada o ruptura de la placa. L'*estria greixosa* és la lesió que es forma quan aquest procés derivat de la disfunció endotelial es repeteix contínuament, i es promou el cúmul massiu de LDL, cèl·lules escumoses, cèl·lules T i CML a l'íntima vascular. Aquesta lesió és groguenca i visible a ull nu. Amb el temps, la lesió progressa i a l'*estria greixosa* s'acumulen, a més, cèl·lules necròtiques i apoptòtiques i residus cel·lulars. Aquesta lesió s'anomena *ateroma*. Els *ateromes* poden esdevenir plaques fibroses quan es cobreixen de col·lagen (sintetitzat per CML) i CML migrades, i contribueixen a la inflamació via la infiltració a la placa de cèl·lules T, macròfags i mastòcits (60). La placa pot romandre estable o inestable en funció de la mida, la composició del nucli lipídic, el gruix de la capa fibrosa i la inflamació generada. Quan la càpsula fibrosa és gruixuda o el nucli conté poc LDL i/o aquest està poc oxidat, es produeix una inflamació més petita i, per tant, la placa és estable. D'altra banda, si la capa fibrosa és prima o el nucli és ric en LDL i/o LDLox, es genera una inflamació crònica que promou l'apoptosi de les CML i, per tant, disminueix la producció de col·lagen; per la qual cosa la placa és inestable. Aquesta placa pot continuar creixent i provocar l'estreñiment del lumen del vas sanguini, la qual cosa esdevé una lesió complicada, ja que pot contribuir a l'hemorràgia o ulceració del lumen, o fins i tot a la isquèmia del teixit circumdant (60). A més, en estadis avançats, si la coberta fibrosa minva molt, es pot produir la ruptura de la placa que promou l'abocament del contingut lipídic. Aquest contingut lipídic, en entrar en contacte amb la sang, facilita l'agregació plaquetària i causa trombosi. La trombosi és la formació de coàguls de sang en els vasos sanguinis formats per plaquetes agregades i glòbuls vermells embolcallats per una malla reticulada de la proteïna fibrina (40, 61) (Figura 17).

En els darrers anys, s'ha postulat que el desenvolupament de MCV-RT, les quals esdevenen de l'aterosclerosi, en pacients amb càncer de mama pot ser causada per la disfunció endotelial de les artèries irradiades durant la RT (62).



**Figura 17. Etapes de l'ateroesclerosi.**

Adatada de: Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(9):1512-31. PMID: 7670967.

## 5. DISFUNCIÓ ENDOTELIAL DERIVADA DE LA RADIOTERÀPIA

La radiació actua danyant directament els components cel·lulars o indirectament originant la formació de radicals lliures. El major efecte de la radiació és el trencament de les cadenes simples i/o dobles de l'ADN. Tot i que les cèl·lules disposen de mecanismes per a reparar els danys a l'ADN, si els danys són molt nombrosos o si s'ha danyat la cadena doble, es produeixen mutacions, aberracions cromosòmiques o la mort cel·lular a causa de la radiació (63). A més, els radicals lliures, generalment formats per la hidròlisi de l'aigua, poden interaccionar amb les molècules de més proximitat i induir l'estrès oxidatiu. Quan els mecanismes antioxidants no són suficientment efectius, l'estrès oxidatiu provocat per la radiació modifica la permeabilitat de la membrana cel·lular i/o la membrana nuclear, i l'ADN de les cèl·lules (43).

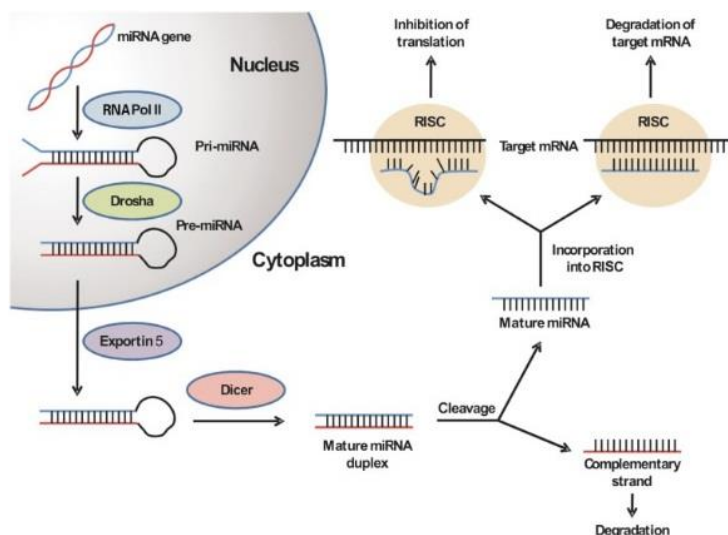
La RT en pacients amb càncer de mama resulta efectiva causant la mort de les cèl·lules canceroses pel dany a l'ADN i estrès oxidatiu ocasionat. Malauradament, i en menor mesura, aquest estrès oxidatiu i la mateixa radiació actuen també sobre les cèl·lules sanes del pacient, tals com les cèl·lules endotelials. L'estrès oxidatiu, provocat per la radiació, indueix la disfunció endotelial que conseqüentment pot derivar amb la formació de la placa ateroscleròtica (64). A més, la radiació indueix la resposta inflamatòria que, per una banda, esdevé de la disfunció endotelial, i, per altra banda, és generada com a mecanisme de defensa cel·lular en resposta als efectes tòxics que la radiació produeix (65, 66).

En els darrers anys s'ha constatat que a la radiació modula els nivells d'unes molècules anomenades *microàcids ribonucleics* (miARN), que participen en la regulació de múltiples processos cel·lulars (67-69). La disfunció endotelial és regulada per miARN que controlen l'estrès oxidatiu, l'expressió de molècules d'adhesió i/o l'alliberació de citocines (70-72). En l'actualitat, s'investiga la relació entre els miARN i el desenvolupament de l'ateroesclerosi (73-75).

## 6. miARN

Els miARN són ARN no codificants de cadena curta de 22 nucleòtids aproximadament de llargada que actuen com a reguladors posttranscripcionals, és a dir, interfereixen en el procés de transcripció d'ADN a ARN missatger (ARNm), i eviten la traducció del corresponent ARNm a proteïna.

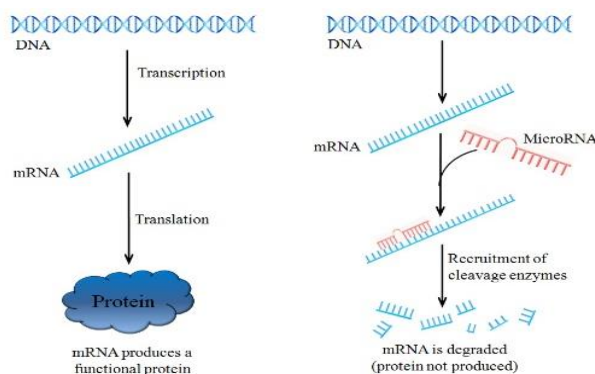
Els miARN són inicialment transcrits com a miARN primaris, pri-ARN, i tenen una estructura de forquilla. Per l'acció de la ribonucleasa *Drosha* s'escindeix a 70 nucleòtids aproximadament de llargada en el nucli de la cèl·lula, i esdevenen miARN precursor, pre-miARN. Seguidament, el pre-miARN és exportat al citoplasma per l'*exportina 5* i processat per la *ribonucleasa Dicer* a miARN madur. La cadena de miARN madur interacciona amb la proteïna *Argonaute* (Ago), i es forma el complex anomenat *complex silenciador induït per ARN* (RISC) (76). Els complexos RISC es poden unir a diverses regions diana de l'ARNm: *regió no traduïda* (UTR) 3' (3' UTR), 5' UTR, *marcs oberts de lectura* (ORF) (77), promotors o seqüències codificants que reprimeixen o activen la traducció. El lloc d'unió crucial per regular la traducció resideix en la seqüència madura de miARN, més acuradament en els 2-7 o 2-8 nucleòtids de la terminació 5' del miARN, anomenada *regió llavor* (78). Un cop units al seu ARNm, els miARN poden desadenilar, és a dir, treure els grups adenil formats per nucleòtids d'adenina dels ARNm, inhibir factors d'iniciació, proteïnes que activen el procés de transcripció, o interferir en l'elongació transcripcional, etapa de la transcripció en la qual l'ARNm s'uneix a l'ADN (79) (Figura 18).



**Figura 18. Biogènesi dels miARN.**

Li W, Lebrun DG, Li M. The expression and functions of microRNAs in pancreatic adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Chin J Cancer*. 2011;30(8):540-50.

Els miARN modulen l'expressió gènica, ja que inhibeixen la traducció a proteïna, però també poden augmentar l'expressió gènica de gens inhibits, promovent la sobrerregulació dels ARNm durant la detenció del cicle cel·lular i reprimint la traducció de cèl·lules proliferatives (Figura 19). Per això es considera que els miARN poden sobrerregular o suprimir l'expressió de gens en funció de la diana on actuen. Un miARN s'uneix a diverses dianes i les regula, fins i tot de la mateixa via de senyalització. Així mateix, un miARN pot tenir diversos llocs d'unió en la seva zona 3' UTR, afegint múltiples nivells de regulació. D'altra banda, un ARNm pot estar regulat per diversos miARN. La majoria dels miARN són expressats en tots les cèl·lules i no són específics del tipus cel·lular. S'estima que més del 60% de les proteïnes estan directament regulades per miARN. Existeix una gran varietat de miARN. De fet, es coneixen entre 1.500 i 2.000 miARN humans. Els miARN poden trobar-se dins les cèl·lules, intracel·lulars, o en medis extracel·lulars com la sang o altres fluids tals com saliva, mucoses i orina (78).



**Figura 19. Acció del miARN en la traducció de proteïnes.**

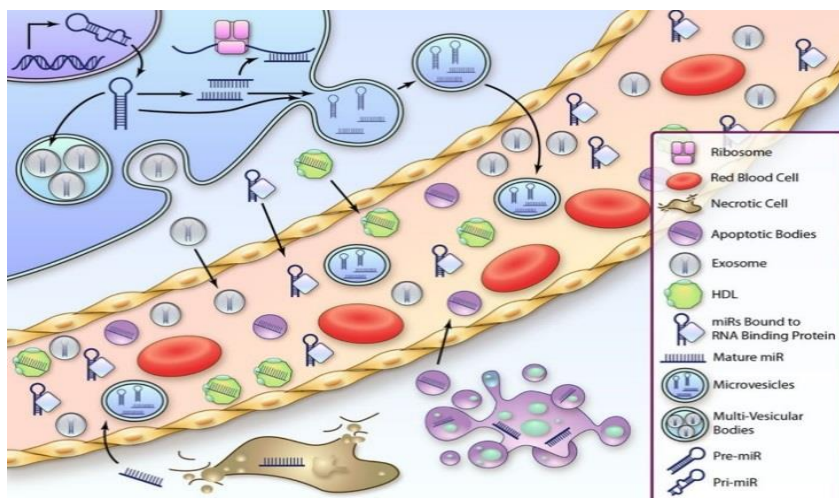
Eastlack SC, Alahari SK. MicroRNA and Breast Cancer: Understanding Pathogenesis, Improving Management. *Noncoding RNA*. 2015;1(1):17-43.

La modulació de l'expressió d'un miARN pot ser específic d'una malaltia en concret. Per exemple, pot estar poc expressat en l'àmbit basal, però en condicions patològiques pot estar sobrerregulat (80-83). Per aquest motiu, recentment alguns estudis se centren en la investigació dels miARN en sang com a candidats a biomarcadors per al diagnòstic de malalties i/o a agents terapèutics (79).

## 6.1 miARN en sang

Els miARN poden ser alliberats a la circulació per tres vies diferents: proteïnes d'unió a miARN, incloent el complex proteic d'unió RISC o Ago; lipoproteïnes, com l'HDL, i cossos de microvesícules, tals com exosomes o cossos apoptòtics, resultants de la lisi o apoptosi cel·lular de teixit danyat, metàstasi o inflamació (84) (Figura 20). Diversos estudis suggereixen que més del 90% del miARN circulant es troba en forma lliure, com a complex de proteïna (85), i que són altament estables (86). Encara que molts d'aquests miARN són subproductes de l'activitat o mort cel·lular, es creu que els miARN poden exercir la funció de comunicació cel·lular, essent captats per cèl·lules de teixits propers o més distants (78).

Actualment, s'estudia la possibilitat d'utilitzar els miARN en sang com a biomarcadors del diagnòstic i/o pronòstic de malalties, ja que s'utilitza un mètode d'extracció no invasiu, poden ser quantificats fàcilment, i la seva detecció és sensible i específica. A més, els miARN són estables en els fluids durant un llarg període i els cicles de congelació-descongelació sembla que no alteren l'estructura (79).



**Figura 20. Tipus de miARN en sang.**

Frantzi M, Metzger J, Banks RE, Husi H, Klein J, et al. Discovery and validation of urinary biomarkers for detection of renal cell carcinoma. *J Proteomics*. 2014;98:44-58.

Els miARN també podrien ser emprats com a agents terapèutics, amb la finalitat de regular l'expressió de gens propis d'una determinada malaltia (87). Les teràpies basades en miARN tenen com a diana diversos gens que estan sota el control de miARN específics. Els miARN poden ser manipulats a través del reemplaçament per oligonucleòtids específics, *miARN mimètics*, o inhibint els oligonucleòtids antisentit de cadena simple, *antimiARN* o *antagomiARN*. Els miARN mimètics són utilitzats en malalties relacionades amb desregulacions d'un miARN específic i són sintetitzats com a oligonucleòtids miARN de doble cadena que, en ser transferits a cèl·lules, són processats com a cadenes simples i regulen els gens diana. Al contrari, els antagomiARN són oligonucleòtids antisentit modificats que poden inhibir els nivells d'un miARN sobrerregulat, i incrementen l'expressió d'un ARNm diana d'un miARN específic. Les possibles rutes d'administració de miARN terapèutics del sistema cardiovascular són intravenoses, subcutànies, intramusculars, intraperitoneals, cardíques o transcoronàries; però encara no s'ha constatat quina resulta més efectiva. Les principals estratègies d'administració dels miARN terapèutics inclouen vesícules lipídiques, sistemes virals, *scaffolds* biodegradables, miARN encapsulats en exosomes o l'activació d'antagòmers induïts per la llum (79).

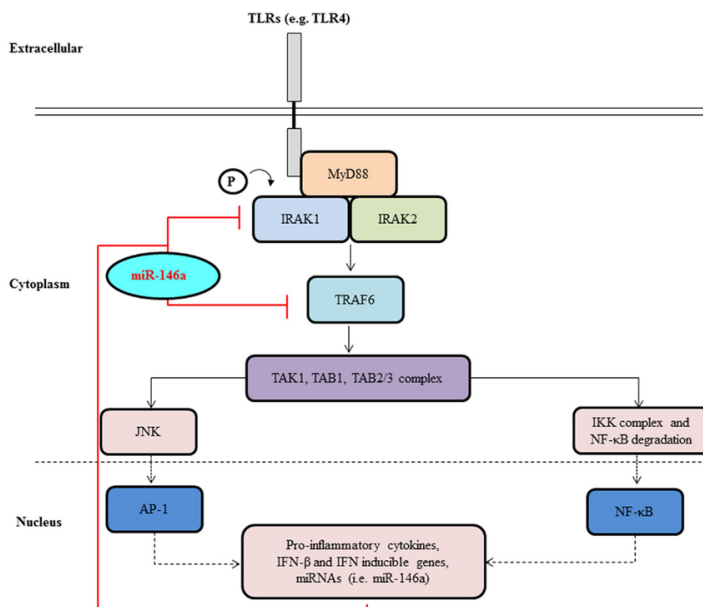
S'ha determinat en diversos estudis que alguns miARN participen en processos ateroscleròtics afavorint la progressió de MCV. A més, els nivells en sang d'aquests miARN estan modulats en pacients que presenten aquest tipus de malaltia. Recentment, s'ha constatat que els miARN-146a,

-155, -221 i -222 exerceixen un rol important la regulació de la disfunció endotelial, l'ateroesclerosi i el desenvolupament de MCV (82, 88).

## 6.2 miARN-146a, -155, -221 i -222

El desenvolupament de l'ateroesclerosi està associada amb canvis en els perfils de diversos miARN que participen en la regulació de processos tals com la disfunció endotelial i la inflamació. Els miARN-146a, -155, -221 i -222 participen en la progressió de les lesions ateroscleròtiques regulant processos d'estrès oxidatiu, inflamació, apoptosi i angiogènesi (89-93).

El miARN-146a exhibeix un rol protectiu envers el desenvolupament de l'ateroesclerosi ja que participa en un mecanisme regulatori de la inflamació de *feedback* negatiu. El miARN-146a actua sobre dianes tals com el *factor associat al receptor del TNF* (TRAF6) i la *quinasa associada al receptor d'IL-1* (IRAK1). TRAF6 i IRAK1 activen el *factor de transcripció nuclear kappa beta* (NF- $\kappa$ B), que indueix l'expressió de citocines proinflamatòries, tals com les IL-1, IL-2, IL-8 i TNF- $\alpha$ ; així com també de molècules d'adhesió tals com les ICAM-1, VCAM-1 i Selectina-E. Així doncs, el miARN-146a inhibeix la resposta inflamatòria induïda per NF- $\kappa$ B. El NF- $\kappa$ B també activa l'expressió de gens protectors contra l'apoptosi tals com les molècules de la família *Bcl-2*. En les cèl·lules endotelials, l'expressió del miARN-146a és induïda pel TNF- $\alpha$  i la IL-1 $\beta$ . Aquest miARN evita la formació de lesions ateroscleròtiques ja que inhibeix l'alliberació de citocines proinflamatòries i comporta un augment de l'apoptosi i necrosi en lesions avançades. En CML vasculars, el miARN-146a promou la proliferació i la hiperplàsia in vivo neointimal. A més, aquest miARN modula la funció i activació de les cèl·lules dendrítiques encarregades de fagocitar i presentar els antígens a les cèl·lules T, que activen la resposta immune. En macròfags, el silenciament de IRAK1, TRAF6 i NF- $\kappa$ B pel miARN-146a condueix a la inhibició de l'expressió de citocines proinflamatòries, tals com el TNF- $\alpha$ . S'ha observat que el miARN-146a està sotregulat en macròfags estimulats per LDLox. No obstant, recentment s'ha observat que l'absència d'aquest miARN en ratolins *knockout* produeix una menor acumulació de lípids en les plaques ateroscleròtiques de l'artèria aorta (90, 94-98) (Figura 21).



**Figura 21. Rol del miARN-146a en la via de senyalització NF-κB.**

Saba R, Sorensen DL, Booth SA. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front Immunol.* 2014 Nov 21;5:578.

El miARN-155 exhibeix un doble rol en la progressió de l'ateroesclerosi. Aquest miARN és sobreexpressat per les LDLox, el TNF- $\alpha$  i l'IFN- $\gamma$ , mentre la seva expressió és inhibida pel *factor de creixement tumoral  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). S'ha descrit que el miARN-155 és secretat en exosomes per les CML vasculars i és captat per les cèl·lules endotelials i els macròfags circumdants. En les cèl·lules endotelials, aquest miARN inhibeix la proliferació i migració cel·lular. A més, bloqueja l'expressió de proteïnes d'unió intercel·lulars tals com la *claudina 1*, la  *$\beta$ -catenina*, la *caderina-E* i la *Zonula occludens-1* (ZO-1); i també de molècules d'adhesió tals com VCAM-1 i ICAM-1. La manca de les proteïnes d'unió altera la barrera endotelial contribuint a la progressió de l'ateroesclerosi, i la manca de molècules d'adhesió inhibeix la resposta inflamatòria. En les cèl·lules endotelials, el miARN-155 inhibeix la *proteïna estable a la calor regulada per calci 1* (CARHSP1), la qual afecta l'estabilitat de l'ARNm del NF- $\kappa$ B; inhibint la secreció de citocines tals com el TNF- $\alpha$ , la IL-6 i la IL-8. A més, el miARN-155 promou la disfunció endotelial ja que disminueix els nivells d'*NO sintasa endotelial* mitjançant el bloqueig del *supressor de la senyalització de citocines 1* (SOCS1) (99). Aquest miARN també redueix l'expressió de VCAM-1 i la migració de les cèl·lules endotelials a través de la inhibició de les *proteïnes quinases regulades per senyals extracel·lulars 1 i 2* (ERK1 i ERK2). Per



altra banda, s'ha descrit que el miARN-155 bloqueja el *receptor de l'angiotensina del tipus I* (AGTR1), ocasionant un augment en els nivells de les molècules d'adhesió i les citocines. En CML vasculars, el miARN-155 inhibeix la diferenciació possiblement disminuint l'expressió del AGTR1. A més, bloqueja l'expressió de membres de la família de les *metaloproteases de la matriu* (MMP) que modulen la remodelació de la matriu extracel·lular, la migració cel·lular, la formació de la placa i la ruptura en l'ateroesclerosi. En macròfags i cèl·lules dendrítiques, el miARN-155 actua sobre dianes de receptors *scavengers* que redueixen la captació de lípids i sotregulen l'expressió de molècules d'adhesió i citocines. També silencia el *gen de resposta primària de diferenciació mieloide 88* (MyD88), inhibint l'activació de TLR i conseqüentment de NF- $\kappa$ B i la secreció de citocines. Contràriament, s'ha descrit que promou la resposta inflamatòria ja que sotregula el SOCS1, el qual activa la via del NF- $\kappa$ B. A més, el miARN-155 participa en la formació de cèl·lules escumoses ja que pot sotregular la *proteïna 6 del limfoma de cèl·lules B* (BCL6) i sobreexpressar les quimosines que es troben sota el control del BCL6. També s'ha descrit que promou la producció de cèl·lules B, la proliferació de cèl·lules T en resposta a un antigen i l'activació de cèl·lules dendrítiques (82, 100-107) (Figura 22).

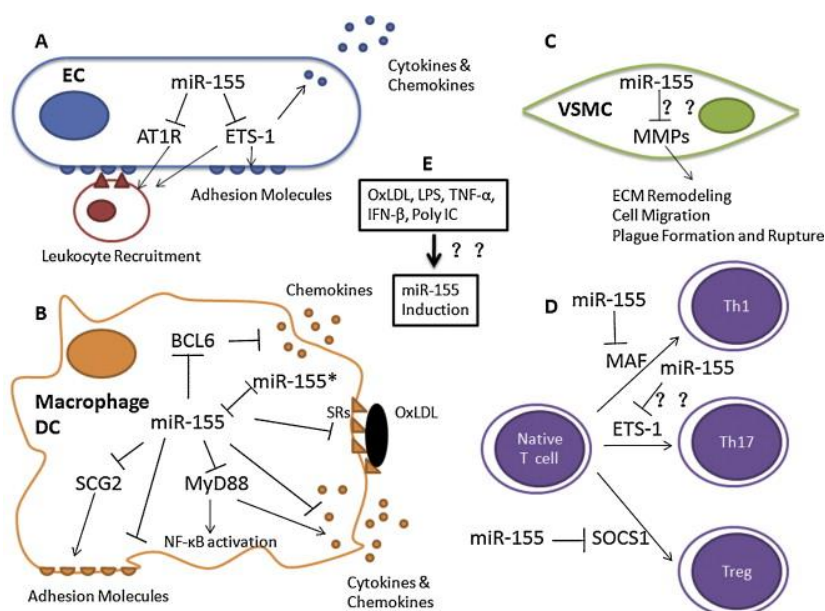
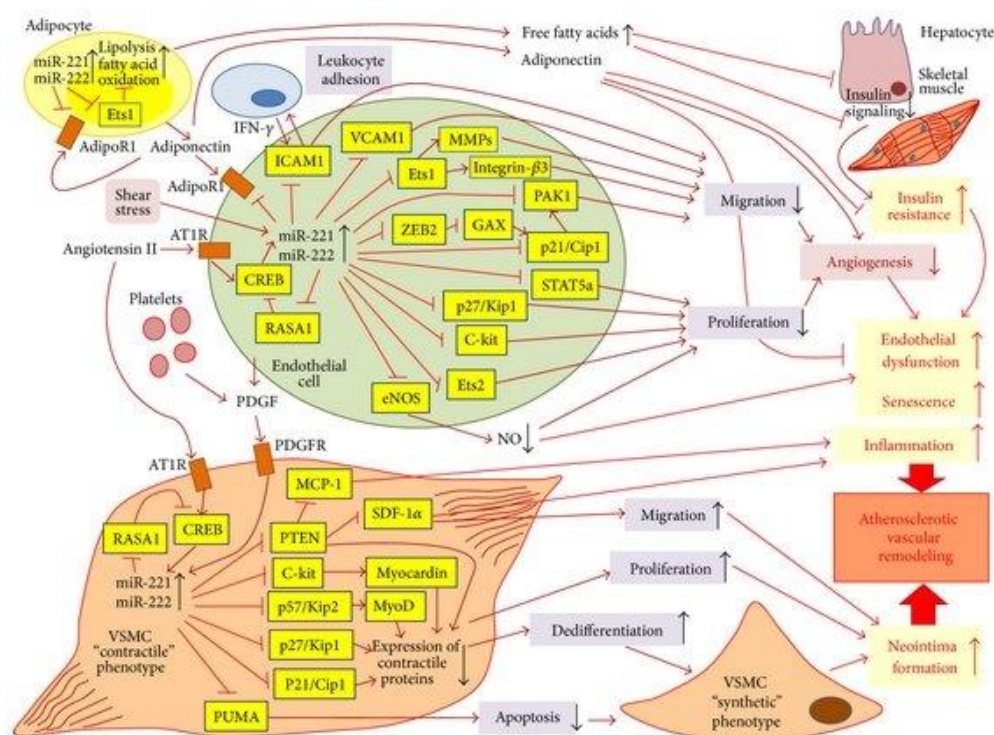


Figura 22. Rol del miARN-155 en diverses vies de senyalització ateroescleròtiques.

Ma X, Ma C, Zheng X. MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: a conflicting role? Heart, lung & circulation. 2013;22(10):811-8.

Els miARN-221 i -222 estan involucrats en la inflamació ateroscleròtica, la remodelació vascular, la fibrosi, la hipertensió dependent de l'angiotensina II i la disfunció endotelial induïda per la hiperglucèmia diabètica. S'ha observat que aquests miARN regulen l'angiogènesi, la hiperplàsia neointimal i l'envelliment vascular. Els miARN-221 i -222 són regulats positivament pel TNF- $\alpha$  i l'angiotensina II; i sotregulats per l'ER $\alpha$  i els *receptors nuclears corepressors 1 i 2* (NCOR1 i NCOR2). Aquests miARNs bloquegen la *fosfatidilinositol-3, 4, 5- trifosfat 3-fosfatasa* (PTEN), la funció de la qual és induir l'expressió de citocines proinflamatòries tals com la *proteïna quimioattractant de monòcits 1* (MCP-1). El PTEN està implicat en la morfogènesi cardiovascular i l'angiogènesi postnatal. En les cèl·lules endotelials, els miARN-221 i -222 exerceixen un rol antiangiogènic, antiinflamatori i proapoptòtic. Aquests miARN supprimeixen l'activació angiogènica inhibint la proliferació i migració endotelial. Per una banda, impedeixen l'expressió de l'*inhibidor de la quinasa dependent de ciclina 1A* (p21<sup>Cip1</sup>) a través del bloqueig del *dit de zinc E-box unit al homeobox 2* (ZEB2); la qual cosa comporta una regulació negativa de la proliferació. ZEB2 reprimeix la traducció de *homeobox 2 mesenquimal* (MEOX2 o GAX), un activador transcripcional de p21<sup>Cip1</sup>. A més, els miARN-221 i -222 regulen negativament l'*inhibidor 1B de quinasa dependent de ciclina* (p27<sup>Kip1</sup>), els factors de transcripció *Ets-1* i *Ets-2*, i el *receptor tirosina quinasa del factor de cèl·lules mare* (c-Kit). L'Ets-1 és un factor de transcripció de l'angiogènesi, remodelació vascular i inflamació i el c-kit promou la supervivència, migració i formació del tub capil·lar. Els miARN-221 i -222 també sotregulen l'expressió de l'NO sintasa endotelial i inhibeixen la migració de les cèl·lules endotelials suprimint la producció de MMP i de molècules d'adhesió tals com ICAM-1 i VCAM-1. S'ha observat que les cèl·lules endotelials secreten els miARN-221 i 222 en resposta al dany vascular. Els miARN-221 i -222 en CML vasculars, promouen la proliferació i augmenten la mobilitat. La diferenciació i l'establiment del fenotip contràctil de les CML vascular és modulada pel bloqueig d'aquests miARN en factors reguladors tals com p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>, c-kit, i PTEN. A més s'ha descrit que el miR-221 bloqueja la senyalització anomenada *PI3K/Akt*, en la qual s'estimula el factor de transcripció ateroprotectiu *factor nuclear derivat de eritroide 2* (Nrf2) que contribueix a la formació de fenotips resistents a l'aterosclerosi en els vasos sanguinis (108-113) (Figura 23).



**Figura 23. Rol dels miARN-221 i -222 en diverses vies de senyalització ateroescleròtiques.**

Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Human miR-221/222 in Physiological and Atherosclerotic Vascular Remodeling. *BioMed research international*. 2015;2015:354517.

Nombrosos estudis confirmen que els nivells d'aquests miARN són elevats en les lesions ateroescleròtiques humanes (94, 113, 114). A més, també s'ha descrit que els seus nivells circulants estan modulats en pacients amb MCV. S'han observat alts nivells del miARN-146a en pacients amb malaltia de l'artèria coronària (115-117). Contràriament, altres investigacions han trobat una sotregulació dels miARN-146a, -155, -221 i -222 en pacients amb dislipèmia, malaltia coronària i/o ateroesclerosi (116, 118-121).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

# HIPÒTESI I OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

## HIPÒTESI

El tractament amb radioteràpia (RT) en pacients amb càncer de mama augmenta el risc de complicacions cardiovasculars a mitjà o llarg termini. Les malalties cardiovasculars (MCV) promogudes per la RT (MCV-RT) representen la primera causa de mortalitat en supervivents d'aquest tipus de càncer. El desenvolupament de les MCV-RT es relaciona amb la radiació de les artèries i/o el cor de la zona exposada a la RT. La inflamació i la disfunció de l'endoteli vascular promouen la progressió de l'ateroesclerosi, la qual està estretament lligada a MCV. Així mateix, s'ha constatat que els miARN-146a, -155, -221 i -222 participen en el desenvolupament d'aquests processos fisiopatològics. En els darrers anys, nombrosos estudis científics realitzats en la població humana i també en models animals posen de manifest la rellevància dels miARN, presents en sang, com a bons candidats a biomarcadors en el diagnòstic, progressió i/o com a agents terapèutics de malalties. Tenint en compte aquests precedents, es planteja la hipòtesi següent:

*El tractament amb RT en dones amb càncer de mama altera l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222 en sang, desregulació que es relaciona amb el desenvolupament de MCV-RT. Tal modulació s'associa amb factors de risc cardiovasculars, que ajudarien a predir la progressió de la malaltia. A més, les cèl·lules endotelials, presents en les artèries irradiades durant la RT, modulen l'expressió dels esmentats miARN i desencadenen la resposta inflamatòria i/o promouen la disfunció de l'endoteli. Per tant, aquests miARN podrien ser potencials biomarcadors de MCV en dones amb càncer de mama sotmeses a RT.*

## OBJECTIUS

Partint de la hipòtesi plantejada, els objectius de la tesi en els diversos treballs presentats són:

### ***Treball 1. Effect of radiotherapy on the expression of cardiovascular disease-related miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of women with breast cancer***

Objectius principals:

- Estudiar in vivo l'afectació del tractament amb RT sobre l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222 en sang de dones amb càncer de mama.
- Avaluar el potencial d'aquests miARN com a biomarcadors de MCV-RT determinant com diversos factors de risc cardiovasculars, en aquestes pacients, s'associen amb la seva expressió.

Objectius secundaris:

- Comparar l'expressió de cadascun dels miARN sanguinis seleccionats en dos temps d'estudi: control pre-RT, una setmana abans d'iniciar el tractament amb RT; i post-RT, un mes després de la finalització de la RT.
- Avaluar la correlació en l'expressió dels miARN seleccionats control pre-RT i post-RT.
- Comparar l'expressió de cadascun dels miARN abans i després de la RT.
- Estudiar l'expressió dels miARN seleccionats en funció de factors de risc cardiovasculars de les pacients, tals com l'edat, la dislipèmia, l'hipotiroïdisme, el tipus de tractament i el costat del pit afectat pel càncer (dret, esquerra o bilateral), abans i després de la RT.



***Treball 2. Radiotherapy-modulation in expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 is associated with cardiovascular risk factors***

Objectiu principal:

- Analitzar el potencial dels miARN estudiats com a biomarcadors de la MCV-RT en dones amb càncer de mama determinant com diversos factors de risc cardiovasculars s'associen amb la modulació induïda per la RT en l'expressió dels diversos miARN.

Objectius secundaris:

- Determinar la modulació induïda per la RT en l'expressió dels miARN en la sang d'aquestes pacients.
- Avaluat la correlació entre la modulació induïda per la RT en l'expressió entre els diversos miARN.
- Estudiar l'efecte de factors de risc cardiovasculars en les pacients sobre la modulació induïda per la RT en l'expressió dels miARN, tals com l'edat i el tipus de tractament.
- Avaluat l'efecte de paràmetres moleculars del càncer de mama en la modulació induïda per la RT en l'expressió dels miARN.

***Treball 3. Effects of radiation on the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222, inflammatory response and endothelial dysfunction on HUVECs***

Objectius principals:

- Avaluar in vitro, en cèl·lules endotelials de vena umbilical humana (HUVEC), l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222 en resposta en fase aguda a la radiació a dosi terapèutica.
- Determinar en HUVEC l'efecte de tal radiació sobre paràmetres biomarcadors del procés d'ateroesclerosi, tals com la resposta inflamatòria i disfunció endotelial.

Objectius secundaris:

- Avaluar la citotoxicitat i viabilitat cel·lular a les dosis de radiació terapèutica, 2 Gy i 10 Gy, en temps postradiació en fase aguda, d'1 a 48 hores.
- Determinar la modulació en l'expressió intracel·lular dels miARN seleccionats en la dosi i temps definits a partir dels estudis de citotoxicitat i viabilitat.
- Estudiar la resposta inflamatòria mesurant l'alliberació de citocines de les cèl·lules en la dosi i temps seleccionats.
- Avaluar la disfunció endotelial determinant els nivells de molècules d'adhesió alliberades per les cèl·lules en la dosi i temps seleccionats.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

# TREBALL 1

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

## Effect of radiotherapy on the expression of cardiovascular disease-related miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of women with breast cancer

Roser Esplugas<sup>1,2\*</sup>, Meritxell Arenas<sup>3\*</sup>, Noemí Serra<sup>2</sup>, Montserrat Bellés<sup>1,2</sup>, Marta Bonet<sup>3</sup>, Marina Gascón<sup>4</sup>, Joan Carles Vallvé<sup>5\*</sup>, Victoria Linares<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Physiology Unit, School of Medicine, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

<sup>2</sup>Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

<sup>3</sup>Radiation Oncology Department, Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

<sup>4</sup>Radiation Oncology Unit, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain

<sup>5</sup>Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

\*These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. PhD. Tel.: +34 977759367. E-mail address: [jc.vallve@urv.cat](mailto:jc.vallve@urv.cat) (J.C. Vallvé). Postal address: School of Medicine, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, SPAIN

### ABSTRACT

#### BACKGROUND:

Breast cancer (BC) is one of the most important neoplasia among women. Many patients receive radiotherapy (RT) which implies the radiation exposure of thoracic zone, including heart and blood vessels, leading to the development of cardiovascular diseases (CVD) as long-term side effect. The severity of CVD-related pathologies leads the research on assessing novel CVD biomarkers in diagnostic, prognostic or as therapeutic agents. Nowadays, possible candidates are blood microRNAs (miRNAs). Previous studies supported the role of miRNAs-146a, -155, -221, and -222 in the progression of CVD. Our purpose was to evaluate the RT-modulation on the expression of these miRNAs in blood of women with BC.

#### MATERIALS AND METHODS:

Pre-RT control and post-RT blood samples were collected and, after miRNA isolation and Reverse Transcription, the levels of selected miRNAs were measured by real-time PCR.

#### RESULTS:

Our results showed that miRNA-155 presented the lowest expression, while miRNA-222 had the higher expression followed by miRNAs-221. The miRNAs expression were positively correlated each other at pre-RT control and post-RT, and inverse correlated to age before RT. Furthermore, RT promoted the overexpression of selected miRNAs. Their levels were also affected by CVD-linked clinical parameters, treatment and BC side.

### *CONCLUSIONS:*

The modulation of selected miRNAs expression together with other risk factors might be associated with the development of future cardiovascular pathologies. Further confirmatory researches are needed to assess their potential as possible biomarker in the progression or as therapeutic targets of RT-induced CVD in BC patients.

**Keywords:** breast cancer (BC), radiotherapy (RT), cardiovascular disease (CVD), microRNA (miRNA), blood, miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-221, miRNA-222

### **INTRODUCTION**

Breast cancer (BC) is one of the most important neoplasia among women. In Spain, 1 in 8 women will have BC and around 26,000 new cases per year are diagnosed (1). According to Instituto Nacional de Epidemiología, there were 6,213 BC deaths in 2014 (2). Both early detection and efficient systemic therapies lead to decrease diagnosed BC cases in UE and North America. Nevertheless, it is still the most common cause of death from cancer in less developed countries and the second cause in more developed countries subsequent to lung cancer (3).

The treatment of BC involves a combination of therapies as surgery, chemotherapy, hormonotherapy, targeted therapy and radiotherapy (RT). While RT could be omitted in some patients with a low-risk profile, above 1,000,000 patients received RT; which reduces the risk of local recurrence and mortality (4). RT treatment implies radiation exposure of the thoracic zone, including heart and blood vessels. Despite RT-related benefits, epidemiological data supports a relationship between RT and cardiovascular disease (CVD) (5, 6).

Patients with left-sided BC exhibit greater cardiotoxicity than those with right-sided tumors due to the exposition at RT by heart and left coronary artery (7-9). In a retrospective study, Darby et al. (9) observed that for every 1Gy increased in radiation on the heart, the risk of cardiac damage rose 7.4% in patients with left-sided BC. These authors also suggested that the exposure of ionizing radiation to the heart during RT of BC increases the risk of ischemia disease increases in a dose-dependent manner. Similarly, the meta-analysis performed by Cheng et al. (10), which includes 1,191,371 patients from 39 studies, supported that RT applied to patients with left-breast tumors caused major coronary heart failure and cardiac death than patients with right-sided BC. They also stated that risk of CVD begins within the first ten years after RT and heart mortality increases in the

second and third decades. Although RT-CVD association is lower than the established by risk factors such as smoking, hypertension, diabetes or hyperlipidemia; the risk of death due to CVD after this therapy exceeds the increase in RT-contributed survival. CVD associated to RT in BC patients are coronary heart disease (10, 11) and atherosclerosis (12).

The severity of these CVD-related pathologies leads the research on assessing novel CVD biomarkers. Nowadays, possible candidates as suitable biomarkers in diagnostic, prognostic or as therapeutic agents of this pathogenesis are microRNAs (miRNAs) (13-16).

miRNAs are small non-coding RNAs of about 22 nucleotides of length, which act as post-transcriptional regulators, thus modulating gene expression (17). There are found about 1,500-2,000 human miRNAs and it is estimated that over of 60% of protein-coding genes are directly regulated by miRNAs. One miRNA target several mRNAs and one mRNA could be regulated by different miRNAs. Furthermore, miRNAs are ubiquitous expressed, non-cell specific and can be released into circulation through 3 pathways: as microvesicles (i.e.: exosomes, apoptotic bodies), lipoproteins (i.e.: HDL) or as protein complex (i.e.: RISC) (18). Blood miRNAs are useful as biomarkers for disease diagnostic because it is used a non-invasive extraction method, they are sensitive, disease-specific, stables in body fluids for a long time and finally freezing-defrosting cycles seem to not affect their structure (19, 20). In fact, blood miRNAs have recently become attractive biomarkers in pathologies including CVD, due to their role as disease regulators (21, 22).

Previous studies supported the role of miRNAs-146a, -155, -221, and -222 in the progression of CVD, mainly by regulating inflammation, oxidative stress, apoptosis, and angiogenesis in atherosclerotic plaques (23-26). It is supported that all these miRNAs are overexpressed in human atherosclerotic lesions (27-29). miRNA-146a is an atheroprotective and anti-inflammatory miRNA that act in oxidized LDL-activated macrophages reducing lipid uptake and cytokine release (23, 30), but its absence suppress paradoxically atherosclerosis development in mice (27). Moreover, miRNA-155 regulates immune and inflammatory processes and also induces lipid uptake in monocytes and macrophages (24, 31). Finally, both miRNAs-221 and 222 exhibit anti-proliferative and pro-apoptotic actions in endothelial cells, whereas they promote proliferation and migration as well as inhibit apoptosis in smooth muscle cells (32, 33).

Therefore, the aim of our study was to evaluate the expression of these miRNAs in blood of pre-RT control and post-RT patients with BC.

## MATERIALS AND METHODS

### Participants treatment

In the study, 136 women (mean age: 56 years, range: 27-84 years) diagnosed of BC were included. They were attended at the Department of Radiation Oncology of Hospital Sant Joan (Reus, Spain). All patients had a Karnofsky Index <70 and were classified as 0 or 1 on the Eastern Cooperative Oncology Group scale (34). The exclusion criteria were to be pregnant or breastfeeding or to have previously received RT at the anatomical site. The protocol for metastatic BC patients (2.94%) was to proceed to RT following complete response of the metastases to primary systemic treatment (34). The applied treatment for these women was as follows. First, the tumor was extirpated by surgery to all patients. Then, according to their risk factor status, they received RT alone or combined with others therapies. On one hand, some patients received adjuvant chemotherapy (55.2%) and/or targeted therapy (17.6%) which were administered post-surgery, for about 4 or 5 months, and was concluded between 1 to 2 months before the RT. On the other hand, adjuvant hormone therapy commenced 1 to 2 months post-surgery and was usually administered simultaneously with RT (78.7% of patients).

### Radiotherapy schedule

All patients received RT during approximately 2 months. The radiation scheduled could be normofractionated RT (50Gy at 2Gy/day on the affected breast and 16Gy at 2Gy/day on the tumor bed for 5days/week) or hypofractionated RT (40Gy at 2.67Gy/day for 5days/week). The dose rate of all schedules was 4.5Gy/min (400MU/min) (35). Additionally, some patients received irradiation of regional lymph nodes, depending on risk factor status (36). During RT, a weekly acute toxicity assessment was performed using the criteria of the Radiation Therapy Oncology Group and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (37).

### Biological Samples

Blood samples of the patients were collected at two time-points: prior to RT (named as pre-RT control) and one month after the conclusion of RT (named as post-RT). Samples were collected into "PAXgene® Blood RNA" tubes (Qiagen) allowing the stabilization of intracellular miRNA, and they were stored at -80°C until use.



### miRNA isolation

For the miRNA isolation, 2mL of blood samples were centrifuged for 10min at 4,000 g. Then, supernatant was discarded and pellet was resuspended with 2mL PBS. After 10min at 4,000g centrifugation, supernatant was discarded and the next steps were performed by following the miRCURY™ RNA Isolation Kit (Exiqon). Briefly, the pellet was resuspended with 350µL of lysis buffer mixed with β-mercaptoethanol (100:1 ratio). Then, 200µL of 100% ethanol was added and mixed by vortex. The content was transferred onto a column and centrifuged 1min at 3,500g. The flowthrough was discarded and the column was washed three times by adding 400µL of Wash Solution and subsequently centrifuging 1min at 14,000g. Then, the flowthrough was discarded and the column was dry off by centrifuging 2min at 14,000g. Finally, 50µL of Buffer Elution was added onto the column and sample was centrifuged twice for 2min at 200g and 1min at 14,000g. The flowthrough containing miRNA was stored into RNA-free tubes at -80°C until use.

### cDNA synthesis

cDNA was synthesized using the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II (Exiqon). Briefly, 2µL of miRNA sample was mixed with 1µL Reverse Transcriptase enzyme, 2µL Reaction buffer and 5µL H<sub>2</sub>O. Then, GeneAmp® PCR System 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems™) was employed for the sample incubation. Using the thermocycler program, the miRNAs samples were reversing transcript for 60min at 42°C, the Reverse Transcriptase was inactivated for 5min at 95°C and the samples containing cDNA were maintained at 4°C and finally stored at -20°C.

### Real-time PCR

To determine miRNA levels, real time PCR assays were performed. The assessed miRNAs were miRNAs-146a, -155, -221 and -222. Levels of target miRNAs were normalized employing the miRNA-U6 as housekeeper. Briefly, the reactions were performed in a final reaction volume of 10µL, adding 3.5µL cDNA sample (previously diluted 1:40 with RNase-free water) and 6.5 µL mix containing 5µL ExiLENT SYBR® Green Master Mix (Exiqon), 1 µL tested Primer (miRCURY LNA™ uniRT PCR primer mix, Exiqon), 0.2µL ROX (Passive reference RT-PARE-03, Exiqon) and 0.3 µL RNase-free water. Negative controls were also run for each assay. Real-time reactions were run by use of a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), performing dsDNA denaturation activation for 10min at 95 °C and 40 cycles of 10 s at 95 °C followed by 1min at 60°C for amplification. Finally,

results were analysed using the 2.4 SDS Software (Applied Biosystems™) and RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems™).

### Statistical Analysis

For the statistical analysis,  $2^{-Dct}$  of selected miRNAs was calculated for each sample. Dct was calculated as Cycle threshold (Ct) of each miRNA – Ct of miRNA-U6. Then, in order to normalize and positivize results, log transformation and subsequent addition of a 3 units constant were applied. Statistics of transformed variable  $\log(2^{-Dct}) + 3$  did not differ from  $2^{-Dct}$  ones. First, ANOVA test was used to evaluate differences between their expressions and percentage of increase was calculated for each miRNA in comparison to the lower expressed one. Then, correlations between miRNAs expression and age at diagnose of patients were assessed employing Pearson correlation coefficient. Moreover, paired t-test was performed in order to assess the differences between pre-RT and post-RT expressions in blood of the selected miRNAs and their percentage of increase was calculated. Finally, single factors ANOVA tests were executed to evaluate the differences in their expression depending on CVD-linked clinical parameters, received treatment and BC side. The level of statistical significance for all tests was established at  $p < 0.05$ . All the calculations were performed with IBM® SPSS® Statistics (SPSS version 25 for Windows, USA).

## **RESULTS**

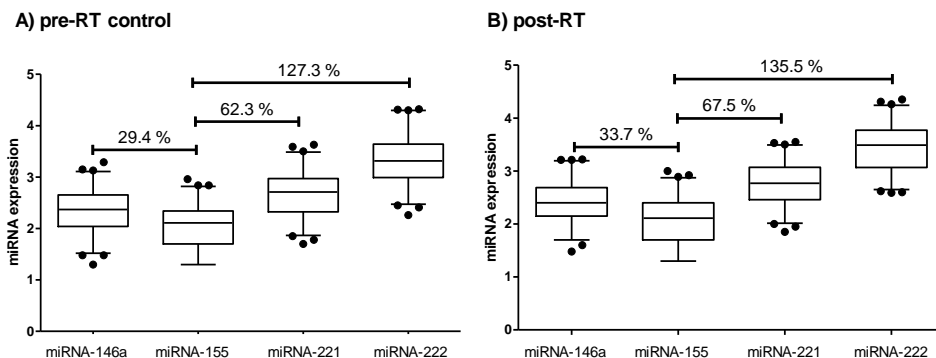
### Clinical characteristics of BC patients

The main clinical characteristics of the BC patients are shown in Table 1. On one hand, when recluded before RT, some women presented CVD-related diseases such as diabetes mellitus (8.1%), arterial hypertension (25.7%), dyslipidemia (27.2%), cardiac pathology (2.9%) or hypothyroidism (7.4%). Furthermore, the majority were post-menopausal. On the other hand, prevalent tumor molecular classification were Luminal A and B types. Moreover, 55.1% women received chemotherapy, 78.7% women received hormonal therapy, and targeted therapy was applied just on 17.6% patients. Lastly, affected BC side was similarly right or left, whereas only 1.5% women presented bilateral BC.

<b>Variable</b>	<b>Frequency (%)</b> <b>Total = 136</b>
Diabetes mellitus	8.1
Arterial hypertension	25.7
Dyslipidemia	27.2
Cardiac pathology	2.9
Hypothyroidism	7.4
<b>Menopause state</b>	
Pre-menopausal	21.3
Peri-menopausal	14.7
Post-menopausal	62.5
<b>Tumor molecular classification</b>	
Luminal A	29.4
Luminal B	36.8
Her2 positive	19.9
Triple negative	12.5
Chemotherapy	55.1
Hormonal therapy	78.7
Targeted therapy	17.6
<b>BC side</b>	
Right	48.5
Left	50.0
Bilateral	1.5

### Expression of miRNAs-146a, -155 -221 and -222 at pre-RT control and post-RT

Levels of miRNAs-146a, -155 -221 and -222 in blood of BC women are shown in Fig.1. In the current study, miRNA-155 presented the lowest expression at both pre-RT control and post-RT. When compared to this miRNA, the expression of miRNAs-146a, -221 and -222 before RT were significantly higher at 29.4%, 62.3% and 127.3%, respectively ( $p < 0.0001$ ) (Fig.1A). In addition, similar differences in expressions were maintained after RT observing a significant increases at 33.7%, 67.5% and 135.5%, respectively ( $p < 0.0001$ ) (Fig.1B).



**Fig.1. Expression of selected miRNAs in blood of breast cancer (BC) patients at pre-radiotherapy (RT) control (A) and post-RT (B).** miRNA expression ( $\log(2^{-DCT})+3$ ) is expressed as percentile 2.5-97.5. Percentage of expression increase in comparison to miRNA-155, which has the lowest expression, is indicated (%).

#### Correlations of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 expression at pre- RT control and post-RT

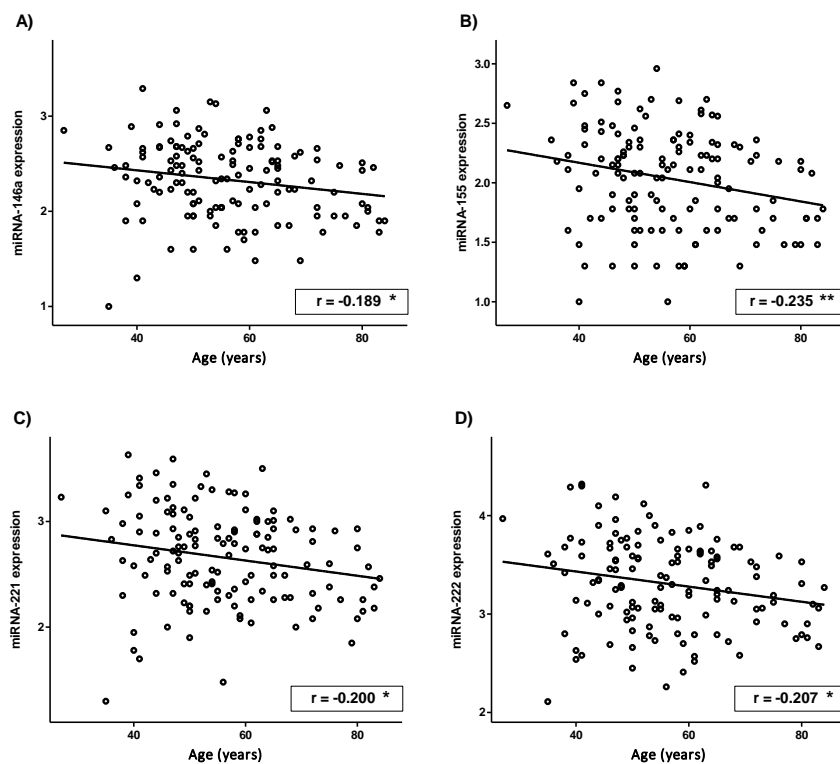
Table 2 shows the correlations between miRNAs expression in blood before and after RT of BC women. Results exhibited a significant positive correlation between miRNAs expression at both pre-RT control and post-RT; Pearson correlation coefficient ( $r$ ) was above 0.882 for all bivariate correlations.

Moreover, the expression of all studied miRNAs at pre-RT was statistically inverse correlated with age at diagnose (Fig.2). Results also exhibited that after RT this significant correlation was lost although persisted the same tendency (data not shown: miRNA-146a;  $r = -0.130$ , miRNA-155;  $r = -0.103$ , miRNA-221;  $r = -0.141$ , miRNA-222;  $r = -0.148$ ).

**Table 2. Correlations between expression of selected miRNAs in blood of breast cancer (BC) patients at pre-radiotherapy (RT) control and post-RT**

	Pre-RT control			Post-RT		
	miRNA-146a	miRNA-155	miRNA-221	miRNA-146a	miRNA-155	miRNA-221
miRNA-155	0.927**			0.924**		
miRNA-221	0.900**	0.917**		0.896**	0.909**	
miRNA-222	0.890**	0.910**	0.930**	0.882**	0.906**	0.922**

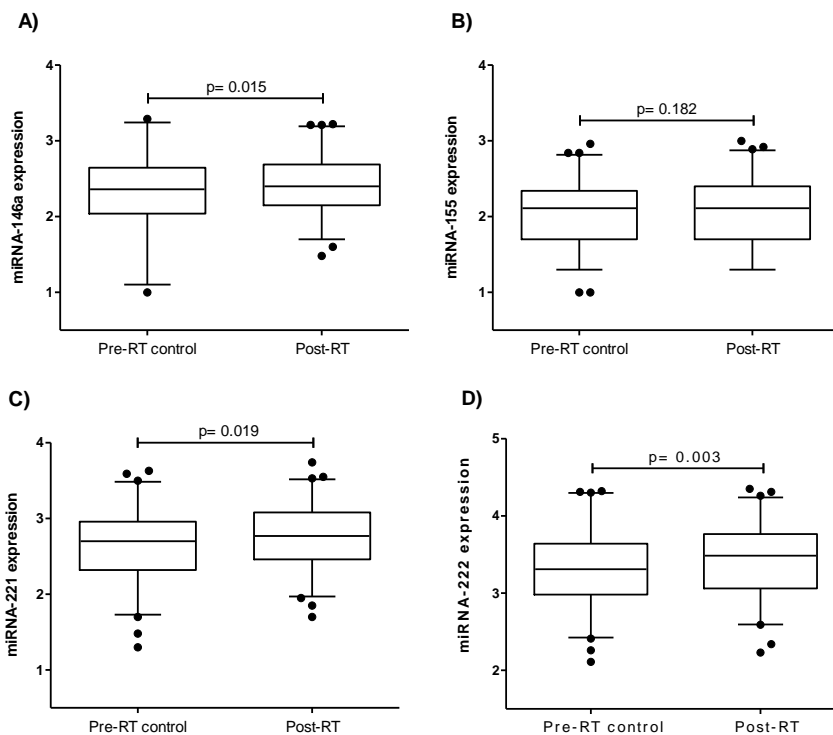
miRNA expression was calculated as  $\log(2^{-DCT})+3$ . Pearson correlation coefficient ( $r$ ) is shown. \*\*means significant differences at  $p < 0.01$  (bilateral).



**Fig.2.** Correlations of the expression of miRNAs-146a (A), -155 (B), -221 (C) and -222 (D) in blood of breast cancer (BC) patients with age at diagnose at pre- radiotherapy (RT) control. miRNA expression was calculated as  $\log(2^{-DC1})+3$ . Pearson correlation coefficient ( $r$ ) is shown. -means inverse correlation. \*means significant differences at  $p < 0.05$  (bilateral). \*\*means significant differences at  $p < 0.01$  (bilateral).

### Comparison of each miRNA expression between pre- RT control and post-RT time points

The expression of selected miRNAs in blood before and after RT of BC women is depicted in Fig.3. We observed that RT treatment induced an increase in the expression of selected miRNAs whose levels were higher post-RT than pre-RT control. While miRNA-222 had the greater statistical significant increase (12%,  $p=0.003$ ) (Fig.3D), miRNAs-146a (Fig.3A) and -221 (Fig.3C) rose significantly 7.6% ( $p=0.015$ ) and 9% ( $p=0.019$ ), respectively. Furthermore, miRNA-155 augmented 3.8% without statistical significance ( $p=0.182$ ) (Fig.3B).



**Fig.3.** Comparison of each blood miRNA (miRNAs-146a (A), -155 (B), -221 (C) and -222 (D)) of breast cancer (BC) patients between pre- radiotherapy (RT) control and post-RT time-points. miRNA expression ( $\log(2^{-DCT})+3$ ) is expressed as percentile 2.5-97.5. Statistics: paired t-test. p value indicates differences between groups.

### Evaluation of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 expression at pre- RT control and post-RT considering CVD-related clinical parameters, treatment and BC side

We assessed if the expression of selected miRNAs was associated with radiation schedule and we found no differences between miRNAs levels in women who received normofractionated RT or hypofractionated RT at both time-points (data not shown). Similarly, hypothyroid women presented significantly less levels than non-hypothyroid, before (miRNA-146a;  $p=0.026$ , miRNA-155;  $p=0.036$ , miRNA-222;  $p=0.015$ ) and after (miRNA-146a;  $p=0.028$ , miRNA-155;  $p=0.034$ , miRNA-221;  $p=0.017$ , miRNA-222;  $p=0.009$ ) RT; excluding miRNA-221 at pre-RT. In addition, expression of some miRNAs were significantly associated with treatment. Women who received chemotherapy showed significant raised levels of all selected miRNAs at pre-RT control (miRNA-146a;  $p=0.003$ , miRNA-155;  $p=0.001$ , miRNA-221;  $p=0.001$ , miRNA-222;  $p=0.001$ ); and miRNAs-155 ( $p=0.025$ ) and -221 at post-RT ( $p=0.030$ ), when compared to those not treated with chemotherapy.

Moreover, in concerning to targeted therapy, the expression of miRNAs-155, -221 and -222 previous to RT showed significantly higher levels in treated women than non-treated ones (miRNA-155;  $p=0.045$ , miRNA-221;  $p=0.003$ , miRNA-222;  $p=0.005$ ). Contrarily, the expression of these miRNAs did not differ significantly between women who received hormonal therapy and those who this therapy was not applied (data not shown). Finally, BC side was also significantly associated with miRNAs expression. It was observed a tendency in showing higher levels of left-sided BC women in comparison to those with right-sided BC for all miRNAs, which was significant for miRNA-146a at both pre-RT control ( $p=0.033$ ) and post-RT ( $p=0.025$ ), and also of miRNA-221 at pre-RT control ( $p=0.021$ ). On the other hand, bilateral BC-affected women had no differences in the miRNA expression when compared to both right- and left-sided BC women neither before nor after RT (data not shown:  $p=1$  for all miRNAs).

## DISCUSSION

In the present study we evaluated the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222, which are involved in the development of CVD, in blood of both pre-RT control and post-RT samples of BC women. Our results showed that at both time points, miRNA-222 had the higher expression, followed by miRNAs-221. Both miRNAs, miRNAs-221 and 222, are involved in the regulation of development and progression of atherosclerosis exhibiting anti-proliferative and pro-apoptotic actions in endothelial cells (32). Contrarily, they played an opposite role in smooth muscle cells inducing proliferation and migration, and inhibiting apoptosis (33). On the other hand, the expression of miRNA-155 were the lowest, in both the pre-RT control and post-RT blood samples. This observation is in accord with Gezer et al. (38) who indicated that circulating miRNA-221 levels of BC patients were higher than miRNA-155. Furthermore, recently miRNA-155 was considered below the detection limit by Alunni-Fabbroni et al. (39) who were not able to found expression of this miRNA in circulation of BC patients. In addition, our results showed that the expression of the four selected miRNAs was positive correlated each other at both pre- control and post-RT. Their correlation could be supported by linked regulation in their expression, as it is described a crosslink between these miRNAs in several pathways which they are involved in, such as inflammatory ones regulating atherosclerotic processes (26, 40, 41). Similarly, Baldeon et al. (42) found a correlation between circulating miRNAs-146 and -155 in diabetics and healthy patients.

Table 3. Expression of selected miRNAs expression in blood of breast cancer (BC) patients at pre-radiotherapy (RT) control and post-RT depending on CVD-linked clinical parameters, received treatment and BC side

Dyslipidemia	Pre-RT control			Post-RT		
	No (71.3%)	Yes (27.2%)		No (71.3%)	Yes (27.2%)	
			<b>p value</b>		<b>p value</b>	
miRNA-146a	2.38±0.043	2.20±0.057	0.023	2.45±0.037	2.28±0.070	0.023
miRNA-155	2.08±0.044	1.88±0.064	0.016	2.12±0.041	1.94±0.075	0.033
miRNA-221	2.71±0.048	2.51±0.060	0.023	2.80±0.040	2.61±0.074	0.018
miRNA-222	3.37±0.049	3.12±0.063	0.005	3.49±0.042	3.26±0.082	0.009
Hypothyroidism	No (91.2%)	Yes (7.4%)		No (91.2%)	Yes (7.4%)	
			<b>p value</b>		<b>p value</b>	
miRNA-146a	2.35±0.037	2.06±0.1	0.026	2.43±0.034	2.15±0.144	0.028
miRNA-155	2.05±0.039	1.76±0.10	0.036	2.07±0.037	1.80±0.141	0.034
miRNA-221	2.68±0.041	2.38±0.10	0.450	2.77±0.036	2.45±0.146	0.017
miRNA-222	3.33±0.042	2.96±0.10	0.015	3.46±0.039	3.07±0.173	0.009
Chemotherapy	No (39%)	Yes (55.1%)		No (39%)	Yes (55.1%)	
			<b>p value</b>		<b>p value</b>	
miRNA-146a	2.20±0.053	2.42±0.047	0.003	2.34±0.045	2.45±0.050	0.119
miRNA-155	1.86±0.054	2.14±0.048	0.001	1.97±0.053	2.15±0.051	0.025
miRNA-221	2.46±0.056	2.78±0.050	0.001	2.65±0.053	2.81±0.050	0.030
miRNA-222	3.13±0.055	3.41±0.055	0.001	3.34±0.055	3.49±0.055	0.069
Targeted therapy	No (78.7%)	Yes (17.6%)		No (78.7%)	Yes (17.6%)	
			<b>p value</b>		<b>p value</b>	
miRNA-146a	2.3±0.038	2.47±0.091	0.054	2.41±0.036	2.38±0.094	0.709
miRNA-155	2.00±0.041	2.19±0.088	0.045	2.08±0.040	2.08±0.098	0.940
miRNA-221	2.60±0.041	2.89±0.093	0.003	2.75±0.040	2.73±0.089	0.803
miRNA-222	3.25±0.042	3.53±0.106	0.005	3.44±0.043	3.38±0.096	0.563
BC side	Right (48.5%)	Left (50%)		Right (48.5%)	Left (50%)	
			<b>p value</b>		<b>p value</b>	
miRNA-146a	2.24±0.053	2.42±0.044	0.033	2.32±0.048	2.50±0.044	0.025
miRNA-155	1.96±0.054	2.11±0.050	0.133	2.00±0.052	2.14±0.050	0.133
miRNA-221	2.55±0.058	2.76±0.048	0.021	2.66±0.050	2.83±0.049	0.053
miRNA-222	3.22±0.060	3.39±0.052	0.083	3.37±0.056	3.48±0.053	0.568

Mean ± SEM of the expression ( $\log_2(\text{DCI})+3$ ) of selected miRNAs is shown. Statistics: Single factor ANOVA test. p value

indicates differences between groups.



We reported that the expression of selected miRNAs was statistically inverse correlated to age at diagnose of patients before RT. Thus, it was observed that with the age, levels of the selected miRNAs decreased significantly. Human aging is associated with an increase in age-related diseases such as cancer, diabetes mellitus or CVD (43, 44). A number of investigations suggest that longevity can be modulated by changes in expression of particular genes (45). It has been reported that changes in miRNA expression occur with human cellular senescence defined as an irreversible decline in cell proliferation (46). In this context, Noren Hooten et al. (47) analyzed the expression of over 800 miRNAs in blood of young and old individuals. The authors identified several miRNAs, including miRNA-221 and miRNA-155 that were less expressed in older individuals than in younger ones. In the same way, Fichtlscherer et al. (48) showed that age of females was inversely correlated with the circulating miRNA-155 levels in coronary artery disease (CAD) patients and in healthy population. Furthermore, our results showed that the correlation between miRNA expression and age was lost after RT treatment which indicated that RT induced an increase in the levels of selected miRNAs affecting mainly older patients.

We propose that observed RT-modulation of blood miRNAs-146a, -155, -221 and -222 might be involved in the progression of CVD that BC patients usually develop few years after RT treatment (15, 49). Numerous studies confirmed that all these miRNAs were overexpressed in atherosclerotic human lesions (27-29). Thus, it would be expected to find high levels of these miRNAs on circulation in CVD patients, as they are involved in this pathology. In fact, circulating miRNA-146a was overexpressed in CAD patients (50-52). However, other studies reported low miRNA-146a levels in circulation, as well as miRNAs-155, -221 and -222, in patients with dyslipidemia, CAD, coronary heart disease (CHD) or atherosclerosis (42, 48, 51, 53, 54). The observed miRNAs downregulation in these studies could be explained by the fact that miRNAs could be uptake by atherosclerotic lesions or maybe a feedback mechanism could control their overactivation. In the current study, to assess the effect of RT in the selected miRNAs levels, we compared the expression of each miRNA in blood between pre-RT control and post-RT samples. We observed a statistical overexpression of miRNAs-146a, -221 and -222, and also an increased tendency of miRNA-155, in blood one month after RT treatment. In previous investigations, miRNA-146a exhibited atheroprotective and anti-inflammatory properties by diminishing lipid uptake and cytokine release by oxidized LDL-activated macrophages (23, 30). Nevertheless, the absence of this miRNA suppressed paradoxically the development of atherosclerosis in mice (27). On the other hand, it has been reported that miRNA-

155 is highly expressed in activated immune cells and regulates immune and inflammatory responses, and also induces lipid uptake in monocytes and macrophages (24, 31). In a previous investigation carried out by Templin et al. (55), the effect of RT on blood miRNA profiles was analyzed. The authors reported 45 miRNAs differently expressed, including miRNAs-221 and -222 that were overexpressed in blood from patients in complete remission 1 or 2, after 4 hours of total body irradiation at a dose of 1.25Gy. In contrast, Sochor et al. (56) stated that chemotherapy or RT did not affect circulating levels of miRNAs-155. The discordance between this study and ours results could be due to differences between RT treatments as their patients received two single RT sessions and post-RT samples were taken at variable time points. Moreover, we observed that miRNA-222 had the higher increase. Despite miRNAs-221 and -222 contain the same seed (57), and both exhibit a role on endothelial dysfunction and atherogenesis (32, 58), miRNA-222 demonstrated to be more biologically relevant for inflammation-mediated neovessel formation (59). Therefore, our results in conjunction with previous data suggest that selected miRNA could be overexpressed due to RT in BC patients after one month, and might become downregulated many years later when developing CVD because they could migrate into atherosclerotic lesions.

One goal of our study was to analyze differences in the expression of selected miRNAs considering CVD-linked clinical parameters, treatment received and BC side. First, we analyzed dyslipidemia and hypothyroidism as both are well-known risk factor for CVD (60, 61). On one hand, results exhibited that BC women who were dyslipidemic had significant low expression of selected miRNAs than non-dyslipidemic at both pre-RT control and post-RT. Previous studies have assessed miRNA-146a levels in non-BC patients with dyslipidemia. In instance, Baldeon et al. (42) found low levels of circulating miRNA-146a of diabetes population, in which dyslipidemia is a common feature. Oppositely, this miRNA was overexpressed in circulation of patients with hyperlipidemia (62). The disagreements between the results of both studies might be due to differences between dyslipidemic profiles of the patients studied in both populations. In the same way, our results showed that patients with hypothyroidism presented significantly less miRNAs levels than non-hypothyroid, before and after RT; except the miRNA-221 at pre-RT. Contrarily, in a recent study enrolling 192 subjects, Quan et al. (63) found that circulating miRNA-146a were higher in patients with CHD and subclinical hypothyroidism than those with only CHD; suggesting that hypothyroidism was the responsible of miRNA-146a overexpression. It should be noted that Quan et al. (63) differed from our study as it was comprised by non-BC but CHD patients. Moreover, our results confirms the relationship

between selected miRNAs downregulation and CVD, as we showed that dyslipidemic and hypothyroid patients had low levels of selected miRNAs.

On the other hand, we assessed if treatment could lead to different miRNAs expression in both pre-RT control and post-RT conditions. It is described that chemotherapy as well as targeted and hormonal therapies are involved in cardiopathologies, but exhibiting less severity than RT (64-67). In the present study, some patients had received chemotherapy at pre-RT control time point. Our results established that BC women who received chemotherapy overexpressed miRNAs-146a and -222 at pre-RT; and miRNAs-155 and -221 at post-RT, when compared to those not chemotherapy-treated. Interestingly, other authors found diminished circulating levels of miRNAs-155 and -221 at the end of chemotherapy on BC patients (38, 68), whereas Rigaud et al. (69) found increased miRNA-146a levels after 3 weeks concluding chemotherapy in BC patients; whose results are in accord with ours. Furthermore, the differences in the expression of these miRNAs due to chemotherapy, as it is an established risk of cardiotoxicity (65, 67), might support their role on CVD. In addition, our results indicated that blood miRNAs-155, -221 and -222 were enhanced previous to RT in women which received targeted therapy in comparison to other ones. Therefore, we suppose that this miRNAs increase might be related with targeted therapy-associated CVD (64, 66). According to the data obtained in our study, we suggest that hormonal therapy, which is applied at the same time of RT on some BC women, did not interfere with miRNAs expression because we did not find differences between miRNA levels in hormonal therapy-treated and -non treated patients neither pre- or post-RT. Furthermore, miRNA-146a was overexpressed in left-sided BC patients before and after RT, and miRNA-221 at post-RT when compared to right-sided. Thus, it might exist a possible link between the observed modulation on miRNA expression and CVD, as RT on left-sided tumor induced greater cardiotoxicity than right-sided (7).

In conclusion, our results showed that RT lead to the overexpression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222, which are involved in the progression of CVD, in blood of BC women. The miRNAs expression were positively correlated each other at pre- control and post-RT, and inverse correlated to age at pre-RT control. Furthermore, CVD-linked clinical parameters such as dyslipidemia and hypothyroidism, as well as the treatment with chemotherapy and targeted therapy, and BC side also affect their levels. Thus, the modulation of these miRNAs expression together with other risk factors might be associated with the development of future cardiovascular pathologies. Variation in the miRNA signature in a diseased peripheral circulatory system opens up a new avenue in the

field of biomarker discovery. However, further more confirmatory researches are needed to assess their potential in the progression of CVD or as therapeutic targets in treatment of RT-induced CVD in BC patients.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI 10/02547, PI030786), Centro de Investigación Biomédica en Red en Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBER-DEM) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). We are especially grateful to Lluís Masana and Sandra Guaita for their useful comments that helped to improve the manuscript and to Roser Rosales for the technical assistance with the miRNA methods.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Conflict of interest: none.

## REFERENCES

1. AECC. Asociación Española Contra el Cáncer. 2014.
2. INE. Instituto Nacional de Epidemiología. 2014.
3. Kim CS, Algan O. Radiation Therapy, Breast Cancer Early Stage. StatPearls. Treasure Island (FL)2018.
4. Chen X YX, Chen J, Yang Z, Shao Z, Zhang Z, Guo X, Feng Y. Radiotherapy can improve the disease-free survival rate in triple-negative breast cancer patients with T1-T2 disease and one to three positive lymph nodes after mastectomy. *The oncologist*. 2013;18(2):7.
5. Obi N, Eulenburg C, Seibold P, Eilber U, Thone K, Behrens S, et al. Associations between adjuvant radiotherapy and different causes of death in a German breast cancer cohort. *Breast*. 2018;38:75-80. Epub 2017/12/19.
6. de Vries S, Schaapveld M, van Nimwegen FA, Jozwiak K, Lugtenburg PJ, Daniels LA, et al. High burden of subsequent malignant neoplasms and cardiovascular disease in long-term Hodgkin lymphoma survivors. *British journal of cancer*. 2018. Epub 2018/01/31.

7. Palumbo I, Palumbo B, Fravolini ML, Marcantonini M, Perrucci E, Latini ME, et al. Brain natriuretic peptide as a cardiac marker of transient radiotherapy-related damage in left-sided breast cancer patients: A prospective study. *Breast*. 2016;25:45-50. Epub 2015/11/09.
8. Skytta T, Tuohinen S, Boman E, Virtanen V, Raatikainen P, Kellokumpu-Lehtinen PL. Troponin T-release associates with cardiac radiation doses during adjuvant left-sided breast cancer radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2015;10:141. Epub 2015/07/15.
9. Darby SC, Ewertz M, McGale P, Bennet AM, Blom-Goldman U, Bronnum D, et al. Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368(11):987-98. Epub 2013/03/15.
10. Cheng YJ, Nie XY, Ji CC, Lin XX, Liu LJ, Chen XM, et al. Long-Term Cardiovascular Risk After Radiotherapy in Women With Breast Cancer. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(5). Epub 2017/05/23.
11. Roos CTG, van den Bogaard VAB, Greuter MJW, Vliegenthart R, Schuit E, Langendijk JA, et al. Is the coronary artery calcium score associated with acute coronary events in breast cancer patients treated with radiotherapy? *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2018;126(1):170-6. Epub 2017/11/02.
12. Raghunathan D, Khilji MI, Hassan SA, Yusuf SW. Radiation-Induced Cardiovascular Disease. *Current atherosclerosis reports*. 2017;19(5):22. Epub 2017/03/21.
13. Costantino S, Camici GG, Mohammed SA, Volpe M, Luscher TF, Paneni F. Epigenetics and cardiovascular regenerative medicine in the elderly. *International journal of cardiology*. 2018;250:207-14. Epub 2017/10/11.
14. Gacon J, Badacz R, Stepien E, Karch I, Enguita FJ, Zmudka K, et al. Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study. *Kardiologia polska*. 2018;76(2):362-9. Epub 2018/01/20.
15. Gangwar RS, Rajagopalan S, Natarajan R, Deiluiis JA. Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Pathological Relevance and Emerging Role as Biomarkers and Therapeutics. *American journal of hypertension*. 2018;31(2):150-65. Epub 2017/12/01.
16. De Rosa S, Eposito F, Carella C, Strangio A, Ammirati G, Sabatino J, et al. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs in heart failure. *European journal of heart failure*. 2018. Epub 2018/01/10.

17. Dlouha D, Hubacek JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiological research*. 2017;66(Supplementum 1):S21-S38. Epub 2017/04/06.
18. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*. 2008;10(12):1470-6. Epub 2008/11/18.
19. de Lucia C, Komici K, Borghetti G, Femminella GD, Bencivenga L, Cannavo A, et al. microRNA in Cardiovascular Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases. *Frontiers in medicine*. 2017;4:74. Epub 2017/07/01.
20. Malla B, Zaugg K, Vassella E, Aebersold DM, Dal Pra A. Exosomes and Exosomal MicroRNAs in Prostate Cancer Radiation Therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2017;98(5):982-95. Epub 2017/07/20.
21. Jiang Y, Wang HY, Li Y, Guo SH, Zhang L, Cai JH. Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases. *Scientific reports*. 2014;4:5026. Epub 2014/05/23.
22. Di Stefano V, Zaccagnini G, Capogrossi MC, Martelli F. microRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vascular pharmacology*. 2011;55(4):111-8. Epub 2011/08/19.
23. Economou EK, Oikonomou E, Siasos G, Papageorgiou N, Tsalamandris S, Mourouzis K, et al. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):624-33. Epub 2015/06/29.
24. Huang RS, Hu GQ, Lin B, Lin ZY, Sun CC. MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages. *Journal of investigative medicine*. 2010;58(8):961-7. Epub 2010/10/30.
25. Liu G, Huang Y, Lu X, Lu M, Huang X, Li W, et al. Identification and characteristics of microRNAs with altered expression patterns in a rat model of abdominal aortic aneurysms. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2010;222(3):187-93. Epub 2010/10/30.
26. Hulsmans M, De Keyser D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB journal*. 2011;25(8):2515-27. Epub 2011/04/22.
27. Cheng HS, Besla R, Li A, Chen Z, Shikatani EA, Nazari-Jahantigh M, et al. Paradoxical Suppression of Atherosclerosis in the Absence of microRNA-146a. *Circulation research*. 2017;121(4):354-67. Epub 2017/06/24.

28. Wang R, Dong LD, Meng XB, Shi Q, Sun WY. Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;464(2):574-9. Epub 2015/07/15.
29. Xue Y, Wei Z, Ding H, Wang Q, Zhou Z, Zheng S, et al. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1alpha in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):671-81. Epub 2015/06/29.
30. Oner T, Arslan C, Yenmis G, Arapi B, Tel C, Aydemir B, et al. Association of NFKB1A and microRNAs variations and the susceptibility to atherosclerosis. *Journal of genetics*. 2017;96(2):251-9. Epub 2017/07/05.
31. Chen T, Yan H, Li Z, Jing T, Zhu W, Ge J, et al. MicroRNA-155 regulates lipid uptake, adhesion/chemokine marker secretion and SCG2 expression in oxLDL-stimulated dendritic cells/macrophages. *International journal of cardiology*. 2011;147(3):446-7. Epub 2011/01/27.
32. Celic T, Metzinger-Le Meuth V, Six I, Massy ZA, Metzinger L. The mir-221/222 Cluster is a Key Player in Vascular Biology via the Fine-Tuning of Endothelial Cell Physiology. *Current vascular pharmacology*. 2017;15(1):40-6. Epub 2016/09/17.
33. Liu X, Cheng Y, Yang J, Xu L, Zhang C. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52(1):245-55. Epub 2011/12/06.
34. Arenas M, Garcia-Heredia A, Cabre N, Luciano-Mateo F, Hernandez-Aguilera A, Sabater S, et al. Effect of radiotherapy on activity and concentration of serum paraoxonase-1 in breast cancer patients. *PloS one*. 2017;12(11):e0188633. Epub 2017/11/28.
35. Prades J, Algara M, Espinas JA, Farrus B, Arenas M, Reyes V, et al. Understanding variations in the use of hypofractionated radiotherapy and its specific indications for breast cancer: A mixed-methods study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2017;123(1):22-8. Epub 2017/02/27.
36. Arenas M, Montero A, de Las Penas MD, Algara M. The position and current status of radiation therapy after primary systemic therapy in breast cancer: a national survey-based expert consensus statement. *Clinical & translational oncology*. 2016;18(6):582-91. Epub 2015/09/16.

37. Bots WTC, van den Bosch S, Zwijnenburg EM, Dijkema T, van den Broek GB, Weijs WLJ, et al. Reirradiation of head and neck cancer: Long-term disease control and toxicity. *Head & neck*. 2017;39(6):1122-30. Epub 2017/03/07.
38. Gezer U, Keskin S, Igci A, Tukenmez M, Tiryakioglu D, Cetinkaya M, et al. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy. *Oncology letters*. 2014;8(2):845-8. Epub 2014/07/11.
39. Alunni-Fabroni M, Majunke L, Trapp EK, Tzschaschel M, Mahner S, Fasching PA, et al. Whole blood microRNAs as potential biomarkers in post-operative early breast cancer patients. *BMC cancer*. 2018;18(1):141. Epub 2018/02/08.
40. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Suarez Y. MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction. *Pharmacological research*. 2013;75:15-27. Epub 2013/04/23.
41. Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):703-20. Epub 2016/02/20.
42. Baldeon RL, Weigelt K, de Wit H, Ozcan B, van Oudenaren A, Sempertegui F, et al. Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PloS one*. 2014;9(12):e115209. Epub 2014/12/17.
43. Strain T, Kelly P, Mutrie N, Fitzsimons C. Differences by age and sex in the sedentary time of adults in Scotland. *Journal of sports sciences*. 2018;36(7):732-41. Epub 2017/06/18.
44. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Frontiers in immunology*. 2018;9:586. Epub 2018/04/25.
45. Vijg J, Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008;454(7208):1065-71. Epub 2008/08/30.
46. Wang Y, Scheiber MN, Neumann C, Calin GA, Zhou D. MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;81(3):839-48. Epub 2010/11/26.
47. Noren Hooten N, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK. microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PloS one*. 2010;5(5):e10724. Epub 2010/05/28.



48. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research*. 2010;107(5):677-84. Epub 2010/07/03.
49. Yang Z, Xie L, Han L, Qu X, Yang Y, Zhang Y, et al. Circular RNAs: Regulators of Cancer-Related Signaling Pathways and Potential Diagnostic Biomarkers for Human Cancers. *Theranostics*. 2017;7(12):3106-17. Epub 2017/08/26.
50. Guo M, Mao X, Ji Q, Lang M, Li S, Peng Y, et al. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome. *Immunology and cell biology*. 2010;88(5):555-64. Epub 2010/03/03.
51. Yao R, Ma Y, Du Y, Liao M, Li H, Liang W, et al. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome. *Cellular & molecular immunology*. 2011;8(6):486-95. Epub 2011/08/02.
52. Ramkaran P, Khan S, Phulukdaree A, Moodley D, Chuturgoon AA. miR-146a polymorphism influences levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in young patients with coronary artery disease. *Cell biochemistry and biophysics*. 2014;68(2):259-66. Epub 2013/06/25.
53. Jia QW, Chen ZH, Ding XQ, Liu JY, Ge PC, An FH, et al. Predictive Effects of Circulating miR-221, miR-130a and miR-155 for Coronary Heart Disease: A Multi-Ethnic Study in China. *Cellular physiology and biochemistry*. 2017;42(2):808-23. Epub 2017/06/20.
54. Bildirici AE, Arslan S, Ozbilum Sahin N, Berkan O, Beton O, Yilmaz MB. MicroRNA-221/222 Expression in Atherosclerotic Coronary Artery Plaque and Peripheral Blood. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2018:1-19. Epub 2018/05/09.
55. Templin T, Paul S, Amundson SA, Young EF, Barker CA, Wolden SL, et al. Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;80(2):549-57. Epub 2011/03/23.
56. Sochor M, Basova P, Pesta M, Dusilkova N, Bartos J, Burda P, et al. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC cancer*. 2014;14:448. Epub 2014/06/19.

57. Zhang C, Kang C, Wang P, Cao Y, Lv Z, Yu S, et al. MicroRNA-221 and -222 regulate radiation sensitivity by targeting the PTEN pathway. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;80(1):240-8. Epub 2011/04/13.
58. Koroleva IA, Nazarenko MS, Kucher AN. Role of microRNA in Development of Instability of Atherosclerotic Plaques. *Biochemistry Biokhimiia*. 2017;82(11):1380-90. Epub 2017/12/11.
59. Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D, Brizzi MF. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(8):1562-8. Epub 2010/05/22.
60. Turer CB, Brady TM, de Ferranti SD. Obesity, Hypertension, and Dyslipidemia in Childhood Are Key Modifiable Antecedents of Adult Cardiovascular Disease: A Call to Action. *Circulation*. 2018;137(12):1256-9. Epub 2018/03/21.
61. Decandia F. Risk factors for cardiovascular disease in subclinical hypothyroidism. *Irish journal of medical science*. 2018;187(1):39-43. Epub 2017/05/12.
62. Simionescu N, Niculescu LS, Sanda GM, Margina D, Sima AV. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Molecular biology reports*. 2014;41(9):5765-73. Epub 2014/06/15.
63. Quan X, Ji Y, Zhang C, Guo X, Zhang Y, Jia S, et al. Circulating MiR-146a May be a Potential Biomarker of Coronary Heart Disease in Patients with Subclinical Hypothyroidism. *Cellular physiology and biochemistry*. 2018;45(1):226-36. Epub 2018/01/23.
64. Khosrow-Khavar F, Filion KB, Al-Qurashi S, Torabi N, Bouganim N, Suissa S, et al. Cardiotoxicity of aromatase inhibitors and tamoxifen in postmenopausal women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of oncology*. 2017;28(3):487-96. Epub 2016/12/22.
65. Zagar TM, Cardinale DM, Marks LB. Breast cancer therapy-associated cardiovascular disease. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016;13(3):172-84. Epub 2015/11/26.
66. Long HD LY, Zhang JJ, Zhong WZ, Zheng RN. Risk of Congestive Heart Failure in Early Breast Cancer Patients Undergoing Adjuvant Treatment With Trastuzumab: A Meta-Analysis. *The oncologist*. 2016;21(5):8.

67. Koelwyn GJ LN, Ellard SL, Jones LW, Gelinás JC, Rolf JD, Melzer B, Thomas SM, Douglas PS, Khouri MG, Eves ND. Ventricular-Arterial Coupling in Breast Cancer Patients After Treatment With Anthracycline-Containing Adjuvant Chemotherapy. *The oncologist*. 2016;21(2):9.
68. Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PloS one*. 2012;7(10):e47003. Epub 2012/10/17.
69. Rigaud VO, Ferreira LR, Ayub-Ferreira SM, Avila MS, Brandao SM, Cruz FD, et al. Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(4):6994-7002. Epub 2017/01/05.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

**TREBALL 2**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

## **RADIOTHERAPY-MODULATION IN EXPRESSION OF MIRNAS-146a, -155, -221 AND -222 IS ASSOCIATED WITH CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN WOMEN WITH BREAST CANCER**

### **INTRODUCTION**

Nowadays, cardiovascular diseases (CVD) has received increased attention among breast cancer (BC) patients in complete remission since it is the main late effect induced by treatment (1). BC survivors have a higher risk of atherosclerosis, hypertension, pericardial disease, valvular heart disease and dyslipidemia (2). Furthermore, the risk of cardiovascular death is higher than the actual risk of cancer recurrence in many of these patients (3). This CVD effects are secondary to a combination of BC treatment-related risk effects such as ionizing irradiation, cytotoxic, targeted agents, familiar risk factors and health behavior (4).

Radiotherapy (RT), which is applied to half million BC patients improving their survival (5), implies the exposition to radiation of thoracic zone, affecting heart and blood vessels and it promoted major cardiotoxicity than other BC treatments (6, 7). Despite it was thought that CVD emerged until 10 years after exposure, nowadays the risk have been observed within 5 years of exposure (8).

Consequently, BC survivors need appropriate surveillance in order to early detect long-term side effects of therapy, allowing appropriate treatment before the toxicity becomes irreversible (9). In this respect, easily accessible circulating biomarkers could be seen as highly valuable diagnostic tools for early detection of cardiotoxicity related to cancer treatments. In the past decade, miRNAs has emerged as a major regulator of several pathologies including CVD (10-13). They act at post-transcriptional level by targeting mRNAs, whereby modulating various processes including cell growth, differentiation, cell cycle and cell death (14). As inherent gene regulators, miRNAs could offer new predictive and therapeutic possibilities (15). They are quite stable in the peripheral circulation and can be detected by high-throughput techniques (16).

Among miRNAs involved in the progression of CVD and atherosclerosis, miRNAs-146a, -155, -221 and -222 exhibit an important role in inflammation, oxidative stress, apoptosis and angiogenesis in atherosclerotic plaque (12, 17-20). More specifically, elevated levels of miRNA-146a has been mainly described for its implication in inflammatory response by inactivating endothelial cell proliferation and viability, lipid accumulation in atherosclerotic plaques and the production of

cytokine secretion; thus exhibiting an atheroprotective and anti-inflammatory role (12, 18). Nevertheless, its role in CVD is still controversial as its absence paradoxically reduced atherosclerosis development in mice (21). Contrarily, miRNA-155 inhibits proliferation and migration of endothelial cells, promotes cytokine production and contribute to the formation of foam cells and enhance atherosclerosis progression (12). It is an immuno-miRNA with a primary role in almost all immune cells and exhibits pro-atherogenic activity in macrophages. It is the second most studied miRNA in respect to atherosclerosis (22, 23). Moreover, miRNAs-221 and -222 were identified as anti-angiogenic by controlling endothelial cell migration and proliferation, and vascular smooth muscle cell growth (19, 24). Therefore, these miRNAs contribute into appearance and/or progression of atherosclerosis (20, 25). In addition, many studies confirm that levels of all selected miRNAs are elevated in human atherosclerotic plaques (21, 23, 26), and their circulating levels are downregulated in CVD patients (27-31).

Due to their role in atherosclerosis and CVD, this study is focused on evaluating the ability of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 as potential CVD biomarkers in blood of women with BC by assessing the modulation of RT-modulation in their expression, as well as their relationship with cardiovascular risk factors for these patients such as age and treatment.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Participant treatment

The current study was comprised of 136 women (mean age: 56 years, range: 27-84) diagnosed of BC who attended at the Department of Radiation Oncology of Hospital Sant Joan (Reus, Spain). They had a Karnofsky Index <70 and were classified as 0 or 1 on the Eastern Cooperative Oncology Group scale (32). The exclusion criteria included to be pregnant or breastfeeding or to have previously received RT at the anatomical site. The protocol for metastatic BC patients (2.94%) was to proceed to RT following complete response of the metastases to primary systemic treatment (32). Women received the following treatment: first, the tumor was extirpated by surgery and, then, they received RT alone or combined with others therapies according to their risk factor status. Adjuvant chemotherapy (55.2%) and/or targeted therapy (17.6%) were administered for about 4 or 5 months, until 1 to 2 months before the RT. Moreover, adjuvant hormone therapy started 1 to 2 months post-surgery and was usually administered simultaneously with RT (78.7%).



### Radiotherapy schedule

RT was applied to all patients for approximately two months. The radiation scheduled could be normofractionated RT (50Gy at 2Gy/day on the affected breast and 16Gy at 2Gy/day on the tumor bed for 5days/week) or hypofractionated RT (40Gy at 2.67Gy/day for 5days/week). The dose rate of all schedules was 4.5Gy/min (400MU/min) (33). During RT, a weekly acute toxicity assessment was performed using the criteria of the Radiation Therapy Oncology Group and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (34).

### Biological Samples

Blood samples of the patients were collected prior to RT and one month after the conclusion of RT; named as pre-RT control and post-RT, respectively. Samples were collected into "PAXgene Blood RNA" tubes (Qiagen), which allow the stabilization of intracellular miRNA, and they were stored at -80°C until use.

### miRNA isolation

For the miRNA isolation, 2 mL of blood sample was centrifuged for 10min at 4,000 g and pellet was resuspended with 2 mL PBS. A centrifugation for 10min at 4,000 g was performed, discarding supernatant. Then next steps were performed by following the miRCURY™ RNA Isolation Kit (Exiqon). Briefly, the pellet was resuspended with 350µL of lysis buffer mixed with β-mercaptoethanol (100:1 ratio) and 200µL of 100% ethanol was added and mixed by vortex. After transferring content onto a column, it was centrifuged for 1min at 3,500 g and the flowthrough was discarded. Then, the column was washed three times by adding 400µL of Wash Solution and subsequently centrifuged for 1min at 14,000 g, discarding the flowthrough. It was centrifuged for 2min at 14,000 g to dry it off and, then, 50µL of Buffer Elution was added onto the column. Finally, after centrifuging sample twice for 2min at 200 g and 1min at 14,000 g, the containing-miRNA flowthrough was stored into RNA-free tubes at -80°C until use.

### cDNA synthesis

cDNA was synthesized using the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II (Exiqon). Briefly, they were mixed 2µL of miRNA sample, 1µL Reverse Transcriptase enzyme, 2µL Reaction buffer and 5µL H<sub>2</sub>O. Sample was incubated in the GeneAmp PCR System 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems). miRNA was reversing transcribed for 60min

at 42°C, the Reverse Transcriptase was inactivated for 5min at 95°C and sample containing cDNA was maintained at 4°C by the thermocycler program. Finally, cDNA was stored at -20°C.

### Real-time PCR

Real-time PCR assays were performed in order to determine the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222, by employing the miRNA-U6 as housekeeper. Briefly, to perform the reaction, 3.5µL cDNA sample (previously diluted 1:40 with RNase-free water) and 6.5µL mix containing 5µL ExiLENT SYBR Green Master Mix (Exiqon), 1µL tested Primer (miRCURY LNA™ uniRT PCR primer mix, Exiqon), 0.2µL ROX (Passive reference RT-PARE-03, Exiqon) and 0.3µL RNase-free water were mixed in a final reaction volume of 10µL. Negative controls were also run for each assay. 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) was used to run the real-time reactions: dsDNA denaturation was activated for 10min at 95°C and sample was amplified during 40cycles of 10s at 95°C followed by 1min at 60°C. Finally, results were analyzed using the 2.4 SDS Software (Applied Biosystems) and RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems). For the statistical analysis, Cycle threshold (Ct) was measured for each sample and DeltaCt (Dct) of selected miRNAs was calculated as Ct sample - Ct median U6, in order to normalize miRNA expression. Then, to assess miRNAs expression, change in levels of selected miRNAs was calculated as Dct of post-RT sample – Dct of pre-RT control

### Statistical Analysis

ANOVA test was used to evaluate differences between change in levels of miRNAs. Then, correlations between expression changes were assessed employing Pearson correlation coefficient. ANOVA tests were executed to evaluate the differences in expression change depending on treatment, such as hormonotherapy, chemotherapy and targeted therapy; as well as BC parameters, such as Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR) and Human Epidermal growth factor Receptor-type2 (HER2) and Ki-67 index. Finally, to test their association with targeted therapy, linear regression for each change in levels of miRNA was conducted initially using a crude model without adjustment for covariates, subsequently using a multivariable model adjusted for age at diagnose, and finally using a multivariable model adjusted for mentioned variable together with treatment. The level of statistical significance for all tests was established at p<0.05. All the calculations were performed with IBM® SPSS® Statistics (SPSS version 25 for Windows, USA).

## RESULTS

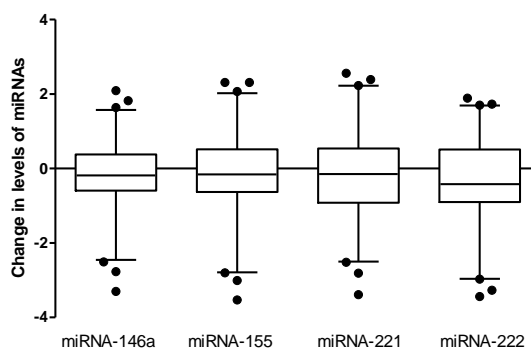
### Clinical characteristics of BC patients

The main clinical characteristics of the BC patients are shown in Table 1. Prevalent tumor molecular classification were Luminal A and B types; and ER and PR positive, HER2 negative and Ki-67 index above 15% were predominant. Hormonotherapy, chemotherapy, and targeted therapy was applied to 78.7%, 55.2%, 17.6% women, respectively.

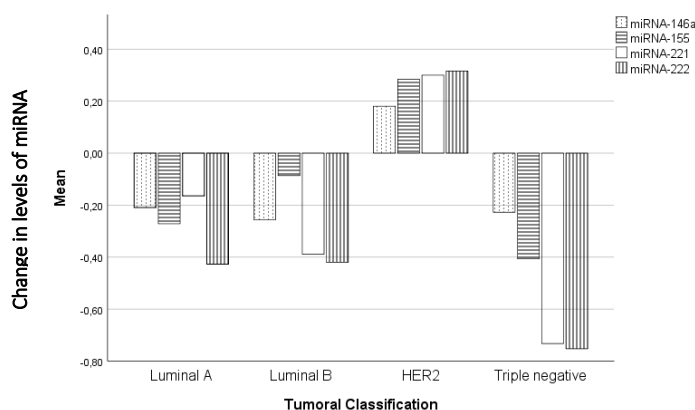
Table 1. Clinical characteristics of breast cancer (BC) patients	
Variable	Frequency (%) Total = 136
<b>Tumor molecular classification</b>	
Luminal A	29.4
Luminal B	36.8
Human Epidermal growth factor Receptor-type2 (HER2)	19.9
Triple negative	12.5
<b>Estrogen Receptors (ER)</b>	
negative	16.2
positive	83.1
<b>Progesterone Receptors (PR)</b>	
negative	33.8
positive	65.4
<b>HER2 in tumor biopsy</b>	
negative	78.7
positive	19.1
<b>Ki-67 index in tumor biopsy (%)</b>	
<15	35.3
>15	59.6
<b>Hormonotherapy</b>	78.7
<b>Chemotherapy</b>	55.1
<b>Targeted therapy</b>	17.6

### Effect of RT on the expression of miRNAs-146a, -155 -221 and -222

Fig.1 shows the change in levels of selected miRNAs. Negative change in levels means an increase in the expression and *vice versa*. Our results showed that RT promoted an increase in the expression of all miRNAs, indicated by a negative value in change in levels. We observed that miRNA-222 had the higher increase, followed by miRNAs-221, -146a and -155. When compared to miRNA-222, their change in expression were lower at 11.44%, 16.70% and 23.11%, respectively without statistical significance. Although RT increased the average of the expression of all miRNAs, we observed that levels were decreased in some patients. It is interesting to note that RT increased the expression of all miRNAs in patients who were classified in all tumor molecular groups except for HER2 (Fig.2). Furthermore, all changes were significant positive correlated with each other, showing a Pearson correlation coefficient ( $r$ ) above 0.809 for all bivariate correlations (Table 2).



**Fig.1. Change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of breast cancer (BC) patients.** Change in levels of miRNA expressions was calculated as Dct of post-RT sample – Dct of pre-RT control. Results are expressed as median and percentile 2.5-97.5.



**Fig.2. Change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of breast cancer (BC) patients in different groups of molecular tumor classification.** Change in levels of miRNA expressions was calculated as Dct of post-RT sample – Dct of pre-RT control. Results are expressed as mean. Patients were classified in Luminal A, Luminal B, HER2 and Triple negative according to tumor molecular classification.

**Table 2. Correlations between change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of breast cancer (BC) patients.**

	miRNA-146a	miRNA-155	miRNA-221
miRNA-155	0,847**		
miRNA-221	0,809**	0,815**	
miRNA-222	0,827**	0,842**	0,873**

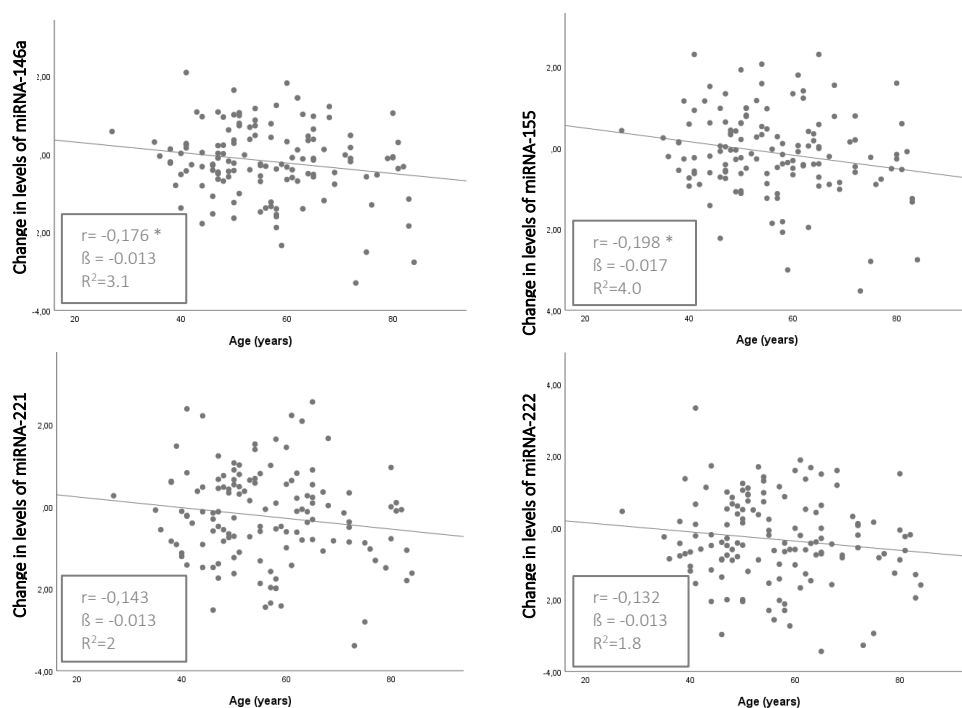
Change in levels of miRNAs was calculated as Dct post-RT – Dct control pre-RT.

Pearson correlation coefficient (r) is shown.

\*\* means significant differences at  $p < 0.01$  (bilateral).

### Evaluation of change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 considering age, treatment and BC molecular parameters

We observed that RT-modulated expression of selected miRNAs was positive correlated with age at diagnose indicated by significant inverse correlation between changes in levels of miRNAs-146a and -155, and a similar tendency in miRNAs-221 and -222 changes (Fig.3).



**Fig.3. Correlations between change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of breast cancer (BC) patients and age at diagnose.** Change in levels of miRNA was calculated as DCT of post-RT sample – DCT of pre-RT control. Pearson correlation coefficient ( $r$ ) is shown. \* means significant differences at  $p < 0.05$  (bilateral).  $\beta$  coefficient and  $R^2$  of each linear regression were shown.

We analyzed the associations between change in levels of selected miRNAs and received treatment, such as hormonotherapy, chemotherapy and targeted therapy, which are cardiovascular risk factors for BC patients; as well as BC molecular parameters, such as ER, PR and HER2 and Ki-67 index. Results showed that the increase in RT-modulated expression of miRNA-221 was significantly lower in patients who received chemotherapy in comparison to non-chemotherapy treated. The same tendency was shown for the other selected miRNAs, although non-significantly. We observed that targeted therapy affected change in levels of all selected miRNAs. As shown in Table 3, women who had received target therapy had decreased RT-modulated expression which significantly differ to those non-treated with targeted therapy. In this case, they present an increase in RT-modulated expression. Oppositely, there was no association between miRNAs changes and hormonotherapy (supplementary data).

In addition, patients who were positive for HER2 had decreased RT-modulated expression, whereas negative ones presented enhanced RT-modulated expression; and both groups differed significantly (Table 3). Finally, ER or PR and Ki-67 index were not associated with miRNAs expression (supplementary data).

Table 3. Change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of breast cancer (BC) patients depending on received treatment and Human Epidermal growth factor Receptor-type2 (HER2).

Chemotherapy	non-chemotherapy (39%)		chemotherapy (55.1%)		p value
	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	
miRNA-146a	-0.3773	Increase	-0.0768	Increase	0.078
miRNA-155	-0.3690	Increase	-0.0056	Increase	0.053
miRNA-221	-0.5180	Increase	-0.0578	Increase	0.024
miRNA-222	-0.5661	Increase	-0.1848	Increase	0.082
Targeted therapy	non-targeted therapy (78.7%)		targeted therapy (17.6%)		p value
	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	
miRNA-146a	-0.3248	Increase	0.3288	Decrease	0.002
miRNA-155	-0.2536	Increase	0.3621	Decrease	0.008
miRNA-221	-0.4420	Increase	0.5154	Decrease	0.000
miRNA-222	-0.5483	Increase	0.5042	Decrease	0.000
HER2	negative (78.7%)		positive (19.1%)		p value
	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	
miRNA-146a	-0.2607	Increase	0.2392	Decrease	0.013
miRNA-155	-0.2080	Increase	0.3135	Decrease	0.018
miRNA-221	-0.3786	Increase	0.3873	Decrease	0.001
miRNA-222	-0.4944	Increase	0.3827	Decrease	0.001

Mean of change in levels of miRNAs (DCt post-RT – DCt control pre-RT) is shown.

Statistics: Single factor ANOVA test.

RT-modulated expression column indicate if expression was increased (negative change in levels value) or decreased (positive change in levels value) at post-RT.

p value indicates differences between groups.

### Association of change in levels of miRNAs expression with targeted therapy

The effect of targeted therapy on the change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 was further estimated by a linear regression model (Table 4). In crude analysis, it was shown that BC patients who were treated with targeted therapy had significantly lower RT-modulated expression, indicated by positive changes in levels, of miRNAs-146a ( $\beta=0.654$ ,  $p=0.001$ ), -155 ( $\beta=0.616$ ,  $p=0.008$ ), -221 ( $\beta=0.957$ ,  $p=0.001$ ) and -222 ( $\beta=1.052$ ,  $p=0.001$ ) in comparison to non-treated ones. Targeted therapy explained 7.5% ( $p=0.002$ ), 5.4% ( $p=0.008$ ), 11.4% ( $p=0.001$ ) and 11.9% ( $p=0.001$ ) of variability in change in miRNAs levels, respectively (Model 1, Table 4). The observed association between targeted therapy and change in miRNAs expression was still significant when adjusted for age, a cardiovascular risk factor (Model 2, Table 4). Finally, Model 3 (Table 4) was used to quantify the association of targeted therapy by adjusting for mentioned confounder variable together with chemotherapy and hormonotherapy. Results showed that targeted therapy was still significantly associated with low RT-modulated expression of all miRNAs-146a ( $\beta=0.494$ ,  $p=0.039$ ), -221 ( $\beta=0.731$ ,  $p=0.010$ ) and -222 ( $\beta=0.864$ ,  $p=0.004$ ).

**Table 4. Estimation of the effect of targeted therapy on change in the levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of women with breast cancer (BC)**

<b>MODEL 1</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	<b>p value of model</b>	<b>N</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>P value <math>\beta</math></b>
miRNA-146a	7.5	0.002	128	0.654	0.001
miRNA-155	5.4	0.008	127	0.616	0.008
miRNA-221	11.4	0.001	127	0.957	0.001
miRNA-222	11.9	0.001	127	1.052	0.001
<b>MODEL 2</b>	<b>Change in R<sup>2</sup> (%)</b>				
miRNA-146a	2.6	0.001	128	0.619	0.003
miRNA-155	3.1	0.004	127	0.575	0.013
miRNA-221	0.9	0.001	127	0.934	0.001
miRNA-222	0.8	0.001	127	1.029	0.001
<b>MODEL 3</b>	<b>Change in R<sup>2</sup> (%)</b>				
miRNA-146a	0.3	0.069	120	0.494	0.039
miRNA-155	0.8	0.142	119	0.322	0.227
miRNA-221	0.6	0.019	119	0.731	0.010
miRNA-222	0.1	0.027	119	0.864	0.004

Estimates were derived applying linear regression. Model 1 is a crude model, whereas Model 2 is adjusted for age at diagnose for all miRNAs. Model 3 is adjusted for mentioned variable together with chemotherapy and hormonotherapy.



## DISCUSSION

In the present study, we evaluated the ability as potential biomarkers in CVD of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of BC patients. Therefore, we tested the change in levels, to assess their RT-modulated expression, as well as their relationship with cardiovascular risk factors for these patients such as age and treatment.

We reported in a previous study that blood miRNAs-146a, -221 and -222 were statistical increased by RT, and the same tendency was observed in miRNA-155 levels in women with BC (unpublished data). Our results showed that miRNA-222 presented the higher RT-modulated expression, followed by miRNAs-221, -146a and -155. Although RT increased the average of the expression of all miRNAs, some patients had decreased levels. We observed that, when patients were classified according to molecular tumor characteristics, HER2 group was the only one in which the expression was not increased. Furthermore, we observed significant positive correlation in RT-modulated expression of these miRNAs; which might support the existed crosslink in the regulation of selected miRNAs, such as in atherosclerotic-related pathways (18, 35, 36). We hypothesize a relationship between observed RT-modulated increase and further migration into atherosclerotic plaques, as is described that these miRNAs are downregulated in circulation of CVD patients (27-30) and overexpressed in atherosclerotic human lesions (21, 23, 26).

In addition, we assessed the influence of cardiovascular risk factors on RT-modulated expression of selected miRNAs in BC patients. Our results showed that age at diagnose, in which CVD are increased (37), was positive statistically correlated with RT-modulated increases for miRNAs-146a and -155, which could be related with the role of selected miRNAs on CVD progression (12, 17-20). We also analyzed the associations between RT-modulated expression in selected miRNAs and treatment since received therapies, as cardiotoxicity agents (1, 38), could influence on levels of selected miRNAs. Hormonotherapy is applied to BC patients who are ER and/or PR positive and their role on cardiotoxicity seems to be indirectly by influencing some risk factors for CVD as estrogens have an important role on the development of CVD (39). For instance, aromatase inhibitors are associated with ischemic heart disease (38). In present study, we found no association between change in levels and hormonotherapy for any miRNAs but we observed an association between miRNA-221 and chemotherapy. Results showed that patients who received chemotherapy before RT had lower RT-modulated expression of this miRNA in comparison to non-chemotherapy treated. This could support the role of miRNA-221 as CVD involved if considering

that anthracycline, a common chemotherapy agent, is associated with the development of this pathology (8). Finally, we observed that RT decreased the expression of selected miRNAs in target therapy-treated BC women; which differs significantly to the observed increase in patients who were non-treated with this therapy. Targeted therapy is employed in BC patients positive for HER2 and involves drugs as trastuzumab, lapatinib, bevacizumab, everolimus and/or pertuzumab. Trastuzumab appears to be the most common targeted therapy associated with cardiotoxicity, whereas lapatinib is less likely to be associated with cardiotoxicity (40). The observed decrease in expression of selected miRNAs supports their relationship with CVD development.

In addition, in order to discard a possible interaction between BC-related molecular parameters and the expression of selected miRNAs, we analyzed the associations between RT-modulated expression in these miRNAs and BC parameters such as presence of ER, PR and HER2, and Ki-67 index. Despite, to our knowledge, there is no previous data evaluating RT effects depending on these BC-related molecular parameters, previous data reported that miRNA-221 levels were lower in ER-negative BC tumors when compared to positive ones (41). It has been contrarily described higher expression of miRNAs-221 and -222 in ER-negative BC cell lines and human BC tumors (42, 43). Both miRNAs were also higher expressed in carcinomas negative for PR in comparison to positive PR and in Ki-67 below 20% compared to above this percentage (42). Moreover, it has been previously described that levels of miRNAs-146a and -155 were overexpressed in circulation and tissue samples of BC patients, respectively, of HER2-positive in comparison to HER2-negative status (44, 45). In the present study, it was not observed associations between RT-modulated expression and Ki-67 index, ER or PR receptors; whereas HER2 was significantly associated. We observed that RT decreased levels of selected miRNAs in BC women with HER2 and enhanced in patients negative for this receptor. Based on our results and due to few studies evaluating the expression of selected miRNAs in blood of BC patients depending on BC-related molecular parameters, we believe that there is no relationship between them. As HER2 patients receive targeted therapy, the observed differences in miRNA levels in these patients might be because of the effect of targeted therapy.

Due to the observed relationship between RT-modulated expression of selected miRNAs and targeted therapy, we decided to analyze this association by performing a linear regression model adjusted for confounder variable as treatment including chemotherapy and hormone therapy. Furthermore, as it was observed that age at diagnose influenced RT-modulated expression of

miRNAs-146a and -155, and as a known CVD risk factor, we decided to include age on respective models. Results showed that when corrected for both age and treatment, targeted therapy was still significantly associated with low RT-modulated expression of miRNAs-146a, -221 and -222. The same tendency but not significant was observed for miRNA-155, which might be mainly due to inverse influence on the change in levels related to age at diagnose in the studied model.

In conclusion, we supported that miRNAs-146a, -155, -221 and -222 could be used as potential CVD biomarkers in blood of patients with BC as their RT-modulated expression was modulated by cardiovascular risk factors such as age and CVD-related treatments as targeted therapy or chemotherapy. Therefore, future studies should focus on the assessment of the modulation of these blood miRNAs expression as well as cardiotoxicity in these patients in order to confirm their potential as CVD biomarkers.

## SUPPLEMENTARY DATA

Table 1. Change in levels of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 in blood of breast cancer (BC) patients depending on hormonotherapy, presence of Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR) and Ki-67 index above 15%.

Hormonotherapy	non-hormonotherapy (16.2%)		hormonotherapy (78.1%)		p value
	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	
miRNA-146a	-0.027	Increase	-0.239	Increase	0.341
miRNA-155	-0.191	Increase	-0.139	Increase	0.833
miRNA-221	-0.202	Increase	-0.277	Increase	0.780
miRNA-222	-0.309	Increase	-0.371	Increase	0.824
ER	negative (16.2%)		positive (83.1%)		p value
	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	
miRNA-146a	-0.058	Increase	-0.204	Increase	0.514
miRNA-155	-0.180	Increase	-0.116	Increase	0.793
miRNA-221	-0.328	Increase	-0.230	Increase	0.715
miRNA-222	-0.385	Increase	-0.322	Increase	0.825
PR	negative (33.8%)		positive (65.4%)		p value
	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	
miRNA-146a	-0.125	Increase	-0.209	Increase	0.629
miRNA-155	-0.055	Increase	-0.162	Increase	0.577
miRNA-221	-0.361	Increase	-0.186	Increase	0.398
miRNA-222	-0.268	Increase	-0.366	Increase	0.657

Table 1. (continued)

Ki-67	lower than 15% (35.3%)		above than 15% (59.6%)		p value
	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	Change in levels (mean)	RT-modulated expression	
miRNA-146a	-0.284	Increase	-0.108	Increase	0.294
miRNA-155	-0.311	Increase	0.006	Decrease	0.086
miRNA-221	-0.276	Increase	-0.212	Increase	0.751
miRNA-222	-0.522	Increase	-0.201	Increase	0.134

Mean of change in levels of miRNAs (DCt post-RT – DCt control pre-RT) is shown.

Statistics: Single factor ANOVA test.

RT-modulated expression column indicate if expression was increased (negative change in levels value) or decreased (positive change in levels value) at post-RT.

p value indicates differences between groups.

## REFERENCES

1. Zagar TM, Cardinale DM, Marks LB. Breast cancer therapy-associated cardiovascular disease. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016;13(3):172-84. Epub 2015/11/26.
2. Freres P, Bouznad N, Servais L, Josse C, Wenric S, Poncin A, et al. Variations of circulating cardiac biomarkers during and after anthracycline-containing chemotherapy in breast cancer patients. *BMC cancer*. 2018;18(1):102. Epub 2018/01/31.
3. Bradshaw PT, Stevens J, Khankari N, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD. Cardiovascular Disease Mortality Among Breast Cancer Survivors. *Epidemiology*. 2016;27(1):6-13. Epub 2015/09/29.
4. Diller L, Chow EJ, Gurney JG, Hudson MM, Kadin-Lottick NS, Kawashima TI, et al. Chronic disease in the Childhood Cancer Survivor Study cohort: a review of published findings. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(14):2339-55. Epub 2009/04/15.
5. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. NCCN Guidelines Insights: Breast Cancer, Version 1.2017. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2017;15(4):433-51. Epub 2017/04/14.
6. Obi N, Eulenburg C, Seibold P, Eilber U, Thone K, Behrens S, et al. Associations between adjuvant radiotherapy and different causes of death in a German breast cancer cohort. *Breast*. 2018;38:75-80. Epub 2017/12/19.

7. Cheng YJ, Nie XY, Ji CC, Lin XX, Liu LJ, Chen XM, et al. Long-Term Cardiovascular Risk After Radiotherapy in Women With Breast Cancer. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(5). Epub 2017/05/23.
8. Boekel NB, Jacobse JN, Schaapveld M, Hooning MJ, Gietema JA, Duane FK, et al. Cardiovascular disease incidence after internal mammary chain irradiation and anthracycline-based chemotherapy for breast cancer. *British journal of cancer*. 2018. Epub 2018/08/02.
9. Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS, et al. American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *Journal of clinical oncology*. 2007;25(25):3991-4008. Epub 2007/06/20.
10. Costantino S, Camici GG, Mohammed SA, Volpe M, Luscher TF, Paneni F. Epigenetics and cardiovascular regenerative medicine in the elderly. *International journal of cardiology*. 2018;250:207-14. Epub 2017/10/11.
11. Gacon J, Badacz R, Stepien E, Karch I, Enguita FJ, Zmudka K, et al. Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study. *Kardiologia polska*. 2018;76(2):362-9. Epub 2018/01/20.
12. Gangwar RS, Rajagopalan S, Natarajan R, Deiluiis JA. Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Pathological Relevance and Emerging Role as Biomarkers and Therapeutics. *American journal of hypertension*. 2018;31(2):150-65. Epub 2017/12/01.
13. De Rosa S, Eposito F, Carella C, Strangio A, Ammirati G, Sabatino J, et al. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs in heart failure. *European journal of heart failure*. 2018. Epub 2018/01/10.
14. Ni J, Bucci J, Chang L, Malouf D, Graham P, Li Y. Targeting MicroRNAs in Prostate Cancer Radiotherapy. *Theranostics*. 2017;7(13):3243-59. Epub 2017/09/14.
15. Baumann V, Winkler J. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future medicinal chemistry*. 2014;6(17):1967-84. Epub 2014/12/17.
16. de Lucia C, Komici K, Borghetti G, Femminella GD, Bencivenga L, Cannavo A, et al. microRNA in Cardiovascular Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases. *Frontiers in medicine*. 2017;4:74. Epub 2017/07/01.

17. Economou EK, Oikonomou E, Siasos G, Papageorgiou N, Tsalamandris S, Mourouzis K, et al. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):624-33. Epub 2015/06/29.
18. Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):703-20. Epub 2016/02/20.
19. Celic T, Metzinger-Le Meuth V, Six I, Massy ZA, Metzinger L. The mir-221/222 Cluster is a Key Player in Vascular Biology via the Fine-Tuning of Endothelial Cell Physiology. *Current vascular pharmacology*. 2017;15(1):40-6. Epub 2016/09/17.
20. Dlouha D, Hubacek JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiological research*. 2017;66(Supplementum 1):S21-S38. Epub 2017/04/06.
21. Cheng HS, Besla R, Li A, Chen Z, Shikatani EA, Nazari-Jahantigh M, et al. Paradoxical Suppression of Atherosclerosis in the Absence of microRNA-146a. *Circulation research*. 2017;121(4):354-67. Epub 2017/06/24.
22. Zheng B, Yin WN, Suzuki T, Zhang XH, Zhang Y, Song LL, et al. Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2017;25(6):1279-94. Epub 2017/04/15.
23. Xue Y, Wei Z, Ding H, Wang Q, Zhou Z, Zheng S, et al. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1alpha in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):671-81. Epub 2015/06/29.
24. Pereira-da-Silva T, Coutinho Cruz M, Carrusca C, Cruz Ferreira R, Napoleao P, Mota Carmo M. Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review. *American journal of cardiovascular disease*. 2018;8(1):1-13. Epub 2018/03/14.
25. Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernandez-Hernando C. MicroRNAs and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2013;15(5):322. Epub 2013/03/21.
26. Wang R, Dong LD, Meng XB, Shi Q, Sun WY. Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;464(2):574-9. Epub 2015/07/15.

27. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research*. 2010;107(5):677-84. Epub 2010/07/03.
28. Jia QW, Chen ZH, Ding XQ, Liu JY, Ge PC, An FH, et al. Predictive Effects of Circulating miR-221, miR-130a and miR-155 for Coronary Heart Disease: A Multi-Ethnic Study in China. *Cellular physiology and biochemistry*. 2017;42(2):808-23. Epub 2017/06/20.
29. Yao R, Ma Y, Du Y, Liao M, Li H, Liang W, et al. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome. *Cellular & molecular immunology*. 2011;8(6):486-95. Epub 2011/08/02.
30. Baldeon RL, Weigelt K, de Wit H, Ozcan B, van Oudenaren A, Sempertegui F, et al. Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PloS one*. 2014;9(12):e115209. Epub 2014/12/17.
31. Bildirici AE, Arslan S, Ozbilum Sahin N, Berkan O, Beton O, Yilmaz MB. MicroRNA-221/222 Expression in Atherosclerotic Coronary Artery Plaque and Peripheral Blood. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2018:1-19. Epub 2018/05/09.
32. Arenas M, Garcia-Heredia A, Cabre N, Luciano-Mateo F, Hernandez-Aguilera A, Sabater S, et al. Effect of radiotherapy on activity and concentration of serum paraoxonase-1 in breast cancer patients. *PloS one*. 2017;12(11):e0188633. Epub 2017/11/28.
33. Prades J, Algara M, Espinas JA, Farrus B, Arenas M, Reyes V, et al. Understanding variations in the use of hypofractionated radiotherapy and its specific indications for breast cancer: A mixed-methods study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2017;123(1):22-8. Epub 2017/02/27.
34. Bots WTC, van den Bosch S, Zwijnenburg EM, Dijkema T, van den Broek GB, Weijs WLJ, et al. Reirradiation of head and neck cancer: Long-term disease control and toxicity. *Head & neck*. 2017;39(6):1122-30. Epub 2017/03/07.
35. Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB journal*. 2011;25(8):2515-27. Epub 2011/04/22.

36. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Suarez Y. MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction. *Pharmacological research*. 2013;75:15-27. Epub 2013/04/23.
37. Rosano GM, Vitale C, Marazzi G, Volterrani M. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2007;10 Suppl 1:19-24. Epub 2007/03/17.
38. Khosrow-Khavar F, Filion KB, Al-Qurashi S, Torabi N, Bouganim N, Suissa S, et al. Cardiotoxicity of aromatase inhibitors and tamoxifen in postmenopausal women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of oncology*. 2017;28(3):487-96. Epub 2016/12/22.
39. Giordano S, Hage FG, Xing D, Chen YF, Allon S, Chen C, et al. Estrogen and Cardiovascular Disease: Is Timing Everything? *The American journal of the medical sciences*. 2015;350(1):27-35. Epub 2015/06/26.
40. Wittayanukorn S, Qian J, Johnson BS, Hansen RA. Cardiotoxicity in targeted therapy for breast cancer: A study of the FDA adverse event reporting system (FAERS). *Journal of oncology pharmacy practice*. 2017;23(2):93-102. Epub 2015/12/15.
41. Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Endo Y, Iwasa M, et al. Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor alpha in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2011;130(1):331-9. Epub 2011/07/15.
42. Petrovic N, Davidovic R, Jovanovic-Cupic S, Krajnovic M, Lukic S, Petrovic M, et al. Changes in miR-221/222 Levels in Invasive and In Situ Carcinomas of the Breast: Differences in Association with Estrogen Receptor and TIMP3 Expression Levels. *Molecular diagnosis & therapy*. 2016;20(6):603-15. Epub 2016/08/05.
43. Zhao M, Zhang Y, Liu W, Xu C, Wang L, Gan J. Estrogenic activity of lambda-cyhalothrin in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environmental toxicology and chemistry*. 2008;27(5):1194-200. Epub 2008/04/19.
44. Stuckrath I, Rack B, Janni W, Jager B, Pantel K, Schwarzenbach H. Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget*. 2015;6(15):13387-401. Epub 2015/06/03.



45. Nassar FJ, El Sabban M, Zgheib NK, Tfayli A, Boulos F, Jabbour M, et al. miRNA as potential biomarkers of breast cancer in the Lebanese population and in young women: a pilot study. PLoS one. 2014;9(9):e107566. Epub 2014/09/19.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

## TREBALL 3

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

## Effects of radiation on the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222, inflammatory response and endothelial dysfunction on HUVECs

Roser Esplugas<sup>1,2</sup>, Montserrat Bellés<sup>1,2</sup>, Noemí Serra<sup>2</sup>, Meritxell Arenas<sup>3</sup>, Víctor Hernández<sup>4</sup>, Joan Carles Vallvé<sup>5\*</sup>, Victoria Linares<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Physiology Unit, School of Medicine, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

<sup>2</sup>Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

<sup>3</sup>Radiation Oncology Department, Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

<sup>4</sup>Department of Medical Physics, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.

<sup>5</sup>Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain

\* Corresponding author. Tel.: +34 977759367. E-mail address: [jc.vallve@urv.cat](mailto:jc.vallve@urv.cat) (J.C. Vallvé). Postal address: School of Medicine, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, SPAIN

### ABSTRACT

Radiotherapy (RT) lead to cardiovascular disease (CVD) development as irradiated endothelium of vessels promotes endothelial dysfunction and inflammation. Evidence suggest that radiation modulates miRNAs levels, such as miRNAs-146a, -155, -221, and -222, which control endothelial dysfunction and inflammatory response. Our purpose was to assess the acute response of radiation-induced modulation on the expression of these miRNAs, inflammatory response and endothelial dysfunction on endothelial cells. HUVECs were exposed to 2Gy, and intracellular levels of selected miRNAs were measured by real-time PCR, after miRNA isolation and reverse transcription, at 2 and 24h. We also assessed cytokine and molecule adhesion release. Results showed that 2Gy significantly increased the expression of miRNAs-221 and -222, and decreased levels of miRNA-155 after 2h; whereas miRNAs-146a and -155 were statistically overexpressed and miRNA-222 was significantly downregulated at 24h. Interleukin-8 (IL-8) and soluble Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (sVCAM-1) levels were not affected by studied radiation. In conclusion, we observed that 2Gy modulate selected miRNAs expression after 2 and 24h, despite not promoting inflammation or endothelial dysfunction. We suggest that radiation induced-variation in selected miRNAs levels could be related with CVD development in patients who receive RT. Future studies should focus on assessing their potential as CVD biomarkers.

**Keywords:** radiation; 2Gy; Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs); miRNA; IL-8; soluble Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (sVCAM-1).

## INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most frequent cancer in women, causing about half a million total deaths each year worldwide (1). Although prevention strategies reduce risk, development cannot be avoided in low- and middle-income countries where BC is diagnosed in very late stages (2). Overall survival rate is 90% with 5 years, and many of them receive radiotherapy (RT) which is employed to cure localized BC, to provide local control or to relief symptom in locally advanced or disseminated cancers (3).

Despite RT reduces BC recurrence and mortality, both early (acute) and late (chronic) side effects persist. While acute side effects occur during treatment, chronic side effects take place months or even years after treatment ends. Actually, it has been demonstrated that RT lead to cardiovascular disease (CVD) due to exposition of heart and vessels at high volumes and doses of radiation (3). The International Commission on Radiological Protection has listed CVD as health risk from RT since 2012 and has reported that 0.5Gy dose might lead to approximately 1% of exposed individuals developing CVD at 10 years post-exposure.

Due to established relationship between CVD and RT in patients with BC, employed radiation dose is limited by the injury to endothelial lining of blood vessels, in particular to arteries (4, 5). Endothelial cells integrate physical and neurohumoral signals from the blood and regulate vascular tone, cellular adhesion, inflammation, smooth muscle phenotype, proliferation and thromboresistance (6). In a molecular level, both endothelial cell radiation and subsequent caused oxidative stress evoke endothelial dysfunction which is considered to be the first step of atherosclerosis resulting in CVD development (7). Inflammatory response is induced by cytokine release from dysfunctional endothelium and from injured irradiated-cells which activate defense mechanisms as a response to the toxic effects (8). Some cytokines, such as IL-1 or TNF- $\alpha$ , promotes the expression of adhesion molecules in endothelial cells, as Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) and E-selectin (9). Adhesion molecules promote leukocyte adhesion to endothelial cells, and can be liberated to circulation (10). In fact, patients with CVD have increased circulating levels of these adhesion molecules (11, 12).

Recent evidence suggest that radiation modulates miRNAs levels, thus altering miRNA-controlled pathways (13). In addition, miRNAs are important regulators of pathophysiological processes involved in the development of CVD such as cellular adhesion, proliferation, lipid uptake, and efflux, and recruitment of inflammatory mediators (14). miRNAs are a set of about 22 nucleotides which

can silence or downregulate expression of their targets by destabilizing and/or cleaving the target mRNA, or reducing the efficiency with which the mRNA can be processed. One miRNA could regulate as much as 60% of available mRNAs (15).

Previous data supported the association of miRNAs-146a, -155, -221, and -222 with endothelial dysfunction and adhesion, and also with infiltration of inflammatory cells into the endothelial space (16, 17). miRNA-146a reduces lipid uptake and cytokine release in oxidized LDL-activated macrophages exhibiting an atheroprotective and anti-inflammatory role (18), despite its absence lead to atherosclerosis suppression in mice (19). Contrarily, miRNA-155 promotes lipid uptake in monocytes and macrophages, and it regulates immune and inflammatory response (20). Furthermore, both miRNAs-221 and -222 induces apoptosis in endothelial cells, whereas they promote proliferation and migration of smooth muscle cells as well as they inhibit their apoptosis (21).

Therefore, our purpose was to assess the radiation-induced modulation on the expression of these miRNAs as well as inflammatory response and endothelial dysfunction as possible miRNAs-mechanism of action, by assessing the release of cytokines and adhesion molecules, respectively, on endothelial cells. We decided to work with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) because they are commonly used as *in vitro* models of the endothelium. First, we wanted to determine the dose and post-radiation time-points by measuring cell cytotoxicity and viability at both 2 and 10Gy. We selected 2Gy as in clinical patients usually receive multiple fractions of this dose over several weeks until achieve total radiation doses of 50 to 60Gy when treated with RT (22), and 10Gy has been widely used on HUVEC (23-25). Furthermore, we chose several time-points from 1 to 48h as we wanted to assess acute response. Then, with selected dose and time-points, we performed the experiments.

## MATERIALS AND METHODS

### HUVECs culture and radiation procedure

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) at 5<sup>th</sup> passage (C-015-5C, GIBCO) were cultured in Medium 200 (Life Technologies) supplemented with Low Serum Growth Supplement (Life Technologies) containing fetal bovine serum (2% v/v), hydrocortisone (1µg/mL), human epidermal growth factor (10 ng/mL), basic fibroblast growth factor (3ng/mL) and heparin (10µg/mL) with

Gentamicin/Amphotericin B solution (Life Technologies). Cells were cultured at a density of 2,500 cells/cm<sup>2</sup> in 5% humidified atmosphere CO<sub>2</sub> at 37°C. On 80% confluence, cells were irradiated.

Radiation was performed using a Clinac 2100C linear accelerator. Doses rates of 4.5Gy/min (400 MU/min) were employed for radiations at doses of 2 and 10Gy. Control samples were placed into machine for the same time without being irradiated.

First, HUVECs were irradiated at both 2 and 10Gy in order to determine radiation dose and time-points (single experiment). Then, HUVECs were irradiated at the selected dose to test the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 as well as inflammatory response and endothelial dysfunction (three-replicate experiments).

#### Determination of radiation dose and time-points: assessment of cytotoxicity and viability tests

Single experiments were performed in order to determine the radiation dose and time-points by performing cytotoxicity and viability tests of both radiations at 2 and 10Gy from 1 to 48h post-radiation.

##### *Cytotoxicity of irradiated HUVECs at doses of 2 and 10Gy*

Cytotoxicity of irradiated HUVECs at both 2 and 10Gy after 0, 1, 3, 6, 24 and 48h was assessed by using the Cytotoxicity Detection Kit (lactate dehydrogenase, LDH) (Roche), which measures LDH content in supernatant of cell culture. First, HUVECs were removed from culture supernatant by centrifuging for 5min at 1,000g. Then, 100µL of cell-free supernatant was mixed with 100µL of Reaction mixture and sample was incubated for up to 30min at room temperature, protecting from light. Finally, absorbance at 490nm was measured by using the Synergy HT (Biotek). Percentage (%) LDH release was calculated as sample O.D. / control O.D. at respective time × 100.

##### *Viability test of irradiated HUVECs at doses of 2 and 10 Gy*

As Adenosine triphosphate (ATP) indicates the presence of metabolically active cells, ATP quantification of irradiated HUVECs at both 2Gy and 10Gy after 0, 1, 3, 6 and 24h was measured. Number of viable cells was assessed using CellTiter-Blo Luminiscent Cell Viability Assay (Promega). Briefly, 100µL of reactive was added onto cell culture and sample was mixed on an orbital shaker for 2min to induce cell lysis. After 10min incubation at room temperature and light-avoided, luminescence, which indicate ATP amount, was recorded in a Synergy HT (Biotek).% ATP release was calculated as sample luminescence / control luminescence at respective time × 100.



### miRNA isolation of irradiated HUVECs at selected dose

To allow miRNA isolation, HUVECs were washed with PBS and lysed by adding 350µL of Lysis Solution. After collection, sample was mixed with 200µL of 100% ethanol. The content was vortex and transferred onto a column and the next steps were performed by following the miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon). Sample was centrifuged 1min at 3,500g. Then, flowthrough was discarded and the column was washed three times with 400µL of Wash Solution. Subsequent centrifugation of 1min at 14,000g was performed and the flowthrough was discarded. Column was centrifuged 2min at 14,000g to dry it off. After adding 50µL of Buffer Elution onto column, sample was finally centrifuged twice for 2min at 200g and 1min at 14,000g. The flowthrough containing miRNA was stored into RNA-free tubes at -80°C until use.

### cDNA synthesis

To synthesize cDNA, the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II (Exiqon) was used. Briefly, 2µL of miRNA sample was mixed with 1µL Reverse Transcriptase enzyme, 2µL Reaction buffer and 5µL H<sub>2</sub>O. Then, sample was incubated employing the GeneAmp PCR System 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems™) by using the following thermocycler program: 60min at 42°C for reversing transcript, 5min at 95°C to inactivate the Reverse Transcriptase and an ultimate 4°C maintenance. Finally, samples containing cDNA were stored at -20°C.

### Real-time PCR

Real-time PCR assays were performed in order to determine the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222; employing miRNA-U6 as housekeeper. Briefly, the reactions were performed in a final reaction volume of 10µL, adding 3.5µL cDNA sample (previously diluted 1:40 with RNase-free water) and 6.5µL mix containing 5µL ExiLent SYBR Green Master Mix (Exiqon), 1µL tested Primer (miRCURY LNA™ uniRT PCR primer mix, Exiqon), 0.2µL ROX (Passive reference RT-PARE-03, Exiqon) and 0.3µL RNase-free water. Negative controls were also run for each assay. To run real-time reactions, 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) was employed by activating dsDNA denaturation for 10min at 95 °C and then amplifying samples with 40 cycles of 10s at 95°C followed by 1min at 60°C. Finally, results were analysed using the 2.4 SDS Software (Applied

Biosystems™) and RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystem™). For the statistical analysis, Cycle threshold (Ct) was measured for each sample and DeltaCt (Dct) of selected miRNAs was calculated as Ct sample - Ct median U6, in order to normalize miRNA expression. Then, to assess miRNAs expression, fold-change in Dct of selected miRNAs was calculated as sample Dct / control Dct at respective time.

#### Inflammatory response of irradiated HUVECs at selected dose

To examine the inflammatory response of HUVECs to selected radiation, we used the Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel (Invitrogen™). All steps were performed protecting plate from light. Briefly, 25µL of Antibody Beads was added into well. After washing twice with 200µL of Wash Solution, 50µL of Incubation Buffer, 50µL of Assay Diluent and 50µL of cell supernatant sample were added. Plate was covered and incubated for 2h at room temperature under agitation on an orbital plate shaker. Next, liquid was decanted and sample was washed twice. Subsequently, 100µL of Biotinylated Detector Antibody was added, and 1h incubation at room temperature on an orbital shaker in the dark was performed. After liquid decantation and two washes, 100µL of Streptavidin-RPE solution was added. Sample was shaken for 30min at room temperature away from light. Then, liquid was decanted and sample was washed three times. Finally, 150µL of Wash Solution was added and plate was read in xPONENT 4.2 for MAGPIX Software User (IVD) after 10min shake. Curve standard controls were also performed. Concentration of cytokines were given by the program and fold-change in cytokines release was calculated as sample release (pg/ml)/ control release (pg/ml) at respective time.

#### Endothelial dysfunction test of irradiated HUVECs at selected dose

To assess endothelial dysfunction we measured the release of the following adhesion molecules in cell supernatants: sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin.

##### *Determination of sICAM-1 and E-selectin*

To test sICAM-1 and sE-selectin, we used Human Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) ELISA Kit (Cusabio®) and Human E-Selectin ELISA Kit (Cusabio®), respectively. Briefly, 100µL of cell supernatant was added into well and incubated 2h at 37°C. Then, liquid was removed and 100µL of Biotin-antibody was added. Sample was incubated 1h at 37°C and after removing, sample was

washed 3 times by adding 200µL of Wash Buffer and removing. 100µL of HRP-avidin was added and 1h-incubation at 37°C was performed. Sample was washed 5 times as before and 90µL of TMB Substrate was added. Finally, sample was incubated for 15-30min at 37°C protecting from light and 50µL of Stop Solution was added until sample reading.

#### *Determination of sVCAM-1*

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) (Cloud-Clone Corp.) was employed in order to determinate sVCAM-1. Briefly, 100µL of cell supernatants was added and it was incubated 1h at 37°C. After liquid removing, 100µL of Detection Reagent A was added and sample was incubated 1h at 37°C. Then, liquid was aspirated and 3 washes were performed by adding 350µL of Wash Solution and removing. 100µL of Detection Reagent B was added and after incubation for 30min at 37°C, sample was washed 5 times. It was added 90µL of Substrate Solution and incubated 10-20min at 37°C protected from light. Finally, 50µL of Stop Solution was added and sample was measured.

The measurement of sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin levels were performed by reading the optical density at 450nm and corrected to 540nm by employing the Synergy HT (Biotek) reader. Fold-change in adhesion molecules release was calculated as sample release (ng/mL)/ control release (ng/mL) at respective time.

#### Statistical Analysis

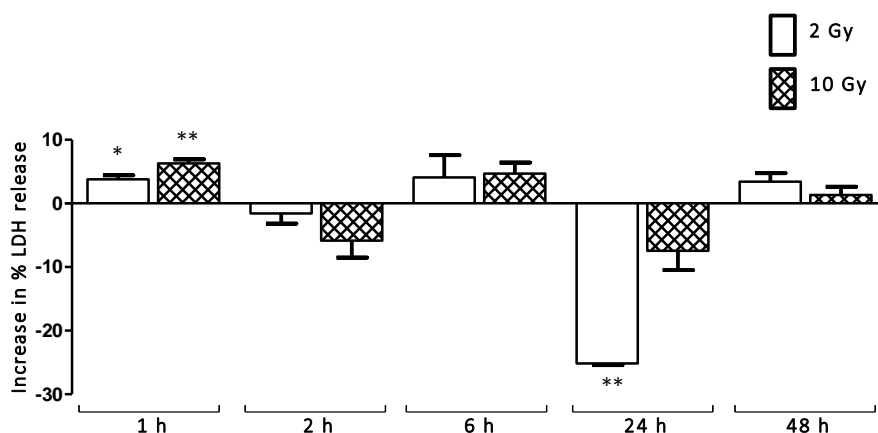
All data was expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Gaussian distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnov test. Then, ANOVA followed by the Bonferroni's post-hoc test was executed to evaluate cytotoxicity and viability, whose variances were homogenous, whereas Welch's unpaired t-test one-tailed was used to test the expression of selected miRNAs, inflammatory response and endothelial dysfunction. The level of statistical significance for all tests was established at  $p < 0.05$ . All data were analyzed by GraphPad Prism Statistical Analysis software (GraphPad Prism version 5.01 for Windows, USA).

## RESULTS

### Determination of radiation dose and time-points: assessment of cytotoxicity and viability tests of irradiated HUVECs at doses of 2 and 10 Gy

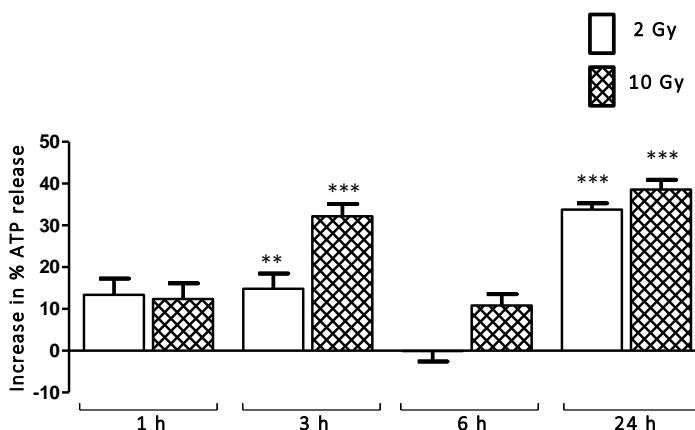
In order to determine optimal dose and post-radiation time points for the experiment, cytotoxicity and viability tests were assessed after radiations at 2 and 10Gy in different times.

Cytotoxicity, as increase in% of LDH release, of irradiated HUVECs at both doses at 1, 3, 6, 24 and 48h post-radiation is depicted in Fig.1. Results indicated that both irradiated groups at 1h post-radiation had significant greater LDH than control at same time, whereas this significance was lost afterwards. In fact, 2 Gy-irradiated group presented significant less cytotoxicity at 24h than its control. Thus, it indicated that both irradiations did not exhibit cytotoxic effects on HUVECs at measured times.



**Fig.1. Cytotoxicity as increase in percentage (%) of LDH release of irradiated HUVECs at doses of 2 and 10Gy after 1, 3, 6, 24 and 48 h.**

Mean  $\pm$  SEM of increase in% of LDH release, calculated as  $\% \text{ LDH release} - 100$ , is shown.  $\% \text{ LDH release}$  was calculated as  $\text{sample O.D.} / \text{control O.D. at respective time O.D.} \times 100$ . Statistics of  $\% \text{ LDH release}$ : ANOVA test and Bonferroni's post-hoc test. \* means differences between irradiated group and control at respective time when  $p < 0.05$ . \*\* means differences between irradiated group and control at respective time when  $p < 0.01$ .



**Fig.2. Viability as increase in percentage (%) of intracellular ATP of irradiated HUVECs at doses of 2 and 10Gy after 1, 3, 6 and 24h after.**

Mean  $\pm$  SEM of increase in% of intracellular ATP, calculated as% intracellular ATP - 100, is shown.% intracellular ATP was calculated as sample luminescence / control luminescence at respective time  $\times$  100. Statistics of% intracellular ATP: ANOVA test and Bonferroni's post-hoc test. \*\* means differences between irradiated group and control at respective time when  $p < 0.01$ . \*\*\* means differences between irradiated group and control at respective time when  $p < 0.001$ .

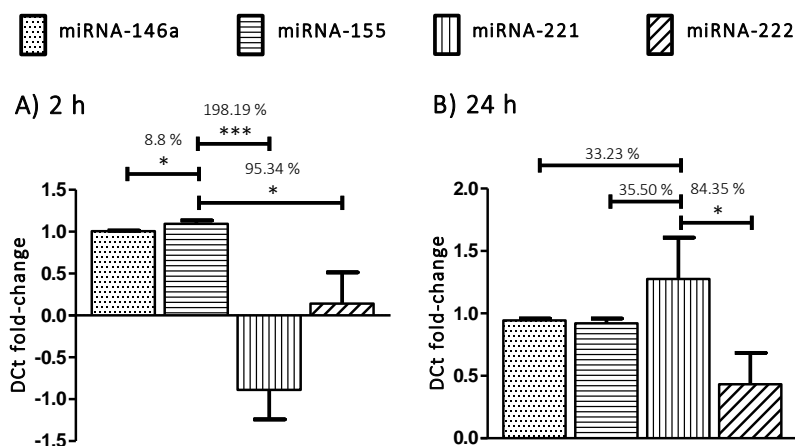
Furthermore, viability, as increase in% of intracellular ATP, of irradiated HUVECs at doses of 2 and 10Gy after 1, 3, 6 and 24h is shown in Fig.2. Results showed that ATP was significantly increased in both irradiated groups at 3 and 24h; indicating that viability was not failed by the effect of 2 and 10Gy doses.

In summary, results showed that both 2 and 10Gy doses did not induce cytotoxicity or viability failure on HUVECs. Then, we assessed the effects of 2Gy dose at two time-points, 2 and 24h, on the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222, inflammatory response and endothelial dysfunction on these cells.

#### Comparison of the expression of miRNAs-146a, -155 -221 and -222 of irradiated HUVECs at 2Gy

The comparison of the expression of selected miRNAs, calculated as D<sub>Ct</sub> fold-change, of irradiated HUVECs at 2Gy after 2 and 24h is shown in Fig.3. High value of D<sub>Ct</sub> fold-change indicates low miRNA expression, and *vice versa*. In the current study, miRNAs-155 and -221 presented the lowest

expression, indicated by the highest DcT fold-change, at 2 and 24h respectively. When compared to this miRNA, the expression of miRNAs-146a, -221 and -222 were significantly enhanced at 8.8%, 198.19% and 95.34% at 2h, respectively (Fig.3A). In addition, while levels of miRNAs-146a and -155 in comparison to miRNA-221 at 24h were higher at 33.23% and 35.50%, respectively; miRNA-222 expression was statistically greater at 84.35% (Fig.3B).



**Fig.3** DcT fold-change of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 of irradiated HUVECs at 2Gy after 2 and 24h.

Mean  $\pm$  SEM of fold-change in DcT of selected miRNAs, calculated as sample DcT / control DcT at respective time, is shown. Statistics: Welch's unpaired t-test one-tailed. \* means differences at  $p < 0.05$ . \*\*\* means differences at  $p < 0.001$ . Percentage (%) of DcT fold-change decrease in comparison to miRNA-155 at 2h and to miRNA-221 at 24h, which has the highest DcT fold-change (lowest expression) is indicated.

#### Effect of radiation at 2Gy in the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 on HUVECs

The effect of 2 Gy-radiation in the expression of selected miRNAs, expressed as DcT fold-change, is depicted in Fig.4). We observed that 2Gy radiation induced a statistical increase in the expression of miRNAs-221 (-188.79%, Fig.4C) and -222 (85.94%, Fig.4D), whereas miRNA-155 was statistical decreased at 2h (9.4%, Fig.4B). At 24h, levels of miRNA-221 were restored and miRNA-222 expression was statistically decreased (-56.75%, Fig.4D). Furthermore, we found an overexpression of miRNAs-146a (-5.63%, Fig.4A), -155 (-7.9%, Fig.4B) at this time-point.

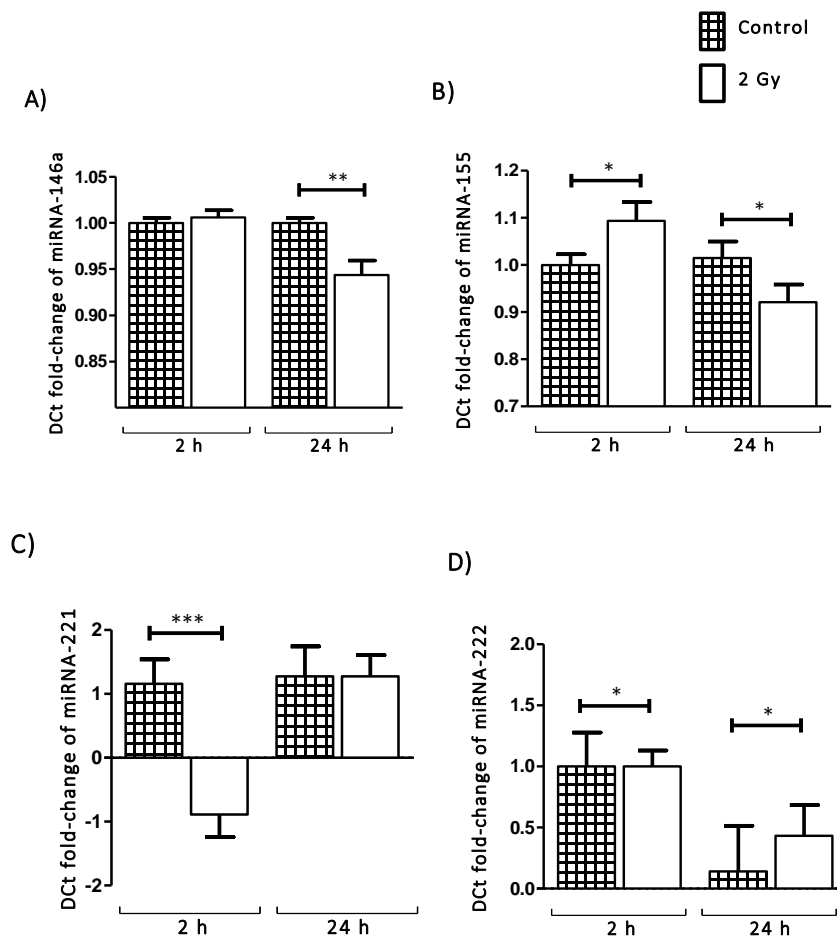


Fig.4. Comparison of Dct fold-change of miRNAs-146a (A), -155 (B), -221 (C) and -222 (D) of irradiated HUVECs at 2Gy after 2 and 24h.

Mean  $\pm$  SEM of fold-change in Dct of selected miRNAs, calculated as sample Dct / control Dct at respective time, is shown. Statistics: Welch's unpaired t-test one-tailed. \* means differences at  $p < 0.05$ . \*\* means differences at  $p < 0.01$ . \*\*\* means differences at  $p < 0.001$ .

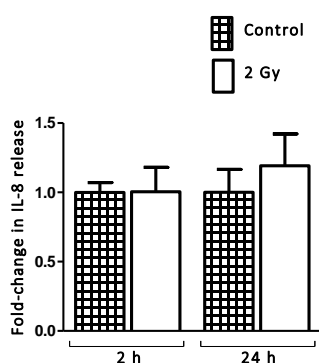
#### Effect of radiation at 2Gy dose in inflammatory response on HUVECs

Fold-change in measurable levels of IL-8 in levels in supernatant of control and irradiated HUVECs at 2Gy after 2 and 24h is shown in Fig.5. Results showed no statistical significance between both groups at both times. In our experimental cell conditions, supernatant levels of analyzed cytokines

GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  were too low to allow valid quantification; and we could not rely on some found differences (data not shown).

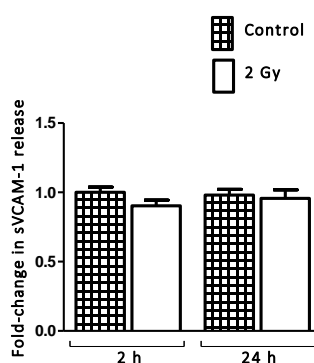
### Effect of radiation at 2Gy dose in endothelial dysfunction on HUVECs

Our results showed that the release of sVCAM-1, which was quantifiable, into supernatant did not differ from control and irradiated HUVECs at 2Gy either at 2 nor 24h (Fig.6). On the other hand, sICAM-1 and sE-selectin were not quantifiable as their levels were too low to assess valid differences (data not shown).



**Fig.5. Fold-change in IL-8 release of irradiated HUVECs at 2Gy after 2 and 24h.**

Mean  $\pm$  SEM of fold-change in IL-8 release, calculated as sample IL-8 release (pg/ml)/ control IL-8 release (pg/ml) at respective time, is shown. Statistics: Welch's unpaired t-test one-tailed.



**Fig.6. Fold-change in sVCAM-1 release of irradiated HUVECs at 2Gy after 2 and 24h.** Mean  $\pm$  SEM of fold-change in VCAM-1 release, calculated as sample VCAM-1 release (ng/ml)/ control VCAM-1 release (ng/ml) at respective time, is shown. Statistics: Welch's unpaired t-test one-tailed.

## DISCUSSION

In the present study we planned to assess the effect of radiation at acute phase on the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222, which are involved in endothelial dysfunction and formation of atherosclerotic plaques; as well as on inflammatory response and endothelial dysfunction as possible action mechanism of these miRNAs in endothelial cells.

First, we decided to determinate optimal dose, 2 or 10Gy, and post-radiation time-points, from 1 to 48h by assessing cytotoxicity and viability on HUVECs. We observed that cytotoxicity,



characterized by an enhancement of LDH release, was not impaired by both radiations. Results showed greater increases in% LDH release by both doses after 1h, but this increase then fell at posterior time-points. Indeed, it was observed a decrease at 2Gy after 24h. Thus, either radiation doses had no cytotoxic effects on HUVECs. Opposed to our results, Yang (26), who also worked with HUVECs, observed LDH increase after radiations at 2, 4, 6 and 8Gy. However, time-points after radiation was not defined which can be the reason for observing differences between his and our study. Furthermore, cytotoxicity of other endothelial cell lines has been assessed in previous studies. In instance, similarly to our results, Vorotnikova, et al. (27) found that radiation at 20Gy did not induce cytotoxicity on bovine capillary endothelial cells after 2 to 72h. Nevertheless, many works performed in 80s reported that, at same post-radiation times, bovine aorta endothelial cells increased LDH release after single doses of 0.5 to 10Gy (28-31). The observed discordance may be due to variability on radiation dose and cell lines. In addition, we measured viability, which is associated with high amounts of ATP, and we observed that the increase in% ATP release was enhanced after both 2 and 10Gy at 3 and 24h. This indicated that viability was not impaired by these doses on HUVECs. To our knowledge, it has not been assessed the effects of radiation on ATP release in HUVECs, otherwise it has in other cell line types. In example, Lindgard et al. (32) found no differences in ATP concentration on human monocytes at the end of being irradiated for 2min at 25°C using photons at 634nm. In addition, Hietanen et al. (33) studied the effects of single radiation doses at 1 to 60Gy alone and combined with heating on Natural Killer (NK) cells, and they found an ATP decrease after 72h for all doses. In fact, Hietanen et al. (34) had previously suggested that ATP production was stimulated by low-dose radiation and inhibited by doses over 10Gy on this cell line. They observed that 1 to 8Gy on NK lead to an ATP enhancement after 0 to 6h and a decrease from 8 to 72h post-radiation; whereas higher doses, from 8 to 80Gy, decreased ATP levels. Thus, it is observed that differences between doses and cell lines existed.

In our study, once we have determined that 2 and 10Gy doses were not cytotoxic and did not impair viability on HUVECs, we proposed to assess the effect of 2Gy after 2 and 24h on the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 as they are involved in oxidative stress, apoptosis, and angiogenesis in atherosclerotic plaques, as well as in inflammation and endothelial dysfunction (16-19). In the present study, we observed that miRNA-221 was the highest expressed after 2h radiation, followed by miRNAs-222, -146a and -155. Differently, miRNA-222 had the highest expression at 24h post-radiation, followed by miRNAs-155, -146a and -221. Moreover, results

showed that 2Gy radiation increased significantly the expression of miRNAs-221 and -222 and decreased statistically miRNA-155 expression at 2h; whereas at 24h, levels of miRNAs-221 and -222 were restored and statistically decreased, respectively, and miRNAs-146a and -155 were statistically overexpressed. Similarly, in a previous study which also worked with HUVECs, it was observed that 1Gy promoted an increase in the expression of miRNAs-221 and -222 after 1 and 2h; despite their levels were restored at 4 and 8h (35). In addition, other studies have assessed the levels of some selected miRNAs in other endothelial cell lines. Kraemer et al. (36) found a similar response of miRNA-146a after radiation, observing that 2.5Gy dose upregulated miRNA-146a, among others, at 4h whereas its levels were restored at 24h in endothelial EA.hy926 cells. Furthermore, miRNAs-221 and -222 were upregulated after 6h at 10Gy, and also miRNA-146a at both 6 and 24h, in human coronary artery endothelial cells (37). Differences in radiation-induced changes of miRNA expression between these studies and our results may be due to the cell specificity, as well as radiation dose and time-points variability. In fact, studies employing other cell types confirm this affirmation. In example, while the expression of miRNAs-146a, -221 and -222 was not modulated in 2.5Gy irradiated-lymphoblast after 4h or 6 days (38), Simone et al. (39) observed a decrease in miRNA-222 levels after 1h irradiating at doses from 0.25 to 10Gy on fibroblasts.

In addition, we wanted to study the mechanism by which these miRNAs could act by assessing inflammation and endothelial dysfunction at selected dose and time-points on HUVECs. We evaluated inflammatory response by measuring the release of several cytokines, as they promote local inflammation in the response of endothelial cells to radiation (8). IL-8 is a pro-inflammatory cytokine that is involved in inflammatory response by contributing to the recruitment of leukocytes following radiation. Furthermore, it is involved in mitogenesis, angiogenesis, chemotaxis and neutrophil degranulation (40). It is highly expressed in atherosclerotic plaques whose main sources are endothelial cells as well as macrophages and smooth muscle cells. Therefore, IL-8 has been intensively studied as a potential marker of atherosclerosis (41). Our results showed that IL-8 levels were not affected by radiation at 2Gy dose neither at 2 or 24h on HUVECs. Similarly, Meeren et al. (42) found no differences in IL-8 release at same dose after 24h, despite they stated that this interleukin was enhanced after 18h. Furthermore, other studies supported that 10Gy was able to increase IL-8 until 6h to 6 days in a time-dependent manner (25, 42). In our study, we also analyzed the release of other cytokines, as they form a complicated network by promoting specific cellular

interactions in inflammation, endothelial dysfunction and in the course of atherosclerosis (41). We could not assess valid quantification because their levels were too low. In fact, many of these cytokines were neither detectable on HUVECs after 10 days radiation at 1 to 20Gy (42) or even when treated with progesterone (43) or proteases (44).

Moreover, we assessed sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin levels in cell supernatant of studied cells as the release of these adhesion molecules have previously been measured in order to test endothelial dysfunction in HUVECs (45, 46), and it is described that their levels are enhanced in circulation of CVD patients (11, 12). We found that levels of sICAM-1 and sE-selectin were too low, whereas there were no differences in the release of sVCAM-1 at studied time-points. There is no previous data evaluating radiation effects on their release, but it was studied their expression at cell surface. It was described that 2Gy enhanced their levels after 5 to 36h (24, 47, 48). This was also observed when employed lower or higher doses (e.g.: 0.125, 0.250, 7, 8 and 10Gy) at times up to 18h (9, 23, 25, 49, 50). However, and similarly to our results, Gaugler et al. (24) and Ebrahimian et al. (51) found unchanged levels of VCAM-1 at 2Gy dose after 2 to 10 days and 1 to 10 weeks, respectively. It should be noted that these studies differed from ours as we measured soluble adhesion molecules whereas they studied the expression in cell surface. Moreover, while we employed ELISA, they performed other evaluation techniques as flow cytometry, Western Blot, Northern Blot and mRNA extraction. Finally, we studied acute response whereas their time-points were from days to weeks, besides the differences in the type of radiation, the dose and the dose rate.

## CONCLUSION

In conclusion, our results showed that single dose radiation at either 2 or 10Gy in our experimental conditions did not affect the cytotoxicity or viability from 1 to 48h on HUVECs. Furthermore, the expression of miRNAs-146a, -155, -221 and -222 was modulated by 2Gy at 2 and 24h in these cells. We observed that studied radiation did not promote inflammation or endothelial dysfunction at acute phase times as possible mechanism of action. Thus, future studies should be focused in assessing chronic response of miRNA modulation, as well as inflammation and dysfunction of endothelium, at following times after radiation exposure. Moreover, we suggested that radiation induced-variation in selected miRNAs levels could be related with atherosclerosis progression and the subsequent development of future cardiovascular pathologies in patients who receive RT. In

addition, further research is needed in order to confirm their role as biomarker or therapeutic agent in this pathology.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI 10/02547, PI030786), Centro de Investigación Biomédica en Red en Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBER-DEM) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

We are especially grateful to Roser Rosales for the technical assistance with the miRNA methods.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Conflict of interest: none.

## REFERENCES

1. Remick J, Amin NP. Radiation Therapy, Breast Cancer, Postmastectomy. StatPearls. Treasure Island (FL)2018.
2. Martei YM, Pace LE, Brock JE, Shulman LN. Breast Cancer in Low- and Middle-Income Countries: Why We Need Pathology Capability to Solve This Challenge. Clinics in laboratory medicine. 2018;38(1):161-73. Epub 2018/02/08.
3. Qian K, Di L, Guo K, Zheng X, Ji Q, Wang Z. Cervical Lymph Node Metastatic Status and Adjuvant Therapy Predict the Prognosis of Salivary Duct Carcinoma. Journal of oral and maxillofacial surgery. 2018;76(7):1578-86. Epub 2018/03/17.
4. Anzalone CL, Cohen PR, Tschen JA, MacFarlane DF. Radiation-associated atypical vascular lesions: vascular lesions with endothelial cell atypia presenting in the radiation port of breast cancer patients. Skinmed. 2014;12(6):344-8. Epub 2015/04/01.
5. Raghunathan D, Khilji MI, Hassan SA, Yusuf SW. Radiation-Induced Cardiovascular Disease. Current atherosclerosis reports. 2017;19(5):22. Epub 2017/03/21.

6. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *Journal of Korean medical science*. 2015;30(9):1213-25. Epub 2015/09/05.
7. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular pharmacology*. 2018;100:1-19. Epub 2017/06/06.
8. Mukherjee D, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms. *The Journal of pathology*. 2014;232(3):289-99. Epub 2013/11/21.
9. Cervelli T, Panetta D, Navarra T, Andreassi MG, Basta G, Galli A, et al. Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):510-8. Epub 2014/06/24.
10. Videm V, Albrigtsen M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. *Scandinavian journal of immunology*. 2008;67(5):523-31. Epub 2008/03/28.
11. Oguz MM, Oguz AD, Sanli C, Cevik A. Serum levels of soluble ICAM-1 in children with pulmonary artery hypertension. *Texas Heart Institute journal*. 2014;41(2):159-64. Epub 2014/05/09.
12. Czucz J, Cervenak L, Forhecz Z, Gombos T, Pozsonyi Z, Kunde J, et al. Serum soluble E-selectin and NT-proBNP levels additively predict mortality in diabetic patients with chronic heart failure. *Clinical research in cardiology*. 2011;100(7):587-94. Epub 2011/02/12.
13. Yentrapalli R, Merl-Pham J, Azimzadeh O, Mutschelknaus L, Peters C, Hauck SM, et al. Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. 2017;93(6):569-80. Epub 2017/03/08.
14. Das A, Samidurai A, Salloum FN. Deciphering Non-coding RNAs in Cardiovascular Health and Disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:73. Epub 2018/07/18.
15. Islas JF, Moreno-Cuevas JE. A MicroRNA Perspective on Cardiovascular Development and Diseases: An Update. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(7). Epub 2018/07/19.

16. Economou EK, Oikonomou E, Siasos G, Papageorgiou N, Tsalamandris S, Mourouzis K, et al. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):624-33. Epub 2015/06/29.
17. Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB journal*. 2011;25(8):2515-27. Epub 2011/04/22.
18. Oner T, Arslan C, Yenmis G, Arapi B, Tel C, Aydemir B, et al. Association of NFKB1A and microRNAs variations and the susceptibility to atherosclerosis. *Journal of genetics*. 2017;96(2):251-9. Epub 2017/07/05.
19. Cheng HS, Besla R, Li A, Chen Z, Shikatani EA, Nazari-Jahantigh M, et al. Paradoxical Suppression of Atherosclerosis in the Absence of microRNA-146a. *Circulation research*. 2017;121(4):354-67. Epub 2017/06/24.
20. Chen AX, Yu KD, Fan L, Li JY, Yang C, Huang AJ, et al. Germline genetic variants disturbing the Let-7/LIN28 double-negative feedback loop alter breast cancer susceptibility. *PLoS genetics*. 2011;7(9):e1002259. Epub 2011/09/14.
21. Celic T, Metzinger-Le Meuth V, Six I, Massy ZA, Metzinger L. The mir-221/222 Cluster is a Key Player in Vascular Biology via the Fine-Tuning of Endothelial Cell Physiology. *Current vascular pharmacology*. 2017;15(1):40-6. Epub 2016/09/17.
22. Koulis TA, Phan T, Olivotto IA. Hypofractionated whole breast radiotherapy: current perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015;7:363-70. Epub 2015/11/26.
23. Prabhakarandian B, Goetz DJ, Swerlick RA, Chen X, Kiani MF. Expression and functional significance of adhesion molecules on cultured endothelial cells in response to ionizing radiation. *Microcirculation*. 2001;8(5):355-64. Epub 2001/11/01.
24. Gaugler MH, Squiban C, van der Meeren A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *International journal of radiation biology*. 1997;72(2):201-9. Epub 1997/08/01.
25. Van Der Meeren A, Squiban C, Gourmelon P, Lafont H, Gaugler MH. Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells. *Cytokine*. 1999;11(11):831-8. Epub 1999/11/05.

26. Yang FB. [Protective effects of curcumin on vascular endothelial injuries induced by radiation]. Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases. 2011;29(11):846-8. Epub 2012/04/04.
27. Vorotnikova E, Ivkov R, Foreman A, Tries M, Braunhut SJ. The magnitude and time-dependence of the apoptotic response of normal and malignant cells subjected to ionizing radiation versus hyperthermia. International journal of radiation biology. 2006;82(8):549-59. Epub 2006/09/13.
28. Rubin DB, Drab EA, Ward WF, Smith LJ, Fowell SM. Enzymatic responses to radiation in cultured vascular endothelial and smooth muscle cells. Radiation research. 1984;99(2):420-32. Epub 1984/08/01.
29. Rubin DB, Drab EA, Ts'ao CH, Gardner D, Ward WF. Prostacyclin synthesis in irradiated endothelial cells cultured from bovine aorta. J Appl Physiol (1985). 1985;58(2):592-7. Epub 1985/02/01.
30. Rubin DB, Drab EA, Ward WF, Bauer KD. Cell cycle changes and cytotoxicity in irradiated cultures of bovine aortic endothelial cells. Radiation research. 1986;108(2):206-14. Epub 1986/11/01.
31. Lam TT, Rubin D, Drab EA. The effect of dexamethasone on the cytotoxic and enzymatic response of cultured endothelial cells to radiation. Radiation research. 1985;103(2):240-50. Epub 1985/08/01.
32. Lindgard A, Hulten LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. Lasers in medical science. 2007;22(1):30-6. Epub 2006/11/23.
33. Hietanen T, Kapanen M, Kellokumpu-Lehtinen PL. Natural Killer Cell Viability After Hyperthermia Alone or Combined with Radiotherapy with or without Cytokines. Anticancer research. 2018;38(2):655-63. Epub 2018/01/29.
34. Hietanen T, Pitkanen M, Kapanen M, Kellokumpu-Lehtinen PL. Effects of Single and Fractionated Irradiation on Natural Killer Cell Populations: Radiobiological Characteristics of Viability and Cytotoxicity In Vitro. Anticancer research. 2015;35(10):5193-200. Epub 2015/09/27.
35. Vincenti S, Brillante N, Lanza V, Bozzoni I, Presutti C, Chiani F, et al. HUVEC respond to radiation by inducing the expression of pro-angiogenic microRNAs. Radiation research. 2011;175(5):535-46. Epub 2011/03/03.

36. Kraemer A, Barjaktarovic Z, Sarioglu H, Winkler K, Eckardt-Schupp F, Tapio S, et al. Cell survival following radiation exposure requires miR-525-3p mediated suppression of ARRB1 and TXN1. *PLoS one*. 2013;8(10):e77484. Epub 2013/10/23.
37. Palayoor ST, John-Aryankalayil M, Makinde AY, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN. Differential expression of stress and immune response pathway transcripts and miRNAs in normal human endothelial cells subjected to fractionated or single-dose radiation. *Molecular cancer research : MCR*. 2014;12(7):1002-15. Epub 2014/05/03.
38. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer research*. 2006;66(22):10843-8. Epub 2006/11/17.
39. Simone NL, Soule BP, Ly D, Saleh AD, Savage JE, Degraff W, et al. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PLoS one*. 2009;4(7):e6377. Epub 2009/07/28.
40. Wu W, Hu Z, Wang F, Gu H, Jiang X, Xu J, et al. Mxi1-0 regulates the growth of human umbilical vein endothelial cells through extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and interleukin-8 (IL-8)-dependent pathways. *PLoS one*. 2017;12(6):e0178831. Epub 2017/06/03.
41. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2009;84(3):353-60. Epub 2009/07/21.
42. Meeren AV, Bertho JM, Vandamme M, Gaugler MH. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators of inflammation*. 1997;6(3):185-93. Epub 1997/01/01.
43. Goddard LM, Ton AN, Org T, Mikkola HK, Iruela-Arispe ML. Selective suppression of endothelial cytokine production by progesterone receptor. *Vascular pharmacology*. 2013;59(1-2):36-43. Epub 2013/06/12.
44. Wang Y, Nie G. High levels of HtrA4 observed in preeclamptic circulation drastically alter endothelial gene expression and induce inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Placenta*. 2016;47:46-55. Epub 2016/10/27.
45. Andresen TK, Svennevig JL, Videm V. Soluble VCAM-1 is a very early marker of endothelial cell activation in cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2002;17(1):15-21. Epub 2002/01/31.



46. Harrington EO, Stefanec T, Newton J, Rounds S. Release of soluble E-selectin from activated endothelial cells upon apoptosis. *Lung*. 2006;184(5):259-66. Epub 2007/01/20.
47. Soltani B, Bodaghabadi N, Mahpour G, Ghaemi N, Sadeghizadeh M. Nanoformulation of curcumin protects HUVEC endothelial cells against ionizing radiation and suppresses their adhesion to monocytes: potential in prevention of radiation-induced atherosclerosis. *Biotechnology letters*. 2016;38(12):2081-8. Epub 2016/10/25.
48. Nubel T, Dippold W, Kaina B, Fritz G. Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis*. 2004;25(8):1335-44. Epub 2004/02/28.
49. Walther M, Kaffenberger W, Van Beuningen D. Influence of clinically used antioxidants on radiation-induced expression of intercellular cell adhesion molecule-1 on HUVEC. *International journal of radiation biology*. 1999;75(10):1317-25. Epub 1999/11/30.
50. Son EW, Cho CK, Rhee DK, Pyo S. Inhibition of gamma-irradiation induced adhesion molecules and NO production by alginate in human endothelial cells. *Archives of pharmacal research*. 2001;24(5):466-71. Epub 2001/11/06.
51. Ebrahimian T, Le Gallic C, Stefani J, Dublineau I, Yentrapalli R, Harms-Ringdahl M, et al. Chronic Gamma-Irradiation Induces a Dose-Rate-Dependent Pro-inflammatory Response and Associated Loss of Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Radiation research*. 2015;183(4):447-54. Epub 2015/03/26.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

# DISCUSSIÓ GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

El càncer de mama és el tipus de càncer més freqüent entre les dones, tant en països desenvolupats com en països en desenvolupament (122). La majoria de les pacients amb càncer de mama reben RT, la qual afecta a les artèries i/o el cor exposats durant el tractament i, conseqüentment, promou el desenvolupament de MCV-RT (27, 28). Es coneix que la radiació de les cèl·lules endotelials, presents en el cor i els vasos sanguinis, desencadena processos d'inflamació i disfunció endotelial i (123). La disfunció endotelial promou el desenvolupament de l'ateroesclerosi que, alhora, participa en la progressió de MCV. És per aquest motiu que les MCV-RT de pacients amb càncer de mama es relacionen amb la disfunció de cèl·lules endotelials durant el tractament amb RT. Actualment, la primera causa de mort d'aquestes pacients després del càncer de mama són les MCV-RT (33). A causa de la severitat d'aquestes malalties, es requereixen biomarcadors de MCV-RT per tal de poder detectar el desenvolupament d'aquest tipus de malalties en estadis primerencs, per poder-ne avaluar la progressió i/o per ser emprats com a diana terapèutica. En els darrers anys, s'han estudiat els miARN en la circulació com a possibles candidats a biomarcadors de les MCV-RT (80-83). Els miARN -146a, -155, -221 i -222 destaquen pel rol que exerceixen en processos inflamatoris, disfunció endotelial, angiogènesi i formació de la placa ateroscleròtica. El miARN146a exerceix un paper ateroprotectiu regulant negativament la inflamació. Evita la formació de lesions ateroscleròtiques a través de la inhibició de l'alliberació de citocines proinflamatòries en cèl·lules endotelials. El miARN-146a promou la proliferació de les CML de la vasculatura i modula la funció i activació de les cèl·lules dendrítiques que activen la resposta immune. En macròfags, també inhibeix l'expressió de citocines proinflamatòries, tals com TNF- $\alpha$ . No obstant, s'ha demostrat recentment que ratolins *knockout* del miARN-146a desenvolupen menors lesions ateroscleròtiques (90, 94-98).

El miARN-155 inhibeix la proliferació i migració de cèl·lules endotelials i bloqueja l'expressió de proteïnes d'unió intercel·lulars, de molècules d'adhesió tals com VCAM-1 i ICAM-1; i de citocines com el TNF- $\alpha$ , la IL-6 i la IL-8. La manca de les proteïnes d'unió altera la barrera endotelial contribuint a la progressió de l'ateroesclerosi, mentre que la manca de molècules d'adhesió inhibeix la resposta inflamatòria. El miARN-155 disminueix els nivells de l'NO sintasa endotelial que comporta la disfunció endotelial i la senescència endotelial. A més, aquest miARN inhibeix la diferenciació de CML vasculars, redueix la captació de lípids de macròfags i cèl·lules dendrítiques i sotregula l'expressió de molècules d'adhesió i citocines. D'altra banda, algunes investigacions han

observat que el miARN-155 participa en la formació de cèl·lules escumoses i promou la resposta inflamatòria (82, 100-107).

Els miARN-221 i -222 regulen processos d'inflamació ateroscleròtica, remodelació vascular, fibrosi, hipertensió i disfunció endotelial. Aquests miARN participen en l'angiogènesi, la hiperplàsia neointimal i l'envelliment vascular. En cèl·lules endotelials, inhibeixen l'angiogènesi i la inflamació, indueixen l'apoptosi i promouen la disfunció endotelial sotregulant l'expressió de l'NO sintasa endotelial. A més, bloquegen l'expressió de les molècules d'adhesió tals com ICAM-1 i VCAM-1. En CML vasculars, aquests miARN indueixen la proliferació i augmenten la mobilitat (108-113).

En aquesta tesi es van analitzar els efectes del tractament amb RT en dones amb càncer de mama. Es van estudiar in vivo els efectes de la RT en l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222 en sang de dones amb càncer de mama. Les pacients van rebre RT durant 2 mesos aproximadament. Els tipus de RT emprats van ser normofraccionada (50 Gy de dosi total aplicada en dosis de 2 Gy/dia a la mama; i 16 Gy de dosi total en dosis de 2 Gy/dia en el llit tumoral, 5 dies/setmana) o hipofraccionada (40 Gy de dosi total aplicada en dosis de 2.67 Gy/dia, 5 dies/setmana). A més, per tal d'avaluar el potencial d'aquests miARN com a biomarcadors de MCV-RT, es van estudiar les associacions de factors de risc cardiovasculars en aquestes pacients amb l'expressió d'aquests miARN abans i després de la RT, així com també amb la modulació induïda per la RT en l'expressió de cada miARN.

Amb la finalitat d'estudiar l'efecte de la RT en cèl·lules endotelials, es va estudiar in vitro la resposta a la radiació en dosi terapèutica i a temps en fase aguda en l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222. A més, es va avaluar la resposta inflamatòria i disfunció endotelial com a processos propis de l'aterosclerosi en les cèl·lules endotelials.

Per tal d'analitzar els efectes in vivo de la RT en l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222, es van mesurar els nivells d'aquests miARN en la sang de 136 dones amb càncer de mama una setmana abans de la RT (mostres control pre-RT) i un mes després d'acabar la RT (mostres post-RT). Primerament, es van comparar els nivells dels miARN entre si en els dos temps d'estudi. Es va observar que el miARN-222 presentava més expressió en els dos temps estudiats, seguit pel miARN-221. D'altra banda, el miARN-155 va ser el menys expressat en les mostres control pre-RT i post-RT. Aquests resultats concorden amb l'estudi de Gezer et al. (38), en el qual van trobar que pacients amb càncer de mama presentaven nivells basals circulants del miARN-221 més elevats que els del

miARN-155. A més, en un estudi recent de pacients amb aquest tipus de càncer, es va observar que el miARN-155 estava per sota els límits de detecció en la circulació (124).

En el nostre treball, l'expressió dels miARN estava correlacionada entre si en els dos temps estudiats. Les dones que presentaven nivells elevats d'un miARN, també tenien nivells elevats de la resta; i viceversa. Aquesta correlació pot confirmar el *crosslink* existent entre els miARN, per exemple, en vies de senyalització de processos inflamatoris i/o ateroscleròtics (90, 92, 125). La correlació entre els nivells circulants dels miARN-146a i -155 també va ser descrita en pacients diabètics i població sana en la investigació de Baldeon et al. (120).

La RT va ocasionar un augment significatiu en l'expressió pels miARN-146a, -221 i -222 i no significatiu pel miARN-155. La mateixa resposta a l'efecte de la RT (augment) en els quatre miARN també pot confirmar el seu *crosslink*. En un estudi previ també es va descriure una sobreexpressió dels miARN-221 i -222 en sang de pacients amb remissió completa 1 o 2 després de la radiació total del cos a la dosi de 1.25 Gy (126). D'altra banda, els nivells circulants del miARN-155 no variaven després de la RT en pacients amb càncer de mama en l'estudi de Sochor et al. (56). Les discordances entre aquest estudi i els nostres resultats poden ser degudes a la diferència entre les dosis i temps post-RT avaluats. En la investigació de Sochor et al. (56) es van aplicar dues sessions de RT i es van fer les mesures en diferents temps post-RT, mentre que en el nostre es van aplicar 20 o 25 sessions i es va fer la mesura un mes després de la RT. En el nostre treball, tot i que la RT va augmentar la mitjana de l'expressió dels miARN seleccionats, es va observar un descens en els nivells d'alguns pacients. Es va observar que la RT augmentava l'expressió en les pacients classificades en tots els tipus tumorals a excepció del grup HER2.

Es podria relacionar l'augment observat en els nivells dels miARN seleccionats per efecte de la RT amb la MCV-RT que les pacients amb càncer de mama poden desenvolupen anys més tard (27, 28). De fet, s'ha descrit una sobreexpressió del miARN-146a en la circulació de pacients amb MCV (115, 116), tot i que diversos estudis van observar que els nivells circulants dels quatre miARN seleccionats eren baixos en aquests pacients respecte a la població sana (115, 116, 118, 119). A més, es coneix que en les lesions ateroscleròtiques humanes, els nivells dels quatre miARN estan elevats (94, 113, 114). Per aquest motiu es relacionen els baixos nivells circulants d'aquests miARN amb la seva captació per part de les lesions arteroescleròtiques en aquests pacients. En el nostre treball, el miARN-222 presentava més increment per efecte de la RT respecte de la resta. Els miARN-221 i -222 tenen la mateixa regió llavor i sovint s'expressen com a clúster, i participen junts en

processos de disfunció endotelial i aterogènesi (127, 128). No obstant això, està demostrat que el miARN-222 exerceix un paper biològicament més rellevant inhibint l'angiogènesi (129). La modulació induïda per la RT en l'expressió dels miARN seleccionats es correlacionava entre si. És a dir, si la RT ocasionava un gran augment en l'expressió d'un miARN, també ho feia per a la resta, i viceversa. Aquesta correlació també dona suport al *crosslink* existent entre aquests miARN (90, 92, 125). Per tant, partint dels resultats observats i de la bibliografia prèvia, es pot afirmar que la RT sobreexpressa els miARN-146a, -155, -221 i -222 en sang de pacients amb càncer de mama, un mes després de finalitzar el tractament. Posteriorment, aquests miARN podrien desplaçar-se a les lesions ateroscleròtiques promovent el desenvolupament de MCV, per la qual cosa els nivells circulants disminuirien.

Per tal de testar el potencial dels miARN-146a, -155, -221 i -222 com a biomarcadors en la MCV-RT en pacients amb càncer de mama, es va analitzar la relació entre factors de risc cardiovasculars i l'expressió dels miARN (tant els nivells dels miARN abans i després de la RT, com la modulació induïda per la RT en l'expressió de cadascun dels miARN). Primerament, es va avaluar l'efecte de l'edat en el moment del diagnòstic de les pacients, ja que l'edat és considerada un factor de risc cardiovascular (130). L'edat es correlacionava de forma inversa amb l'expressió dels miARN abans de la RT; això indicava que les dones més grans tenien nivells inferiors dels miARN. Nombrosos estudis suggereixen que l'expressió dels gens varia en funció de l'edat (131), així com també l'expressió dels miARN (132). D'acord amb els nostres resultats, Noren Hooten et al. (47) van analitzar l'expressió de més de 800 miARN en sang identificant que diversos miARN, incloent els miARN-221 i -155, presentaven nivells més baixos en la població de més edat que en els joves. De manera similar, Fichtlscherer et al. (48) van observar que els nivells circulants del miARN-155 es correlacionaven inversament amb l'edat en la població sana i en pacients amb MCV. En el nostre treball, la correlació observada no es mostrava en el temps post-RT; i això indicava que la RT augmentava el nivell dels miARN i afectava principalment les dones de més edat. De fet, la modulació induïda per la RT en els miARN-146a i -155 es correlacionava significativament amb l'edat.

El nostre estudi va incloure l'anàlisi dels efectes de la dislipèmia i l'hipotiroidisme, coneguts com a factors de risc cardiovasculars, en l'expressió dels miARN seleccionats. Les alteracions en els nivells sanguinis dels lípids promouen el desenvolupament de MCV i les baixes concentracions de les hormones tiroïdals afecten l'homeòstasi del sistema cardiovascular (133, 134). Es va observar que



les pacients dislipèmiques presentaven menys expressió en els nivells dels miARN, tant abans com després de la RT, que les que no ho eren. Baldeon et al. (120) van observar que població diabètica, en la qual la dislipèmia és una característica comuna, mostrava nivells baixos del miARN-146a circulant. Contràriament, una investigació prèvia va mostrar una sobreexpressió del miARN-146 en pacients hiperlipèmics (135). Les diferències entre el nostre treball i aquest estudi es pot deure a les diferències entre els perfils lipídics dels pacients. D'altra banda, els nostres resultats posen de manifest que les dones amb hipotiroïdisme presentaven nivells més baixos dels miARN respecte a la resta tant abans com després de la RT, a excepció del miARN-221 en el temps control pre-RT. En un estudi previ es va observar que el miARN-146a estava sobreexpressat en la circulació de pacients amb MCV i hipotiroïdisme respecte dels que presentaven MCV sense hipotiroïdisme. Es va suggerir que l'hipotiroïdisme era el responsable d'aquest augment en els nivells del miARN-146a (136). Cal considerar que els pacients d'aquest estudi no presentaven càncer de mama, sinó MCV; per la qual cosa s'observen diferències en els resultats.

Un altre objectiu del nostre treball va ser avaluar els efectes del tipus de tractament sobre l'expressió dels miARN seleccionats i sobre la modulació induïda per la RT en la seva expressió. S'ha descrit que la quimioteràpia, hormonoteràpia i teràpia dirigida estan involucrades en cardiopatologies, tot i que en menor mesura que la RT (137-140). En el nostre estudi, algunes pacients havien rebut quimioteràpia en el temps control pre-RT. La quimioteràpia va ser aplicada durant 4 o 5 mesos, i va concloure un o dos mesos abans de la RT. Les pacients que havien rebut quimioteràpia tenien nivells més elevats dels quatre miARN abans de la RT, respecte de les que no n'havien rebut, i també dels miARN-155 i -221 després de la RT. De manera similar, Rigaud et al. (141), van detectar una sobreexpressió del miARN-146a després de tres setmanes de la finalització de la quimioteràpia en pacients amb càncer de mama. Contràriament, però, altres investigacions van observar que els miARN-155 i -221 circulants havien disminuït just al final de la quimioteràpia en pacients amb càncer de mama (142, 143). Considerant aquests resultats i donat que les mostres del nostre estudi abans de la RT corresponen a un o dos mesos acabada la quimioteràpia, podem suposar que els miARN es comencen a sobreexpressar passades unes quantes setmanes de la finalització de la quimioteràpia. Pel que fa a la modulació induïda per la RT en l'expressió, les pacients tractats amb quimioteràpia presentaven menors augments del miARN-221 que els que no l'havien rebut.

L'hormonoteràpia va ser aplicada a pacients ER i PR positives durant la RT. Es va establir que no estava associada amb els nivells dels miARN ni amb la modulació induïda per la RT en l'expressió. Per la qual cosa, es podria afirmar que no interfereix en l'efecte observat de la RT en els nivells dels miARN.

La teràpia dirigida va ser aplicada durant quatre o cinc mesos i finalitzada un o dos mesos previs a la RT en pacients HER2 positives. L'expressió dels miARN-155, -221 i -222 en les pacients que van fer tal teràpia va ser més elevada abans de la RT, que la de les pacients que no en van rebre. A més, la RT va ocasionar una disminució en l'expressió dels miARN en les pacients que havien rebut teràpia dirigida, mentre que la RT va augmentar-los en les que no havien rebut tal teràpia. Com a conseqüència de la relació entre la modulació induïda per la RT en l'expressió dels miARN i la teràpia dirigida, es va analitzar aquesta associació mitjançant un model de regressió lineal ajustat per factors de confusió tals com l'edat i el tipus de tractament (quimioteràpia i hormonoteràpia). Es va observar que la teràpia dirigida estava igualment associada amb la modulació de l'expressió dels miARN-146a, -221 i -222 en els models ajustats per aquests factors. El miARN-155 presentava la mateixa tendència, però no significativa, principalment a causa de l'efecte invers de l'edat en la modulació en l'expressió.

Un altre factor de risc cardiovascular avaluat va ser el costat del pit on estava localitzat el càncer de mama (dret, esquerre o bilateral). S'ha descrit que les dones amb càncer de mama esquerra tenen més cardiotoxicitat que les de la mama dreta a causa de l'exposició directa del cor i l'artèria coronària en el procediment de la RT (34-36). Segons els nostres resultats, en les dones amb càncer de mama esquerra, el miARN-146a estava sobreexpressat en les mostres control pre-RT i post-RT, i el miARN-221 abans de la RT, respecte de les dones amb càncer en la mama dreta.

Es va considerar l'efecte de la dosi total rebuda de RT per les pacients (50 o 60 Gy). No es va observar cap associació amb l'expressió dels miARN abans o després de la RT, ni tampoc amb la modulació induïda per la RT en l'expressió de tals miARN.

En l'anàlisi dels resultats obtinguts en el nostre estudi, les associacions entre l'expressió dels miARN i l'edat, dislipèmia, hipotiroidisme, tipus de tractament i costat del pit afectat pel càncer de mama (factors de risc cardiovasculars); podria confirmar el rol dels miARN estudiats en els processos ateroscleròtics que comporten al desenvolupament de MCV (116, 118-120).

Es va estudiar la influència de paràmetres moleculars del càncer de mama, tals com la presència d'ER, PR, HER2, i l'índex Ki-67 amb els canvis induïts per RT en l'expressió dels miARN. Alguns autors van descriure que els tumors de càncer de mama ER positius presentaven nivells més elevats del miARN-221 que els ER negatius (144), mentre que altres estudis van trobar baixos nivells dels miARN-221 i -222 en cultius cel·lulars i tumors de càncer de mama (145, 146). Aquests dos miARN també estaven menys expressats en carcinomes PR positius i amb l'índex Ki-67 menor al 20%, en comparació amb els PR negatius i amb l'índex Ki-67 per sobre del 20%, respectivament (145). A més, els nivells dels miARN-146a i -155 estaven sobreexpressats en la circulació i en teixit de dones amb càncer de mama, respectivament, en HER2 positives en comparació amb els HER2 negatives (147, 148). En el nostre estudi, l'HER2 estava associat amb els canvis en l'expressió; les pacients HER2 positives van presentar una disminució induïda per la RT en els nivells dels miARN seleccionats i viceversa. Tenint en compte que les pacients HER2 són les mateixes que han rebut teràpia dirigida, i considerant la relació entre els miARN seleccionats i cardiotoxicitat, es pot suposar que l'associació observada es deu a l'efecte de la teràpia dirigida. Pel que fa a la resta de paràmetres moleculars, no es van observar associacions entre la modulació induïda per la RT i l'expressió dels miARN estudiats.

Partint dels resultats obtinguts, es pot concloure que l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222 en la sang de pacients amb càncer de mama augmenta per efecte de la RT. El miARN-222 és el més expressat en els temps control pre-RT i post-RT, i també el que presenta un augment induït per la RT més elevat. A més, els nivells dels quatre miARN i la modulació induïda per la RT en l'expressió es correlacionen entre si. Els nivells dels miARN i la modulació induïda per la RT en l'expressió està associada a factors de risc cardiovasculars en les pacients tals com l'edat, la dislipèmia, l'hipotiroidisme, el tipus de tractament i el costat del pit afectat pel càncer de mama. Per tant, la variació en els nivells dels miARN i la relació de la seva expressió amb factors de risc cardiovasculars suggereixen que aquests miARN podrien ser bons candidats a biomarcadors de MCV-RT.

Les cèl·lules endotelials es troben en les artèries que estan exposades a la radiació durant la RT en pacients amb càncer de mama, participant en el desenvolupament de la MCV (62). Per tal de determinar si els nivells dels miARN seleccionats estan modulats en les cèl·lules endotelials durant la RT, es va estudiar la resposta in vitro en fase aguda a la radiació a dosi terapèutica dels miARN seleccionats en HUVEC. Les HUVEC han estat àmpliament utilitzades com a model cel·lular en

estudis in vitro. A més, es van avaluar la resposta inflamatòria i la disfunció endotelial com a processos relacionats amb el desenvolupament de l'ateroesclerosi.

Es va realitzar un estudi pilot amb la finalitat de determinar la dosi de radiació i els temps postradiació d'estudi, mesurant la citotoxicitat i viabilitat de les HUVEC. Es van seleccionar les dosis de 2 Gy (utilitzada com a fracció en cadascuna de les sessions de RT en pacients amb càncer de mama (149)) i 10 Gy (utilitzada en múltiples estudis de radiació en els quals s'utilitzen les HUVEC com a model cel·lular (150-152)); entre 1 i 48 hores (temps en fase aguda). Es va estudiar la citotoxicitat ocasionada per les dues dosis de radiació i es van mesurar els nivells de lactat deshidrogenasa (LDH) alliberats per les cèl·lules en els diferents temps. L'enzim LDH és alliberat al medi per les cèl·lules que estan mortes o es troben moribundes per efecte d'un agent tòxic. En el nostre treball, els nivells de LDH van augmentar després d'1 hora per efecte de les dues dosis estudiades, però en temps posteriors es va perdre aquest increment. A les 24 hores, els nivells van disminuir en les cèl·lules irradiades a 2 Gy. En un estudi previ, Yang (153) va observar un increment de LDH a dosis entre 2 i 8 Gy en temps no determinats; raó per la qual els nostres resultats i els seus difereixen. Vorotnikova et al. (36) tampoc van observar citotoxicitat a 20 Gy en cèl·lules endotelials de capil·lar en temps entre 2 i 72 hores. D'altra banda, altres estudis previs van observar un augment als mateixos temps postradiació amb dosis entre 0,5 i 10 Gy (154-157). Les diferents dosis de radiació utilitzades en els estudis esmentats, així com el fet que van emprar un model cel·lulars endotelial diferent, poden ser els causants de la variabilitat entre els resultats d'aquests autors i del nostre treball.

Quan la viabilitat cel·lular es veu afectada, disminueix l'alliberació d'adenosina trifosfat (ATP) al medi. En el nostre treball, es va mostrar un increment en l'alliberació d'ATP en les dues dosis de radiació en els temps 3 i 24 hores; la qual cosa indica que la viabilitat no va ser perjudicada. L'alliberació d'ATP ha estat analitzada en diversos models cel·lulars. Lindgard et al. (158) no van trobar diferències en monòcits irradiats amb fotons a 250°C durant 2 minuts a 634 nm. D'altra banda, Hietanen et al. (159) van observar una disminució en dosis entre 1 i 60 Gy després de 72 hores en NK. Hietanen et al. (160) va reportar que la producció d'ATP era estimulada per dosis de radiació baixes i inhibida per dosis superiors a 10 Gy en aquest model cel·lular. Van observar que dosis entre 1 i 8 Gy feien augmentar l'ATP entre 0 i 6 hores i disminuir-lo de 8 a 78 hores, mentre que dosis entre 8 i 80 Gy, el disminuïen.

Un cop es va determinar que les dosis i el temps no eren citotòxics ni impediien la viabilitat, es van dur a terme els experiments in vitro utilitzant la dosi de 2 Gy en els temps 2 i 24 hores postradiació. Respecte a l'estudi de la modulació dels nivells dels miARN amb dosi i temps seleccionats, els miARN-221 i -222 van ser els més expressats després de 2 i 24 hores, respectivament, respecte de la resta. La radiació a 2 Gy va ocasionar un augment en l'expressió dels miARN-221 i -222 i un descens dels nivells del miARN-155 després de 2 hores. A més, l'augment del miARN-221 va ser restaurat després de 24 hores, mentre que l'expressió del miARN-222 va disminuir. Pel que fa als miARN-146a i -155 en aquest temps, els seus nivells van augmentar. De manera similar, en un estudi previ es va observar en HUVEC que els nivells dels miARN-221 i -222 incrementaven a dosi d'1 Gy després d'1 i 2 hores i aquests eren restaurats a les 4 i 8 hores postradiació (161). Kraemer et al. (162) van trobar, en un el model cel·lular endotelial EA.hy926, que la dosi de 2,5 Gy va ocasionar un augment del miARN-146a a les 4 hores postradiació; però aquest va ser restaurat després de 24 hores. En cèl·lules endotelials arterials coronàries humanes irradiades a 10 Gy, els miARN-221 i -222 estaven sobreexpressats després de 6 hores i el miARN-146a després de 6 i 24 hores (163). La variació entre els resultats dels estudis previs i els resultats obtinguts en el nostre treball pot ser deguda al fet que aquests autors van utilitzar dosis inferiors i/o superiors a la nostra, a més d'utilitzar models cel·lulars endotelials diferents a les HUVEC.

Per tal d'estudiar la resposta inflamatòria i disfunció endotelial d'HUVEC irradiades a 2 Gy a les 2 i 24 hores postradiació, es va determinar l'alliberació de diverses citocines i de molècules d'adhesió respectivament. La resposta inflamatòria és induïda per l'alliberació de citocines per part de l'endoteli disfuncional i de les cèl·lules irradiades danyades com a mecanisme de defensa als efectes tòxics (65). Algunes citocines, com la IL-1 o el TNF- $\alpha$ , promouen l'expressió de molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials, tals com ICAM-1, VCAM-1 i Selectina-E. Aquestes molècules d'adhesió poden ser alliberades a la circulació, en forma soluble; ICAM-1s, VCAM-1s i Selectina-Es. En el nostre treball, l'alliberació de la IL-8, la qual ha estat estudiada com a potencial marcador d'ateroesclerosi (164), no va ser afectada per la radiació. D'acord amb els nostres resultats, Meeren et al. (165) tampoc van observar diferències després de 24 hores, tot i que van veure un augment després de 18 hores en les mateixes cèl·lules i dosi. En canvi, en una altra investigació es va observar un augment de IL-8 de manera temps-depenent de 6 hores a 6 dies en HUVEC irradiades a 10 Gy (152, 165). En el nostre treball, pel que fa a les citocines GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$ , no es va poder quantificar-ne l'alliberació, ja que els seus nivells eren molt baixos.

Les molècules d'adhesió ICAM-1s, VCAM-1s i Selectina-Es han estat mesurades com a marcadors de disfunció endotelial en la circulació de pacients amb MCV (49, 50) i també en estudis in vitro utilitzant com a model cel·lular les HUVEC (166, 167). En el nostre estudi, l'alliberació de VCAM-1s no va variar en els temps postradiació, mentre que els nivells de l'ICAM-1s i la Selectina-Es van ser massa baixos per ser quantificables. Diversos autors van observar un augment dels nivells de les molècules d'adhesió seleccionades en dosis entre 0,125 i 10 Gy a temps entre 5 i 18 hores (150-152, 168-172). Les diferències entre aquests resultats i el nostre treball es poden deure al fet que enlloc de mesurar els nivells alliberats de les molècules d'adhesió en el medi, en aquestes investigacions es van determinar els nivells en la superfície cel·lular. D'altra banda, i de forma similar als nostres resultats, Gaugler et al. (151) i Ebrahimian et al. (173) no van trobar diferències en els nivells de VCAM-1 a la dosi de 2 Gy després de 2 a 10 dies i d'1 a 10 setmanes, respectivament.

Els resultats del nostre treball mostren que la radiació a 2 Gy és capaç de modular l'expressió dels miARN seleccionats després de 2 i 24 hores en cèl·lules endotelials i, en les nostres condicions de treball, no provoca una resposta inflamatòria ni disfunció endotelial en els temps postradiació seleccionats. Es necessiten futures investigacions que avaluin l'efecte de la radiació a 2 Gy sobre aquests paràmetres a temps posteriors. D'aquesta manera, es podria determinar com l'expressió dels miARN seleccionats és modulada i si es produeix una resposta crònica inflamatòria i/o disfunció endotelial en aquest model cel·lular. Aquests estudis ajudarien a confirmar si les cèl·lules endotelials participen en l'augment observat en els nivells dels miARN seleccionats en la circulació de les pacients amb càncer de mama per efecte de la radiació.

Per tal de confirmar que els miRNAs estudiats poden ser utilitzats com a bons biomarcadors de MCV-RT, caldria fer un seguiment de les pacients amb càncer de mama. El seguiment consistiria en determinar la modulació en l'expressió circulants dels miARN en els anys següents, així com també, mesurar indicadors de cardiotoxicitat.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

## CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs



A partir dels resultats obtinguts en aquesta tesi, es pot concloure que:

- Dels quatre miARN seleccionats, el miARN-222 és el més expressat en la circulació de dones amb càncer de mama, seguit pels miARN-221, -146a i -155; en els dos temps estudiats (abans i després de la radioteràpia).
- La radioteràpia provoca un augment significatiu en l'expressió dels miARN seleccionats en la circulació de les pacients. El miARN-222 és el més sobreexpressat.
- Existeix una correlació significativa entre els nivells i entre les modulacions induïdes per la radioteràpia en l'expressió dels miARN seleccionats, tant abans com després de la radioteràpia.
- Els factors de risc cardiovasculars en dones amb càncer de mama s'associen als nivells en sang dels miARN seleccionats i a la modulació induïda per la radioteràpia.
  - o L'edat es relaciona amb una baixa expressió dels miARN seleccionats abans de la radioteràpia; i també amb un gran augment induït per la radioteràpia en l'expressió dels miARN-146a i -155.
  - o La dislipèmia es relaciona amb una baixa expressió dels miARN seleccionats, en els dos temps estudiats.
  - o L'hipotiroïdisme es relaciona amb nivells baixos dels miARN seleccionats, tant abans com després de la radioteràpia.
  - o La quimioteràpia es relaciona amb nivells alts dels miARN-146a i -222 abans de la radioteràpia i dels miARN-155 i -221 després; i també amb un baix augment induït per la radioteràpia en l'expressió del miARN-221.
  - o La teràpia dirigida es relaciona amb nivells elevats dels miARN-155, -221 i -222, abans de la radioteràpia.
  - o La teràpia dirigida es relaciona amb la modulació induïda per la radioteràpia en l'expressió dels miARN seleccionats.
  - o La localització del càncer de mama s'associa amb l'expressió dels miARN-146a i -221.
- El paràmetre molecular del càncer de mama HER2 s'associa amb la modulació induïda per la radioteràpia en l'expressió dels miARN seleccionats.
- Els miARN seleccionats poden ser candidats a biomarcadors de malalties cardiovasculars associades a la radioteràpia en dones amb càncer de mama.

- La radiació a dosi terapèutica aplicada in vitro a cèl·lules endotelials de vena umbilical humana (HUVEC), en les nostres condicions de treball, no altera la citotoxicitat ni la viabilitat cel·lular en temps de resposta en fase aguda.
- L'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222 en HUVEC està modulada per la radiació a la dosi de 2 Gy en els temps en fase aguda seleccionats.
- No es produeix una resposta inflamatòria ni disfunció endotelial en HUVEC per efecte de la radiació a la dosi de 2 Gy en els temps en fase aguda seleccionats, en les nostres condicions de treball.

Per tant, la conclusió general de la tesi és la següent:

- La radioteràpia modula in vivo i in vitro l'expressió dels miARN-146a, -155, -221 i -222. El tractament amb RT augmenta els nivells dels miARN seleccionats en sang de dones amb càncer de mama. Els nivells dels miARN i la modulació induïda per la RT en la seva expressió estan associats amb factors de risc cardiovasculars en aquestes pacients. A més, la radiació a dosi terapèutica modula l'expressió in vitro dels miARN estudiats en cèl·lules endotelials a temps d'estudi en fase aguda.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

## REFERÈNCIES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

Roser Esplugas Borràs

1. NCI. What Is Cancer? National Cancer Institute 2018.
2. Cooper G. The Development and Causes of Cancer. In: (US) NloH, editor. The Cell: A Molecular Approach Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
3. US. Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007
4. Muñoz A. Cáncer: genes y nuevas terapias. Editorial Hélice. 2004:1-16.
5. OMS. Cáncer. Datos y cifras. Organización Mundial de la Salud (OMS); 2018; Disponible a: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
6. CRUK. Worldwide cancer statistics. Cancer research UK (CRUK); 2018; Disponible a: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Zero>.
7. SEOM. Las cifras del cáncer en España 2018. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM); 2018; Disponible a: [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_Cifras\\_del\\_cance\\_en\\_Espana2018.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cance_en_Espana2018.pdf).
8. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quiros JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. Clinical & translational oncology. 2017;19(7):799-825. Epub 2017/01/18.
9. GENCAT. El Càncer a Catalunya. Pla Director d'Oncologia, Registre del Càncer de Catalunya [Internet]. 2016. Disponible a: <http://cancer.gencat.cat/web/es/professionals/estadistiques/Monografia-2016.pdf>.
10. GLOBOCAN. Breast Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. World Health Organization (WHO); 2018; Disponible a: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
11. U Welsch JS. Histología. Médica Panamericana. 2008:537.
12. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology. 2012;1(4):533-57. Epub 2012/07/31.
13. Marsden J. Hormonal contraception and breast cancer, what more do we need to know? Post reproductive health. 2017;23(3):116-27. Epub 2017/06/24.

14. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences*. 2017;13(11):1387-97. Epub 2017/12/07.
15. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical medicine insights Pathology*. 2015;8:23-31. Epub 2016/01/08.
16. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*. 2010;10(10):955-60. Epub 2010/11/09.
17. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*. 2014;465(1):1-14. Epub 2014/06/01.
18. NCI. Breast Cancer Treatment. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.
19. Franceschini G, Martin Sanchez A, Di Leone A, Magno S, Moschella F, Accetta C, et al. New trends in breast cancer surgery: a therapeutic approach increasingly efficacy and respectful of the patient. *Il Giornale di chirurgia*. 2015;36(4):145-52. Epub 2015/12/30.
20. Ejlersen B. Adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Danish medical journal*. 2016;63(5). Epub 2016/04/30.
21. Tremont A, Lu J, Cole JT. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *The Ochsner journal*. 2017;17(4):405-11. Epub 2017/12/13.
22. Masoud V, Pages G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World journal of clinical oncology*. 2017;8(2):120-34. Epub 2017/04/26.
23. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. NCCN Guidelines Insights: Breast Cancer, Version 1.2017. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2017;15(4):433-51. Epub 2017/04/14.
24. Brown LC, Mutter RW, Halyard MY. Benefits, risks, and safety of external beam radiation therapy for breast cancer. *International journal of women's health*. 2015;7:449-58. Epub 2015/05/16.
25. Deng X, Wu H, Gao F, Su Y, Li Q, Liu S, et al. Brachytherapy in the treatment of breast cancer. *International journal of clinical oncology*. 2017;22(4):641-50. Epub 2017/07/01.
26. Agrawal S. Late effects of cancer treatment in breast cancer survivors. *South Asian journal of cancer*. 2014;3(2):112-5. Epub 2014/05/13.

27. Obi N, Eulenburg C, Seibold P, Eilber U, Thone K, Behrens S, et al. Associations between adjuvant radiotherapy and different causes of death in a German breast cancer cohort. *Breast*. 2018;38:75-80. Epub 2017/12/19.
28. de Vries S, Schaapveld M, van Nimwegen FA, Jozwiak K, Lugtenburg PJ, Daniels LA, et al. High burden of subsequent malignant neoplasms and cardiovascular disease in long-term Hodgkin lymphoma survivors. *British journal of cancer*. 2018. Epub 2018/01/31.
29. Cheng YJ, Nie XY, Ji CC, Lin XX, Liu LJ, Chen XM, et al. Long-Term Cardiovascular Risk After Radiotherapy in Women With Breast Cancer. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(5). Epub 2017/05/23.
30. Roos CTG, van den Bogaard VAB, Greuter MJW, Vliegenthart R, Schuit E, Langendijk JA, et al. Is the coronary artery calcium score associated with acute coronary events in breast cancer patients treated with radiotherapy? *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2018;126(1):170-6. Epub 2017/11/02.
31. Raghunathan D, Khilji MI, Hassan SA, Yusuf SW. Radiation-Induced Cardiovascular Disease. *Current atherosclerosis reports*. 2017;19(5):22. Epub 2017/03/21.
32. Gabriels K, Hoving S, Gijbels MJ, Pol JF, te Poele JA, Biessen EA, et al. Irradiation of existing atherosclerotic lesions increased inflammation by favoring pro-inflammatory macrophages. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2014;110(3):455-60. Epub 2014/03/19.
33. Bradshaw PT, Stevens J, Khankari N, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD. Cardiovascular Disease Mortality Among Breast Cancer Survivors. *Epidemiology*. 2016;27(1):6-13. Epub 2015/09/29.
34. Darby SC, Ewertz M, McGale P, Bennet AM, Blom-Goldman U, Bronnum D, et al. Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368(11):987-98. Epub 2013/03/15.
35. Palumbo I, Palumbo B, Fravolini ML, Marcantonini M, Perrucci E, Latini ME, et al. Brain natriuretic peptide as a cardiac marker of transient radiotherapy-related damage in left-sided breast cancer patients: A prospective study. *Breast*. 2016;25:45-50. Epub 2015/11/09.

36. Skytta T, Tuohinen S, Boman E, Virtanen V, Raatikainen P, Kellokumpu-Lehtinen PL. Troponin T-release associates with cardiac radiation doses during adjuvant left-sided breast cancer radiotherapy. *Radiat Oncol.* 2015;10:141. Epub 2015/07/15.
37. Dahlof B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *The American journal of cardiology.* 2010;105(1 Suppl):3A-9A. Epub 2010/02/05.
38. Gujral DM, Lloyd G, Bhattacharyya S. Radiation-induced valvular heart disease. *Heart.* 2016;102(4):269-76. Epub 2015/12/15.
39. Cagle SD, Jr., Cooperstein N. Coronary Artery Disease: Diagnosis and Management. Primary care. 2018;45(1):45-61. Epub 2018/02/07.
40. Pahwa R JI. Atherosclerosis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
41. Carvajal C. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Med. leg. Costa Rica* 2017.
42. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2003;23(2):168-75. Epub 2003/02/18.
43. Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coronary artery disease.* 2014;25(8):713-24. Epub 2014/11/05.
44. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *Journal of Korean medical science.* 2015;30(9):1213-25. Epub 2015/09/05.
45. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism: clinical and experimental.* 2000;49(2 Suppl 1):3-8. Epub 2000/02/29.
46. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology.* 2017;956:511-40. Epub 2016/12/31.
47. Zhou J, Li YS, Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2014;34(10):2191-8. Epub 2014/05/31.
48. Videm V, Albrigtsen M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. *Scandinavian journal of immunology.* 2008;67(5):523-31. Epub 2008/03/28.



49. Oguz MM, Oguz AD, Sanli C, Cevik A. Serum levels of soluble ICAM-1 in children with pulmonary artery hypertension. *Texas Heart Institute journal*. 2014;41(2):159-64. Epub 2014/05/09.
50. Czucz J, Cervenak L, Forhecz Z, Gombos T, Pozsonyi Z, Kunde J, et al. Serum soluble E-selectin and NT-proBNP levels additively predict mortality in diabetic patients with chronic heart failure. *Clinical research in cardiology*. 2011;100(7):587-94. Epub 2011/02/12.
51. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;424:245-52. Epub 2013/06/21.
52. Fels J, Jeggle P, Liashkovich I, Peters W, Oberleithner H. Nanomechanics of vascular endothelium. *Cell and tissue research*. 2014;355(3):727-37. Epub 2014/03/20.
53. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC cardiovascular disorders*. 2015;15:130. Epub 2015/10/21.
54. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(4):477-87. Epub 2008/04/11.
55. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(11):2563-82. Epub 2014/06/04.
56. Hoyer KK, Doods H, Barron L, Abbas AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunological reviews*. 2008;226:19-28. Epub 2009/01/24.
57. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia*. 2010;2(3):161-75. Epub 2010/01/01.
58. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic research in cardiology*. 2008;103(5):398-406. Epub 2008/07/05.
59. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):620-36. Epub 2016/02/20.
60. Luigi-Fabrizio Rodella RR. Endothelial and Vascular Smooth Cell Dysfunctions: A Comprehensive Appraisal. In: Parthasarathy S, editor. *Atherogenesis*: IntechOpen; 2012.

61. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Experimental and clinical cardiology*. 2002;7(1):40-53. Epub 2002/04/01.
62. Lyubimova N, Hopewell JW. Experimental evidence to support the hypothesis that damage to vascular endothelium plays the primary role in the development of late radiation-induced CNS injury. *The British journal of radiology*. 2004;77(918):488-92. Epub 2004/05/21.
63. Borghini A, Gianicolo EA, Picano E, Andreassi MG. Ionizing radiation and atherosclerosis: current knowledge and future challenges. *Atherosclerosis*. 2013;230(1):40-7. Epub 2013/08/21.
64. Boerma M, Hauer-Jensen M. Preclinical research into basic mechanisms of radiation-induced heart disease. *Cardiology research and practice*. 2010;2011. Epub 2010/10/19.
65. Mukherjee D, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms. *The Journal of pathology*. 2014;232(3):289-99. Epub 2013/11/21.
66. Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(22):3047-55. Epub 2007/06/26.
67. Chaudhry MA. Radiation-induced microRNA: discovery, functional analysis, and cancer radiotherapy. *Journal of cellular biochemistry*. 2014;115(3):436-49. Epub 2013/10/17.
68. Johnke RM, Sattler JA, Allison RR. Radioprotective agents for radiation therapy: future trends. *Future Oncol*. 2014;10(15):2345-57. Epub 2014/12/20.
69. Yentrapalli R, Merl-Pham J, Azimzadeh O, Mutschelknaus L, Peters C, Hauck SM, et al. Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. 2017;93(6):569-80. Epub 2017/03/08.
70. Kassan M, Vikram A, Li Q, Kim YR, Kumar S, Gabani M, et al. MicroRNA-204 promotes vascular endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction by targeting Sirtuin1. *Scientific reports*. 2017;7(1):9308. Epub 2017/08/26.
71. Aryal B, Suarez Y. Non-coding RNA regulation of endothelial and macrophage functions during atherosclerosis. *Vascular pharmacology*. 2018. Epub 2018/03/20.

72. Nemezc M, Alexandru N, Tanko G, Georgescu A. Role of MicroRNA in Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Current hypertension reports*. 2016;18(12):87. Epub 2016/11/12.
73. Yokoyama Y, Mise N, Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Izuoka K, Zhang L, et al. MicroRNAs as Potential Mediators for Cigarette Smoking Induced Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4). Epub 2018/04/13.
74. Novak J, Olejnickova V, Tkacova N, Santulli G. Mechanistic Role of MicroRNAs in Coupling Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;887:79-100. Epub 2015/12/15.
75. Yilmaz SG, Isbir S, Kunt AT, Isbir T. Circulating microRNAs as Novel Biomarkers for Atherosclerosis. *In Vivo*. 2018;32(3):561-5. Epub 2018/04/27.
76. Rivas A, Monteagudo C, Heras-Gonzalez L, Mariscal-Arcas M, Lorenzo-Tovar ML, Olea-Serrano F. Association of bisphenol A exposure with dietary quality indices in Spanish schoolchildren. *Food and chemical toxicology*. 2016;94:25-30. Epub 2016/05/22.
77. Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, Perez EA. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(6):313-9. Epub 2011/03/08.
78. Dlouha D, Hubacek JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiological research*. 2017;66(Supplementum 1):S21-S38. Epub 2017/04/06.
79. de Lucia C, Komici K, Borghetti G, Femminella GD, Bencivenga L, Cannavo A, et al. microRNA in Cardiovascular Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases. *Frontiers in medicine*. 2017;4:74. Epub 2017/07/01.
80. Costantino S, Camici GG, Mohammed SA, Volpe M, Luscher TF, Paneni F. Epigenetics and cardiovascular regenerative medicine in the elderly. *International journal of cardiology*. 2018;250:207-14. Epub 2017/10/11.
81. Gacon J, Badacz R, Stepien E, Karch I, Enguita FJ, Zmudka K, et al. Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study. *Kardiologia polska*. 2018;76(2):362-9. Epub 2018/01/20.

82. Gangwar RS, Rajagopalan S, Natarajan R, Deilulis JA. Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Pathological Relevance and Emerging Role as Biomarkers and Therapeutics. *American journal of hypertension*. 2018;31(2):150-65. Epub 2017/12/01.
83. De Rosa S, Eposito F, Carella C, Strangio A, Ammirati G, Sabatino J, et al. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs in heart failure. *European journal of heart failure*. 2018. Epub 2018/01/10.
84. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*. 2008;10(12):1470-6. Epub 2008/11/18.
85. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5003-8. Epub 2011/03/09.
86. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation research*. 2012;110(3):483-95. Epub 2012/02/04.
87. Baumann V, Winkler J. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future medicinal chemistry*. 2014;6(17):1967-84. Epub 2014/12/17.
88. Pereira T, Brito JAR, Guimaraes ALS, Gomes CC, de Lacerda JCT, de Castro WH, et al. MicroRNA profiling reveals dysregulated microRNAs and their target gene regulatory networks in cemento-ossifying fibroma. *Journal of oral pathology & medicine*. 2018;47(1):78-85. Epub 2017/10/17.
89. Economou EK, Oikonomou E, Siasos G, Papageorgiou N, Tsalamandris S, Mourouzis K, et al. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):624-33. Epub 2015/06/29.
90. Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):703-20. Epub 2016/02/20.

Roser Esplugas Borràs

91. Huang RS, Hu GQ, Lin B, Lin ZY, Sun CC. MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages. *Journal of investigative medicine*. 2010;58(8):961-7. Epub 2010/10/30.
92. Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB journal*. 2011;25(8):2515-27. Epub 2011/04/22.
93. Liu X, Cheng Y, Yang J, Xu L, Zhang C. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52(1):245-55. Epub 2011/12/06.
94. Cheng HS, Besla R, Li A, Chen Z, Shikatani EA, Nazari-Jahantigh M, et al. Paradoxical Suppression of Atherosclerosis in the Absence of microRNA-146a. *Circulation research*. 2017;121(4):354-67. Epub 2017/06/24.
95. Li Z, Wang S, Zhao W, Sun Z, Yan H, Zhu J. Oxidized low-density lipoprotein upregulates microRNA-146a via JNK and NF-kappaB signaling. *Molecular medicine reports*. 2016;13(2):1709-16. Epub 2016/01/01.
96. Hamann L, Glaeser C, Schulz S, Gross M, Franke A, Nothlings U, et al. A micro RNA-146a polymorphism is associated with coronary restenosis. *International journal of immunogenetics*. 2014;41(5):393-6. Epub 2014/07/24.
97. Fish JE, Cybulsky MI. ApoE attenuates atherosclerosis via miR-146a. *Circulation research*. 2015;117(1):3-6. Epub 2015/06/20.
98. Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Nguyen NQ, Scherr M, et al. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(5):2143-54. Epub 2013/04/27.
99. Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kavvalakis MP, Barmpas M, Kokkinakis EN, Xenos K, et al. Biomonitoring of bisphenol A in hair of Greek population. *Chemosphere*. 2015;118:336-41. Epub 2014/12/03.
100. Raitoharju E, Oksala N, Lehtimäki T. MicroRNAs in the atherosclerotic plaque. *Clinical chemistry*. 2013;59(12):1708-21. Epub 2013/06/05.

101. Yang Z, Xie L, Han L, Qu X, Yang Y, Zhang Y, et al. Circular RNAs: Regulators of Cancer-Related Signaling Pathways and Potential Diagnostic Biomarkers for Human Cancers. *Theranostics*. 2017;7(12):3106-17. Epub 2017/08/26.
102. Yang PY, Almofti MR, Lu L, Kang H, Zhang J, Li TJ, et al. Reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in foam cells by a water-soluble fraction of *Polygonum multiflorum*. *Journal of pharmacological sciences*. 2005;99(3):294-300. Epub 2005/11/09.
103. Virtue A, Johnson C, Lopez-Pastrana J, Shao Y, Fu H, Li X, et al. MicroRNA-155 Deficiency Leads to Decreased Atherosclerosis, Increased White Adipose Tissue Obesity, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A NOVEL MOUSE MODEL OF OBESITY PARADOX. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(4):1267-87. Epub 2016/11/20.
104. Zheng B, Yin WN, Suzuki T, Zhang XH, Zhang Y, Song LL, et al. Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2017;25(6):1279-94. Epub 2017/04/15.
105. Kumar S, Kim CW, Simmons RD, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(10):2206-16. Epub 2014/07/12.
106. Lv J, Yang L, Guo R, Shi Y, Zhang Z, Ye J. Ox-LDL-Induced MicroRNA-155 Promotes Autophagy in Human Endothelial Cells via Repressing the Rheb/ mTOR Pathway. *Cellular physiology and biochemistry*. 2017;43(4):1436-48. Epub 2017/10/11.
107. Ma X, Ma C, Zheng X. MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: a conflicting role? *Heart, lung & circulation*. 2013;22(10):811-8. Epub 2013/07/06.
108. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martinez JA, Marti A. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB journal*. 2015;29(9):3595-611. Epub 2015/06/13.
109. Li L, Wang Z, Hu X, Wan T, Wu H, Jiang W, et al. Human aortic smooth muscle cell-derived exosomal miR-221/222 inhibits autophagy via a PTEN/Akt signaling pathway in human umbilical

- vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;479(2):343-50. Epub 2016/09/21.
110. Qin B, Cao Y, Yang H, Xiao B, Lu Z. MicroRNA-221/222 regulate ox-LDL-induced endothelial apoptosis via Ets-1/p21 inhibition. *Molecular and cellular biochemistry*. 2015;405(1-2):115-24. Epub 2015/04/22.
111. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Human miR-221/222 in Physiological and Atherosclerotic Vascular Remodeling. *BioMed research international*. 2015;2015:354517. Epub 2015/07/30.
112. Pereira-da-Silva T, Coutinho Cruz M, Carrusca C, Cruz Ferreira R, Napoleao P, Mota Carmo M. Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review. *American journal of cardiovascular disease*. 2018;8(1):1-13. Epub 2018/03/14.
113. Xue Y, Wei Z, Ding H, Wang Q, Zhou Z, Zheng S, et al. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1alpha in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):671-81. Epub 2015/06/29.
114. Wang R, Dong LD, Meng XB, Shi Q, Sun WY. Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;464(2):574-9. Epub 2015/07/15.
115. Guo M, Mao X, Ji Q, Lang M, Li S, Peng Y, et al. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome. *Immunology and cell biology*. 2010;88(5):555-64. Epub 2010/03/03.
116. Yao R, Ma Y, Du Y, Liao M, Li H, Liang W, et al. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome. *Cellular & molecular immunology*. 2011;8(6):486-95. Epub 2011/08/02.
117. Ramkaran P, Khan S, Phulukdaree A, Moodley D, Chuturgoon AA. miR-146a polymorphism influences levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in young patients with coronary artery disease. *Cell biochemistry and biophysics*. 2014;68(2):259-66. Epub 2013/06/25.

118. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research*. 2010;107(5):677-84. Epub 2010/07/03.
119. Jia QW, Chen ZH, Ding XQ, Liu JY, Ge PC, An FH, et al. Predictive Effects of Circulating miR-221, miR-130a and miR-155 for Coronary Heart Disease: A Multi-Ethnic Study in China. *Cellular physiology and biochemistry*. 2017;42(2):808-23. Epub 2017/06/20.
120. Baldeon RL, Weigelt K, de Wit H, Ozcan B, van Oudenaren A, Sempertegui F, et al. Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PloS one*. 2014;9(12):e115209. Epub 2014/12/17.
121. Bildirici AE, Arslan S, Ozbilum Sahin N, Berkan O, Beton O, Yilmaz MB. MicroRNA-221/222 Expression in Atherosclerotic Coronary Artery Plaque and Peripheral Blood. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2018:1-19. Epub 2018/05/09.
122. AECC. Asociación Española Contra el Cáncer. 2014.
123. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular pharmacology*. 2018;100:1-19. Epub 2017/06/06.
124. Alunni-Fabbroni M, Majunke L, Trapp EK, Tzschaschel M, Mahner S, Fasching PA, et al. Whole blood microRNAs as potential biomarkers in post-operative early breast cancer patients. *BMC cancer*. 2018;18(1):141. Epub 2018/02/08.
125. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Suarez Y. MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction. *Pharmacological research*. 2013;75:15-27. Epub 2013/04/23.
126. Templin T, Paul S, Amundson SA, Young EF, Barker CA, Wolden SL, et al. Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;80(2):549-57. Epub 2011/03/23.
127. Celic T, Metzinger-Le Meuth V, Six I, Massy ZA, Metzinger L. The mir-221/222 Cluster is a Key Player in Vascular Biology via the Fine-Tuning of Endothelial Cell Physiology. *Current vascular pharmacology*. 2017;15(1):40-6. Epub 2016/09/17.



Roser Esplugas Borràs

128. Koroleva IA, Nazarenko MS, Kucher AN. Role of microRNA in Development of Instability of Atherosclerotic Plaques. *Biochemistry Biokhimiia*. 2017;82(11):1380-90. Epub 2017/12/11.
129. Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D, Brizzi MF. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(8):1562-8. Epub 2010/05/22.
130. Rosano GM, Vitale C, Marazzi G, Volterrani M. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric*. 2007;10 Suppl 1:19-24. Epub 2007/03/17.
131. Vijg J, Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008;454(7208):1065-71. Epub 2008/08/30.
132. Wang Y, Scheiber MN, Neumann C, Calin GA, Zhou D. MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;81(3):839-48. Epub 2010/11/26.
133. Turer CB, Brady TM, de Ferranti SD. Obesity, Hypertension, and Dyslipidemia in Childhood Are Key Modifiable Antecedents of Adult Cardiovascular Disease: A Call to Action. *Circulation*. 2018;137(12):1256-9. Epub 2018/03/21.
134. Decandia F. Risk factors for cardiovascular disease in subclinical hypothyroidism. *Irish journal of medical science*. 2018;187(1):39-43. Epub 2017/05/12.
135. Simionescu N, Niculescu LS, Sanda GM, Margina D, Sima AV. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Molecular biology reports*. 2014;41(9):5765-73. Epub 2014/06/15.
136. Quan X, Ji Y, Zhang C, Guo X, Zhang Y, Jia S, et al. Circulating MiR-146a May be a Potential Biomarker of Coronary Heart Disease in Patients with Subclinical Hypothyroidism. *Cellular physiology and biochemistry*. 2018;45(1):226-36. Epub 2018/01/23.
137. Khosrow-Khavar F, Filion KB, Al-Qurashi S, Torabi N, Bouganim N, Suissa S, et al. Cardiotoxicity of aromatase inhibitors and tamoxifen in postmenopausal women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of oncology*. 2017;28(3):487-96. Epub 2016/12/22.

138. Zagar TM, Cardinale DM, Marks LB. Breast cancer therapy-associated cardiovascular disease. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016;13(3):172-84. Epub 2015/11/26.
139. Long HD LY, Zhang JJ, Zhong WZ, Zheng RN. Risk of Congestive Heart Failure in Early Breast Cancer Patients Undergoing Adjuvant Treatment With Trastuzumab: A Meta-Analysis. *The oncologist*. 2016;21(5):8.
140. Koelwyn GJ LN, Ellard SL, Jones LW, Gelinac JC, Rolf JD, Melzer B, Thomas SM, Douglas PS, Khouri MG, Eves ND. Ventricular-Arterial Coupling in Breast Cancer Patients After Treatment With Anthracycline-Containing Adjuvant Chemotherapy. *The oncologist*. 2016;21(2):9.
141. Rigaud VO, Ferreira LR, Ayub-Ferreira SM, Avila MS, Brandao SM, Cruz FD, et al. Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(4):6994-7002. Epub 2017/01/05.
142. Gezer U, Keskin S, Igci A, Tukenmez M, Tiryakioglu D, Cetinkaya M, et al. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy. *Oncology letters*. 2014;8(2):845-8. Epub 2014/07/11.
143. Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PloS one*. 2012;7(10):e47003. Epub 2012/10/17.
144. Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Endo Y, Iwasa M, et al. Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor alpha in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2011;130(1):331-9. Epub 2011/07/15.
145. Petrovic N, Davidovic R, Jovanovic-Cupic S, Krajnovic M, Lukic S, Petrovic M, et al. Changes in miR-221/222 Levels in Invasive and In Situ Carcinomas of the Breast: Differences in Association with Estrogen Receptor and TIMP3 Expression Levels. *Molecular diagnosis & therapy*. 2016;20(6):603-15. Epub 2016/08/05.
146. Zhao M, Zhang Y, Liu W, Xu C, Wang L, Gan J. Estrogenic activity of lambda-cyhalothrin in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environmental toxicology and chemistry*. 2008;27(5):1194-200. Epub 2008/04/19.
147. Stuckrath I, Rack B, Janni W, Jager B, Pantel K, Schwarzenbach H. Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis

- and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget*. 2015;6(15):13387-401. Epub 2015/06/03.
148. Nassar FJ, El Sabban M, Zgheib NK, Tfayli A, Boulos F, Jabbour M, et al. miRNA as potential biomarkers of breast cancer in the Lebanese population and in young women: a pilot study. *PLoS one*. 2014;9(9):e107566. Epub 2014/09/19.
149. Koulis TA, Phan T, Olivotto IA. Hypofractionated whole breast radiotherapy: current perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015;7:363-70. Epub 2015/11/26.
150. Prabhakarbandian B, Goetz DJ, Swerlick RA, Chen X, Kiani MF. Expression and functional significance of adhesion molecules on cultured endothelial cells in response to ionizing radiation. *Microcirculation*. 2001;8(5):355-64. Epub 2001/11/01.
151. Gaugler MH, Squiban C, van der Meeren A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *International journal of radiation biology*. 1997;72(2):201-9. Epub 1997/08/01.
152. Van Der Meeren A, Squiban C, Gourmelon P, Lafont H, Gaugler MH. Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells. *Cytokine*. 1999;11(11):831-8. Epub 1999/11/05.
153. Yang FB. [Protective effects of curcumin on vascular endothelial injuries induced by radiation]. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*. 2011;29(11):846-8. Epub 2012/04/04.
154. Rubin DB, Drab EA, Ward WF, Smith LJ, Fowell SM. Enzymatic responses to radiation in cultured vascular endothelial and smooth muscle cells. *Radiation research*. 1984;99(2):420-32. Epub 1984/08/01.
155. Rubin DB, Drab EA, Ts'ao CH, Gardner D, Ward WF. Prostacyclin synthesis in irradiated endothelial cells cultured from bovine aorta. *J Appl Physiol (1985)*. 1985;58(2):592-7. Epub 1985/02/01.

156. Rubin DB, Drab EA, Ward WF, Bauer KD. Cell cycle changes and cytotoxicity in irradiated cultures of bovine aortic endothelial cells. *Radiation research*. 1986;108(2):206-14. Epub 1986/11/01.
157. Lam TT, Rubin D, Drab EA. The effect of dexamethasone on the cytotoxic and enzymatic response of cultured endothelial cells to radiation. *Radiation research*. 1985;103(2):240-50. Epub 1985/08/01.
158. Lindgard A, Hulten LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers in medical science*. 2007;22(1):30-6. Epub 2006/11/23.
159. Hietanen T, Kapanen M, Kellokumpu-Lehtinen PL. Natural Killer Cell Viability After Hyperthermia Alone or Combined with Radiotherapy with or without Cytokines. *Anticancer research*. 2018;38(2):655-63. Epub 2018/01/29.
160. Hietanen T, Pitkanen M, Kapanen M, Kellokumpu-Lehtinen PL. Effects of Single and Fractionated Irradiation on Natural Killer Cell Populations: Radiobiological Characteristics of Viability and Cytotoxicity In Vitro. *Anticancer research*. 2015;35(10):5193-200. Epub 2015/09/27.
161. Vincenti S, Brillante N, Lanza V, Bozzoni I, Presutti C, Chiani F, et al. HUVEC respond to radiation by inducing the expression of pro-angiogenic microRNAs. *Radiation research*. 2011;175(5):535-46. Epub 2011/03/03.
162. Kraemer A, Barjaktarovic Z, Sarioglu H, Winkler K, Eckardt-Schupp F, Tapio S, et al. Cell survival following radiation exposure requires miR-525-3p mediated suppression of ARRB1 and TXN1. *PloS one*. 2013;8(10):e77484. Epub 2013/10/23.
163. Palayoor ST, John-Aryankalayil M, Makinde AY, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN. Differential expression of stress and immune response pathway transcripts and miRNAs in normal human endothelial cells subjected to fractionated or single-dose radiation. *Molecular cancer research : MCR*. 2014;12(7):1002-15. Epub 2014/05/03.
164. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2009;84(3):353-60. Epub 2009/07/21.
165. Meeren AV, Bertho JM, Vandamme M, Gaugler MH. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators of inflammation*. 1997;6(3):185-93. Epub 1997/01/01.

166. Andresen TK, Svennevig JL, Videm V. Soluble VCAM-1 is a very early marker of endothelial cell activation in cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2002;17(1):15-21. Epub 2002/01/31.
167. Harrington EO, Stefanec T, Newton J, Rounds S. Release of soluble E-selectin from activated endothelial cells upon apoptosis. *Lung*. 2006;184(5):259-66. Epub 2007/01/20.
168. Soltani B, Bodaghabadi N, Mahpour G, Ghaemi N, Sadeghizadeh M. Nanof ormulation of curcumin protects HUVEC endothelial cells against ionizing radiation and suppresses their adhesion to monocytes: potential in prevention of radiation-induced atherosclerosis. *Biotechnology letters*. 2016;38(12):2081-8. Epub 2016/10/25.
169. Nubel T, Dippold W, Kaina B, Fritz G. Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis*. 2004;25(8):1335-44. Epub 2004/02/28.
170. Cervelli T, Panetta D, Navarra T, Andreassi MG, Basta G, Galli A, et al. Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):510-8. Epub 2014/06/24.
171. Walther M, Kaffenberger W, Van Beuningen D. Influence of clinically used antioxidants on radiation-induced expression of intercellular cell adhesion molecule-1 on HUVEC. *International journal of radiation biology*. 1999;75(10):1317-25. Epub 1999/11/30.
172. Son EW, Cho CK, Rhee DK, Pyo S. Inhibition of gamma-irradiation induced adhesion molecules and NO production by alginate in human endothelial cells. *Archives of pharmacal research*. 2001;24(5):466-71. Epub 2001/11/06.
173. Ebrahimian T, Le Gallic C, Stefani J, Dublineau I, Yentrapalli R, Harms-Ringdahl M, et al. Chronic Gamma-Irradiation Induces a Dose-Rate-Dependent Pro-inflammatory Response and Associated Loss of Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Radiation research*. 2015;183(4):447-54. Epub 2015/03/26.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO  
DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC  
CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ  
ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNs-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA EN PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA. AVALUACIÓ IN VIVO I IN VITRO DE L'EXPRESSIÓ DELS MIARNS-146A, -155, -221 I -222, I DE LA SEVA ASSOCIACIÓ AMB FACTORS DE RISC CARDIOVASCULARS, RESPOSTA INFLAMATÒRIA I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

Roser Esplugas Borràs