

Universidad CEU San Pablo
Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Médicas Básicas



Determinación de Nm23, un gen supresor de metástasis y su relación con parámetros del microambiente tumoral en cáncer de mama

Dirigido por:

Dra. Riánsares Arriazu Navarro y Dr. Miguel Ángel Reina Perticone

Memoria presentada por Esther M^a Durán Mateos para aspirar al grado de Doctor

Madrid, 2015



CEU

*Universidad
San Pablo*

Facultad de Medicina

Dña. **Riánsares Arriazu Navarro**, Profesora Agregada del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad San Pablo CEU, y D. **Miguel Ángel Reina Perticone**, Profesor Adjunto del Departamento de Ciencias Médicas Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad San Pablo CEU.

CERTIFICAN

Que Doña **Esther M^a Durán Mateos** ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral titulada “ **Determinación de Nm23, un gen supresor de metástasis y su relación con parámetros del microambiente tumoral en cáncer de mama**”, y que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Biología.

Fdo. Prof. Riánsares Arriazu Navarro

Fdo. Miguel Ángel Reina Perticone

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no es fruto de un simple trabajo individual, sino que es el resultado de una suma de apoyos y esfuerzos a lo largo de muchos años. A todas las personas que, aunque no sean conscientes de ello, han hecho posible finalizarlo mil gracias de corazón:

A la Universidad San Pablo C.E.U., por acogerme con los brazos abiertos. Gracias por permitirme comenzar y concluir esta etapa de mi labor investigadora. Al Vicerrectorado de Investigación por hacer que mi vida diera un giro de 180° y mostrarme que el esfuerzo anteriormente realizado tenía recompensa concediéndome la beca FPI.

A mi directora de Tesis, Riánsares Arriazu por elegirme y confiar en mí; enseñarme, apoyarme, guiarme y hacerme sentir que no estoy sola en esto. Gracias.

Al Dr. Miguel Ángel Reina Perticone por su bondad.

Al Dr. José Manuel Pozuelo y el Dr. Nuno Henriques por seguir confiando en mí. Gracias por permitirme seguir estando en esta “casa”.

Al Dr. Fernando Vidal Vanaclocha por aportarme sus conocimientos sobre este tema.

A mis compañeros de Ciencias Médicas Básicas: Bea Bravo, Bea Oltra, Vero, Charo, María, Marina, Arancha, Anne, Eva... Gracias por lo aprendo de vosotras cada día.

A mis “amigas del CEU”: Amalia, Caridad, Bea, Ana... Gracias por estar ahí.

A mi familia. A mi tía. A Macarena. Aunque estemos lejos os siento cerca...

A Paqui y a Benito por apoyarnos en esta difícil decisión.

A mis padres por parecer que nos separan dos calles cuando estamos a 500 km, por ayudarme a no rendirme nunca y animarme a luchar siempre. Gracias por vuestro apoyo. Todo os lo debo a vosotros.

Gracias papá por tus sacrificios.

Gracias mamá por enseñármelo todo

A mi hermano... en apenas segundos cuando te vi la cara te comencé a querer...

A mi compañero, mi amigo, mi apoyo, mi pareja. Por estar ahí siempre, casi sin preguntar y querer acompañarme en esta aventura porque sí. Nunca podré agradecerte lo que haces por mí.

A todos, gracias.

REFERENCIAS DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<i>ADN:</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ARNm:</i>	<i>Ácido ribonucleico mensajero</i>
<i>cDNA:</i>	<i>DNA complementario</i>
<i>CAV-1:</i>	<i>Caveolina 1</i>
<i>COX-2</i>	<i>Ciclooxigenasa 2</i>
<i>et al:</i>	<i>y colaboradores</i>
<i>Ig A:</i>	<i>Inmunoglobulina A</i>
<i>IL:</i>	<i>Interleucina</i>
<i>kDa:</i>	<i>kilo Dalton</i>
<i>NDPK:</i>	<i>Nucleósido difosfato quinasa</i>
<i>pb:</i>	<i>pares de bases</i>
<i>PTEN:</i>	<i>Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa</i>
<i>TxNx:</i>	<i>Tamaño x-Afectación Ganglionar x</i>
<i>uPA:</i>	<i>Activador del plasminógeno tipo uroquinasa</i>
<i>VEGF:</i>	<i>Factor de crecimiento endotelial vascular</i>

ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	8
<i>GENERALIDADES</i>	9
<i>MORFOLOGÍA DE LA MAMA NORMAL DE LA MUJER NO LACTANTE</i>	10
<i>ANATOMÍA MACROSCÓPICA</i>	10
<i>ANATOMÍA MICROSCÓPICA</i>	13
<i>FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA</i>	16
<i>BREVE RECUERDO CLÍNICO</i>	20
<i>PROCESO DE METÁSTASIS</i>	22
<i>Nm23</i>	24
<i>MICROAMBIENTE TUMORAL</i>	26
<i>ANGIOGÉNESIS</i>	27
<i>ESTROMAGÉNESIS</i>	27
<i>SISTEMA INMUNE</i>	28
<i>MARCADOR PROMETASTÁSICO</i>	29
<i>TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA</i>	30
<i>MOLÉCULA DE ADHESIÓN FOCAL</i>	32

<i>HIPÓTESIS Y OBEJTIVOS</i>	34
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	36
<i>MUESTRAS CLÍNICAS</i>	37
<i>ESTUDIO CUALITATIVO</i>	39
<i>ESTUDIO CUANTITATIVO</i>	41
<i>ESTADÍSTICA</i>	45
<i>RESULTADOS</i>	46
<i>RESULTADOS CUALITATIVOS</i>	47
<i>HISTOLOGÍA DE LOS CARCINOMAS</i>	47
<i>MARCADORES TRADICIONALES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA</i>	47
<i>GEN SUPRESOR DE METÁSTASIS</i>	50
<i>MICROAMBIENTE TUMORAL</i>	51
<i>RESULTADOS CUANTITATIVOS</i>	57
<i>CORRELACIONES</i>	57
<i>INMUNOEXPRESIÓN DE Nm23</i>	61
<i>RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE Nm23 CON PARÁMETROS DEL DIAGNÓSTICO CLÁSICO</i>	63
<i>RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE Nm23 CON PARÁMETROS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL</i>	64

<i>DISCUSIÓN</i>	70
<i>ELECCIÓN DEL TIPO DE CARCINOMA</i>	71
<i>MARCADORES TRADICIONALES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA</i>	71
<i>MARCADORES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL</i>	74
<i>GEN SUPRESOR DE METÁSTASIS</i>	78
<i>RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE Nm23 CON PARÁMETROS DEL DIAGNÓSTICO CLÁSICO</i>	80
<i>RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE Nm23 CON PARÁMETROS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL</i>	81
<i>CONCLUSIONES</i>	88
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	90

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que comprende varias entidades asociadas con distintas características histológicas y biológicas, diferentes manifestaciones clínicas, comportamiento y respuestas terapéuticas. [1]

La etiología es muy compleja, siendo difícil relacionarla con un único factor, sin embargo, se pueden destacar algunos como la edad, la historia familiar, la predisposición genética y factores hormonales y clínicos. [2] La tasa del cáncer de mama tiende a crecer en el mundo occidental. [3] Según el Instituto Nacional de estadística en el año 2012, las tres principales causas de muerte por grandes grupos de enfermedades fueron las del sistema circulatorio (responsables del 30,3% del total de defunciones), los tumores (27,5%) y las enfermedades del sistema respiratorio (11,7%). Entre los tumores, los responsables de una mayor mortalidad fueron el cáncer de bronquios y pulmón y el cáncer de colon con un aumento porcentual de un 2,0 y un 0,7 respectivamente. El primero fue el cáncer que más muertes causó entre los hombres. Entre las mujeres, el cáncer que más defunciones causó fue el de mama (aunque el total de muertes disminuyó un 0,4% respecto a 2011).

El cáncer de mama puede diseminarse a casi cualquier órgano que se encuentre dentro del cuerpo. La metástasis regional se disemina hacia zonas que rodean las mamas; mientras que la metástasis distante lo hace a órganos que se encuentren alejados. Los lugares más comunes para que se desarrolle metástasis son:

Los Huesos: La metástasis de huesos representa el 25% de todos los tipos de cáncer de mama metastásicos. Existen dos tipos principales de cáncer de huesos: osteolítico y osteoblástico. El cáncer osteolítico va carcomiendo la estructura ósea y formando huecos en los huesos, disminuyendo la densidad ósea. Este tipo de cáncer deja los huesos propensos a sufrir roturas y fracturas. Mientras que el cáncer osteoblástico incrementa la densidad de los huesos, haciéndolos, también, propensos a las fracturas.

Los Pulmones: Este tipo de metástasis representa entre el 60% y el 70% de todas las muertes asociadas con el cáncer de mama metastásico.

El Hígado: Se desarrolla metástasis hepática en las dos terceras partes del cáncer de mama metastásico.

La metástasis es una de las manifestaciones más letales del cáncer, por ello, se ha hecho imprescindible el estudio de genes supresores de metástasis para retardarla o prevenirla. [4]

Conviene revisar, la estructura y función de la glándula mamaria en humanos, antes de estudiar las lesiones mamarias cancerígenas, sus subtipos y la implicación de los genes supresores de metástasis.

MORFOLOGÍA DE LA MAMA NORMAL DE LA MUJER NO LACTANTE

ANATOMÍA MACROSCÓPICA

Descripción de la glándula mamaria

Las mamas están situadas en la región anterior del tórax, a ambos lados del esternón hasta la axila y desde la segunda hasta la sexta costilla, adosadas al músculo pectoral mayor. En sentido horizontal, se extienden desde el borde del hueso esternón hasta una línea media, imaginaria, de la axila. A nivel del extremo anterior más distal del tórax, a la altura del tercer espacio intercostal, la piel se especializa para formar la areola y el pezón.

Cada mama limita en su cara posterior con la aponeurosis o fascia del músculo pectoral y contiene abundante tejido graso allí donde no hay tejido glandular. La grasa y el tejido conectivo, junto con los *ligamentos de Cooper* (que unen la glándula a la piel) constituyen un verdadero ligamento que dan forma y la sostienen, permitiendo el deslizamiento normal del seno sobre los planos musculares subyacentes. El cuadrante superior lateral (el más alejado del esternón) se extiende diagonalmente en dirección a la axila y se le conoce como la *cola de Spence*. Una delgada capa de tejido mamario se extiende desde la clavícula por arriba, hasta la séptima u octava costilla por abajo y desde la línea media hasta el borde del músculo dorsal ancho. No es raro encontrar tejido mamario en pleno hueco de la axila o bajo la piel, en la cara anterior del abdomen (Figura 1). [5]

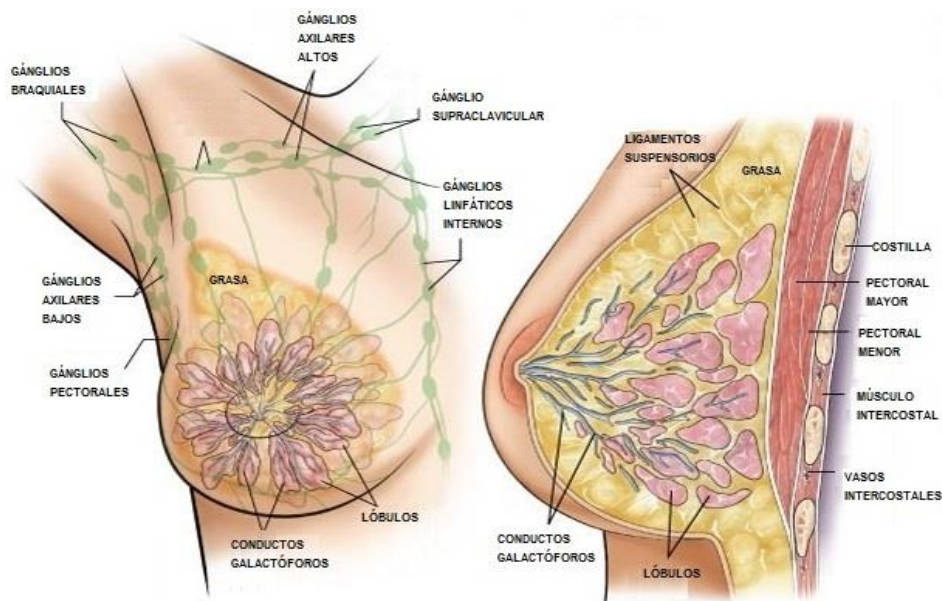


Figura 1. Anatomía macroscópica de la glándula mamaria humana (modificada de Glenn Allen [6]).

El pecho de adultos se compone de tres estructuras principales: la piel, el tejido adiposo subcutáneo y el tejido mamario (parénquima y el estroma). La piel contiene folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas ecrinas. La glándula mamaria está cubierta por una cápsula conjuntiva que se une a la piel mediante pequeñas láminas, entre las cuales se forman unas fosas adiposas. La zona de la areola carece, sin embargo, de tejido adiposo. Por la cara posterior existe también una capa de tejido adiposo que separa la glándula de la aponeurosis del músculo pectoral mayor y la fascia superficial del tórax.

Tienen forma hemiesférica y en su zona central está el pezón, un saliente cilíndrico de aproximadamente 1 cm de anchura y 1 cm de altura, perforado por 15 ó 20 orificios denominados poros galactóforos. El pezón presenta la superficie irregular debido a las abundantes glándulas sebáceas que contiene; además, se encuentra rodeado por la areola mamaria. Al igual que la mayor parte de las glándulas ramificadas (compuestas), la mama contiene un sistema de conductos, lóbulos y lobulillos. Cada lóbulo está formado por un conducto galactóforo que se ramifica y que se extiende por el tejido fibroadiposo mamario. Cada conducto se rodea de un tejido conjuntivo laxo y una red capilar. Un lobulillo comprende un conducto galactóforo y varios acinos alveolares (unidades secretoras túbulo-saculares). El conducto galactóforo desemboca en un seno lactóforo. [7]

Vascularización de la glándula mamaria

El aporte arterial de la mama se establece por: ramas perforantes de la arteria mamaria interna, ramas perforantes laterales de las arterias intercostales posteriores, ramas de la arteria axilar, incluyendo torácica superior, torácica lateral o mamaria externa y ramas pectorales de la acromiotorácica (Figura 2). Las venas de la mama, básicamente, siguen el mismo patrón que las arterias, describiendo un círculo venoso anastomótico alrededor de la base de los pezones conocido como el *círculo venoso de Haller*. Desde la periferia de la mama la sangre alcanza las venas mamaria interna, axilar y yugular interna. Tres grupos de venas parecen encargadas de conducir el drenaje de la pared torácica y de la mama: ramas perforantes de la mamaria interna, tributarias de la axilar y perforantes de las venas intercostales posteriores. El *plexo venoso vertebral de Batson* representa la comunicación entre los vasos intercostales posteriores y el plexo vertebral y esta comunicación es manifiesta cuando se incrementa la presión intra-abdominal, al no disponer estas venas de sistema valvular, por lo que puede considerarse como una segunda vía venosa de metástasis del carcinoma de mama. [8]

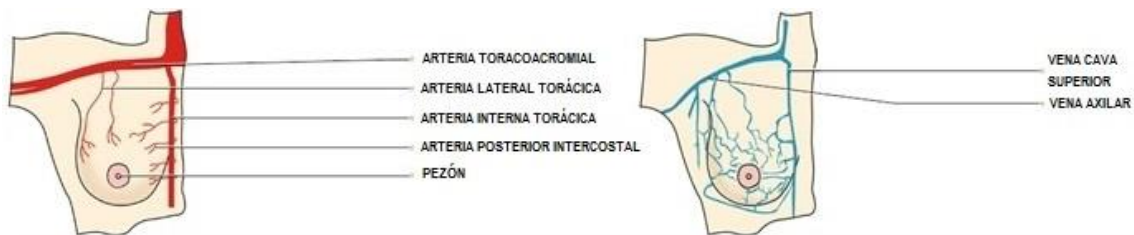


Figura 2. Vascularización de las glándulas mamarias humanas (modificada de Vocational Training Charitable Trust [9]).

Inervación mamaria

La inervación sensitiva de la mama mayoritariamente procede de las ramas perforantes cutáneas anterior y lateral del segundo al sexto nervios intercostales. La rama lateral del segundo intercostal tiene una significación especial al tratarse de un nervio largo, el intercosto-braquial, que discurre por el hueco axilar. Una pequeña zona superior de la piel mamaria está inervada por ramas cutáneas del plexo cervical superficial y ramas anterior o medial del nervio supraclavicular. Todos estos nervios contienen fibras simpáticas. [8]

Drenaje linfático en la glándula mamaria

Hay descritos clásicamente cuatro plexos linfáticos en el pecho: dos superficiales y dos más profundos. Los plexos superficiales se encuentran en la dermis (plexo cutáneo) y en la región subcutánea superficial (plexo subcutáneo). Uno de los plexos más profundos se encuentra en la fascia del músculo pectoral mayor (plexo fascial) y el otro está en la glándula mamaria (plexo glandular). Este último se comunica, a través de los vasos linfáticos que acompañan a los conductos lactíferos con una región del plexo subcutáneo situada inmediatamente debajo de las areolas, conocida como plexo braquial subareolar (*plexo de Sappey*). El plexo fascial comunica con el plexo subcutáneo a través de vasos linfáticos a lo largo de los fascículos fibrosos del estroma. Con menor frecuencia, los vasos linfáticos de la mama, también, pueden drenar el plexo linfático del hígado y debajo del plexo del diafragma, a través de los vasos de la pared abdominal (*paramamarios de Gerota*). [10]

ANATOMÍA MICROSCÓPICA

Histología general de la glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula exocrina de estructura túbulo-alveolar que se constituye por la unión de 14 a 24 sistemas independientes de conductos muy ramificados (lóbulos), rodeados por un estroma fibroso, relativamente denso y abundante tejido adiposo.

Unidad ducto-alveolar terminal

El sistema de conductos está revestido por células epiteliales, en forma columnar baja o cúbica, con un núcleo ovalado y un prominente nucléolo. En los conductos grandes, éstas forman, a menudo, dos capas celulares, mientras en los conductos pequeños hay sólo una capa de células. Por debajo encontramos una capa discontinua de células mioepiteliales, rodeando las células de revestimiento ductal. [7] Tras la capa de células mioepiteliales se encuentra una membrana basal formada por un conglomerado de fibras colágenas y elásticas en proporciones variables. La membrana basal separa el epitelio glandular y la capa de células mioepiteliales del estroma circundante.

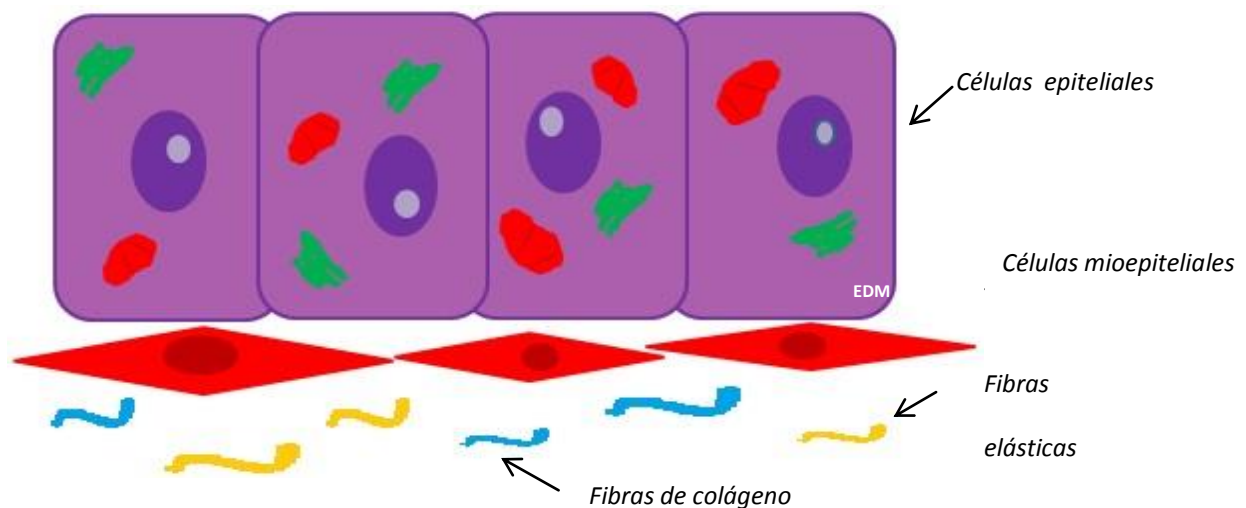


Figura 3. Esquema del epitelio del conducto terminal intralobulillar o del acino mamario.

Cada acino se continúa con un pequeño conducto, denominado terminal intralobulillar, de estructura histológica similar (figura 3), revestido por el mismo epitelio cúbico y células mioepiteliales separadas del estroma por una membrana basal. A partir de este conductillo las células mioepiteliales son menos ramificadas y comienzan a presentar una orientación cada vez más longitudinal.

Como se mencionó anteriormente, esta unidad ducto-alveolar está, además, formada por un conducto terminal extralobulillar revestido por un epitelio que

transiciona de cúbico simple a cilíndrico simple con células mioepiteliales longitudinales (Figura 4, Tabla 1).

Sistema excretor

El sistema excretor de la mama se encuentra constituido por múltiples conductos de tamaño creciente que confluyen en diferentes niveles hasta formar el conducto excretor principal. El conducto terminal intralobulillar es considerado el componente inicial del sistema excretor. Los conductos terminales de cada lobulillo desembocan en los conductos subsegmentarios, estos en los conductos segmentarios y finalmente en el conducto galactóforo. El revestimiento epitelial de los conductos que conforman el sistema excretor es cilíndrico simple, con células mioepiteliales cada vez más escasas. Los cortes histológicos donde se observa epitelio cilíndrico simple, es posible que los distintos niveles de los núcleos confieran una imagen de epitelio pseudoestratificado que en realidad no existe.

El revestimiento del conducto excretor principal (galactóforo) es un epitelio de dos capas, una superficial de células cilíndricas y otra basal de células cúbicas, y cerca del pezón, aproximadamente en los senos galactóforos se transforma en un epitelio plano estratificado sin queratina (Figura 4, Tabla 1).

La unidad ducto-alveolar terminal y el sistema excretor constituyen un lóbulo mamario.

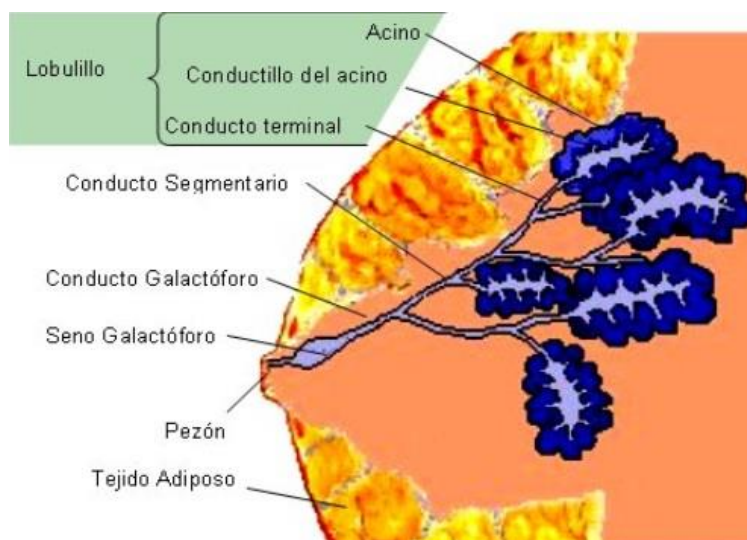


Figura 4. Estructura de la glándula mamaria de una mujer adulta (tomada de Mastología.net [11]).

Tabla 1. Estructura histológica del componente glandular de la mama normal.

Lóbulo	Unidad ducto-alveolar terminal	Lobulillo	Acino con su conductillo	Epitelio cúbico simple. Células mioepiteliales alrededor de todo el acino
			Conducto terminal intralobulillar	Epitelio cúbico simple. Células mioepiteliales con orientación longitudinal
		Conducto terminal extralobulillar	Transición de epitelio cúbico a cilíndrico simple. Células mioepiteliales con orientación longitudinal	
	Sistema excretor	Conducto sub-segmentario		Epitelio cilíndrico simple
		Conducto segmentario		Epitelio cilíndrico simple
		Conducto galactóforo		Transición de epitelio cilíndrico simple a cilíndrico de dos capas (capa superficial cilíndrica, capa basal cúbica) y desde el seno galactóforo plano estratificado sin queratina. Próximo al pezón puede transformarse en un epitelio escamoso.

Estroma

Todo el tejido glandular, desde el acino hasta la desembocadura en el pezón, se encuentra debidamente separado del estroma por la membrana basal. Esta estructura es un reforzamiento fibroso de los tejidos circundantes, que sirve de sostén al crecimiento y desarrollo del epitelio glandular.

Los espacios entre los acinos del lobulillo están ocupados por el estroma intralobulillar, constituido por tejido conectivo laxo con abundantes fibras de colágeno, un infiltrado linfocitario muy característico y una rica red sanguínea y linfática. Los espacios entre los lobulillos se encuentran ocupados por el estroma interlobulillar, que si bien no se delimita claramente del intralobulillar, está constituido por tejido conectivo denso, rico en fibras de colágeno y elásticas. Otra característica diferencial, es que el estroma intralobulillar presenta una gran capacidad de responder a estímulos hormonales, mientras que el interlobulillar carece de esta propiedad. El tejido estromal que une los lóbulos entre si se denomina interlobular, y es importante ya que de él se proyectan fibras hacia la piel llamadas *crestas de Duret* y *ligamentos de Cooper*, encargados del soporte de la mama. [10]

El tejido adiposo representa otro importante componente de la mama. Aumenta su proporción con la edad, y puede variar con los cambios en el peso corporal, siendo responsable en gran parte del aumento de tamaño mamario durante la pubertad y la madurez. Las células adiposas se encuentran en gran cantidad alrededor del tejido mamario y dentro de él en el estroma interlobular e interlobulillar. En el estroma mamario se encuentra gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y una gran variedad celular como linfocitos, histiocitos, fibroblastos y células plasmáticas. [8]

Pezón, areola y piel

La epidermis del pezón (la papila mamaria) y la areola se pigmentan y se arrugan; se componen de un epitelio plano estratificado queratinizado. Tiene de 15-60 mm de diámetro; hay haces de fibras musculares lisas que están dispuestas circunferencialmente en el tejido conectivo denso y son responsables de la función contráctil y de la erección del pezón. Posee dos tipos de receptores nerviosos: *corpúsculos de Ruffini* y *de Krause* que se asocian con la recepción táctil al estiramiento y la presión. La areola tiene glándulas sudoríparas apocrinas y glándulas sebáceas (*de Montgomery*); se consideran intermedias entre las verdaderas glándulas mamarias y las glándulas sudoríparas y se abren en la superficie hasta formar un único conducto galactóforo. El resto de la piel de la mama no presenta ninguna distinción particular con respecto al resto del cuerpo, es un epitelio plano estratificado queratinizado, y contiene glándulas sudoríparas, sebáceas y folículos pilosos en cantidades variables. [12]

FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA (MAMOGÉNESIS)

Las hormonas encargadas del desarrollo de la glándula mamaria son: el lactógeno placentario y los estrógenos; en éste participan interacciones entre el epitelio y el mesénquima (Figura 5a). La mamogénesis se divide en dos fases: la formación del pezón y el desarrollo de la glándula mamaria. A la semana 6, el pezón se reconoce como una acumulación de células epiteliales ectodérmicas siguiendo la línea que va desde la axila a la ingle (línea mamaria) y formando una depresión, el pezón invertido. Posterior al nacimiento, la areola se eleva acorde al desarrollo de las glándulas areolares alrededor del pezón y éste protruye (Figura 5b).

La yema mamaria (células epiteliales ectodérmicas), entran en el mesodermo subyacente, además, se ramifica para dar lugar a entre 15 y 25 cordones mamarios epiteliales, durante el primer trimestre. Posteriormente, durante el segundo trimestre, estos cordones epiteliales sólidos se hacen huecos, desarrollándose alveolos así como convirtiéndose los conductos mamarios en conductos galactóforos durante el tercer trimestre. El estroma (conjuntivo y adiposo) y tejido muscular del pezón provienen del mesodermo, mientras que las células mioepiteliales provienen de células epiteliales de los conductos y alveolos (Figura 5c).

El sistema sencillo de conductos embrionario persiste en las niñas sin cambios hasta la pubertad, mientras que en el sexo masculino involuciona cuando la hormona testosterona está presente. Durante la adolescencia, estrógenos y prolactina estimulan el desarrollo de los conductos galactóforos, así como la hiperplasia del tejido adiposo. Los receptores estrogénicos, tanto citoplasmático como nucleares se encuentran en las células epiteliales, y la progesterona contribuye a la formación de nuevas yemas

alveolares, provocando que las antiguas desaparezcan al final de cada ciclo ovárico. Durante cada ciclo menstrual se producen estos cambios.

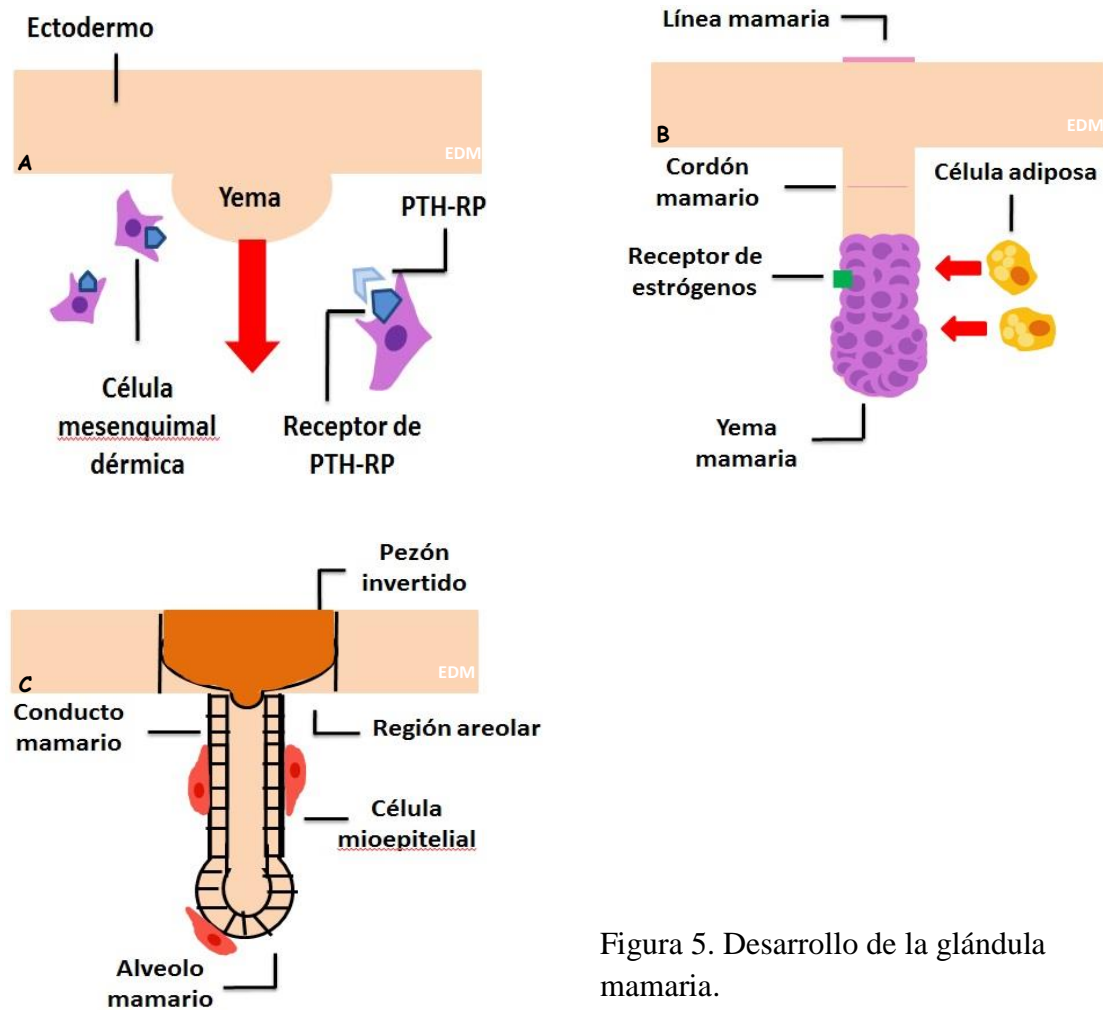


Figura 5. Desarrollo de la glándula mamaria.

CAMBIOS EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN HORMONAL

Ciclo menstrual

El ciclo menstrual se produce como consecuencia de las variaciones cíclicas de las concentraciones hormonales en la sangre. Así como los estrógenos y progestágenos actúan sobre el endometrio, también presentan un efecto directo sobre el tejido mamario, modificando sus características histológicas, especialmente en la etapa premenstrual cuando los niveles elevados de hormona no han comenzado a descendentes. Las hormonas producen cambios tanto a nivel estromal como glandular. Durante la menstruación, el estroma intralobulillar, sufre niveles variables de edema e infiltrado de células inflamatorias, modificando su volumen; así como, se modifica su composición. A nivel glandular, se produce un incremento de acinos debido al crecimiento y multiplicación celular con el fin de preparar la mama para la producción de leche.

Estos cambios suelen ser reversibles, ya que el líquido es reabsorbido y las células acinares sufren apoptosis. [12]

Embarazo y lactancia

Los cambios finales que completan la maduración funcional del lobulillo, se producen durante el período gestante. Los cambios producidos durante la etapa premenstrual se magnifican, debido a que los niveles hormonales se mantienen e incrementan durante el embarazo.

Durante el primer trimestre se da un crecimiento de los ductos mamarios, aumentando el número de ramificaciones así como su tamaño. Es durante los últimos meses de embarazo, cuando los nuevos acinos así como los preexistentes se hipertrofian; incluso se produce una hiperplasia celular, convirtiéndose las células cúbicas en células cilíndricas de base ancha y con gran cantidad de vacuolas en el citoplasma. La luz de los acinos se amplía y los ductos se llenan de forma progresiva.

Una vez iniciada la lactancia materna, se pueden encontrar acinos vacíos con células epiteliales cilíndricas, a veces superpuestas, núcleo claro, redondeado y en la zona basal y citoplasma eosinófilo, además presentan una luz disminuida. El epitelio acinar cambia de cilíndricas-cúbicas a planas cuando el citoplasma se lleva de grandes vacuolas contenedoras de leche.

Además, se produce un aumento en las fibras musculares, tamaño y eversión del pezón; así como hiperpigmentación de la piel e hipertrofia de las *glándulas de Morgani*. Los orificios del pezón, por otro lado, se hacen permeables.

Tras la lactancia, y debido a la disminución de la carga hormonal se produce una regresión de la mama; aunque, no se llega a tener las mismas características que en el estado anterior a la gestación, existiendo cierto aumento en la cantidad de tejido mamario así como gran parte de los cambios del complejo areola-pezón.

La mama de la mujer nulípara contiene mayor estroma interlobulillar que tejido glandular, pero tras el embarazo, esta relación se invierte. La involución que se produce tras la lactancia no es suficiente para revertir esta relación y no es hasta la menopausia y como consecuencia de la atrofia del tejido mamario por adiposo cuando se revierte.

Secreción mamaria

Prolactina, lactógeno placentario, así como estrógenos, progesterona y diversos factores de crecimiento, participan en el desarrollo de los conductos galactóforos y alveolos secretores durante el embarazo. Durante la lactancia, el sistema de conductos galactóforos y el tejido lobulillar están desarrollados y funcionan por completo.

La succión del pezón, provoca un estímulo neural que libera oxitocina y determina la expulsión de leche, mientras que el factor liberador de hormona

luteinizante inhibe la liberación, determinando una interrupción de la ovulación, de forma temporal. Las células mioepiteliales que rodea al alveolo, se contraen o distienden en respuesta al estímulo mecánico.

La leche contiene:

Proteínas: caseína, α -lactoalbúmina y proteínas relacionadas con la hormona paratifoidea (PTH-RP). Todas estas proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso y van hacia el aparato de Golgi, aquí se acumulan en vesículas que serán liberadas mediante un tipo de exocitosis, secreción merocrina.

Lípidos: Triglicéridos y colesterol. Sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso y liberadas al citoplasma en forma de vacuolas, mediante secreción apocrina.

Azúcares: Lactosa y uridina-difosfato-galactosa. Son liberadas junto con proteínas.

Además, se libera Ig A dimérica producida por las células plasmáticas presentes en el estroma.

Tras la lactancia, la secreción de prolactina disminuye involucionando tanto alveolos como sistema de conductos galactóforos, recuperándose el estado normal en varios meses. [8]

Menopausia e involución mamaria

La finalización de la estimulación hormonal se produce durante la menopausia. Se produce una disminución de células acinares, del tamaño lobulillar y atrofia en los ductos mamarios. Además, los conductos pequeños y medianos se cierran. Por otro lado, se produce un predominio progresivo de tejido graso debido a un aumento histológico de células adiposas o a un aumento general de peso; incluso, la cantidad de tejido adiposo puede permanecer estable, aumentando en proporción sólo como consecuencia de la disminución del tejido fibroglandular.

Este tipo de cambios son involutivos, pudiendo registrarse atrofias desde el inicio de la edad adulta, incluso antes de la menopausia y sin relación con la actividad ovárica. Por lo que han de existir otros factores, además de la carga hormonal, implicados en la involución mamaria.

BREVE RECUERDO CLÍNICO.

En la mama se agrupan tejidos de diferentes estirpes que pueden dar lugar a distintos tipos de tumores (sarcomas, basaliomas, linfomas, etc.); sin embargo sólo trataremos los tumores malignos de mama específicos de esta glándula. Existen otros tumores de tipo benigno que no son el objeto de esta revisión (fibroadenoma, tumor filodes y papilomaintraductal). [13]

TIPOS HISTOLÓGICOS VERSUS TIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA

Clasificación histológica

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que incluye numerosas entidades distintas que no sólo tienen diferentes características biológicas, sino también diferentes comportamientos clínicos. [1, 2, 3] Hay evidencias que sugieren que este tipo de cáncer es, de hecho, una colección de diferentes enfermedades con distintos factores de riesgo, manifestaciones clínicas, características patológicas y respuestas a terapias.

Los cánceres de mama se pueden dividir en subgrupos biológicos y clínicos de acuerdo a su tipo de clasificación histológica. [14] Se hacen referencias a distintos tipos histológicos, refiriéndose al patrón de crecimiento de los tumores. La diversidad histológica de los adenocarcinomas de mama han fascinado a los patólogos, quienes han identificado determinados patrones morfológicos y citológicos que se asocian siempre con distintas manifestaciones clínicas. Entre las neoplasias malignas de mama más frecuentes destacan:

Carcinoma ductal in situ se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis. Se trata de una manifestación pre-maligna.

Carcinoma ductal infiltrante (o invasivo) es el más frecuente, se da en el 80% de los casos. Se inicia en el conducto mamario, pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo.

Carcinoma lobular in situ se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos) y, aunque no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que la mujer pueda desarrollar un tumor en el futuro.

Carcinoma lobular infiltrante (o invasivo) comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y diseminar a otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo.

La última edición de la Organización Mundial de la Salud reconoce por lo menos 17 tipos histológicos especiales de cáncer de mama, lo que representa hasta el 25% de todos los cánceres mamarios.

Clasificación molecular

Se emplean diferentes marcadores de inmunohistoquímica como sustituto de una clasificación por mecanismos moleculares en los cánceres de mama; Sin embargo, no existe un consenso sobre el panel adecuado de marcadores inmunohistoquímicos.

Entre los más empleados encontramos:

Receptor de estrógenos (Estrogen receptor) (ER): El receptor de estrógeno hace referencia a un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona denominada 17 β -estradiol o estrógeno. [15] Los receptores de estrógeno se encuentran sobre-expresados en aproximadamente el 70% de los casos de cáncer de mama, referidos como "ER positivos". Se han propuesto dos hipótesis para explicar por qué esto causa tumorigénesis, y las evidencias que apoyan cada una de dichas hipótesis.

En primer lugar, la unión de ER estimula la proliferación de las células de las glándulas mamarias, con el resultado de un incremento en la división celular y así, de la replicación del ADN, con el consiguiente riesgo de sufrir mutaciones.

En segundo lugar, el metabolismo del estrógeno produce residuos genotóxicos.

El resultado de ambos procesos es la interrupción del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN, con la consecuente posibilidad de la formación de un tumor. ER α se encuentra asociado con multitud de tumores de diverso origen, mientras que la implicación de ER β aún es controvertida. Se han identificado diferentes versiones del gen *ESR1* (con polimorfismo de nucleótido simple), asociadas con diferentes porcentajes de riesgo de desarrollar cáncer de mama. [15]

Receptor de progesterona (Progesterone receptor) (PR): La progesterona participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos en los mamíferos. La respuesta biológica a la progesterona está mediada por dos isoformas del receptor, denominadas PR-A y PR-B. La diferencia entre éstas está dada por 164 aminoácidos de la región amino-terminal de PR-B que están ausentes en PR-A. Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos promotores que son inducidos por los estrógenos. PR-B actúa como un fuerte activador transcripcional en diferentes contextos celulares mientras que PR-A funciona como un inhibidor. El contenido de las isoformas del PR, así como su regulación por hormonas esteroides se presenta de manera tejido-específica en los órganos blanco como el útero, la glándula mamaria y el cerebro. El conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se regula la expresión y función de las isoformas del PR permitirá entender procesos biológicos fundamentales como la conducta sexual y la reproducción; además

contribuirá al diseño de terapias hormonales en el control de la fertilidad, así como en el tratamiento de tumores de mama, endometriales y cerebrales. [16]

Erb-B2 ó HER2neu: El HER2/neu, conocido también como ErbB2 y designado como cúmulo de diferenciación CD340 y p185, es un oncogén localizado en el cromosoma 17, que se expresa en aproximadamente 25-30% de las pacientes con cáncer de mama. La expresión de este oncogén está asociada a la progresión y evolución desfavorable del cáncer de mama. Her2/neu pertenece a la familia de receptores celulares de membrana ErbB con actividad tirosin quinasa en su dominio intracitoplasmático. Es una glicoproteína de 185 kDa, y se localiza en la región cromosómica 17q12-212. [17]

La clasificación molecular se inicia con dos subgrupos:

Carcinomas de mama receptores de estrógenos positivos (ER+):

- Luminal A. (ER+ y/o PR+, HER2-).
- Luminal B. (ER+ y/o PR+, HER2+).

Carcinomas de mama receptores de estrógenos negativos (ER-).

- Carcinoma de células basales (BCL). (ER-, PR-, HER2-).
- Subtipo HER2. (ER-, PR-, HER2+).

PROCESO DE METÁSTASIS

La capacidad para detectar y tratar con éxito el cáncer de mama localizado ha mejorado en los últimos años, sin embargo el proceso metastásico representa un desafío terapéutico al constituir la causa de muerte más común relacionada con cáncer debido a la incapacidad de los parámetros de diagnóstico e histológicos convencionales para predecir con precisión el verdadero alcance y el pronóstico de la enfermedad de una proporción de cánceres clínicamente localizados. [18]

Un tercio de pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos desarrollarán metástasis, mientras que los otros dos tercios, a pesar de no recibir quimioterapia, no la desarrollaran. [19] Incluso en pacientes con tumores pequeños y ganglios linfáticos tumorales negativos (T1N0), hay un 15-25 % de probabilidad de metástasis a distancia. [20]

Dado que los sistemas de clasificación actuales para los cánceres de mama y de próstata no identifican con precisión aquellos pacientes curables, la evaluación de los parámetros adicionales asociados con el fenotipo metastásico será muy importante para la diferenciación de los pacientes curables. El conteo del número de microvasos, así como la expresión de genes supresores de metástasis, son mejores biomarcadores pronóstico que el análisis convencional de tamaño del tumor y grado. La información

obtenida de la evaluación de biomarcadores como estos, tienen el potencial de dar lugar a una reducción de la morbilidad entre los pacientes que no requieren quimioterapia y, posiblemente, identificar a los pacientes que requieren terapias más agresivas que las indicadas por los métodos actuales. [18]

Existe una necesidad de marcadores que distingan con precisión las lesiones histológicas que tienen una alta probabilidad de causar, clínicamente, enfermedad metastásica importante de las que permanecerán indolentes. [21]

La mera propagación de células cancerígenas en el sistema vascular o a un sitio secundario no constituye metástasis; para que tenga lugar el desarrollo clínico de la metástasis se requiere que las células completen una serie de pasos bien definidos (figura 6): las células han de dejar el tumor primario, migrar a través de la matriz extracelular, alcanzar la circulación sanguínea o linfática, resistir a Anoikis y evadir el sistema inmune. [22]

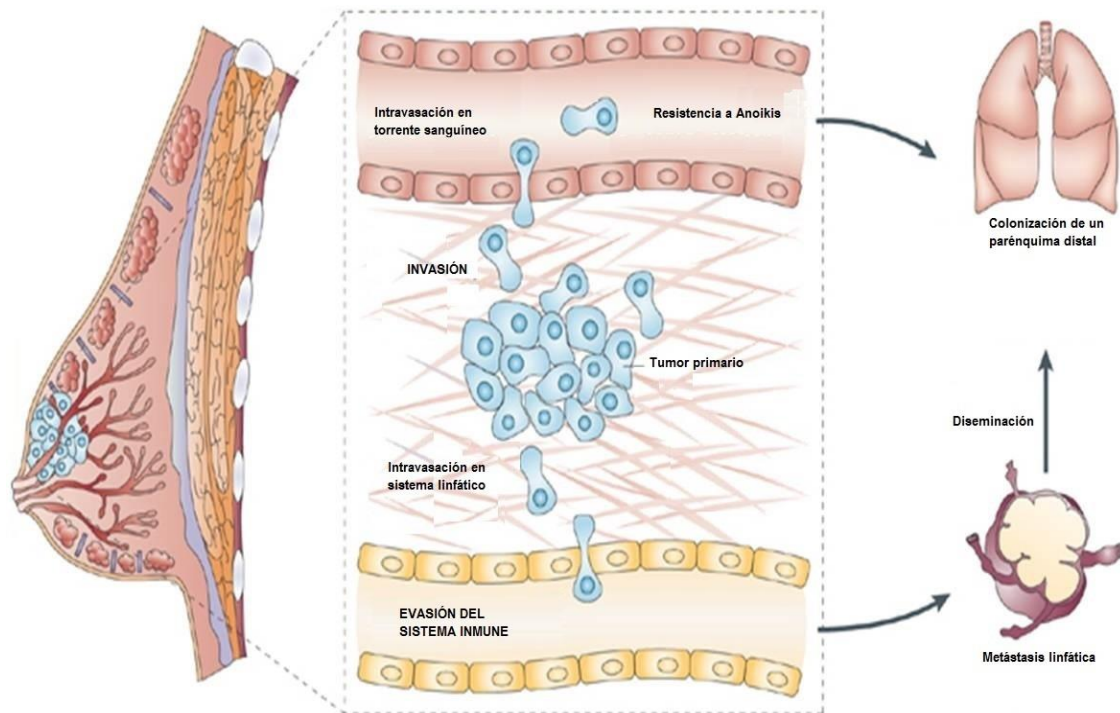


Figura 6: Resumen del proceso metastásico (modificada de Marshall et al, 2010. [22])

GENES SUPRESORES DE METÁSTASIS

Son especialmente atractivos desde un punto de vista funcional y terapéutico. Los genes supresores de metástasis actúan para inhibir el comportamiento metastásico tumoral sin afectar el crecimiento del tumor primario; sin embargo, en la mayoría se desconoce la regulación de su expresión y su contribución al perfil clínico, patológico y terapéutico del cáncer de mama. Sus productos actúan para inducir o suprimir la metástasis sin afectar el crecimiento del tumor primario. [23]

Hasta la fecha, han sido identificadas más de veinticinco de estas moléculas y todas parecen ser críticas en la regulación de etapas de metástasis. En algunos casos pueden funcionar para inhibir la apoptosis al perder la adhesión celular, o aumentar la habilidad de las células a migrar a través del estroma, en otras, regulan la capacidad de adaptación de las células tumorales en los órganos a distancia, y se espera que algunas de estas moléculas puedan ser valiosas en la predicción del riesgo de metástasis. [24]

NM23

Definición

Nm23 es un gen supresor de metástasis. Por definición, no afecta al crecimiento del tumor primario, pero inhibe significativamente la metástasis y reduce la formación del foco metastásico. [25] Sus rutas y procesos de regulación constituyen un amplio tema de estudio en la actualidad.

Nm23 fue el primer gen supresor de metástasis que se descubrió en líneas celulares de melanoma de ratón. [26] Posee una gran variedad de actividades moleculares relacionadas con su capacidad para inhibir la metástasis; la primera de ellas, actúa como NDPK autofosforilándose en el residuo 118 de histidina, aunque esta actividad está bien caracterizada, no se ha encontrado correlación con los efectos inhibidores de metástasis. Por otro lado, Nm23-H1 fosforilado tiene actividad histidina-quinasa (que en mamíferos está poco estudiada), con tres sustratos conocidos:

ATP- citrato liasa. Donde Nm23-H1 fosforilado se une al sitio catalítico del enzima y cataliza la producción de Acetil-Coa citosólico.

Aldolasa C. Nm23-H1 fosforila la aldolasa C en el aspartato 319. Las consecuencias biológicas de esta fosforilación tampoco se conocen.

Quinasa supresora de Ras (KSR). Suprime las funciones de Ras, provocando que no se lleven a cabo fenómenos como la proliferación, diferenciación, migración etc.

Inhibe la ruta de las MAP quinastas (MAPKs), por tanto, tiene efectos anti proliferativos.

Hasta la fecha no hay dianas terapéuticas clínicamente relevantes en cualquiera de los sustratos conocidos de Nm23-H1. [23]

Nm23 y cáncer de mama

El Nm23 se asocia con la metástasis en diferentes tipos de cánceres humanos; además, varios estudios han demostrado relación inversa entre la expresión Nm23-H1 y la invasión de metástasis en un sistema *in vitro* con líneas celulares de carcinoma de mama y también en experimentos con ratones *in vivo*. [27-31] Varios estudios han demostrado el efecto supresor de Nm23 sobre la agresividad metastásica de células de carcinoma de mama *in vivo*. [27, 32] En un estudio del desarrollo embrionario de ratón se observó que un incremento en la expresión de Nm23 se asoció a la diferenciación funcional de la glándula mamaria en animales nulíparas y preñadas. En cáncer de mama humano, cinco estudios han demostrado una asociación significativa entre la reducción en la expresión de proteína o ARN de Nm23 y el comportamiento agresivo del tumor. [28]

Los estudios en pacientes humanos con cáncer de mama han demostrado que altos niveles de Nm23 se asocian con excelentes probabilidades de supervivencia. [33] Se han realizado estudios de transfección con cDNA de Nm23-H1 en líneas celulares de cáncer de mama humano (MDA-MB-435) que indican que Nm23-H1 suprime el potencial metastásico *in vivo* en un 50-90%. [28]

Mutaciones de Nm23

Recientemente han aparecido diversos estudios sobre metilación de genes y se ha sugerido su posible empleo clínico como marcador de cáncer.

En el desarrollo tumoral coexisten alteraciones genéticas y epigenéticas, que modifican la expresión de genes. En las células, los cambios epigenéticos pueden ser heredables y consisten en la metilación del carbono de la posición 5 de citosinas presentes en dinucleótidos CG (llamados islas CpG) y se encuentran concentrados en los promotores de los genes. [34] La metilación de las islas CpG representa una señal que desencadena un cambio en la cromatina, que impide la transcripción de un determinado gen.

En un estado normal, la metilación es un mecanismo que regula, entre otros procesos, la diferenciación de tejidos al silenciar ciertos genes en determinados tejidos. Pero cuando la metilación se desregula y afecta genes que no deben ser silenciados, puede iniciarse un proceso patológico. La metilación aberrante de genes supresores de tumores provoca un descontrol del ciclo celular, así como la metilación aberrante de genes inhibidores de metástasis, facilita el escape de la célula tumoral. [35] La consecuencia de esta metilación desregulada tiene un efecto comparable al que produce una mutación en la secuencia codificante del gen.

Estudios genéticos en líneas celulares de carcinoma de mama han identificado en la zona del promotor (2,1 kb) tres regiones involucradas en los niveles de expresión de Nm23, una región de 195 pb responsable de los niveles de expresión basal, un

fragmento de 248 pb que contribuye a la elevación de la expresión de Nm23 y un último fragmento que contiene un elemento inhibidor. [36]

Se muestra un esquema del promotor de Nm23-H1 (figura 7) donde se observa que el codón de inicio ATG está localizado en el exón 2, precedido por un gran intrón. Un pequeño exón 1 contiene el sitio de iniciación de la transcripción. Existen, dos áreas de alta frecuencia CpG. Una de ellas, denominada isla B desde la base 21672 hasta la 22343; esta isla, incluye, además la iniciación de la traducción. La isla A se encuentra hacia el extremo 5' entre las bases 23090 y 23922. [37]

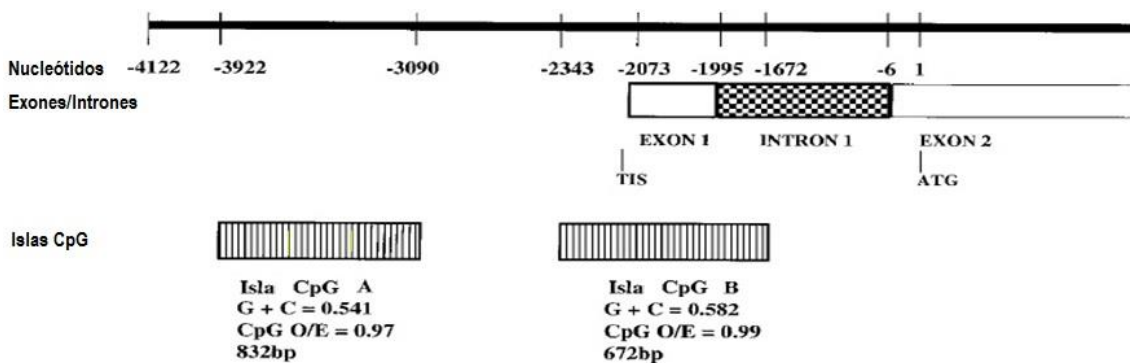


Figura 7. Representación esquemática del promotor de Nm23-H1 (modificada de Hartsough., et al 2001. [36])

Se han realizado estudios en líneas celulares de cáncer de mama con inhibidores de metilación como 5-Aza-2' deoxycitidina, aumentando éste la expresión de Nm23-H1 e inhibiendo la movilidad in vitro. [38]

MICROAMBIENTE TUMORAL

Desde que se conociera la conexión entre las células tumorales y su microambiente tumoral circundante, se ha sospechado que éste juega un papel importante en la iniciación y progresión de los tumores. [39,40] El microambiente tumoral se compone de muchos tipos diferentes de células, tales como células endoteliales, fibroblastos, linfocitos y macrófagos. También consta de numerosas moléculas solubles tales como factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, anticuerpos, proteasas, diversos tipos de enzimas, y metabolitos, así como la matriz extracelular. La estrecha relación que existe entre las células tumorales y su microambiente juega un papel importante en la iniciación del tumor, el crecimiento y la metástasis. [41,42]

Una mejor comprensión de la interacción entre las células tumorales y el microambiente que las rodea puede ser útil para el reconocimiento de los mecanismos

de desarrollo del tumor subyacente y la progresión, así como el descubrimiento de dianas terapéuticas novedosas. [43]

ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis se define como el crecimiento de un nuevo tubo capilar sanguíneo. [44] Los estudios han demostrado una relación estadísticamente significativa entre el aumento de los microvasos y el riesgo de metástasis y una disminución en la supervivencia de pacientes con tumores de mama. [45] Los tumores que muestran mayor angiogénesis son relativamente más agresivos que aquellos que no lo hacen. [46]

CD34

El marcador CD34 es una proteína transmembrana monocatenaria marcadora de superficie celular, que permite la categorización de células precursoras del sistema hematopoyético. Se trata de un marcador de células musculares lisas o pericitos, detectado en las células del sistema linfa-hematopoyético, así como en el endotelio vascular; se ha propuesto al inicio de la invasión tumoral, contribuyendo tanto al crecimiento como a la progresión del tumor. [46]

ESTROMAGÉNESIS

Las células tumorales están rodeadas de un tejido denominado estroma, formado por células no tumorales que afectan a la progresión de la enfermedad. El estroma se encuentra presente en los llamados tumores desmoplásicos, entre los cuales se encuentra el cáncer de mama. Según algunas investigaciones, el estroma podría aparecer alrededor de las células tumorales como reacción de defensa del organismo ante la enfermedad, pero a la vez dificulta la acción de los fármacos en la célula maligna y estimula la dispersión del tumor a otras partes del cuerpo. La cantidad de estroma es directamente proporcional a la agresividad de los tumores.

α -Actina del músculo liso (α -SMA)

Las células estromales pueden desempeñar un papel importante en la respuesta del huésped a daños en los tejidos, contribuyendo la estromagénesis a aumentar el potencial de invasividad de las células tumorales. Un aumento en la expresión de α -actina de músculo liso (α -smooth muscle actin) (α -SMA) como marcador de miofibroblastos estromales, se ha asociado con distintos tipos de carcinomas más invasivos. [46]

SISTEMA INMUNE

En un principio, cabría pensar que el organismo debe poseer algún sistema eficaz que le proteja frente al desarrollo y crecimiento de células tumorales. Efectivamente estudios realizados por Burnet (1959) [47] demostraron que el sistema inmune juega un importante papel defendiendo al individuo frente al crecimiento de células neoplásicas; esto se conoce como *teoría de inmunovigilancia* y postula que las células tumorales expresan antígenos, que no están presentes en las células normales, y que hacen que la célula tumoral sea reconocida por el sistema inmune como extraña y por consiguiente sea destruida. Esta hipótesis se ha visto confirmada por múltiples evidencias entre las que destacan: la existencia de una estrecha relación entre la aparición y desarrollo de cánceres y el estado funcional del sistema inmune y la presencia de un infiltrado celular, principalmente linfocitos y macrófagos, en el seno del tumor. [47]

El papel del sistema inmunológico en el cáncer es una espada de doble filo, ya que en muchos casos promueve el crecimiento tumoral. Las células inmunológicas presentes en el seno del tumor, se encuentran elevadas en tejidos pre-malignos y malignos, y se cree que pueden contribuir a la formación tumoral a través de la liberación de moléculas que regulan el crecimiento celular y la migración, alteran la matriz extracelular y promueven la formación de vasos sanguíneos [48], por otro lado las condiciones inflamatorias crónicas hacen que exista una predisposición a desarrollar ciertos tipos de cáncer.

CD8

Se trata del marcador de linfocitos T citotóxicos, un componente celular crucial en la respuesta inmune adaptativa. La molécula CD8 es un heterodímero compuesto por cadenas alfa y beta similares a la inmunoglobulina unidos por un puente disulfuro. Recientemente, muchos informes sugieren que el desarrollo del cáncer es controlado por el sistema inmune del huésped, que subyace a la importancia de incluir biomarcadores inmunológicos para la predicción del pronóstico y la respuesta a la terapia, un concepto que ha sido denominado "immunoscore". [48]

CD68

El cúmulo de diferenciación 68 (CD68) es una proteína de membrana lisosomal muy glicosilada que se emplea como marcador de macrófagos en diferentes tipos de cánceres.

Se sabe que el tumor atrae células inmunológicas que pueden, en ese momento, impactar en la progresión tumoral. El daño en una célula tumoral e hipoxia de la zona atraen macrófagos de la sangre hacia el tejido rodeando el tumor. En la mayoría de los casos, el conteo alto de macrófagos asociados al tumor se encuentra correlacionado con una reducida supervivencia. Los macrófagos en sí secretan factores que mejoran la proliferación de células tumorales, invasión y promueven la angiogénesis. Además, los

macrófagos asociados al tumor liberan radicales con oxígeno libre y otros compuestos mutagénicos que pueden crear mutaciones en las células cercanas. La habilidad de los macrófagos para pegarse a las células tumorales permite que éstas alcancen la circulación y, por consiguiente, ayudan en la propagación del cáncer. [49]

MARCADOR PROMETASTÁSICO

Receptor del ácido lisofosfatídico 1 (LPA1)

El ácido lisofosfatídico es un lisofosfolípido con diversas funciones en múltiples tipos celulares. Se le conocen efectos proliferativos y morfológicos entre los que se incluye neurogénesis, mielinización, angiogénesis, cicatrización de heridas o procesos patológicos como cáncer. Actúa a través de 3 receptores específicos: LPA1 / vzg-1 / Edg2, LPA2 / Edg4, LPA3 / Edg7. De entre los que nos vamos a centrar en el LPA1. [50]

El LPA1 es un receptor con 7 dominios transmembrana acoplado a la superfamilia de proteínas G. Está codificado por los genes *lp* que se encuentran en el cromosoma 9, concretamente en el brazo largo (9q 31.3). Consiste en una proteína de 364 aminoácidos con un peso molecular de 41,1 kDa. El transcrito primario del gen se divide en 4 exones con el marco abierto de lectura distribuido sobre los 3 últimos exones. Posee dos intrones, uno situado en la región codificante para el dominio transmembrana I y el otro en la región que codifica para el dominio transmembrana. IV. Está extensamente distribuido por la mayoría de los tejidos, con mayor abundancia en: tracto digestivo, cerebro, placenta, corazón y con menor abundancia en: hígado y leucocitos de sangre periférica. [51]

El LPA1 está, entonces, implicado en distintos procesos:

Efecto proliferativo. Se conoce esta actividad desde mediados de 1980, ya que se realizaron estudios en cultivos de fibroblastos humanos que respondían a LPA. [50] Este efecto se reconoce por: un incremento en la incorporación de timidina, inositol fosfato, calcio intracelular y de la actividad de proteína-quinasa C y una disminución de la actividad adenilatociclasa.

Efecto sobre la morfología. Este efecto se reconoce por un reordenamiento celular, debido a cambios en el citoesqueleto de actina.

Efectos angiogénicos. Al producir un incremento de la expresión y síntesis de factores neovasculares tales como: IL-6, IL-8, VEGF, Gro- α (growth-regulated oncogen alpha) y uPA (uro kinasa plasminogen activator).

Debido a que el LPA promueve la proliferación, supervivencia y migración. Se han realizado múltiples estudios en varios tipos de cáncer como: Ovario, próstata, mama, etc. En relación a este tipo de tumor se ha observado que el LPA1 incrementa la

invasión y tumorigénesis en líneas celulares de cáncer de mama; por otro lado, un alto nivel de LPA1 se correlaciona con una disminución en el Nm23. En modelos de ratones transgénicos, una aberración que modifica la expresión del gen de LPA1 es suficiente para la iniciación y progresión de un cáncer de mama. [52]

TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA (TEM)

La transición epitelio-mesénquima (TEM) (figura 8) es un proceso complejo y generalmente reversible que comienza con la rotura de las uniones intercelulares y la pérdida de polaridad apico-basal típica de las células epiteliales, las cuales se transforman en células fibroblásticas con características migratorias, invasivas y fibrogénicas. [53]

En cáncer de mama, se produce una pérdida en la polaridad celular, sin alteraciones morfológicas claras, así como una reducción en la adhesión intercelular y una serie de modificaciones en las proteínas del citoesqueleto, como pérdida de citoqueratinas, aumento de vimentina, sustitución de fibras de estrés por filamentos de actina finos; estos cambios se producen modulados por factores de crecimiento, así como por modificaciones en la transcripción de proteínas implicadas en la remodelación celular. [54]

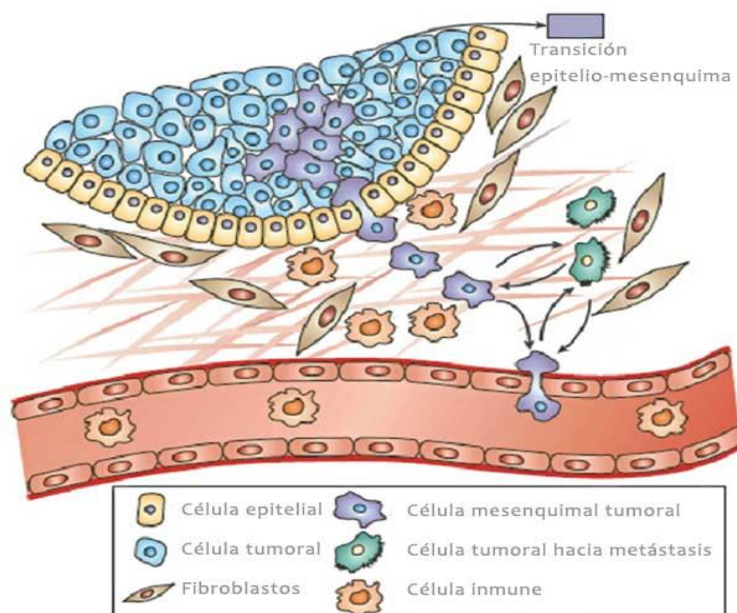


Figura 8. Representación del proceso de transición epitelio mesénquima en la invasión tumoral (modificada de Peinado et al., 2007. [55])

Ezrin

Ezrin, un miembro de la familia Ezrin/Radixin/Moesin (ERM), es una proteína del citoesqueleto que se une a la membrana y regula la forma celular, la motilidad y la interacción célula a célula a través de la vinculación de los elementos contráctiles de la célula a las proteínas transmembrana. De esta manera, Ezrin está involucrado en la regulación fenotípica y cambios en la arquitectura celular. Todas estas funciones celulares son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis de las células normales, así como todo el proceso de tumorigénesis y metástasis a distancia. [56]

Ezrin está compuesto de 585 aminoácidos con tres regiones diferenciadas. Los 296 primeros aminoácidos contienen el dominio N-terminal ERM (N-ERMAD), que se encuentra altamente conservado. Seguido de este una hélice alfa positivamente cargada contiene el dominio C-ERMAD constituido por 107 aminoácidos. El dominio N-terminal se une a la membrana plasmática y el carboxilo a los filamentos de actina. Se trata de una proteína regulada por conformación, que actúa a través de uniones adherentes entre proteínas transmembrana. Se encuentra en el citoplasma de forma latente sin fosforilar en una conformación plegada y de forma activa mediante fosforilación en el residuo de tirosina 567. Así mismo, se encuentra manteniendo la polaridad celular en la membrana plasmática. (Figura 9). [57]

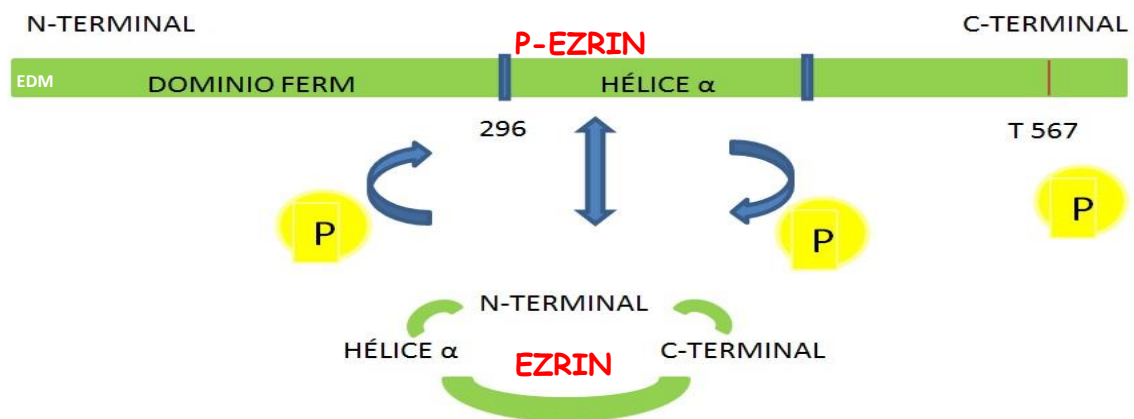


Figura 9. Representación esquemática de la molécula de Ezrin activada, una vez se fosforila en el residuo 567 de tirosina, así como la forma plegada sin fosforilar que se encuentra presente en el citoplasma.

Como se representa en la figura 10, en tejidos normales, Ezrin se encuentra en la porción apical de la célula, contribuyendo al mantenimiento de la forma normal de los filamentos de actina que pueden fortalecer la adhesión intracelular. En procesos cancerosos, la expresión de Ezrin citoplasmática se intensifica. Las formas latentes aumentan más que las formas activas lo que hace disminuir la fuerza de anclaje entre las células y les permite desprenderse unas de otras con mayor facilidad que en condiciones

normales. Desaparece el borde en cepillo y se fortalece la invasión celular. Se piensa que estos cambios son un factor esencial para eventos metastásicos tempranos. [57]

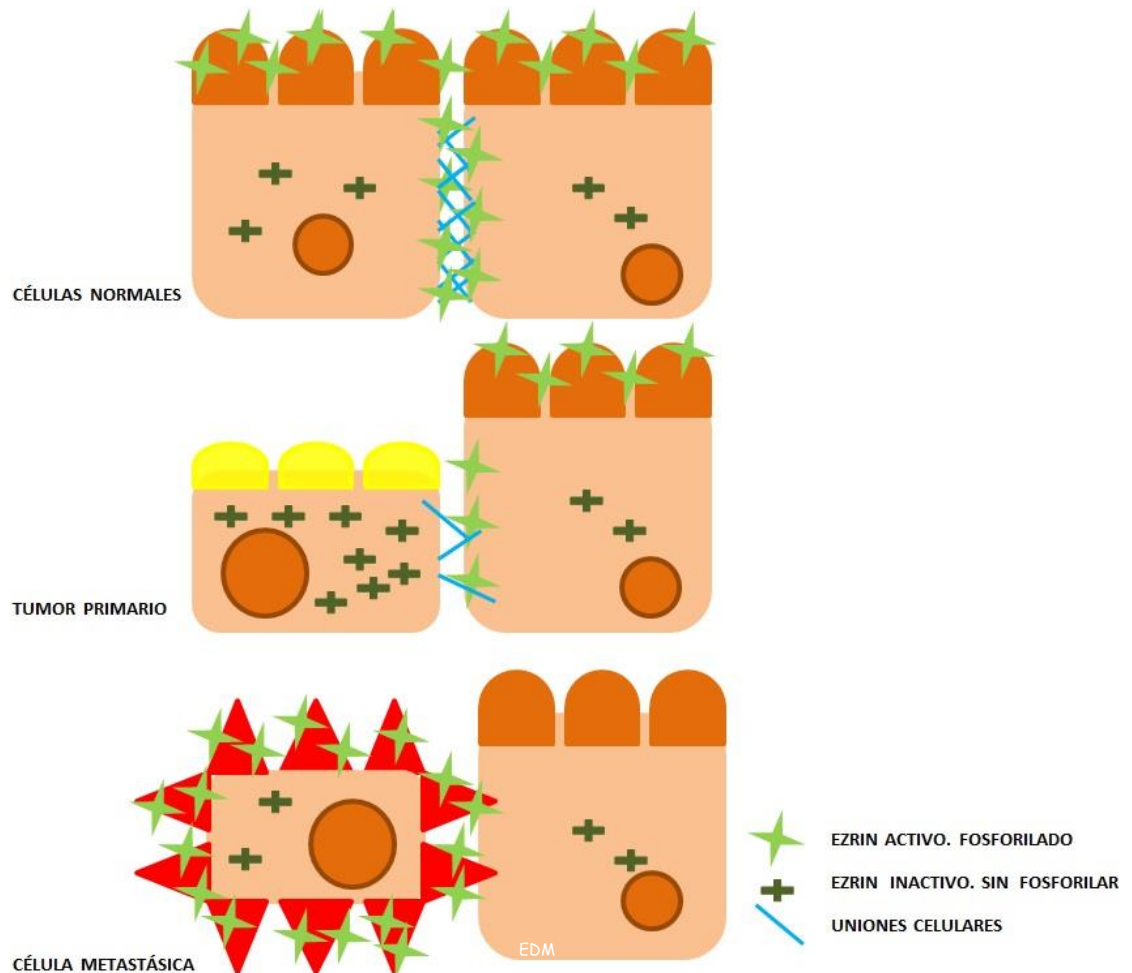


Figura 10. Representación esquemática de la distribución de ezrin en tejido sano y patológico.

MOLÉCULA DE ADHESIÓN FOCAL

FAK

La tirosina quinasa de adhesión focal (FAK), es una proteína que media la unión de las integrinas a la matriz extracelular. Estructuralmente consiste en un dominio FERM regulador en la zona amino-terminal, un dominio central con actividad catalítica y un dominio de unión a adhesión focal en la zona carboxi-terminal.

La activación de las integrinas de la matriz extracelular, promueven la autofosforilación de FAK en la tirosina 397 (figura 11), lo que desencadena en una cascada de señalización involucrada en fenómenos tales como la reorganización del citoesqueleto o la inducción de la expresión de diversos genes., implicados en migración, invasión, tumorigénesis o angiogénesis. Las señales intracelulares generadas

a través de las integrinas pueden tener un efecto sinérgico con las inducidas a través de otros receptores celulares y que en conjunto resultan finalmente en proliferación y diferenciación celular. [58]

Mediante Northern-blot se han analizado los niveles de ARNm de esta proteína, en tejidos normales, tumores primarios y metastásicos, observándose una sobreexpresión significativa en diferentes tipos de cánceres. [58]

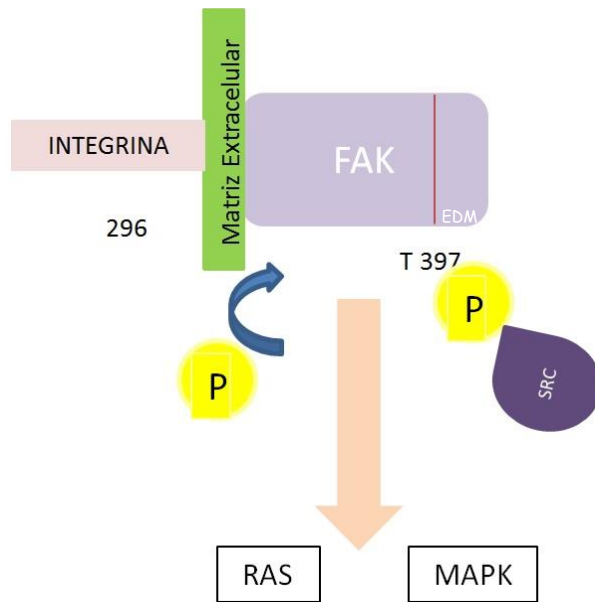


Figura 11. Representación esquemática del mecanismo de acción de FAK, activando diversas cascadas de señalización implicadas en la proliferación celular.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

- Nm23 es un gen supresor de metástasis que puede tener respuesta en el valor pronóstico de la enfermedad.
- Así mismo, Nm23 puede tener relación con las características clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas e influir en el patrón de diseminación tumoral.
- Nm23 puede tener efectos en el desarrollo de la enfermedad.

Objetivos

- Creación de micromatrices de tejidos con biopsias de carcinomas de mama en estadios precoces.
- Determinación de Nm23 mediante técnicas de inmunohistoquímica.
- Correlacionar la expresión del gen supresor de metástasis Nm23, con parámetros clínicos empleados en el diagnóstico clásico de cáncer de mama: receptores de estrógenos, de progesterona, p53, ki67 y CerbB2.
- Determinación de parámetros de angiogénesis (CD34), estromagénesis (α -SMA), de infiltración leucocitaria (CD8) y macrófagos (CD68) en el seno del tumor primario de mama.
- Determinación de parámetros prometastásicos (LPA1), proteínas implicadas en la transición epitelio mesénquima (Ezrin/Radixin/Moesin y sus formas fosforiladas), proteínas implicadas en la adhesión focal (pFak) en los tumores primarios de mama.
- Correlacionar la expresión del gen supresor de metástasis Nm23, con los parámetros del microambiente tumoral determinados anteriormente.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS CLÍNICAS

Se han utilizado 200 biopsias de pacientes de entre 28 y 90 años con cáncer de mama ductal infiltrante, en las primeras etapas de la enfermedad (N0, N1), así como con otros tipos de cáncer de mama menos frecuentes, también en estadios precoces al momento de diagnóstico; considerándose ambos casos desde un punto de vista clínico de grado I ó II, y con unos tamaños comprendidos entre 8 y 45 mm.

Del total de muestras, 130 han sido aportadas, con el consentimiento informado preceptivo, por el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Madrid Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid, para su estudio por el Laboratorio de Histología e Imagen de la Facultad de Medicina de la Universidad CEU San Pablo, Madrid. Los bloques de tejidos incluidos en parafina se cortaron con un microtomo de parafina (Reichert-Jung 2030) en secciones de 5µm de espesor para la realización de la descripción histológica con la tinción hematoxilina-eosina; de esta manera se localiza la zona de interés con el fin de construir micromatrices de tejido (*Tissue micro-array* o TMA).

Posteriormente, se construyeron 5 TMA con un equipo automático TMA-CK3500 (Olympus SZ), para ello se han utilizado los bloques de tejidos incluidos en parafina de las biopsias de cáncer de mama seleccionadas en el estudio. De cada caso se han tomado dos cilindros de un milímetro de diámetro cada uno de la zona de interés, los cuales se han colocado con unas coordenadas concretas en un nuevo bloque de parafina. Por otro lado, las restantes 70 biopsias proceden de la casa comercial Biochain (Newark, USA). Estas muestras se encontraban formando spots que conforman un tissue TMA. La tabla 2 muestra las características de las pacientes.

Tabla 2. Características de las pacientes del estudio.

Características	Número de casos	%
Tipo de tumor		
CDI	166	83
Otros	34	17
Edad		
≤50	87	44
>50	113	56
ER		
Positivo	116	58
Negativo	84	42
PR		
Positivo	135	67
Negativo	65	33
Ki67		
Positivo	26	13
Negativo	174	87
p53		
Positivo	22	11
Negativo	178	89
CerbB2		
0	85	42
1	61	31
2	22	11
3	10	5
0-1+	12	6
1-2+	4	2
2-3+	6	3

PROCESADO DEL TEJIDO

Se realizaron secciones de 5 µm de grosor de cada TMA para la técnica de inmunohistoquímica. Se llevaron a cabo con un microtomo de parafina (Reichert-Jung 2030). Los cortes para inmunohistoquímica se recogieron sobre portaobjetos previamente tratados con Poly-l-lisina (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA).

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS CARCINOMAS

El laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Madrid Montepíncipe, Boadilla del Monte, Madrid, fue el encargado de clasificar los carcinomas por tipo histológico y grado siguiendo el estudio histológico e inmunohistoquímico con los marcadores de diagnóstico convencional: receptor de estrógenos, receptor de progesterona, Ki67, CerB2 y p53.

ESTUDIO CUALITATIVO

INMUNOHISTOQUÍMICA

Las técnicas inmunohistoquímicas sirven para detectar antígenos celulares o tisulares mediante reacciones antígeno-anticuerpo.

En el presente trabajo se realizó una técnica inmunohistoquímica de tipo indirecto, la cual utiliza anticuerpos marcados y el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa. En un primer paso, se agrega el anticuerpo primario sin conjugar, el cual se une al antígeno presente en el tejido. A continuación, se añade un anticuerpo secundario biotinilado que se liga al anticuerpo primario. En tercer lugar, el trazador enzimático biotinilado, se conjuga con el anticuerpo secundario. Este trazador está formado por moléculas de avidina y biotina. Cada molécula de avidina consta de cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión con la biotina, pero sólo lleva tres moléculas de biotina unidas, de manera que queda un lugar libre en la molécula de avidina, que es donde se conjuga con la molécula de biotina, que presenta el anticuerpo secundario. Este proceso se resume en la figura 12.

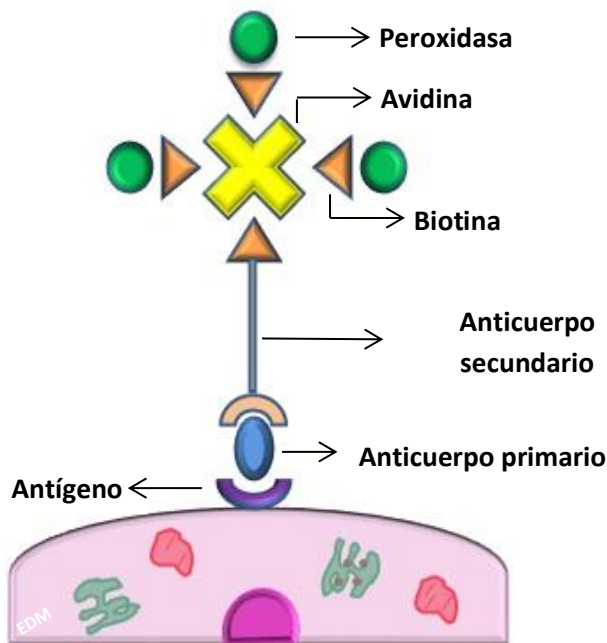


Figura 12. Representación esquemática de una inmunohistoquímica de tipo indirecto.

Los cortes histológicos, una vez desparafinados y rehidratados en serie de alcoholes decrecientes, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destilada, durante 30 minutos para inactivar la peroxidasa endógena.

Los anticuerpos primarios utilizados en el estudio se indican en la tabla 3.

Los anticuerpos primarios Nm23, LPA1, Ezrin, Fosfo-Ezrin/Radixin/Moesin y Fosfo-Fak, se diluyeron en una disolución de albúmina sérica (BSA) al 1% en tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS) más azida sódica al 0,1%. La incubación con el antisuero primario, se realizó durante 24 horas en cámara húmeda a una temperatura de 4°C. El resto de anticuerpos empleados en el estudio venían preparados por el fabricante para su uso.

Tabla 3. Relación de anticuerpos utilizados en el estudio.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	FUENTE	ANTICUERPO SECUNDARIO
Nm23-H1	1:100	NOVUS BIOLOGICALS Littleton. USA	Monoclonal
SMA	Ready to use	DAKO Carpinteria, California. USA	
CD34		DAKO Carpinteria, California. USA	
CD8		DAKO Carpinteria, California. USA	
CD68		DAKO Carpinteria, California. USA	
Ezrin	1:100	CELL SIGNALING Leiden. Netherlands	Policlonal
P-Ezrin (Thr567)/Radixin (Thr 564)/Moesin(Thr 558) (P-ERM)		CELL SIGNALING Leiden. Netherlands	
EDG2 (LPA1)		NOVUS BIOLOGICALS Littleton. USA	
Fak-P (Y397)		ABCAM Cambrige. UK	

Previo a la incubación, se realizó un pre-tratamiento de las muestras, con el fin de mejorar la visualización de la señal de inmunorreactividad. El pre-tratamiento consistió en una digestión enzimática de los tejidos con pepsina (Sigma, St Louis, USA; [59] durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, con una solución bloqueante con suero no inmune al 10% (cabra) perteneciente al kit Histostain® (Invitrogen, FlynnRd, USA), para evitar uniones inespecíficas. Se trata de un reactivo preparado para usar. Transcurrido este tiempo se añade el anticuerpo primario, que se deja a 4°C durante toda la noche en atmósfera húmeda.

El anticuerpo secundario utilizado para todas las muestras es una inmunoglobulina biotinilada de amplio espectro (anti ratón, conejo, cobaya y rata) perteneciente al kit Histostain® (Invitrogen, FlynnRd, USA). Se trata de un reactivo preparado para usar, cuyas incubaciones se realizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, todas las secciones se trataron con el conjugado preparado para usar de estreptavidina-peroxidasa perteneciente al kit Histostain® (Invitrogen, FlynnRd, USA), durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se revelaron en una solución formada por 200 ml de PBS y 0.1g de diaminobencidina (3,3',4,4'-Tetraaminobifenilo; Sigma, St Louis, USA) a la que se añaden 40 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. En el sitio de unión del complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, se obtiene un precipitado pardo de gran estabilidad.

Después se procedió al contraste con hematoxilina diluida, que tiñe los núcleos de las células, pero no enmascaran el marcaje producido por los anticuerpos utilizados. Por último, las muestras se deshidrataron en serie creciente de alcoholes, se pasaron por Hemo-de y se montaron con Depex.

La especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas ha sido comprobada mediante incubación de las secciones con suero no inmune como sustituto del anticuerpo primario.

ESTUDIO CUANTITATIVO

DENSITOMETRÍA. DETERMINACIÓN DEL ÁREA DE CÉLULAS EPITELIALES TUMORALES INMUNOTEÑIDAS ASÍ COMO DEL ÁREA ESTROMAGÉNICA.

La cuantificación del número de células epiteliales tumorales inmunoteñidas se llevó a cabo mediante técnicas densitométricas, para los siguientes anticuerpos: Nm23, LPA1, Ezrin, P-ERM y Fak-P.

El análisis de imagen se basa en el procesado de imágenes procedentes de un microscopio y su posterior digitalización, de modo directo o a través de fotografías como en el trabajo que presentamos. Con la digitalización, la imagen grabada se convierte en una matriz de puntos, los cuales son identificados en función de sus coordenadas (de posición, de luminosidad y de color) a través de un soporte informático. De esta manera, se podrán realizar múltiples mediciones de longitudes, perímetros o áreas, medidas de color, de densidad, etc. **[60]**

Adquisición de imágenes digitales

Las fotografías de las secciones histológicas fueron adquiridas con una cámara de campo claro Leica DFC425 (Leica, Mannheim, Alemania) acoplada a un microscopio Leica CTR 6000 (Leica, Mannheim, Alemania), conectado a un ordenador HP 1260. El programa utilizado fue el LeicaMetamorph AF 1.4. Las imágenes digitales se guardan en color de 24 bits en formato TIFF.

Análisis de imagen

Se analizaron las imágenes utilizando el software Leica Metamorph AF 1.4. Se empleó el modelo de color *hue-saturation luminosity* (HSL). El modelo HSL [61, 62], el cual define un color en función de tres parámetros; Por un lado el *hue* (matiz) que es el estado puro del color, sin el blanco o negro agregados, y corresponde a un atributo asociado con la longitud de onda dominante en la mezcla de las ondas luminosas. Por otro lado, la saturación o pureza (la cantidad de luz blanca mezclada) y por último, la luminosidad (promedio entre el mayor y el menor componente de color RGB). Para un análisis individual, un equipo de ocho bits asigna uno de los valores enteros (241 enteros posibles, de 0 a 240) a cada píxel. [63]

Las imágenes correspondientes a los controles negativos incubados sin anticuerpos, pero con PBS y el mismo protocolo de inmunohistoquímica, sirvieron para observar el umbral de expresión, mediante el comando *Set color Threshold*. Este umbral de cromaticidad negativo (rango que incluye todos los píxeles) se obtuvo con 10 imágenes de secciones de tejido mamario que fueron procesadas como controles negativo (figura 13a).

Para seleccionar el rango incluido en los valores HSL, del comando *Set Color Thershold* del LeicaMetamorph, como se mencionó anteriormente, por cada píxel de una imagen, los valores de *hue*, saturación e intensidad se transforman de manera independiente a uno de 241 valores enteros de 0 a 240, y se podría dar un rango de valores como datos de interés para cada parámetro; por ello para minimizar el error y homogeneizar al máximo las condiciones se utilizaron estos controles.

La figura 13a muestra la ventana de la pantalla del LeicaMetamorph AF 1.4 durante la selección del rango de valores HSL para el control negativo de las imágenes, donde el rango de valor umbral incluido en *hue* se incrementó hasta que todos los píxeles presentes en la imagen se incluyeron. Para esta imagen en particular, el rango umbral seleccionado incluye 38-240. Los valores umbral para la saturación e intensidad, sin embargo, permiten incluir toda la gama de valores posibles (0-240). No obstante, se calculó el porcentaje de área de la imagen (figura 13b) para confirmar la exactitud del rango umbral, y se definió como del 100% para los controles negativos.

Se calculó el rango umbral en tres réplicas de las 10 muestras y se realizó la media y error estándar, donde obtuvimos un intervalo de 36-240 que definen el rango umbral negativo para esas muestras.

Procedimos a calcular el rango umbral positivo; teniendo en cuenta que en nuestros experimentos se utiliza un cromógeno negro-parduzco que al unirse al anticuerpo da un precipitado marrón. Como cabía esperar, tras realizar tres réplicas de 10 muestras de controles negativo se obtuvo un rango de 0-36 de *hue* con valores de 0-240 para saturación e intensidad para los que ningún pixel de la imagen se incluía.

De esta forma se define de manera inequívoca el rango *hue* para nuestras muestras. [63]

Para efectuar la cuantificación de inmunoexpresión positiva se seleccionaron tres zonas por anticuerpo de epitelio tumoral mediante muestreo sistemático al azar, utilizando el programa LeicaMetamorph AF 1.4. Dentro de cada zona se obtuvo un valor promedio del área inmunoteñida respecto al área total de cada corte histológico.

Determinación de Nm23, un gen supresor de metástasis y su relación con parámetros del microambiente tumoral en cáncer de mama

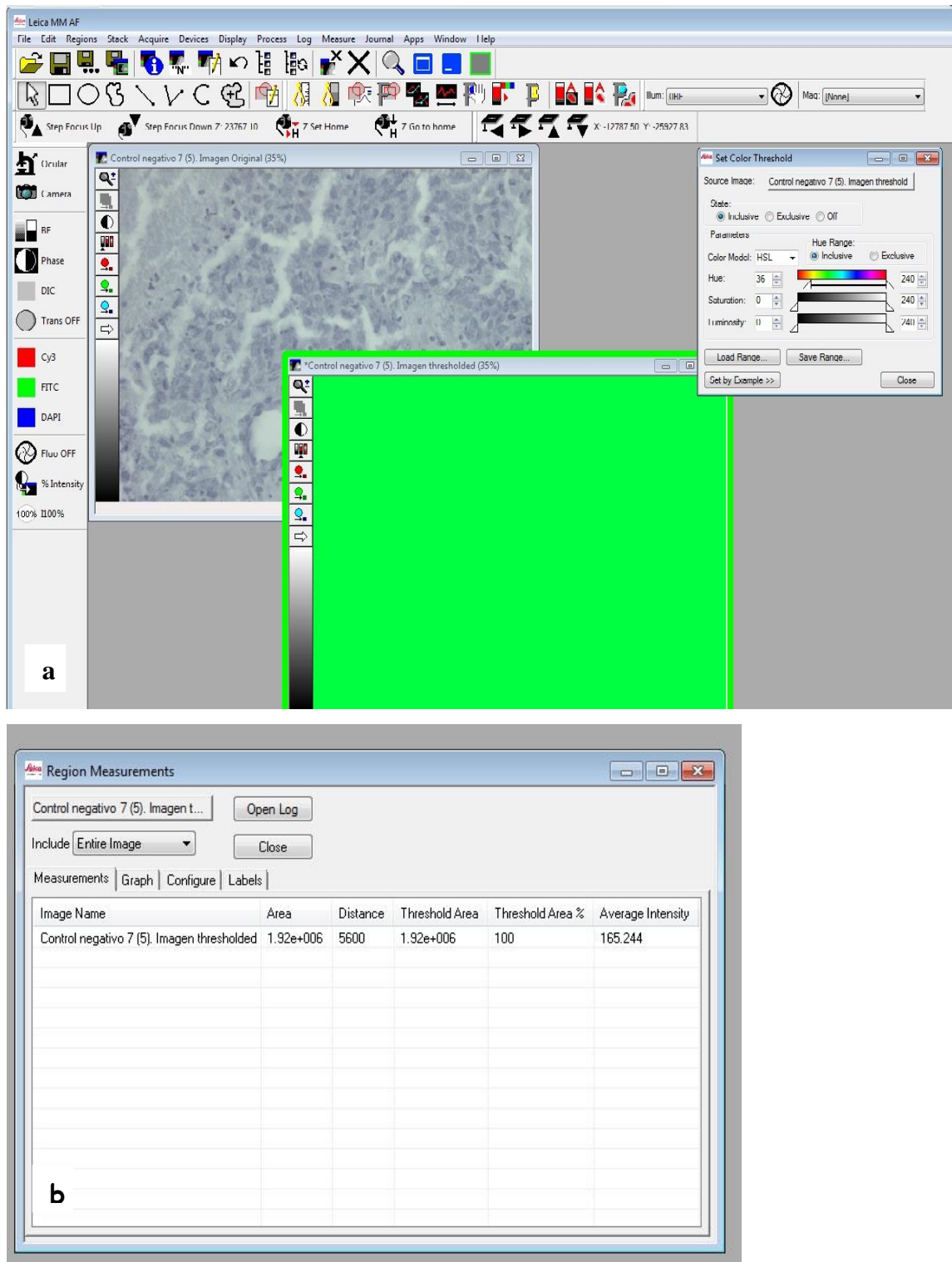


Figura 13. Display mostrando la prueba de control.

- Ventana del display mostrando el umbral de valores para una muestra de control negativo.
- Ventana del display mostrando el área threshold para una muestra de control negativo.

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VASOS, LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS INMUNOTEÑIDOS

Para llevar a cabo el conteo del número de vasos, linfocitos y macrófagos inmunopositivos se seleccionaron tres zonas por anticuerpo mediante muestreo sistemático al azar, utilizando el programa Leica Metamorph AF 1.4. Dentro de cada zona se obtuvo un valor promedio del número de vasos sanguíneos positivos, el número de células y macrófagos marcados por cada corte histológico.

ESTADÍSTICA

El estudio estadístico se realizó con el programa informático SPSS 20.0 (IBM SPSS Inc., Armonk, NY).

Se realizó el coeficiente de correlación de Pearson para cada uno de los marcadores de estudio, que posteriormente se compararon mediante la t de Student entre los coeficientes obtenidos para el análisis de correlaciones.

Por otro lado, se obtuvo la media y error estándar de todos los anticuerpos cuantificados, así como de aquellos parámetros clásicos empleados en el diagnóstico de la enfermedad. Mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, se ha estudiado si cualquiera de los marcadores, tanto de diagnóstico clásico, como del microambiente tumoral (variable dependiente) eran diferentes entre los grupos Nm23 negativo y Nm23 positivo (factor). Una vez determinado que existían diferencias entre las medias, se realizó una comparación post hoc o a posteriori con el test de Bonferroni, que permite determinar qué medias difieren, utilizando las pruebas de t para realizar comparaciones por pares entre las medias de los grupos, pero controlando la tasa de error, así se corrige el nivel de significación observado.

En todos los casos se estableció como nivel de significación $p < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS CUALITATIVOS

HISTOLOGÍA DE LOS CARCINOMAS

Tinción de Hematoxilina-eosina

A nivel microscópico esta tinción permite reconocer las características de las células distinguiendo entre tejido sano y tejido patológico. En la figura 14a se observa una sección de tejido sano, constituido por acinos mamarios compuestos por células epiteliales de forma columnar baja o cúbica. Las células tumorales presentan (figura 14b) núcleo prominente, evidente nucléolo y en algunos casos citoplasmas con bordes irregulares. Además, los acinos a veces pierden el contacto con la membrana basal con la consiguiente desorganización de la estructura normal.

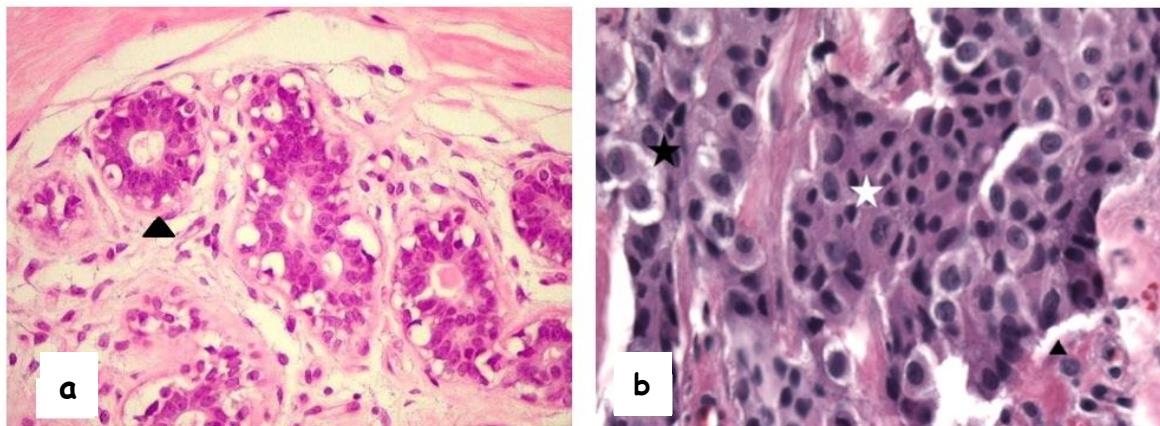


Figura 14. Comparación de una tinción de hematoxilina-eosina entre tejido normal y tejido tumoral.

- a. Histología de una sección sana de tejido mamario, constituido por acinos (triángulo relleno). Anatomía patológica. Universidad Estadual de Campinas (Brasil) (200x). [64]
- b. Histología de una sección tumoral de cáncer de mama. Se observa el tamaño del núcleo y nucléolo, la desorganización acinar (estrella blanca) y la pérdida de contacto con la membrana basal (200x).

MARCADORES TRADICIONALES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA

Los resultados obtenidos sobre los marcadores tradicionales en el diagnóstico del cáncer de mama: receptor de estrógenos, receptor de progesterona, Ki67, p53 y CerbB2 fueron proporcionados por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Madrid Montepríncipe.

Las muestras, fueron revisadas para corroborar dichos resultados así como fotografiadas con el equipo de trabajo empleado.

Expresión de estrógenos

Se aprecia inmunexpresión positiva para receptores de estrógenos (ER) en el núcleo de las células epiteliales, sin embargo, los núcleos del estroma no presentan el antígeno de los receptores de estrógenos (Figura 15a).

Expresión de progesterona

Se ve inmunexpresión positiva para receptores de progesterona (PR) en el núcleo de las células epiteliales. Los núcleos del estroma no presentan el antígeno de los receptores de progesterona (Figura 15b).

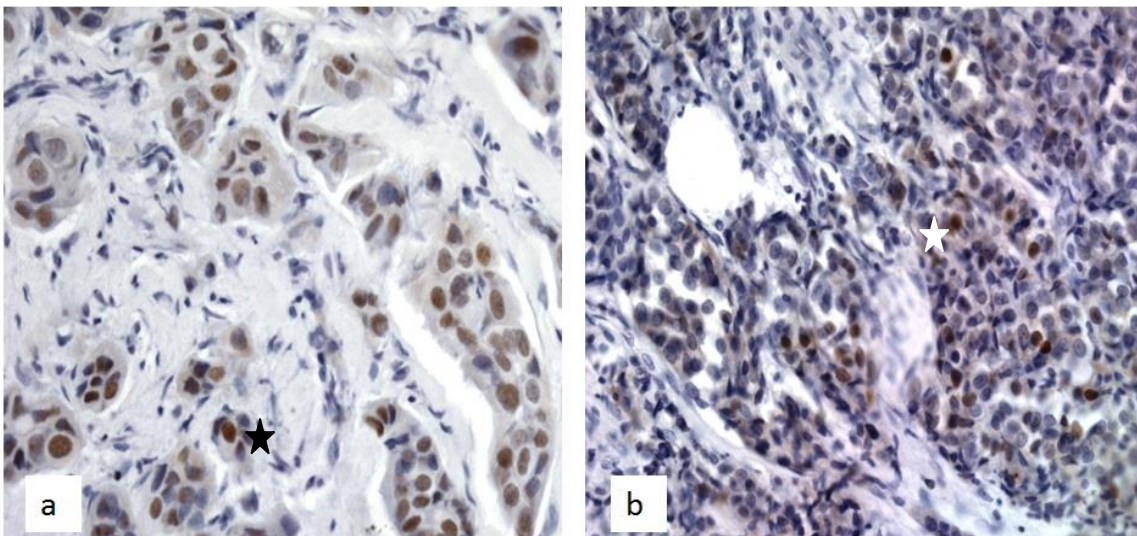


Figura 15. Inmunohistoquímica para receptores de estrógenos

- a. Se detecta inmunexpresión en el núcleo de las células epiteliales para el marcador de estrógenos en color marrón (estrella negra), mientras que el citoplasma está contrateñido de morado por la hematoxilina (200x).
- b. Se detecta inmunexpresión en el núcleo de las células epiteliales para el marcador de progesterona en color marrón (estrella negra), mientras que el citoplasma está contrateñido de morado por la hematoxilina (200x).

Expresión de p53

La inmunotinción de este marcador presenta dos patrones de expresión; de una parte, existen células con una intensidad de señal muy elevada y el núcleo intensamente teñido de marrón, y de otra, una inmunoexpresión más difusa en el citoplasma (Figura 16a).

Expresión de Ki67

Se aprecia inmunoreactividad para Ki67 en los núcleos de las células epiteliales de los acinos. Existen distintos tipos de inmunoreactividad positiva para Ki67 y se observa una gradación en la intensidad de la tinción. Así, se ven núcleos que presentan una tinción homogénea, caracterizada por un color marrón oscuro, o una tinción granular, con núcleos poco intensos y de color marrón claro (Figura 16b).

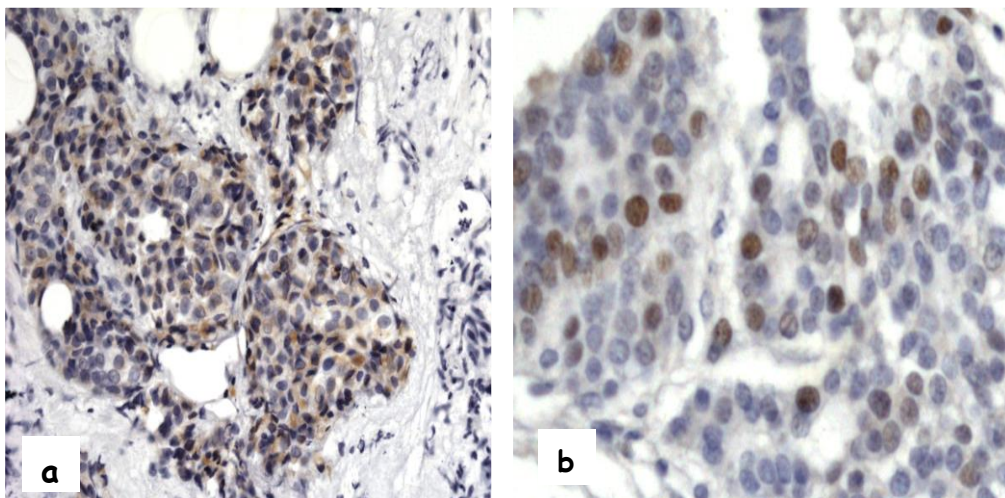


Figura 16. Inmunohistoquímica para el marcador citoplasmático p53 y el nuclear Ki67.

- a. Expresión difusa marrón en el citoplasma de p53, el núcleo está contrateñido con hematoxila (colora morado) (200x).
- b. Expresión en marrón de Ki67 en los núcleos de las células tumorales. Obsérvese la distinta intensidad de tinción. El citoplasma está contrateñido con hematoxilina. (200x).

GEN SUPRESOR DE METÁSTASIS

Expresión de Nm23

Se observa inmunoexpresión positiva para Nm23 en el citoplasma de las células epiteliales de los acinos (Figura 17a). El aspecto de la expresión de Nm23 de los carcinomas de mama exhibe diferencias cualitativas (Figura 17a y 17b) de unos casos respecto a otros. En el citoplasma de las células epiteliales que han perdido la estructura histológica normal y se disponen formando masas celulares, encontramos también expresión de Nm23 (Figura 17c).

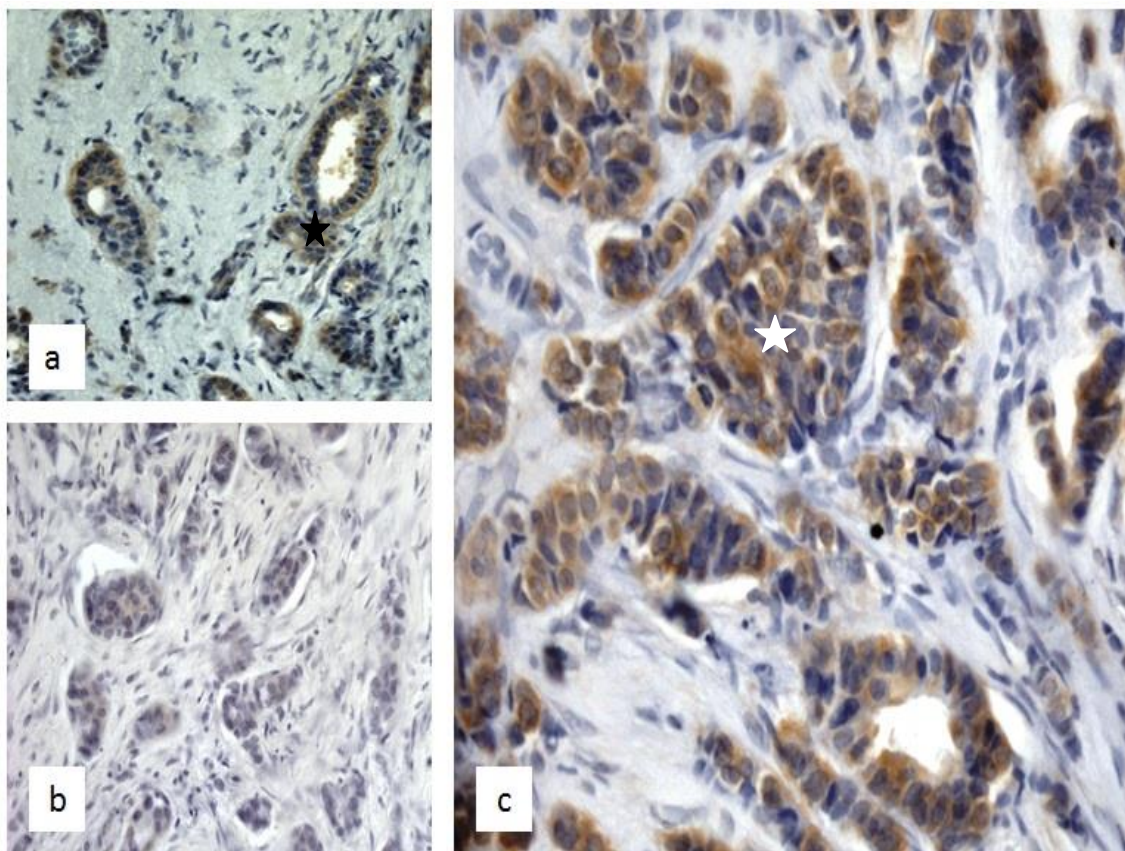


Figura 17. Inmunohistoquímica para el gen Nm23

- Se observa inmunitinción marrón en el citoplasma de los acinos, correspondientes a la expresión de Nm23. Los núcleos están contrateñidos con hematoxilina (morado). La estrella rellena señala un acino inmunteñido (200x).
- Comparación cualitativa de la inmunoexpresión de Nm23. Obsérvese la baja intensidad citoplasmática de la expresión de Nm23. (200x).
- Comparación cualitativa de la inmunoexpresión de Nm23. La estrella blanca señala una masa tumoral inmunteñida de una forma intensa con el marcador citoplasmático Nm23 (200x).

MICROAMBIENTE TUMORAL

ANGIOGÉNESIS

Expresión de CD34

Las muestras de tejidos de carcinomas de mama analizadas en el estudio, presentan inmunotinción positiva en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (no linfáticos) presentes en el estroma adyacente a la zona del tumor (Figura 18a). El número de vasos sanguíneos exhibe diferencias cualitativas en función de la muestra estudiada (Figura 18b).

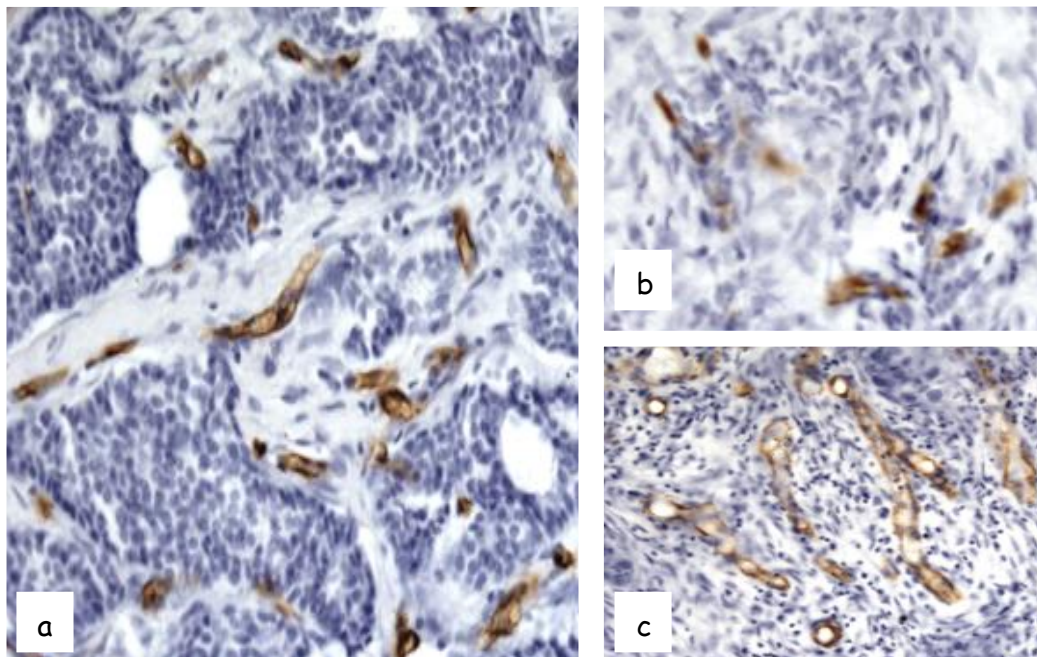


Figura 18. Inmunohistoquímica para el marcador de vasos sanguíneos CD34.

- a. Se observa inmunotinción positiva marrón en el endotelio de los vasos sanguíneos adyacentes a la masa tumoral, contrateñida con hematoxilina (morado) (200x).
- b y c. Comparación cualitativa entre el número de vasos sanguíneos, observándose diferencias en el conteo de este marcador endotelial entre unas muestras otras (200x).

ESTROMAGÉNESIS

La estromagénesis (formación de estroma) se cuantificó por densidad óptica inmunopositiva en el estroma tumoral a través del marcador de α -actina del músculo liso (α -SMA). Para obtener el dato de marcaje positivo, evitando áreas no inmunoteñidas, se relativizó al total de estroma. El área inmunopositiva exhibe diferencias cualitativas de unos casos a otros (Figura 19 a y b).

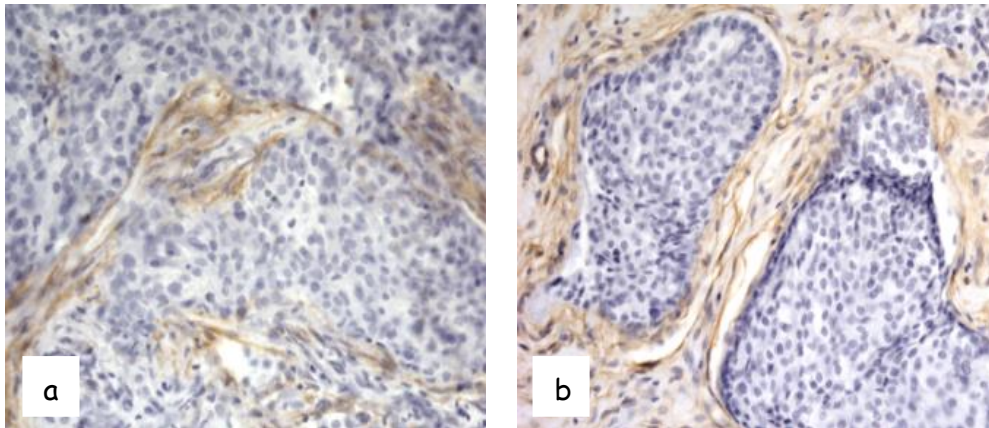


Figura 19. Inmunohistoquímica para el marcador de estroma, α -SMA.

a y b. Se observa inmunoexpresión positiva (marrón) en el estroma adyacente a la zona tumoral, contrateñida con hematoxilina (morado). Obsérvese la diferencia en el área de inmunoexpresión en función de la muestra estudiada (200x).

SISTEMA INMUNE

Expresión de CD8

En los carcinomas de mama estudiados, la inmunotinción positiva para el marcador CD8 se presenta como el recuento de número de linfocitos T citotóxicos en el seno del tumor (Figura 20).

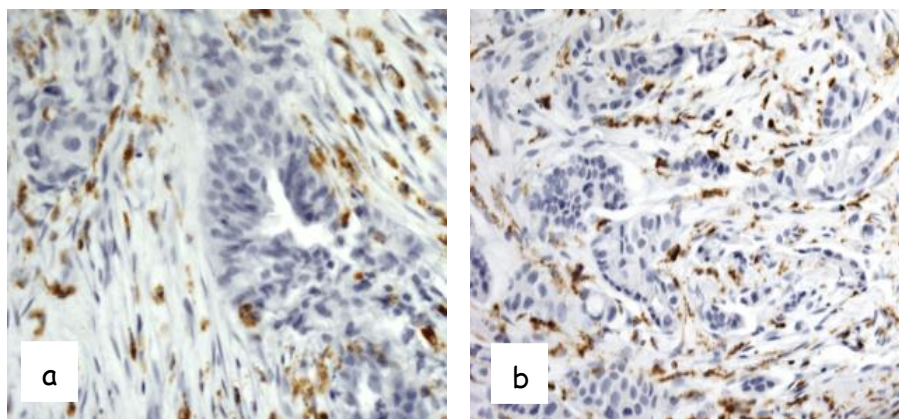


Figura 20. Inmunohistoquímica para el marcador de linfocitos CD8.

- a. y b. Muestras de carcinoma de mama empleadas en el estudio, en las que puede apreciarse el elevado número de linfocitos inmunopositivos (marrón) adyacentes a la zona tumoral, contrateñida con hematoxilina (200x).

Expresión de CD68

Los macrófagos que se encuentran dentro y alrededor de los tumores, se denominan macrófagos asociados al tumor (TAM). Se obtuvo el número de TAM en la zona cercana a la lesión tumoral. Figura 21.

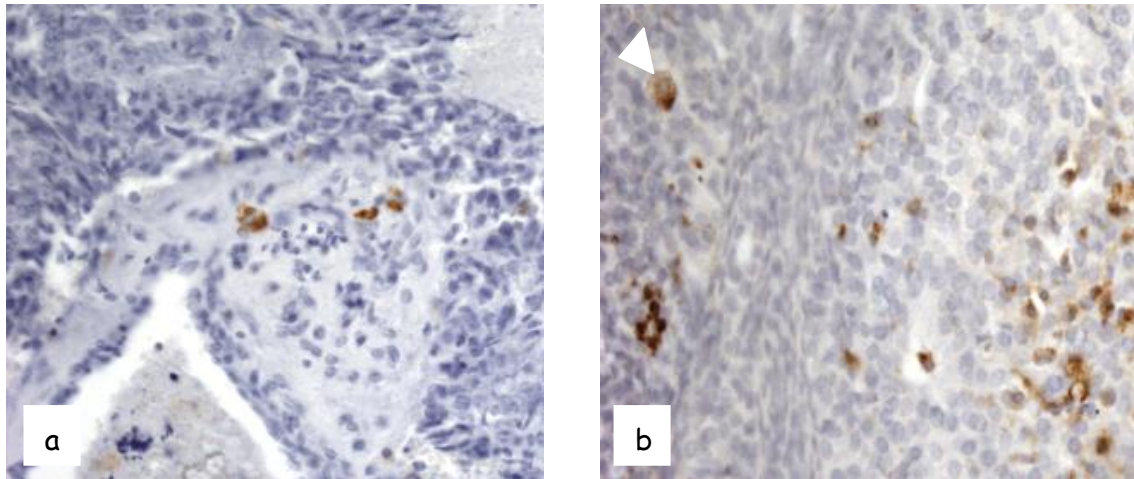


Figura 21. Inmunohistoquímica para el marcador de macrófagos CD68

- a. Expresión de CD68 (marrón) en una de las muestras de carcinoma de mama estudiadas. La zona epitelial, así como el estroma adyacente están contrateñidos con hematoxilina (morado) (200x).
- b. Obsérvese el tamaño celular del macrófago (punta de fecha blanca), con respecto a otros inmunopositivos (marrón) (200x).

MARCADOR PROMETASTÁSICO

Expresión de LPA1

En los carcinomas de mama estudiados, se observa inmunotinción positiva para LPA1, en las células epiteliales de los acinos (Figura 22a).

El marcaje de esta tinción es cualitativamente similar al de Nm23. La inmunoexpresión muestra diferencias cualitativas de unos casos a otros, sin distinción entre el tipo de tumor. (Figura 22b).

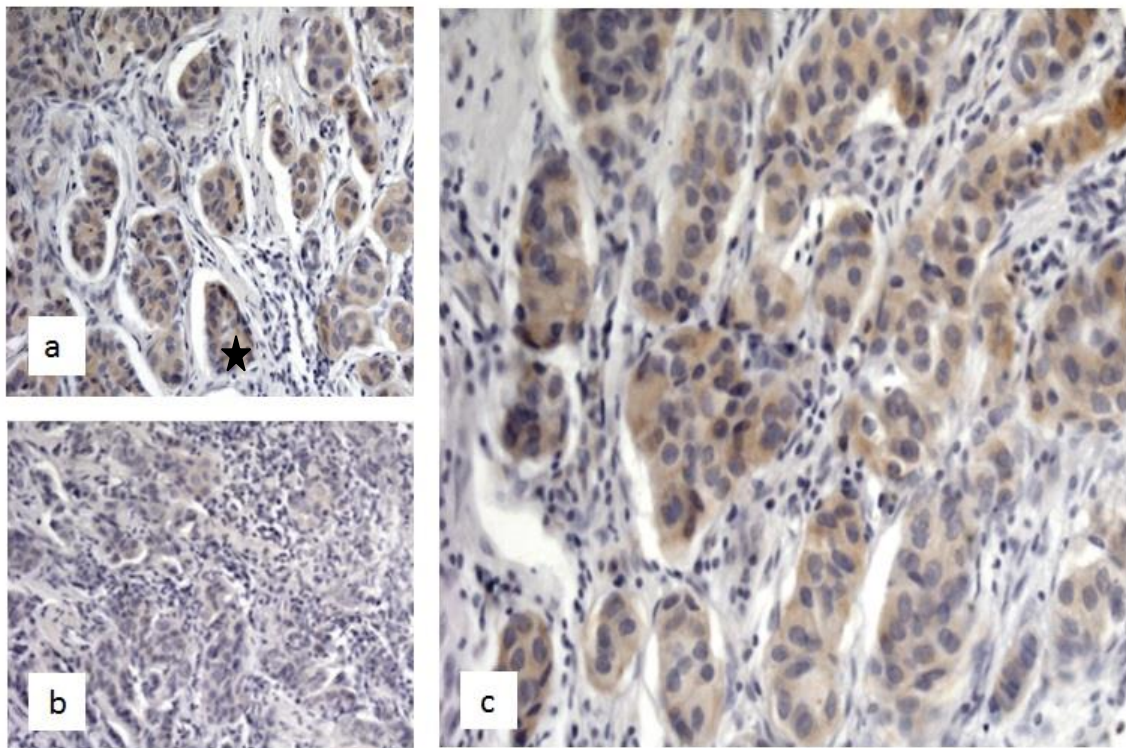


Figura 22. Inmunohistoquímica para el marcador proetastásico LPA1.

a. Se observa inmunitinción marrón en el citoplasma de los acinos, correspondientes a la expresión de LPA1. Los núcleos están contrateñidos con hematoxilina (morado). La estrella rellena señala un acino inmunoteñido (200x).

b y c. Comparación cualitativa de la inmunoexpresión de LPA1. Obsérvese la baja intensidad citoplasmática de la expresión de LPA1 (b), en contraposición a las masas tumorales teñidas de una forma intensa (c) (200x).

TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA

Ezrin

El marcador de transición epitelio-mesénquima, Ezrin, se encuentra distribuido por la membrana y el citoplasma de las células tumorales. Por ello se obtuvo su expresión por porcentaje de área inmunoteñida, en las lesiones de carcinomas de mama (Figura 23). Esta distribución membrana-citoplasma difiere de unas muestras a otras, pudiéndose encontrar mayor inmunoexpresión en una localización u otra (Figura 23).

Phospho-Ezrin/Radixin/Moesin

El patrón de marcaje del trio fosforilado perteneciente a la familia Ezrin es similar al comentado anteriormente. Existen muestras que presentan diseminación citoplasmática y/o de membrana en función de la paciente estudiada (Figura 23).

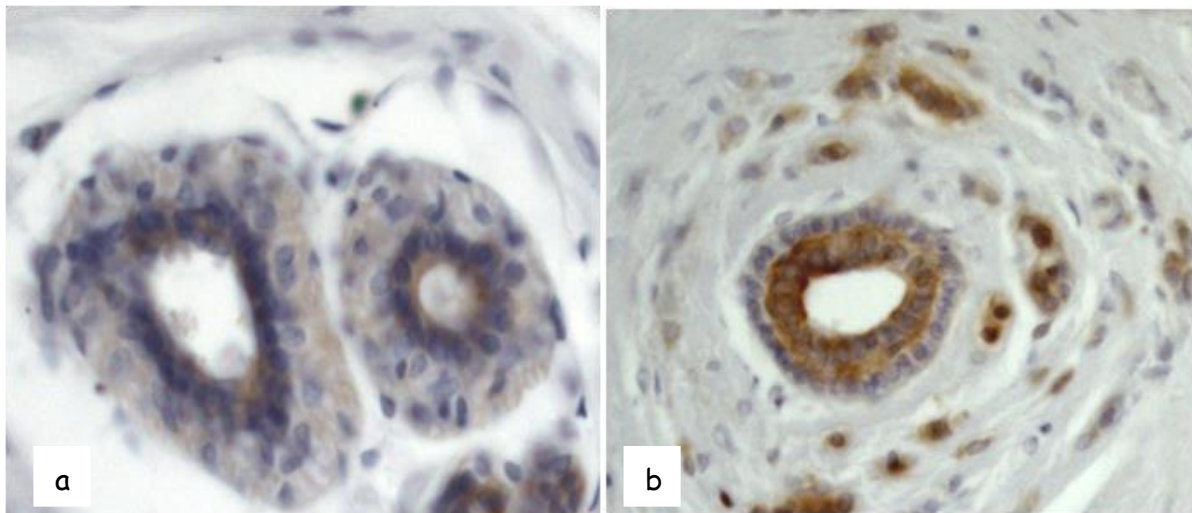


Figura 23. Inmunoquímica para el marcador de transición epitelio mesénquima Ezrin. Se observa distinta concentración del marcador (marrón) en la zona apical de los acinos mamarios (a) o citoplasmática (b) en función de la muestra estudiada. Los núcleos, así como el estroma están contrateñidos con hematoxilina (morado) (200x).

MARCADOR DE ADHESIÓN FOCAL

Phospho-Fak (pFak)

El marcador pFak, presenta inmunoexpresión positiva tanto en el citoplasma de las células, como en los núcleos de las mismas; observándose mayor intensidad de inmunoexpresión en esta localización celular, debido al mayor tamaño de los núcleos de las zonas tumorales (Figura 24).

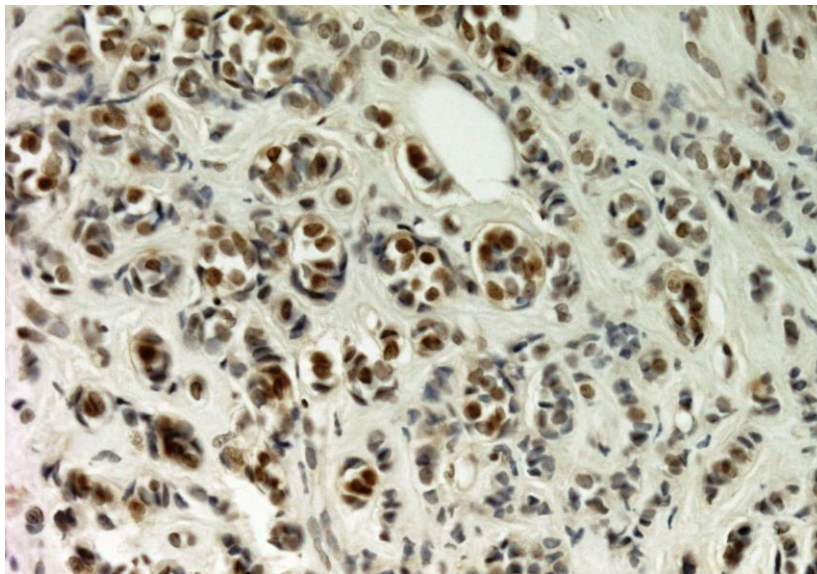


Figura 24. Inmunohistoquímica para el marcador de adhesión focal, pFak. Patrón de expresión de pFak (marrón), fundamentalmente en los núcleos de los acinos tumorales. Los núcleos que no presentan positividad, así como el estroma, se encuentran contrateñidos con hematoxilina (morado) (200x).

RESULTADOS CUANTITATIVOS

CORRELACIONES

Se procedió al estudio de correlaciones de los parámetros con el fin de observar si existe alguna relación entre ellos.

Marcadores clásicos en el diagnóstico del carcinoma de mama

Los datos obtenidos para CerbB2 se representan de forma cualitativa. Según estudios en cultivos celulares como el de Ross et al. (2012) [64] se ha podido hacer una estimación para cuantificar estos receptores, aplicando dicho criterio para llevar a cabo las correlaciones.

Se correlacionaron dichos marcadores entre sí, obteniéndose los datos observados en la Tabla 4.

Para todos los casos de estudio, los grados de libertad fueron $n-2$, siendo $n = 200$.

El marcador Ki67 correlaciona de manera inversa ($r = -0.20$; $r = -0.242$) con los marcadores hormonales ER y PR respectivamente ($p < 0.05$); lo hace de forma positiva ($r = 0.290$) con el gen supresor tumoral p53 ($p < 0.01$).

Los receptores de hormonas correlacionan de manera positiva ($r=0.543$) entre sí ($p<0.01$) y de forma inversa la expresión del proto-oncogen CerbB2. ($p<0.01$); sin embargo, sólo el receptor de estrógenos correlaciona de forma inversa con p53 ($r= -0.2$; $p<0.05$).

Tabla 4. Relación de correlación entre los marcadores de diagnóstico clásico (* $p<0.05$), (** $p<0.01$).

Marcadores		Coefficiente correlación de Pearson (r)
Ki67	ER	- 0,20 *
	PR	-0,242 *
	p53	0,290 **
ER	PR	0,543 **
	CerbB2	- 0,299 **
	p53	-0,2 *
PR	CerbB2	-0,236 **

Marcadores del microambiente tumoral entre sí.

Para comprobar si existe alguna relación entre los parámetros del microambiente tumoral se realizaron correlaciones entre dichos marcadores, obteniéndose los datos reportados por la tabla 5.

El marcador de estromagénesis SMA correlaciona de manera positiva ($r=0.399$) con el marcador de angiogénesis CD34 ($p<0.01$).

Los marcadores correspondientes al estudio del sistema inmune CD8 y CD68 correlacionan de forma negativa ($r= -0.182$; $p<0.05$).

Por otro lado, el marcador prometastásico correlaciona de manera directa con el marcador de angiogénesis ($r=0.217$; $p<0.05$) y con el marcador de transición epitelio mesénquima, Ezrin ($r=0.293$; $p<0.01$).

Por último, los marcadores correspondientes a los cambios en el citoesqueleto y forma celular, mantienen también una correlación positiva entre sí ($r=0.322$; $p<0.01$).

Tabla 5. Relación de correlación entre los marcadores de diagnóstico clásico (* p<0.05), (** p<0.01).

Marcadores		Coefficiente de correlación de Pearson (r)
SMA	CD34	0,399 **
CD8	CD68	-0,182 *
LPA1	Ezrin	0,293 **
	CD34	0,217 *
Ezrin	P-ERM	0,322 **

Gen supresor de metástasis con parámetros clásicos del diagnóstico en cáncer de mama

El marcador principal del estudio, correlaciona de forma estadísticamente significativa (p<0.05), únicamente con el gen supresor tumoral p53 (r=0.2; Tabla 6). El resto de correlaciones resultaron ser estadísticamente no significativas.

Tabla 6. Relación de correlación entre el gen supresor de metástasis Nm23 y los marcadores de diagnóstico clásico (* $p < 0.05$).

Gen supresor de metástasis	Parámetros clásicos	Coefficiente de correlación de Pearson (r)
Nm23	Ki67	0,067
	ER	-0,051
	PR	-0,098
	p53	0,2 *

Gen supresor de metástasis con parámetros del microambiente tumoral

El gen supresor de metástasis correlaciona de manera inversa con el parámetro de angiogénesis CD34 ($r = -0.319$), de forma estadísticamente significativa ($p < 0.01$); igualmente correlaciona con CD68 ($r = -0.260$) de forma inversa y estadísticamente significativa ($p < 0.01$), así como con el marcador de linfocitos CD8 lo hace de manera directa ($r = 0.294$), mostrando también significancia estadística ($p < 0.01$) (Tabla 7).

Es, también estadísticamente significativa ($p < 0.01$), la relación inversa con el marcador prometastásico LPA1 ($r = -0.459$), y con el marcador de transición epitelio mesénquima Ezrin ($r = -0.282$) ($p < 0.01$). El resto de parámetros no mostraron significancia estadística (Tabla 7).

Tabla 7. Relación de correlación entre el gen supresor de metástasis Nm23 y los marcadores de diagnóstico clásico (* p<0.05).

Gen supresor de metástasis	Parámetros microambiente tumoral	Coefficiente de correlación de Pearson (r)
Nm23	CD34	-0,319 **
	SMA	-0,125
	CD8	-0,294**
	CD68	-0,260 **
	LPA1	-0,459 **
	Ezrin	-0,282 *
	pERM	-0,194
	pFak	-0,062

INMUNOEXPRESIÓN DE NM23.

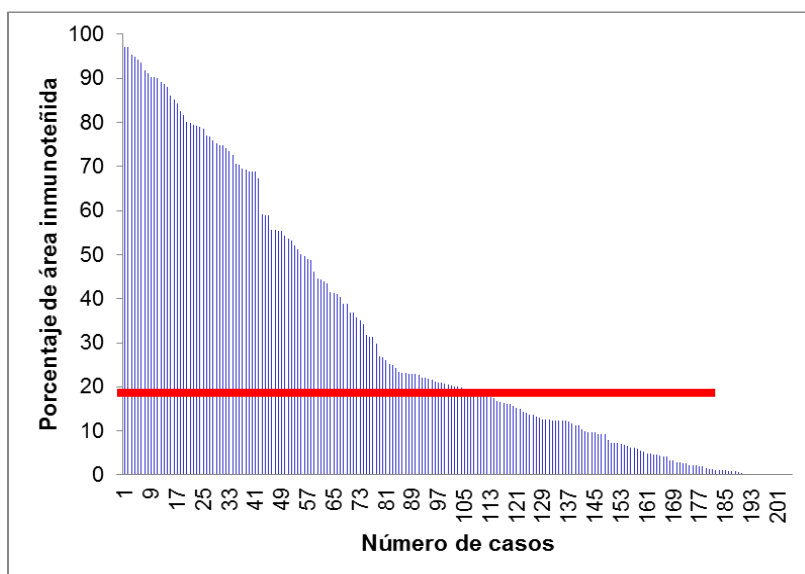
GRUPOS DE ESTUDIO

El porcentaje de área correspondiente al marcador principal de estudio, comprende rangos desde 97,22 %, para la muestra con mayor valor y 0,09% para la de menor valor empleadas en el estudio.

De acuerdo con ello, y a fin de igualar al máximo los grupos de estudio, se tomó como rango de marcaje inmunopositivo aquellas muestras que superaban el 20% de porcentaje de área.

Por tanto, el grupo considerado positivo en el estudio corresponde al rango 97,22%-20,15% formado por 103 casos.

El grupo considerado negativo en el estudio corresponde al rango 19,86%-0,09%, formado por 97 casos.

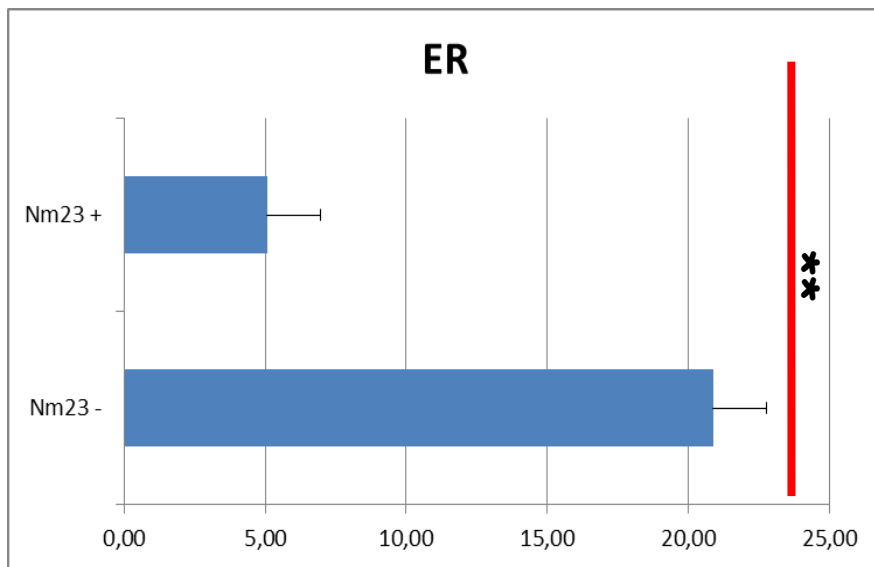


Gráfica 1. Distribución del porcentaje de Nm23 en los casos empleados en el estudio.

**RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE NM23 CON PARÁMETROS DEL
DIAGNÓSTICO CLÁSICO.**

En cuanto a estos parámetros estudiados, la ausencia o presencia de Nm23, mantiene constante estos parámetros en todos los casos, excepto en el marcador de receptor de estrógenos.

En las muestras en las que Nm23 es positivo, el número de receptores de estrógenos es estadísticamente menor ($p= 0.005$), que en aquellas en las que Nm23 es negativo (Gráfica 2).

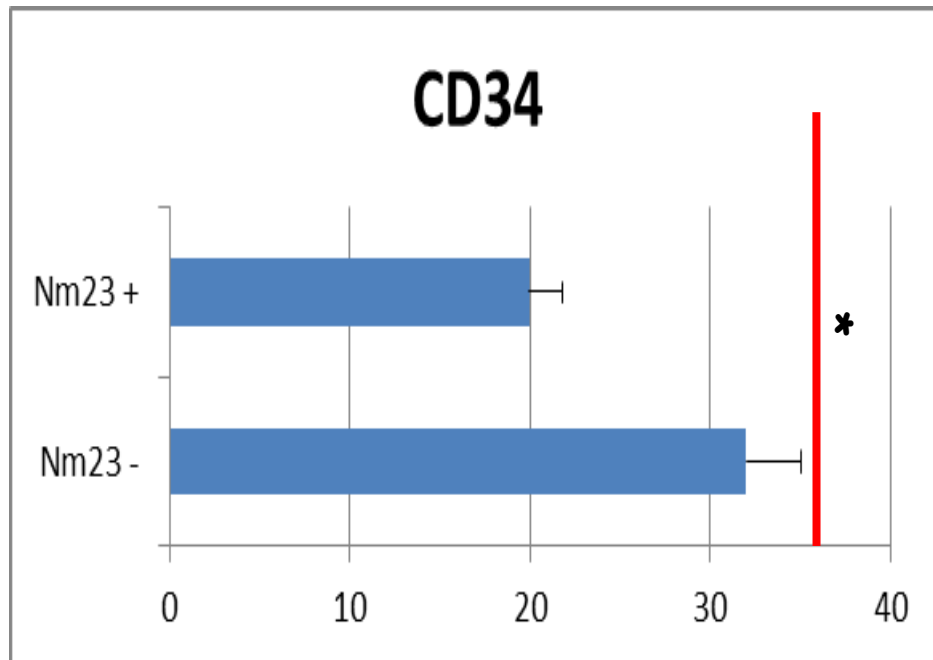


Gráfica 2. Representación de la expresión del marcador de receptor de estrógeno (ER), en función de los niveles de Nm23. En aquellos casos en los que Nm23+ el ER presenta un valor de 5.07 ± 2.04 ; mientras que cuando Nm23- el valor para el ER es de 20.88 ± 7.35 ($p=0.005$).

RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE NM23 CON PARÁMETROS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.

Parámetro angiogénico

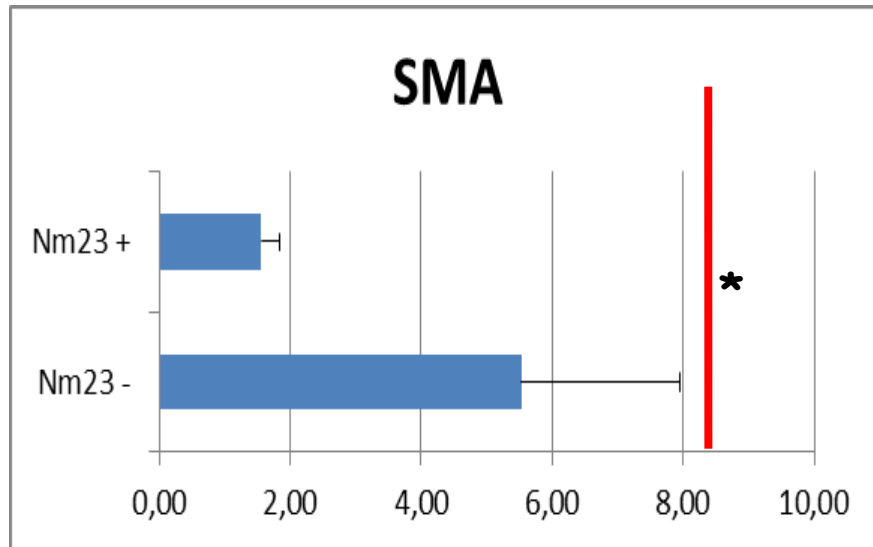
Para las muestras en las que Nm23 es positivo, el número de vasos sanguíneos es estadísticamente ($p= 0.01$) menor, con referencia a las que Nm23 es negativo. (Gráfica 3).



Gráfica3. Representación de la expresión del marcador de vasos sanguíneos (CD34), en función de los niveles de Nm23. En aquellos casos en los que Nm23+, CD34 presenta un valor de 19.94 ± 1.89 ; mientras que cuando Nm23- el valor para CD34 es de 31.98 ± 3.07 ($p=0.01$).

Parámetro estromagénico

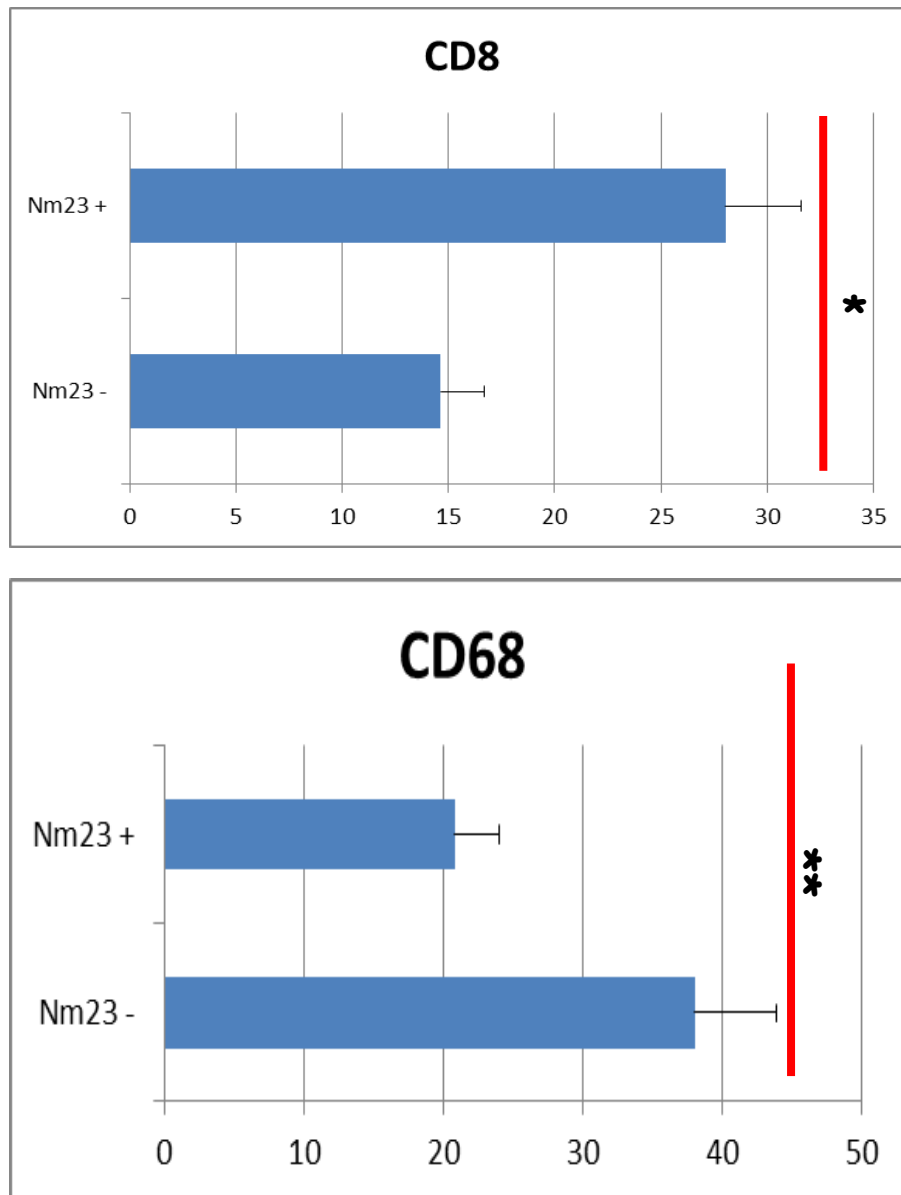
Para aquellas muestras del estudio, en las que Nm23 es negativo, se produce un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el marcador de estromagénesis SMA (Gráfica 4).



Gráfica 4. Representación de la expresión del marcador de estroma α -SMA, en función de los niveles de Nm23. En aquellos casos en los que Nm23+, α -SMA presenta un valor de 1.56 ± 0.28 ; mientras que cuando Nm23- el valor para α -SMA es de 5.53 ± 2.42 ($p=0.038$).

Parámetros del sistema inmune

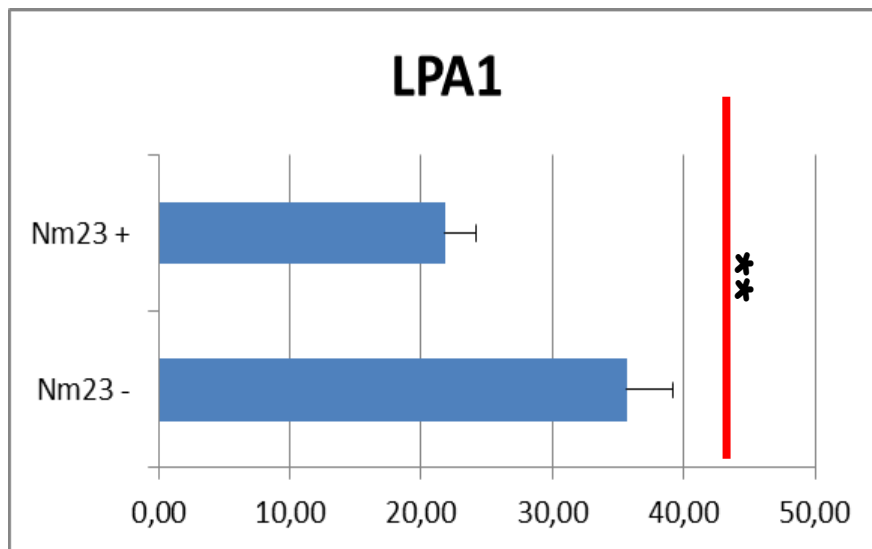
En cuanto a los parámetros que comprometen el sistema inmune, el marcador CD8 se ve favorecido en aquellas muestras en las que Nm23 es negativo (Gráfica 5); siendo este incremento estadísticamente significativo; hecho que se repite en el caso del marcador de macrófagos CD68 (Gráfica 5).



Gráfica 5. Representación de la expresión del marcador de linfocitos CD8 y de macrófagos CD68, en función de los niveles de Nm23. Para el marcador de linfocitos, en aquellos casos en los que Nm23+, CD8 presenta un valor de 28.04 ± 3.56 ; mientras que cuando Nm23- el valor para CD8 es de 14.63 ± 2.03 ($p=0.025$). Para el marcador de macrófagos, en aquellos casos en los que Nm23+, CD68 presenta un valor de 20.83 ± 3.22 ; mientras que cuando Nm23- el valor para CD68 es de 38.03 ± 5.83 ($p=0.005$).

Parámetro prometastásico

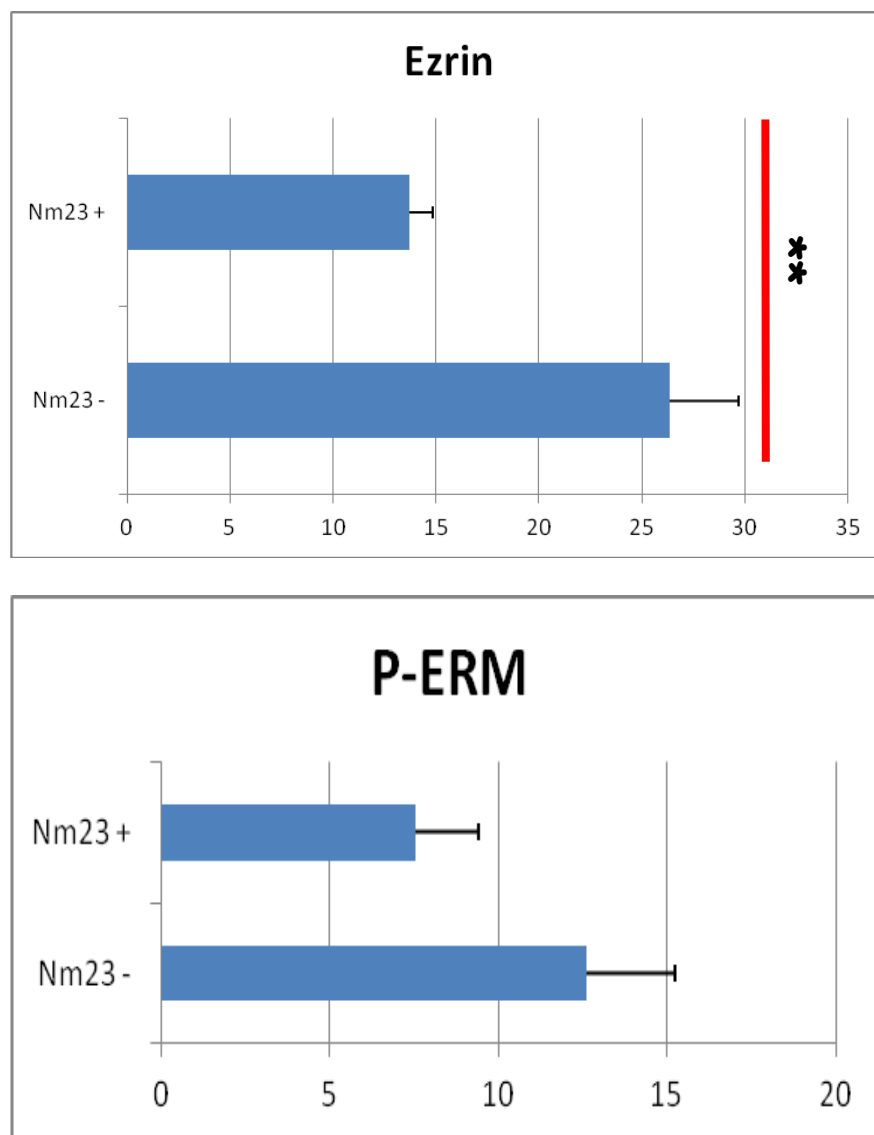
Para las muestras en las que Nm23 es positivo, el marcador LPA1 es menor, de forma estadísticamente significativa, en comparación con aquellas en las que Nm23 es negativo (Gráfica 6).



Gráfica. Representación de la expresión del marcador prometastásico LPA1, en función de los niveles de Nm23. En aquellos casos en los que Nm23+, CD8 presenta un valor de 21.82 ± 2.37 ; mientras que cuando Nm23- el valor para LPA1 es de 35.65 ± 3.55 ($p=0.001$).

Parámetros transición epitelio-mesénquima

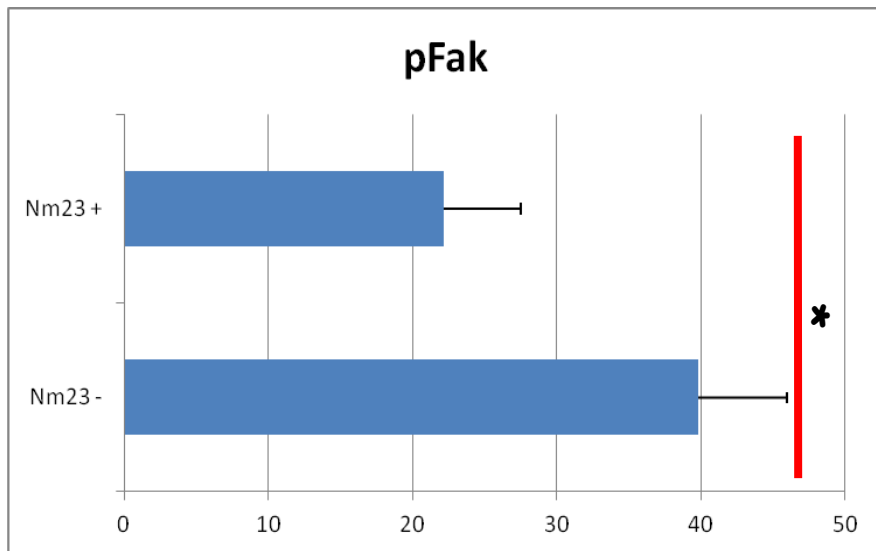
En cuanto a los parámetros que están implicados en la remodelación del citoesqueleto, y con ello la transición epitelio-mesénquima, el marcador Ezrin es mayor en aquellas muestras en las que Nm23 es negativo; incremento que es estadísticamente significativo (Gráfica 7). Sin embargo, para el marcador P-ERM este aumento no presenta significancia estadística. Obsérvese que estos dos marcadores, presentan una duplicación cuando el gen supresor de metástasis es negativo. (Gráfica 7).



Gráfica 7. Representación de la expresión de los marcadores de transición epitelio mesénquima Ezrin y P-ERM, en función de los niveles de Nm23. En aquellos casos en los que Nm23+, Ezrin presenta un valor de 26.36 ± 3.34 ; mientras que cuando Nm23- el valor para Ezrin es de 13.70 ± 1.16 ($p=0.001$). Para P-ERM, en aquellos casos en los que Nm23+, presenta un valor de 12.65 ± 2.61 ; mientras que cuando Nm23- el valor para P-ERM es de 7.56 ± 1.86 ($p=0.102$; no significativo).

Marcador de adhesión focal (pFak)

El marcador implicado en la adhesión focal, pFak, se encuentra disminuido cuando Nm23 es positivo, de manera estadísticamente significativa, con respecto a las muestras en las que Nm23 es negativo. (Gráfica 8).



Gráfica 8. Representación de la expresión del marcador de adhesión focal pFak, en función de los niveles de Nm23. En aquellos casos en los que Nm23+, pFak presenta un valor de 22.20 ± 5.33 ; mientras que cuando Nm23- el valor para pFak es de 39.83 ± 6.16 ($p=0.035$).

DISCUSIÓN

ELECCIÓN DEL TIPO DE CARCINOMA

En el presente trabajo, en primer lugar, se ha elegido como grupo mayoritario de estudio al tipo histológico diagnosticado como carcinoma ductal infiltrante, ya que es la forma más frecuente de cáncer de mama, constituyendo un 80% de todos los casos diagnosticados. Se ha observado que el 74 por ciento de las biopsias estudiadas corresponden a este tipo tumoral; por tanto, refleja, en gran medida, la realidad clínica.

Diversos autores [66-68] han demostrado que en función del diagnóstico histopatológico, los carcinomas presentan características y comportamientos distintos, aunque no está claro cuál de los tipos presenta mejor pronóstico. [69, 70]

En nuestro estudio, el porcentaje de mujeres mayores de 50 años fue superior; presentándose una relación de 19 mujeres menores o iguales a 50 años por cada 31 que rebasan esta edad. Hecho que constata que la población de riesgo para esta enfermedad está comprendida por encima de los 50 años. [71]

MARCADORES TRADICIONALES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA

En 2005, el Comité de Consenso sobre el Tratamiento adyuvante para el cáncer de mama en fases tempranas, recomendó que la primera consideración para seleccionar el tipo de tratamiento ha de ser la respuesta endocrina. El reconocimiento de este hecho ha aumentado la importancia de la evaluación patológica en cuanto a la información biológica. [72]

Por esta razón, el receptor de estrógenos ha sido el indicador pronóstico más ampliamente estudiado hasta la fecha. Autores como Orvieto et al. (2002), Kasami et al., (2008) [73,74] han informado sobre una relación positiva entre los receptores de estrógenos, el aumento de intervalo libre de enfermedad y una mejor supervivencia de los pacientes. Los receptores de estrógeno y la progesterona son actualmente los factores predictivos más utilizados para la elección de tratamiento hormonal. [72]

Al observar el porcentaje de pacientes que presentan positividad para los receptores hormonales, se ha obtenido que un 77% de ellas muestran inmunoreactividad para el receptor de estrógenos y 72% para el de progesterona. Estos datos son similares a los aportados por otros autores como Lu y col (1996). [75]

Las correlaciones para los receptores hormonales obtenidas en nuestro estudio (Tabla 4) mostraron la estrecha relación existente entre el marcador estrogénico y el progestágeno ($r = 0.543^{**}$); la importancia clínica del receptor de estrógenos, se relaciona con el hecho de que su presencia identifica tumores que son sensibles al tratamiento hormonal con el antagonista correspondiente. Cerca de un 50-60% de las pacientes responden favorablemente a este tipo de terapia endocrina. Un porcentaje

mayor de tumores responde, si se expresan tanto el receptor de progesterona como el de estrógeno y la intensidad de tinción del receptor de estrógeno es alta. Es así como se ha observado que pacientes con tumores que expresan receptores de estrógenos tienen mayor supervivencia, un período mayor libre de enfermedad, cuando se les compara con pacientes que tenían tumores negativos para este receptor. Esta es una ventaja que es independiente del estado de los ganglios axilares. No obstante, la utilidad del receptor de estrógenos como valor pronóstico independiente, está disminuida por su asociación con otros indicadores de buen pronóstico. Los tumores positivos para el receptor de estrógenos generalmente tienen características histopatológicas de bajo grado, además de grado nuclear e índice de proliferación bajos. La influencia de la terapia en el pronóstico es difícil de excluir, porque las pacientes positivas para este receptor, son habitualmente tratadas y se benefician de la terapia hormonal, tanto en forma coadyuvante como paliativa. [76, 77]

Así también, se ha obtenido que el 11% de las pacientes incluidas en el estudio mostraron positividad para el gen supresor tumoral p53; éste se encuentra implicado en un punto de control del ciclo celular G1 y es el gen más frecuentemente mutado en cáncer humano. [78] Además juega un papel crítico en una variedad de respuestas inhibitoras del crecimiento, como la diferenciación y apoptosis.

La literatura nos habla de que el porcentaje de mujeres que presentan este gen mutado es variable en función de la clasificación molecular que se lleve a cabo, así para los tumores de tipo luminal a, menos del 15% presentan positividad para este gen. [79, 80]; para los clasificados como luminal b sobre el 30% de las pacientes presentan positividad para este gen y para los tumores considerados triple negativo la mayoría de las pacientes presentan mutación en este gen. [79-81] En nuestro estudio nos encontramos con biopsias muy precoces en el momento del diagnóstico siendo de grado I, II, por lo que el dato de p53 está en consonancia con estudios de autores anteriores.

Además, el estudio de correlaciones (Tabla 4), también nos muestra que p53, tiene relación inversa con el receptor de estrógenos (-0.2*), como otros autores han postulado anteriormente. [82] En síntesis, la expresión de p53 mutante tiene una influencia negativa en la supervivencia total y en el tiempo libre de enfermedad en el caso del cáncer de mama. [83]

Ki67 es un marcador que se expresa en las fases activas del ciclo celular G1-, S-G2 y la fase de mitosis y se ausenta en la fase G0. [84]

El 13% de las pacientes incluidas en este estudio, mostraron unos niveles altos de Ki67 (más del 20% de los núcleos tumorales presentan positividad para Ki67), indicando así una alta tasa de crecimiento celular, poniendo de manifiesto que la amplia mayoría de las pacientes estudiadas poseen un bajo crecimiento celular.

Además Ki67 correlacionó de manera inversa con el receptor de estrógenos y progesterona (-0.20* y -0.242* respectivamente) y de manera directa con p53 (0.290*). (Tabla 4).

Índices altos de Ki-67 están asociados con una baja diferenciación histológica y con la ocurrencia de metástasis ganglionares. Un estudio de Veronese et al., [85] quienes usaron el 20% de las células con tinción nuclear como límite entre índices de proliferación alta y baja, encontró que este marcador predijo la supervivencia a cuatro años independientemente del estado ganglionar y del estado de los receptores de estrógeno. Al estudiar un grupo de pacientes con metástasis axilares se encontró una diferencia significativa en el tiempo libre de enfermedad en las pacientes que tenían Ki-67 positivo y receptores estrogénicos negativos al compararlos con el grupo de Ki-67 negativo y receptores estrogénicos positivos. [85, 86]

HER2 o *C-erb-B2* es un oncogén que codifica para un receptor transmembrana tirosin-quinasa. Está implicado en la mayoría de los tumores de mama y constituye, hoy en día, una diana terapéutica que se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad. [65] Como se comentó, típicamente, este receptor suele tener un tipo de cuantificación cualitativa y para poder establecer una correlación entre este marcador y los restantes estudiados, se ha cuantificado teniendo en cuenta lo propuesto por Ross et al., (2012) [65]

Diversos estudios han demostrado que un 25-30% de todos los cánceres de mama sobre expresan C-erb-B2; [87] los datos sugieren que los tumores con estos caracteres presentan también un mayor crecimiento de células tumorales y producen metástasis con mayor rapidez que los tumores que no presentan sobreexpresión. La patogenia estaría dada porque la proteína HER2 mediaría la transformación de las células normales en tumorales, transmitiendo señales de crecimiento desde la membrana celular al núcleo, aumentando la división celular. [86, 88-89]

En nuestro estudio, el 74% de nuestras pacientes presentan negatividad (0, 1, 0-1+) para el oncogén HER2; mientras que sólo el 10% presenta fuerte positividad (3, 2-3+) siendo un poco inferior al porcentaje reportado por la literatura.

Además, el estudio de correlaciones (Tabla 4) muestra relación inversa con los receptores hormonales (-0.299** para el receptor de estrógenos y -0.236** para el receptor de progesterona), hecho que concuerda con lo expuesto por diversos autores que afirman que la expresión del gen está relacionada con un mal pronóstico, debido a resistencia a la quimioterapia combinada y a la terapia hormonal

Debido al programa de screening llevado a cabo en los países desarrollados, el cáncer de mama se diagnostica en unas fases muy precoces de enfermedad, y aunque a priori el pronóstico es favorable y existe una alta tasa de curación, hay un porcentaje de pacientes que desarrollan metástasis a distancia. Por tanto, existen cambios en el seno del tumor así como en el estroma circundante, que no son reconocidos hasta el momento

y podrían dilucidar los cambios que se están sucediendo, antes incluso, de que se dé una masa tumoral metastásica detectable.

La oncología clínica contemporánea se centra en el conocimiento del microambiente tumoral en diferentes fases clínicas, que contribuyen a la progresión del cáncer y la metástasis, [90] la comprensión de la relación de las células cancerosas con diversos factores en el microambiente es un requisito previo esencial para la terapéutica racional. [91]

Descubrimientos recientes en esta área incluyen: mecanismos de regulación de las células de cáncer en nichos metastásicos; identificación de enlaces funcionales entre el fondo biológico en órganos y la incidencia y progresión del cáncer y la metástasis; la implicación en la formación de micrometástasis de factores inflamatorios, la hipoxia y el estrés oxidativo en la progresión del cáncer; hallazgos relacionados con el origen y las características únicas de los fibroblastos asociados al cáncer, los macrófagos y las células derivadas de la médula ósea; la arquitectura del tejido y de la matriz extracelular asociada a estromagenesis tumoral y la angiogénesis. [90]

Por ello, en este trabajo, se ha llevado a cabo el estudio de una serie de marcadores que están relacionados con la diseminación tumoral, más concretamente, posibles marcadores histológicos relacionados con la angiogénesis, estromagenesis, molécula prometastásica y cambios sucedidos en la matriz extracelular.

MARCADORES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

En primer lugar, se han relacionado los marcadores tumorales entre sí, para comprobar la posible relación que existe entre cada uno de ellos.

Angiogénesis y estromagenesis

La angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasos preexistentes y es un fenómeno esencial para el crecimiento del tumor; de hecho si el fenómeno de angiogénesis falla en un tumor de 2-3 mm, alrededor de 10^6 células dejarán de crecer y perderán la capacidad de metástasis. [92]

Los estudios han demostrado una diferencia estadísticamente significativa, entre la relación del aumento de la densidad de microvasos y el riesgo de metástasis y con ello se ha disminuido la supervivencia en este tipo de pacientes con tumores de mama. [93-95]

Como marcador de microvasos (MVD) se ha usado CD34 ya que este se considera altamente sensible y su uso está ampliamente extendido. [96]

El número de microvasos contados en el estudio presentaba gran heterogeneidad, observándose pacientes con ningún marcaje para dicho anticuerpo y muestras con 100

microvasos por campo contado. Indicándonos que el proceso de angiogénesis difiere de unas pacientes estudiadas a otras.

Muchos investigadores sostienen que el estroma tumoral juega un papel crucial en la iniciación, progresión y formación de metástasis. Los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) son los componentes más frecuentes del estroma tumoral, especialmente en cáncer de mama, [97-99] debido a que los fibroblastos son las células más abundantes en el tejido conectivo. [100] Estos CAFs, comparten muchas similitudes con los fibroblastos activados que se encuentran en las heridas y los sitios inflamatorios.

En los últimos años, los fibroblastos activados se han encontrado en la cicatrización de heridas y en procesos como la fibrosis, observándose un aumento de la expresión de alfa actina de músculo liso (α -SMA) y fibronectina. [100]

El origen de este tipo celular, así como los marcadores del mismo, están en controversia. Algunos autores sugieren que el origen se da a través de fibroblastos residentes activados, o de células mesénquimales, como lo expuesto por el trabajo de Spaeth EL et al en 2009 [101] que mostró *in vivo* como las células madre mesenquimales localizadas en una masa tumoral se han diferenciado en CAFs y pericitos, presentando altos niveles de α -SMA.

Por otra parte, se ha observado que los CAFs pueden surgir a partir de células endoteliales por la transición endotelial-mesenquimal con la pérdida de CD31 y mayor expresión de α -SMA y la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1). [102]

En la actualidad los marcadores aceptables de los CAF consisten en altas expresiones de: α -SMA, FSP-1, FAP, receptor del factor α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina o pérdidas en la expresión de: CAV-1, PTEN, p21, o TP53. [97]

En nuestro estudio, los niveles de α -SMA, tomaron valores diversos y heterogéneos, presentando patrones estromagénicos elevados o disminuídos en función de la muestra estudiada, indicándonos que la expresión de este tipo de marcador es independiente del tumor estudiado.

El estudio de correlaciones (Tabla 5), mostró una relación directa ($r=0.399^{**}$) entre el marcador empleado para el marcaje angiogénico y el de estromagénesis, hecho que corrobora la investigación realizada por Pavlakis K et al. (2008) [46] donde mostraba una correlación estadísticamente significativa ($p<0.05$) para el número de MVD y α -SMA en lesiones pre-invasivas de cáncer de mama.

Sistema inmunitario

Las células tumorales están rodeadas de infiltrados celulares compuestos, principalmente, por linfocitos B, linfocitos T, natural killers (NK) y macrófagos. Hay una fuerte evidencia en estudios de células murinas, que indica que la adaptación del sistema inmunológico puede eliminar tumores incipientes, siendo los propios antígenos tumorales los que impulsan el desarrollo de las respuestas inmunitarias adaptativas. **[103]**

La mayoría de los linfocitos del infiltrado tumoral tienen el fenotipo T CD3+, el cual incluye: linfocitos CD4+ helpers (colaborador) y linfocitos T CD8+ citotóxicos, estos últimos, destruyen las células tumorales como resultado de la activación de la apoptosis, por tanto, se piensa que tienen efectos en el crecimiento tumoral, **[104]** de ahí que en este estudio hayamos incluido este subtipo como marcador linfocitario. El número de linfocitos contados en nuestro estudio resultó ser heterogéneo y exhibió diferencias cuantitativas en relación de una paciente u otra.

Los macrófagos se conocen como un componente de la infiltración leucocitaria fundamental. La acumulación de pruebas sugiere que estos macrófagos asociados a tumores (TAM) promueven activamente todos los aspectos de la iniciación del tumor, el crecimiento y el desarrollo; estas células representan un objetivo potencial para la terapéutica frente al cáncer. **[105,106]**

Los macrófagos pueden diferenciarse en el subtipo M1 pro-inflamatorios y M2 anti-inflamatorios. Los del tipo M1, activan las células de tipo T helper 1 (Th1), tienen la capacidad de matar a los agentes patógenos y son anti tumorales, el subtipo M2 está implicado en la cicatrización de heridas y regula negativamente las reacciones inflamatorias, promueve la angiogénesis, recluta fibroblastos y está implicado en la remodelación del tejido conectivo, además tiene una débil capacidad antitumoral. **[107]**

En 2002 Bingle et al. **[108]** realizó una revisión de los artículos publicados hasta la fecha, sobre la relación de los TAM en distintos tipos de cánceres (incluyendo el cáncer de mama), concluyendo que la mayor parte de las publicaciones indicaban una correlación negativa entre una alta infiltración de TAM y los resultados de supervivencia de los pacientes. Todos los artículos revisados por Bingle, excepto uno, utilizaban CD68 como marcador de TAM, a pesar de marcar las dos subpoblaciones macrófagos. Por tanto CD68 es el anticuerpo más empleado para detectar TAM y correlacionarlo con el pronóstico de la enfermedad, tal y como indica, también, un trabajo reciente de Zhang et al. (2013). **[109]**

En nuestro estudio el número de macrófagos fue heterogéneo, presentándose nivel elevado o bajo de este tipo celular, con independencia de la muestra. En cuanto al estudio de correlaciones (Tabla 5) con el microambiente tumoral, las dos poblaciones pertenecientes al sistema inmune presentaron un coeficiente de correlación de Pearson

$r = -0.182$, siendo no significativo ($p = 0.055$); aunque se aprecia una ligera tendencia, ésta no resultó estadísticamente significativa.

Marcador prometastásico

Como se comentó anteriormente, en la cascada metastásica participan una serie de moléculas que la promueven, en este estudio nos referimos como marcador prometastásico al receptor del ácido lisofosfatídico 1 (LPA1).

LPA1 es un receptor acoplado a la proteína G para el ácido lisofosfatídico, [110] está presente en niveles submilimolares en suero, [111] su sobreexpresión en las glándulas mamarias de ratones transgénicos promueve la tumorigénesis, [112] pero los estudios han demostrado que la señalización mediada por LPA1 también estimula la adhesión de células tumorales, la motilidad, la invasión y la metástasis. [112]

La cantidad de LPA1 se tomó como porcentaje de área inmunoteñida con unos valores comprendidos, para las muestras estudiadas, entre el 97% del citoplasma tumoral y el 1% del mismo.

En el año 2008, un estudio llevado a cabo por Shuangxing Y et al. [113] en cáncer de ovario, concluyó que: el LPA1 promueve el crecimiento y la supervivencia de dicho cáncer, estimula la migración y la invasión de células siendo ellas las que pueden producir LPA, formando un bucle autocrino y con ello mediar el crecimiento, la supervivencia, y la motilidad de las células tumorales, además, la acción de LPA incrementa la expresión de factores angiogénicos y metastásicos, tales como IL-6, IL-8, VEGF, uPA, y la COX-2, y aumenta la invasión y con ello metástasis.

En relación a estos dos últimos puntos, en nuestro estudio (Tabla 5) el LPA1 muestra una correlación directa con el marcador angiogénico ($r = 0.217^*$) y también la presenta con el marcador de transición epitelio mesénquima Ezrin ($r = 0.293^{**}$), poniendo de manifiesto, efectivamente, que el biomarcador prometastásico tiene implicaciones en la angiogénesis tumoral, así como en los cambios del citoesqueleto que promueven el movimiento celular.

Moléculas implicadas en la transición epitelio-mesénquima

Ezrin es miembro de la familia de proteínas Ezrin / Radixin / Moesin (ERM). Las proteínas ERM interactúan con proteínas de membrana y del citoesqueleto de actina, y participan en la organización de la estructura membrana-citoesqueleto, además también juegan un papel clave en la señalización celular. [114]

Se cree que la familia ERM participa en la regulación de una variedad de funciones celulares, incluyendo las interacciones con la matriz extracelular, la comunicación célula-célula, la apoptosis, la carcinogénesis y la metástasis. [114] Se ha propuesto, que el aumento de expresión de Ezrin se asocia con la progresión tumoral y

la metástasis en diversos tipos de tumores, incluyendo osteosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinomas de páncreas, ovario, endometrio y mama. [114, 115]

Como se comentó en la introducción, la forma de Ezrin que se presenta en tejidos normales es la fosforilada, encontrándose, en la zona apical de la célula, manteniendo así la polaridad de la misma. [115] Es Ezrin citoplasmático el que se ve aumentado en los tumores primarios, permitiendo la despolarización celular, de hecho existe una correlación positiva entre el aumento de Ezrin citoplasmático y las características adversas del tumor en cánceres de mama. [115,116] La localización en la membrana apical se encuentra en el epitelio normal de la mama y se asocia con características favorables de los tumores de dicho órgano. [115]

En nuestro trabajo, se ha medido Ezrin citoplasmático, mediante porcentaje de área inmunoteñida, encontrándose unos valores comprendidos entre marcaje negativo (0%) y el 60% del área inmunopositiva.

Así también, hemos estudiado la inmunoexpresión de Phosho-Ezrin Radixin Moesin en la membrana de los acinos tumorales, encontrándose valores comprendidos entre el 0-30% del área inmunopositiva. Como se comentó en la introducción, este porcentaje menor que el encontrado en Ezrin, puede deberse, a que se ha observado, en diversos cánceres femeninos (ovarios y endometrio) que P-ERM se encuentra presente, en mayor medida, en la célula metastásica y no en el tumor primario. [57, 117] Además, en el estudio de correlaciones (Tabla 5) se observó una relación directa entre ambos marcadores ($r= 0.322^{**}$).

GEN SUPRESOR DE METÁSTASIS

El objetivo principal de este estudio, es observar cómo se comporta un gen supresor de metástasis en lesiones precoces de tumores primarios de mama y relacionar tanto con los parámetros empleados en la actualidad para el diagnóstico de la enfermedad, como con parámetros del microambiente tumoral, con la finalidad de poder predecir el proceso de metástasis de forma anticipada a la manifestación clínica.

El gen supresor de metástasis empleado ha sido Nm23, se trata del primero de ellos identificado en 1988 [23] en siete líneas celulares derivadas de un solo melanoma murino K-1735 en ratones desnudos. Todas las líneas celulares formaron tumores primarios, pero variaron ampliamente en el número de metástasis presentes en el punto final del experimento. Estudios de expresión génica identificaron un ADNc candidato, Nm23, cuya expresión estaba desregulada en cinco líneas de células altamente metastásicas. La expresión ectópica de Nm23 suprime la metástasis sin alterar el crecimiento del tumor primario. [118] Estos resultados proporcionan la evidencia, de que la expresión de genes específicos en células tumorales que han adquirido la capacidad de formar metástasis, así como la reintroducción de los mismos, puede

suprimir el fenotipo metastásico. Los enfoques terapéuticos para restaurar la función antimetastásica de Nm23-H1 (el primero de la familia de ocho NM23 homólogos humanos) se han intentado utilizando diferentes estrategias. [118]

Cómo se ha dicho anteriormente, las actividades en las que participa este gen supresor de metástasis son diversas, pero su implicación clínica aún se desconoce. [22]

Lo que se ha observado es que Nm23 juega un papel importante en la progresión del cáncer de mama. [119] Varios investigadores han encontrado una asociación inversa entre la expresión de Nm23, el pronóstico de la enfermedad y la metástasis, en varios tipos de cánceres, relacionándola con el estadio y el pronóstico de la enfermedad; entre ellos el estudio de Amanjit et al., (2008) [120] en el que sugieren que la pérdida de expresión de Nm23 en fases tempranas de cáncer de mama puede ser de ayuda en la predicción del agravamiento de la enfermedad. De ahí, la importancia de estudiar este marcador en biopsias de mama y su relación con diversos parámetros implicados en la cascada metastásica.

Correlación con parámetros clínicos en el diagnóstico de cáncer de mama

En relación con los parámetros clásicos, no se encontró significancia con los receptores de estrógenos, Ki67 ni Cerb-B2 para al coeficiente de correlación, aunque sí se observaron tendencias positivas con Ki67 y con los receptores hormonales.

Un estudio previo en carcinoma ductal infiltrante y nódulos linfáticos positivos mostró una correlación inversa al observar una disminución de Nm23 con un aumento de Ki67, [121] en nuestro estudio las pacientes no presentan nódulos linfáticos positivos, por lo que es posible, que se observe la tendencia sin significancia estadística. Al igual ocurre con el marcador Cerb-B2, que reporta correlación inversa con Nm23 en un estudio realizado a pacientes con afectación ganglionar y no en función del grado histológico. [122]

Sí se observó correlación positiva (Tabla 6) con el oncogén p53 ($r=0.2^*$); en relación a este hecho, en el año 2003 Chen et al., [123] afirmó que p53 es un regulador de Nm23-H1 ya que sus experimentos *in vitro* indicaron, que en varias líneas celular el tipo *wild-type* p53 regula positivamente la expresión de Nm23-H1 tanto en los niveles de proteína, como en los de ARNm. Observaron que esa capacidad de p53 para regular la expresión de Nm23-H1 no era sólo debido al p53 endógeno sino también de origen exógeno y no se reproducía con p53 mutante. Posteriormente, la capacidad invasiva de las células fue suprimida; y se ha sabido, mediante experimentos *in vitro* realizados por Jung et al., (2007) [124] que Nm23-H1 y su pareja de unión STRAP (proteína asociada al receptor serina-treonina) interactúan con p53 y potencian la actividad del mismo. Tanto Nm23-H1 como STRAP actúan directamente con el dominio central de unión del ADN dentro de los residuos 113-290. El uso de Nm23-H1 y mutantes STRAP reveló que Cys (145) de Nm23-H1 y Cys (152) (ó Cys (270)) de STRAP eran responsables de

la unión de p53. Además, Cys (176) y Cys (135) de p53 se requiere para enlazar Nm23-H1 y SRTAP, respectivamente.

Correlación con parámetros del microambiente tumoral

Se quiso comprobar la tendencia que marcaba este gen supresor junto al resto de parámetros del microambiente tumoral (Tabla 7). En el caso de todos los marcadores empleados en el estudio, se observó la tendencia esperada según lo aportado en la literatura, mostrando significancia estadística con el parámetro de angiogénesis, CD34 ($r = -0.319^{**}$), con los marcadores: de linfocitos CD8 ($r = 0.294^{**}$), de macrófagos CD68 ($r = -0.260^{**}$), prometastásico LPA1 (-0.459^{**}) y Ezrin ($r = -0.282^{*}$).

Una vez analizadas las tendencias entre los distintos grupos de estudio, se quiso observar si atendiendo a la positividad o negatividad del gen supresor de metástasis, los diferentes parámetros clásicos y de microambiente mostraban valores mayores o menores en función a la expresión de dicho gen. Los niveles de porcentaje de área para Nm23 comprendieron los valores 0- 97%, mostrándonos la heterogeneidad en cuanto a este parámetro.

La bibliografía ha mostrado trabajos realizados en función a la baja o alta expresión de Nm23 en tejido mamario fijado en parafina, como el de Barnes et al. (1991), [125] que definía los grupos atendiendo a una cuantificación cualitativa, menos precisa que la cuantitativa, debido a la poca objetividad; por tanto, nuestro sistema de cuantificación, al realizarse de forma cuantitativa resulta más preciso que el propuesto por Barnes et al. (1991). [125]

Con el fin de homogeneizar el número de pacientes en los grupos de estudio realizados, de manera que ambos tuviesen números similares de enfermas, y con un porcentaje de área que concordase con el sesgo realizado, se optó por agruparlos de la siguiente manera: aquellas pacientes que presentan un porcentaje de área mayor o igual al 20% ($n=103$) será consideradas Nm23 positivas y aquellas cuyo porcentaje de área fuese menor a 20% ($n=97$) pertenecerán al grupo de Nm23 negativo (Gráfica 1).

RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE NM23 CON PARÁMETROS DEL DIAGNÓSTICO CLÁSICO

En este estudio se pretendió comprobar cómo podían influir los niveles de Nm23 con los parámetros clásicos del diagnóstico de cáncer de mama.

Se observó que no hay diferencias significativas entre la mayor parte de los parámetros clásicos cuando hay altos o bajos niveles de Nm23, tal y como se corrobora con la literatura, [126] de hecho, las únicas correlaciones estadísticamente significativas atendiendo a los niveles de Nm23, hasta la fecha, lo han relacionado únicamente con el tamaño tumoral. [127]

Sin embargo, en el caso del receptor de estrógenos si los niveles de Nm23 son bajos, su valor es cuatro veces mayor (20,88) con respecto a los valores de Nm23 elevado, donde presenta unos niveles de 5.07; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,005$) (Gráfica 2).

Un trabajo previo, llevado a cabo por Sgouros (2007) [126] no mostró significancia estadística para el receptor de estrógenos ($p=0.5$), probablemente por el bajo número de muestras estudiadas ($n=7$), o debido a que no separó estrógenos de progesterona. Un análisis multivariado de factores pronósticos que incluyó los receptores hormonales para 3000 casos demostró que, los receptores estrogénicos son más importantes para el pronóstico que el tamaño tumoral, cuando las pacientes no presentan afectación ganglionar. [128]

Sin embargo, y como ya se comentó, existen autores que indican que la influencia de la terapia en el pronóstico es difícil de excluir, [76,77] por lo que no está claro si el estado hormonal influye per sé en el pronóstico de la enfermedad o simplemente juega un papel importante al permitir diversos tipos de terapias coadyuvantes o paliativas.

RELACIÓN DE LA AUSENCIA O PRESENCIA DE NM23 CON PARÁMETROS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Parámetro angiogénico

La angiogénesis tumoral es un proceso que lleva siendo de interés médico desde 1970, cuando Judah Folkman formuló el axioma de que no hay tumor (nuevo) que pueda crecer más de 1-2 mm sin el desarrollo de nuevos vasos. [129-133] El proceso de la angiogénesis está implicado, no sólo, en el crecimiento tumoral, sino también en el desarrollo de la metástasis, haciendo que su cuantificación sea una necesidad. [134-136] Fue en 1991, cuando Weidner et al. [137,138] introdujeron la necesidad de evaluar la angiogénesis tumoral a través de la densidad de microvasos.

Un factor importante en la evaluación de la angiogénesis, como hemos comentado anteriormente, está representado por la selección del marcador. [139, 140] Al principio Weidner y colaboradores, utilizaron el anticuerpo contra el factor de von Willebrand (FVIII), aunque éste marcaba también los vasos linfáticos. [137] Otros estudios cuentan vasos sanguíneos identificados con el anticuerpo CD31 o CD34. Distintos trabajos [141-143] han mostrado que CD31 puede reaccionar con fibroblastos. Algunos estudios [141-143] han comparado la tinción de los tres marcadores (FVIII, CD31 y CD34) concluyendo que CD34 es el marcador más fiable para la evaluación de la angiogénesis en inmunohistoquímica, razón por la que lo hemos elegido. [144]

La significancia pronóstica de la angiogénesis en el cáncer de mama, se ha encontrado en numerosos estudios, [137,145-150] observándose una asociación clara

entre una alta vascularización y un mal pronóstico en pacientes con ganglios linfáticos negativos. [151]

En nuestro estudio el número de microvasos fue mayor en aquellas pacientes en las que el nivel de Nm23 era bajo ($p=0.01$) (Gráfica 3). Un trabajo previo, analizando a 43 pacientes con cáncer de mama y ganglios linfáticos negativos, correlacionó el marcador FVII con niveles altos y bajos del gen supresor de metástasis, mostrando, también, un mayor número de vasos marcados en aquellos casos en los que Nm23 era bajo ($p=0.012$). [152]

En ensayos clínicos y experimentales, se ha observado que la actividad nucleótido difosfato kinasa (NDPK), que posee Nm23, está inversamente relacionada con la metástasis del cáncer de mama y la angiogénesis. Para inhibir el potencial metastásico de células cancerosas, Nm23-H1/NDPK parece interactuar con muchas proteínas implicadas en la transducción de señales celulares en la angiogénesis y la tumorigénesis, y por lo tanto reduce la activación de la vía de MAP/ERK. [152]

A la luz de nuestros resultados, además de otros mecanismos, Nm23 pudiera inhibir de algún modo la formación de nuevos vasos sanguíneos, impidiendo así que se produjera uno de los pasos implicados en la metástasis.

Parámetro estromagénico

Como ya se ha comentado, los fibroblastos asociados al cáncer (CAFS) juegan un papel fundamental en el crecimiento del cáncer, la progresión, metástasis, y resistencia terapéutica, al producir factores de crecimiento paracrinos, enzimas proteolíticas y componentes de la matriz extracelular (ECM) e interactuar con las células neoplásicas. [153]

Se sabe que la cantidad de estroma es directamente proporcional a la agresividad de los tumores primarios sólidos. Es decir, cuanto más estroma hay alrededor del tumor primario, más probabilidad existe que las células tumorales se puedan escapar a otras partes del cuerpo. [154]

En el caso de nuestro estudio, observando la cantidad del parámetro empleado para marcar el estroma tumoral, SMA, se ha encontrado que en aquellas muestras en las que los niveles de Nm23 son bajos, el valor de este marcador es cuatro veces mayor (5.53 frente a 1.56) (Gráfica 4) a aquellas muestras en las que los valores del gen supresor de metástasis está elevado ($p=0.038$).

Aunque no se han realizado estudios correlacionando ambos marcadores, en el año 1997 se realizó un trabajo inmunohistoquímico llevado a cabo por Charpin et al [155] que mostró en biopsias de cáncer de mama una relación inversa ($r= -0.29$) entre altos niveles de Nm23 y una proteína de la matriz extracelular, la tenascina ($p<0.01$); afirmando que el gen Nm23 puede actuar sobre las células tumorales y las interacciones

en el estroma tumoral, inhibiendo, así la progresión tumoral a través de la matriz extracelular.

Esta conclusión es extrapolable a nuestro estudio, debido a que hemos observado cambios estadísticamente significativos en el marcador de estroma tumoral, aunque los mecanismos moleculares por los que Nm23 podría interactuar con el estroma, son desconocidos.

Parámetros del sistema inmune

Los dos parámetros que se han estudiado, en relación a este punto son, como ya se ha comentado, CD8 y CD68; un marcador de linfocitos citotóxicos y otro de macrófagos.

La relación entre el cáncer y el sistema inmune es compleja y en parte desconocida en la actualidad. Algunos tipos de células inmunes, tales como las Natural Killer (NK) y linfocitos B se asocian con un mejor pronóstico cuando su número es elevado, ya que parece que suprimen el crecimiento de las células cancerosas; [156-158] y por otro lados existen estudios que han demostrado que otros tipos de células inmunes, incluyendo macrófagos y FOXP3+ (células T reguladoras), facilitan y promueven la expansión y el desarrollo del cáncer. [159-161]

Estos resultados, aparentemente conflictivos, han servido para formular la hipótesis que sugiere que, el sistema inmunológico tiene tanto la función anti-tumoral, como la acción promotora de tumores en la progresión del cáncer humano. [162-165]

En la respuesta inmune adaptativa contra el cáncer, los linfocitos T citotóxicos (CD8+) han jugado uno de los papeles más importantes, atacando a las células cancerosas mediante la producción de interferón gamma e induciendo la apoptosis de las células tumorales. [165]

Por consiguiente, los tumores CD8+ se han demostrado, que se asocian con una mejor supervivencia en diversos tipos de cánceres, por ejemplo: colon [166, 167], pulmón [168,169], esófago [170, 171], ovario [172, 173], renal [174] y de páncreas. [175]

En el cáncer de mama, sin embargo, el efecto pronóstico de CD8+ es todavía un tema de debate. Mientras que un estudio demostró que tanto el número total y el estroma distante se asocian significativamente con un mejor pronóstico de cáncer de mama y sus subtipos, [176] otro estudio mostró que ni los linfocitos intratumorales, ni los peritumorales tenían efecto protector sobre la supervivencia de pacientes con cáncer de mama. [177]

Un trabajo reciente realizado en 2014, [178] ha demostrado que las pacientes con CD8+ se asocian significativamente con una mejor supervivencia, lo que implica

que este tipo de linfocitos tiene, en cierta medida, efecto inhibitor tumoral al estar presente en el microambiente.

Existen estudios, en los que se corrobora este hecho de tal manera, que aunque existan parámetros que fomenten la diseminación del tumor, como por ejemplo, positividad frente a linfocitos FOXP3 +, si hay infiltrado de linfocitos CD8+ en un número superior, esas pacientes se asocian con una buena supervivencia, lo que indica que los linfocitos CD8+ juegan un papel más importante en el pronóstico del cáncer de mama, que otro tipo de linfocitos. [179] Se ha relacionado la presencia de este tipo de linfocitos con buen pronóstico, también, en pacientes triples negativas, mostrando que la inmunidad celular, representada por los linfocitos CD8 +, tiene actividad anti-tumoral, y pueden ser utilizados como herramienta inmunoterapéutica para mejorar el pronóstico de pacientes de cáncer de mama, incluso en subtipos biológicos con mal pronóstico. [179]

En nuestro trabajo, y a vista de lo aportado por la bibliografía, hemos relacionado la inmunoexpresión de Nm23 con el número de linfocitos CD8+, mostrando que cuando el marcador supresor de metástasis está presente en el seno del tumor, el número de linfocitos CD8+ es mayor (28.04) que en aquellos casos en los que Nm23 está en niveles bajos, donde el número de linfocitos CD8+ es de 14.63 (p=0.025) (Gráfica 5).

No existen evidencias que relacionen ambos parámetros en conjunto, pero debido a que por separado se correlacionan con un buen pronóstico, es posible, que la interacción entre el tumor y el microambiente circundante, en este caso los linfocitos CD8+, jueguen algún papel cooperativo que permita, que aunque no se afecte al tumor primario, la probabilidad de metástasis se reduzca, así como se mejore la supervivencia de las pacientes.

Como ya se ha comentado, las células inflamatorias han adquirido un interés renovado en la investigación del cáncer de mama, debido a la mayor comprensión de su papel en el desarrollo del tumor. Inicialmente se pensó que los macrófagos asociados al tumor (TAM) podrían ser útiles en la respuesta del huésped contra los tumores, ahora la evidencia sugiere que, estas células pueden, en realidad, contribuir al desarrollo del cáncer. [180] El reclutamiento de TAM cambia el microambiente tumoral, ya que incluye el enriquecimiento de citoquinas y factores de crecimiento que pueden estimular la proliferación de células malignas [181] además, las señales entre los TAM y las células cancerosas, es probable, que puedan tener efectos en la progresión del tumor, aumentándose así el riesgo de metástasis. [182,183]

Un gran número de estudios, han sugerido que los TAM están íntimamente asociados con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama. [184-187]

Al analizar nuestros resultados, hemos observado que cuando Nm23 está presente en el tumor de forma elevada, el número de macrófagos es de 20.83, mientras

que el número es estadísticamente superior (38.03) ($p=0.04$) cuando los niveles de Nm23 son bajos (Gráfica 5).

Por tanto, pensamos, que existe una comunicación entre el tumor y este tipo de células que podría contribuir a la no diseminación del mismo, aumentando así las probabilidades de supervivencia de las pacientes.

Parámetro prometastásico

Como ya se comentó anteriormente, en el estudio que presentamos, Nm23 frente a LPA1 muestra correlación inversa.

Existen numerosos hechos que demuestran esta relación inversa entre Nm23 y LPA1: *in vitro* como el estudio de Horak et al., (2007) [188] en el que suplementaron con LPA1 una línea celular en la que estaba suprimido Nm23-H1, con el consiguiente aumento significativo de la incidencia de metástasis pulmonar, *in vivo* transfectando células de Nm23-H1 con un vector para LPA1 a ratones desnudos con tumor; y, con muestras humanas en el que han validado esta relación mediante inmunohistoquímica, obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson que evidencia una relación inversa en 18 muestras de tumores de mama. [188]

En cuanto a cómo se modifican los valores de LPA1 con los niveles de Nm23, en nuestro estudio las muestras que presentan valores altos de Nm23 han presentado valores estadísticamente significativos menores ($p=0.001$) a los valores obtenidos en el grupo de Nm23 negativo; siendo los datos de LPA1 de 21.82 y 35.63, respectivamente (Gráfica 6).

Estos hechos experimentales son explicados, ya que, como hemos dicho Nm23 inhibe la ruta de las MAPKs, en contraposición a lo que ocurre con LPA1, que ha demostrado ser un activador de esta ruta, vía implicada en el aumento de la proliferación. Además se sabe que LPA1 estimula la ruta de las Rho quinasas induciendo cambios en el citoesqueleto y morfológicos. [189,190]

Parámetros transición epitelio-mesénquima

La mayoría de los tumores sólidos se originan en las células epiteliales, las cuales, por lo general, se mantienen adheridas en una hilera firmemente cohesionada para proporcionar la base estructural de muchos órganos. En principio, estas células carecen de la capacidad para romper con esas cadenas y migrar hacia tejidos cercanos, otros órganos o el sistema circulatorio. En la última década, un cúmulo de evidencias ha mostrado que las células de tumores epiteliales pueden experimentar un cambio drástico que las convierten en células mesenquimales migratorias (conversión, conocida como transición epitelio-mesénquima, o TEM). Para que un carcinoma escape y forme micrometástasis en un tejido distante, la TEM puede ser incluso fundamental.

En este sentido, hemos decidido incluir varios parámetros relacionados con este proceso, que están actualmente estudiándose en múltiples tipos tumorales: Ezrin y su forma activa P-ERM.

En el caso de Ezrin y su relación con elevados y bajos niveles de Nm23 los resultados mostraron lo siguiente: cuando Nm23 está presente los valores para Ezrin son de 26.36, mientras que cuando Nm23 se encuentra en niveles bajos, Ezrin presenta unos datos de 13.70 ($p=0.001$) (Gráfica 7). En el caso de P-ERM el patrón de expresión es el mismo, es decir, cuando Nm23 está presente se observan valores más altos que cuando Nm23 es más bajo (Gráfica 7).

Se sabe que la familia ERM está vinculada a la progresión de la enfermedad en los cánceres clínicos. Por ejemplo, en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, altos niveles de Ezrin se asocian con una supervivencia más corta. [191] En los tejidos de próstata, la inmunoreactividad de Ezrin se asocia con la invasión de la vesícula seminal. [192] En sarcomas pediátricos de tejidos blandos (STS), así como en cáncer de mama, altos niveles de Ezrin, se asocian con una menor supervivencia libre de enfermedad y con peor pronóstico. [193,194]

Cómo se relaciona Nm23 y Ezrin aún se desconoce; no hay trabajos que muestren ningún tipo de vinculación entre ambos marcadores, pero en nuestro estudio, hemos observado cómo niveles elevados de una proteína relacionada con la transición epitelio mesénquima tiene relación con bajos niveles de un inhibidor de metástasis; por tanto ha de existir algún tipo de comunicación que permita la conexión entre ambas proteínas.

Por otro lado, se ha estudiado la forma activa de la familia P-ERM, que como se ha mencionado, parece estar presente en niveles más elevados en el órgano metastásico que en el tumor primario. [114-118]; existe una diferencia de patrón entre esta proteína cuando Nm23 es positivo y cuando no, pero los niveles encontrados, además de ser no significativos, son menores a los de la proteína Ezrin, por tanto, creemos deberíamos obtener biopsias de los órganos en los que se ha dado metástasis de estas pacientes y comprobar de esta manera si los niveles de la forma activa son mayores a los de Ezrin.

Quinasa de adhesión focal

El proceso de metástasis e invasión de las células tumorales requiere que estas tengan la capacidad de adherirse o separarse del estroma y la matriz extracelular (ECM). Las integrinas de membrana juegan un papel crucial en muchos aspectos de la iniciación y progresión del tumor. [195,196] En este sentido, la quinasa de adhesión focal (FAK), una tirosina quinasa intracelular, es la encargada de regular los sitios de agrupación de integrinas o adhesiones focales, además, posee funciones como mediador de la transducción de señales para los receptores de la superficie celular, está implicado en la regulación de receptores de citoquinas y participa en la señalización de diversos factores de crecimiento. [196-198]

Modelos de ratones transgénicos de cáncer de mama han revelado, que FAK es esencial durante las etapas iniciales de la formación de metástasis para la transición de hiperplasias premalignas a carcinoma y posteriores metástasis. Por otra parte, FAK se ha demostrado estar elevada en los tejidos tumorales. [199]

Aunque FAK no se ha correlacionado con Nm23 en cáncer de mama, sí que se han realizado estudios de ambos marcadores en tumores de pulmón de células pequeñas, como el trabajo llevado a cabo por Hsu NY et al. (2007), [200] donde mostraron que elevados niveles de Nm23 correlacionaban con bajos valores para FAK ($p < 0.001$), relacionándose con un mal pronóstico para este tipo de cáncer.

En nuestro caso, hemos medido la actividad de esta proteína a través de su producto de fosforilación, es decir pFAK; se sabe que unos niveles reducidos de este producto de fosforilación, suprime la migración, la invasión y la formación de metástasis e incrementa la supervivencia en modelos animales. [201]

En nuestro trabajo no hemos encontrado ninguna correlación, estadísticamente significativa entre éste parámetro y el resto de los estudiados; sin embargo al hacer el estudio sobre la expresión de Nm23, sí se ha evidenciado que niveles altos de Nm23 muestran valores más bajos para pFAK (22.20) que aquellas muestras en las que Nm23 es más bajo, donde los niveles de pFAK se muestran más elevados (39.83) ($p = 0.035$) (Gráfica 8).

Por tanto, existe alguna comunicación entre estos marcadores que permite que se incremente o disminuya la probabilidad de formarse metástasis, e influir así en el pronóstico de las pacientes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha encontrado significación estadística en la correlación del gen supresor de metástasis Nm23 y el gen supresor de tumores p53, postulándose éste como un regulador de Nm23. Además, cuando los niveles de Nm23 son positivos, el receptor de estrógenos se encuentra más disminuido que en aquellos casos donde Nm23 es negativo, de forma significativa, indicando que la influencia en el pronóstico que implica el estado hormonal está, hoy día en controversia.
2. El número de microvasos, así como la cantidad de estroma tumoral fue menor en aquellas pacientes que expresaban el gen supresor de metástasis, Nm23; por lo que éste, inhibe la ruta angiogénica, posiblemente a través de inhibición de la vía de las MAPKs; e interactúa con el estroma de algún modo, aunque los mecanismos moleculares por los que hace, aún son desconocidos.
3. Cuando el marcador supresor de metástasis Nm23 está presente, el número de linfocitos CD8+ es mayor que en aquellos casos en los que Nm23 está en niveles bajos, en contraposición a lo que ocurre con el marcador macrófago CD68, por lo que debe existir algún mecanismo cooperativo entre el sistema inmune y el marcador supresor de metástasis que influyan en la probabilidad de metástasis.
4. Los niveles de marcador prometastático, LPA1 son menores en aquellos casos en los que los valores de Nm23 son positivos, ambos parámetros parecen estar relacionados con la ruta de las MAPKs de manera inversa, influyendo así, entre otros procesos, en la proliferación celular.
5. La relación de Nm23 con los parámetros de transición epitelio-mesénquima ha mostrado significancia estadística con Ezrin, encontrándose éste más bajo en aquellos casos en los que Nm23 es positivo; por lo que Nm23 interactúa, de algún modo, con el citoesqueleto promoviendo cambios que afectan a la forma celular y condicionan el proceso de metástasis.
6. La expresión de Nm23 condiciona los niveles de p-Fak, siendo éste más bajo en los casos en los que el gen supresor de metástasis es positivo; estando relacionado Nm23 a través de este marcador con fenómenos como la migración e invasión celular.
7. Existe una estrecha comunicación entre el tumor y el microambiente circundante afectando procesos como la angiogénesis, estromagénesis, mecanismos de defensa del sistema inmune, moléculas prometastáticas y citoesqueleto celular que condiciona en el transcurso de la enfermedad y en la probabilidad de desarrollar metástasis, afectando, en última instancia, a la supervivencia de las pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Weigelt B, Geyer FC y Reis-Filho JS (2010). Histological types of breast cancer: how special are they. *MolOncol*;4(3):192-208.
- 2.- American Cancer Society. (Breast Cancer Facts & figures 2011-2012).Atlanta: American Cancer Society, Inc.
- 3.- Instituto Nacional de Estadística. (INE) 2012
- 4.- Sobel ME (1990). Metastasis suppressor genes. *Journal of the National Cancer Institute*. 82: 267-276.
- 5.- Cortese G, Itala J, Lange D, Provenzano S(2014). Enfermedades de la glándula mamaria. Manejo integral de la patología benigna y maligna. Editorial médica Panamericana.
- 6.- S&A Medical Graphics. 4424 Springfield Rd. Ste. 103. Glen Allen, Va 23060
- 7.- Kierszenbaum AL, (2006). *Histología y Biología Celular (Introducción a la Anatomía Patológica, 2º edición)*. Editorial Elveiser Mosby.
- 8.- *The breast*. Bland and Copeland. 3ª edición. 2004.
- 9.- Vocational Training Charitable Trust 2014
- 10.- *Breast cancer*. Winchester. 2º edición. American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology. 2006
- 11.- www.mastologia.net
- 12.- Ellis H. (1993). Surgical embryology and anatomy of the breast and its related anatomic structure. *Surg Clin North Am*. 73: 611.
- 13.- Tortora, Derrickson, (2012). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Panamericana 13º edición.
- 14.- Elston CW and Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403-10.
- 15.- Ali S, Coombes RC (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*. Feb;2(2):101-12.14.- Guerra y Camacho.
- 16.- Guerra Araiza C, Camacho Arroyo I. (2000). Las isoformas del receptor de progesterona: función y regulación *RevInvestClin*; 52(6): 686-691.
- 17.- Morales L, Reigosa A, Caleiras E (2008). Expresión del HER2/neu en pacientes venezolanas con cáncer de mama localmente avanzado (en español). *Invest. clín.* [online]. vol.49, no.1 p.69-78.

- 18.- Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. (2000). Metastasis-Suppressor Genes: a Review and Perspective on an Emerging Field. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 21, November 1.
- 19.- Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S. (2000). Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res*; 60:298–304.
- 20.- Heimann R, Hellman S. (2000). Clinical progression of breast cancer malignant behavior: what to expect and when to expect it. *J Clin Oncol*; 18: 591–9.
- 21.- Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. (1999). What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst*; 91:1351–3.
- 22.- Marshall JC, Collins J, Marino N, Steeg P. (2010). The Nm23-H1 metastasis suppressor as a translational target. *Eur J Cancer*. 46(7): 1278-1282.
- 23.- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. (1988). Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*; 80:200–4.
- 24.- Rinker-Schaeffer CW, O’Keefe JP, Welch DR, Theodorescu D. (2006). Metastasis suppressor proteins: discovery, molecular mechanisms, and clinical application. *Clin Cancer Res*; 12:3882–9
- 25.- Steeg PS, Horak CE, Miller KD. (2008). Clinical-translational approaches to the Nm23-H1 metastasis suppressor. *Clin Cancer Res*; 14(16): 5006-5012.
- 26.- Steeg PS. (1989). Search for metastasis suppressor genes. *Invasion Metastasis*. 9(6):351-9.
- 27.- Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. (1993). Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene*. Sep;8(9):2325-33.
- 28.- Steeg PS, de la Rosa A, Flatow U, MacDonald NJ, Benedict M, Leone A. (1993). Nm23 and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat*. 25(2):175-87.
- 29.- Subramanian C, Cotter MA 2nd, Robertson ES. (2001). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med*. Mar;7(3):350-5.
- 30.- Murakami M, Lan K, Subramanian C, Robertson ES. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 interacts with Nm23-H1 in lymphoblastoid cell lines and inhibits its ability to suppress cell migration. *J Virol*. Feb;79 (3):1559-68.
- 31.- Kaul R, Murakami M, Choudhuri T, Robertson ES. (2007). Epstein-Barr virus latent nuclear antigens can induce metastasis in a nude mouse model. *J Virol*. Oct;81(19):10352-61. Epub2007 Jul 18.

- 32.- Howlett AR, Petersen OW, Steeg PS, Bissell MJ. (1994). A novel function for the nm23-H1 gene: overexpression in human breast carcinoma cells leads to the formation of basement membrane and growth arrest. *J Natl Cancer Inst.* Dec 21;86(24):1838-44.
- 33.- Heimann R, Ferguson DJ, Hellman S. (1998). The relationship between nm23, angiogenesis, and the metastatic proclivity of node-negative breast cancer. *Cancer Res.* Jul 1;58(13):2766-71.
- 34.- Gardiner-Garden M; Frommer M. (1987). CpG Islands in Vertebrate Genome. *J. Mol. Biol.* 196, 261-282.
- 35.- Esteller M. (2002). CpG Island Hypermethylation and Tumor Suppressor Genes: a Booming Present, a Brighter Future. *Oncogene* 21, 5427-5440.
- 36.- Ouatas T, Clare SE, Hartsough MT, De La Rosa A, Steeg PS. (2002). MMTV-associated transcription factor binding sites increase nm23-H1 metastasis suppressor gene expression in human breast carcinoma cell lines. *ClinExp Metastasis.* 19(1):35-42.
- 37.- Hartsough MT, Clare SE, Mair M, Elkahloun AG, Sgroi D, Osborne CK, Clark G, Steeg PS. (2001). Elevation of breast carcinoma Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression and reduced motility by DNA methylation inhibition. *Cancer Res.* Mar 1;61(5):2320-7.
- 38.- Du Y, Carling T, Fang W, Piao Z, Sheu JC, Huang S. (2001). *Cancer Res.*, 61: 8094-8099.
- 39.- Balkwill F, Mantovani A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*; 357:539-545.
- 40.- Hussain SP, Harris CC. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*; 121:2373-2380.
- 41.- Witz IP, Levy-Nissenbaum O. (2006). The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett*; 242:1-10.
- 42.- Witz IP. (2008). Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons. *Adv Cancer Res*; 100:203-229.
- 43.- Martin DN, Boersma BJ, Yi M, Reimers M, Howe TM, et al. (2009). Differences in the Tumor Microenvironment between African-American and European- American Breast Cancer Patients. *PLoS ONE* 4(2).
- 44.- Jan Rykala J, Przybyłowska K, Majsterek I, Pasz-Walczak G, Sygut A, Dziki A, Kruk-Jeromi n J. (2011). Angiogenesis Markers Quantification in Breast Cancer and Their Correlation with Clinicopathological Prognostic Variables *Pathol. Oncol. Res* 17:809-817.
- 45.- Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G, (1992). Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl CancerInst*; 84: 1875-188.

- 46.- Pavlakis K, Messini I, Vrekoussis T, Yiannou P, Keramopoulos D, Louvrou N, Liakakos T, Stathopoulos EN. (2008). The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer*. Apr 2;8:88. doi: 10.1186/1471-2407-8-88.
- 47.- Burnet FM. (1957). *Cancer – A biological approach*. 1. The process of control. *Br Med J*, 1:779-782.
- 48.- Quail DF & Joyce JA. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine* 19, 1423–1437.
- 49.- Ning-Bo Hao, Mu-Han Lü, Ya-Han Fan, Ya-Ling Cao, Zhi-Ren Zhang, and Shi-Ming Yang, (2012). “Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors,” *Clinical and Developmental Immunology*, Article ID 948098, 11 pages.
- 50.- Takuwa Y, Takuwa N, Sugimoto N. (2002). The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *J Biochem.Jun*;131(6):767-71.
- 51.-Contos JJ, Ishii I, Chun J. (2000). Lysophosphatidic acid receptors.*Mol Pharmacol.Dec*;58(6):1188-96.
- 52.- Contos James JA, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J. (2002). Characterization of lpa2 (Edg4) and lpa1/lpa2 (Edg2/Edg4) Lysophosphatidic Acid Receptor Knockout Mice: Signaling Deficits without Obvious Phenotypic Abnormality Attributable to lpa2. *Mol. Cell. Biol.* 22(19):6921.
- 53.- Kalluri R, & Weinberg RA. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428.
- 54.- Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno Bueno G & Palacios J. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Relates to the Basal-like Phenotype. *Cancer Res* February 15, 68; 989.
- 55.- Peinado H, Olmeda D, Cano A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.Jun*;7(6):415-28.
- 56.- Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. (2003). The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol*; 46: 165-86.
- 57.- Seung Do Choi, M.D. (2012). Ezrin is an Essential Marker for Metastasis of Gynecologic Cancer. *J Korean Soc Menopause*; 18:81-93.
- 58.- Song GJ, Leslie KL, Barrick S, Bougoin S, Taboas JM & Bisello A. (2012). EBP50 Promotes Focal Adhesion Turnover and Vascular Smooth Muscle Cells Migration. *J Mol Cell Cardiol.*; 53(6): 809–819.

- 59.- Brozman M. (1978). Immunohistochemical analysis of formaldehyde- and trypsin- or pepsin-treated material. *ActaHistochem.* 63(2):251-60.
- 60.- Mendizábal JA. y Goñi V. (2001). Aplicaciones de la técnica de análisis de imagen en la determinación de la calidad de la canal y de la carne (Revisión). *Investagr: ProdSanid Anim.* 16, 99-108.
- 61.- Castleman KR. (1998). Concepts in imaging and microscopy: color image processing for microscopy. *Biol Bull. Apr;*194(2):100-7.
- 62.- Ma W, Lozanoff S. (1999). A full color system for quantitative assessment of histochemical and immunohistochemical staining patterns. *Biotech Histochem.* Jan;74(1):1 9.
- 63.- Maximova OA, Taffs RE, Pomeroy KL, Piccardo P, Asher DM. (2006). Computerized morphometric analysis of pathological prion protein deposition in scrapie-infected hamster brain. *J HistochemCytochem.* Jan; 54(1):97-107. Epub 2005 Sep 7.
- 64.- [www. anatpat.unicamp.br](http://www.anatpat.unicamp.br). Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Ciencias Médicas.
- 65.- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF. (2012). The her-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-her-2 therapy and personalized medicine. *The oncologist* 2012;14:320–368
- 66.- Chia S, Al-Forheidi M, Speers C, Woods R, KenneckeH. (2010). Outcome of invasive lobular carcinoma compared to infiltrating ductal carcinoma: A population based study from British Columbia. *EJC.* 8(3):122.
- 67.- Lee JH, Park S, Park HS, Park BW. (2010). Clinical pathological features of infiltrating lobular carcinomas comparing with infiltrating ductal carcinomas: A case control study. *World J SurgOncol.* 8:34.
- 68.- Acosta V., Acosta FV, Marín E, Fuentes PJ, Longobardi I, Ramírez KA, Acosta MM, Contreras A, Ravelo R, Coutinho MT, Ramos DU. (2011). ¿Es carcinoma lobulillar infiltrante igual a carcinoma ductal infiltrante? seguimiento a largo plazo. *RevVenezOncol;*23(2):56-65.
- 69.- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. (2005). Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J ClinOncol.* Mar 1;23(7):1420-30.
- 70.- Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, Holmberg SB, Lindtner J, Snyder R, Thürlimann B, Murray E, Viale G, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A. (2008). International Breast Cancer Study Group. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol.* Jun 20;26(18):3006-14.

71.- www.breastcancer.org

72.- Pachnicki JP, Czecko NG, Tuon F, Cavalcanti TS, Malafaia AB, Tuleski AM. (2012). Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors of pre and post-neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Rev Col Bras Cir.* Apr;39(2):86-92.

73.- Orvieto E, Viale G. (2002). Receptores dos hormônios esteroides. In. Rio de Janeiro: Medsi: 267-271.

74.- Kasami M., Uematsu T., Honda M., Yabuzaki T., Sanuki J., Uchida Y., Sugimura H. (2008). Comparison of estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2 status in breast cancer pre- and post-neoadjuvant chemotherapy. *Breast.* Oct;17(5):523-7. Epub 2008 Jun 5.

75.- Lu X, Chen S, Shuang S. (1996). A study on methodology and the criteria for positive immunohistostaining of estrogen and progesterone receptors in paraffine embedded sections of breast cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.*; 25:329-331.

76.- Rosens PP, Hoda SA, Brogi E & Koerner FC. (2014). Rosen's breast pathology. 4^a edition. Editorial Lippincott Williams & Wilkins.

77.- Donegan W. (1992). Prognostic factors: Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer* 70: 1755-64.

78.- Chen YK, Huse SS, Lin LM. (2003). Differential expression of p53, p63 and p73 proteins in human buccal squamous-cell carcinomas. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* Volume 28, Issue 5, pages 451-455.

79.- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast cancer Study. *JAMA.* 295(21):2492-2502.

80.- Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. (2012). Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 490(7418):61-70.

81.- Potemski P, Kusinska R, Watala C, Pluciennik E, Bednarek AK, Kordek R. (2005). Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology.* 69(6):478-85.

82.- Korkolis D, Ardavanis A, Yotis J, Kyroudi A, Gorgolis V, Kittas C. (2001). HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathologic parameters, p53 oncoprotein and cathepsin D. *Anticancer Res;* 21 (3C): 2207-2212.

83.- Marks JR, Humphrey PA, Wu K (1994): Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg;* 219: 332-41,

84.- Korabiowska M., Hönig JF, Jawien J, Jadwig Knapik J, Stachura J, Cordon-Cardo C y Fischer G (2005). Relationship of Nm23 Expression to Proliferation and Prognosis in Malignant Melanomas of the Oral Cavity. *In vivo* 19: 1093-1096.

- 85.- Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O (1993): Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer*; 71: 3926-31.
- 86.- Rosen PP (1997). *Breast pathology. Biological markers of prognosis*. Lippincott-Raven,308-320.
- 87.- Poblete MT. Marcadores de utilidad en cancer mamario. 2001. *Cuad. Cir*; 15:74-79.
- 88.- Tetu B, Brisson J. (1994). Prognostic significance of Her-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer: the influence of the pattern of immunostaining and adjuvante therapy. *Cancer* 73: 2359-65.
- 89.- Muss HB, Thor AD, Berry DA. 1994. C-erbB-2 expression and response to adjuvante therapy in women with node positive early breast cancer. *N Engl J Med*; 330: 1260-5.
- 90.- Vidal-Vanaclocha F & Witz IP. 2010. Introducing the Cancer Microenvironment Section of *Journal of Translational Medicine*. *Journal of translational od Medicine*. 8:60.
- 91.- Witz IP (2008). Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons. *Adv Cancer Res*, 100:203-229.
- 92.- da Silva BB, Pires CG, dos Santos AR, de Castro-Leão AH, Alencar AP, Lopes-Costa PV. (2009). Effects of raloxifene on Ki-67 and CD34 antigen expression in breast cancer. *Gynecol Obstet Invest*. 67(2):103-8.
- 93.- Gary MK , Tse FRCPC, Philip CW , Lui MB et al. (2003). Tumour Angiogenesis and p53 Protein Expression in Mammary Phyllodes Tumors *Mod Pathol* 2003;16(10):1007–1013
- 94.- Kato T, Kameoka S, Kimura T, Soga N, Abe Y, Nishikawa T, et al. (2001). Angiogenesis as a predictor of long-term survival for 377 Japanese patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 70: 65–74.
- 95.- de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. (2000). Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology*; 36: 306–312.
- 96.- Leek RD. (2001): The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res*; 21: 4325–4331.
- 97.- Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K & Wang J. (2012). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1-13.
- 98.- Ostman, A., et al. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth—bystanders turning into key players. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(1), 67–73.
- 99.- Loeffler, M., et al. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1955-1962.

- 100.- Gabbiani, G., et al. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27(5), 549–550.
- 101.- Spaeth, E. L., et al. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*, 4(4), e4992.
- 102.- Zeisberg, E.M., et al. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Research*, 67(21), 10123–10128.
- 103.- Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. May 20;29(15):1949-55.
- 104.- Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szewczyk K, Staszek U, Pudelko M, Szynglarewicz B, Szelachowska J, Zolnierek A, Kornafel J. (2009). The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Res*. Jul;29(7):2445-51.
- 105.- Quatromoni JG & Eruslanov E. (2012) . Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res*;4(4):376-89.
- 106.- Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 23;12:306.
107. Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* ;3(1):23–35.
108. - Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. Mar;196(3):254-65.
- 109.- Zhang Y, Cheng S, Zhang M, Zhen L, Pang D, Zhang Q, Li Z. (2013). High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PLoS One*. Sep 30;8(9):e76147.
- 110.- Marshall JC, Collins JW, Nakayama J, Horak CE, Liewehr DJ, Steinberg SM, Albaugh M, Vidal-Vanaclocha F, Palmieri D, Barbier M, Murone M, Steeg PS. (2012). Effect of inhibition of the lysophosphatidic acid receptor 1 on metastasis and metastatic dormancy in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. Sep 5;104 (17):1306-19.
- 111.- Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, et al. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(4):48737–48744.
- 112.- Liu S, Umezu-Goto M, Murph M, et al. (2009). Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell*;15(6):539–550.

- 113.- Yu S, Murph MM, Lu Y, Liu S, Hall HS, Liu J, Stephens C, Fang X, Mills GB. (2008). Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* Nov 19;100(22):1630-42.
- 114.- Arslan AA, Silvera D, Arju R, Giashuddin S, Belitskaya-Levy I, Formenti SC, Schneider RJ. (2012). Atypical ezrin localization as a marker of locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Aug;134(3):981-8.
- 115.- Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Dotor A, Calero F, Hardisson D, Palacios J. (2006). Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 98:71–79.
- 116.- Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M. (2005). The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res* 7(3): R365–R373.
- 117.- Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, Yeung C, Gorlick R, Hewitt SM, Helman LJ. (2004). The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* 10:182–186.
- 118.- Kaul R, Murakami M, Kumar P & Robertson ES. (2009). Nm23 as a Metastasis Inhibitor. Chapter 11. Editorial Springer.
- 119.- Tokunaga Y, Urano T, Furukawa K, Kondo H, Kanematsu T, Shiku H. (1993). Reduced expression of nm23-H1, but not of nm23-H2, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer. *Int J Cancer.* Aug 19;55(1):66-71.
- 120.- Amanjit B., Kusum J., Rajesh L., B.D. Radrota., Rajinder S. (2008). Expression of Nm23 in the spectrum of pre-invasive, invasive and metastatic breast lesions. *Diagnostic Pathology*, 3:23.
- 121.- Terasaki-Fukuzawa Y., Kijima H., Suto A., Takeshita T., Iezumi K., Sato S., Yoshida H., Sato T., Shimbori M., Shiina Y. (2002). Decreased nm23 expression, but not Ki-67 labeling index, is significantly correlated with lymph node metastasis of breast invasive ductal carcinoma. *Int J Mol Med.* Jan;9(1):25-9.
- 122.- Li X.R., Liu M., Zhang Y.J., Wang J.D., Zheng Y.Q., Li J., Ma B., Song X. (2011). Evaluation of ER, PgR, HER-2, Ki-67, cyclin D1, and nm23-H1 as predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Med Oncol.* 28 Suppl 1:S31-8.
- 123.- Chen SL, Wu YS, Shieh HY, Yen CC, Shen JJ, Lin KH. P53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1. (2003). *Mol Carcinog.* Apr;36(4):204-14.
- 124.- Jung H., Seong H.A., Ha H. (2007). NM23-H1 tumor suppressor and its interacting partner STRAP activate p53 function. *J BiolChem.* Nov 30;282 (48):35293-307.

- 125.- Barnes R, Masood S, Barker E, Rosengard AM, Coggin DL, Crowell T, King CR, Porter-Jordan K, Wargotz ES, Liotta LA, et al.(1991). Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced patient survival. *Am J Pathol.* Aug;139(2):245-50.
- 126.- Sgouros J, Galani E, Gonos E, Moutsatsou P, Belechri M, Skarlos D, Dionyssiou-Asteriou A. (2007). Correlation of nm23-H1 gene expression with clinical outcome in patients with advanced breast cancer. *In Vivo.* May-Jun;21(3):519-22.
- 127.- Heimann R, Ferguson DJ, Hellman S. (1998). The relationship between nm23, angiogenesis, and the metastatic proclivity of node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 1998 Jul 1;58(13):2766-71.
- 128.- Alfred DC, Bustamante MA, Daniel CO. (1990). Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas: Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. *Arch Surg;* 125: 107-13.
- 129.- J. Folkman. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *The New England Journal of Medicine*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186.
- 130.- J. Folkman and R. Cotran (1976). Relation of vascular proliferation to tumor growth. *International Review of Experimental Pathology*, vol. 16, pp. 207–248.
- 131.-J. Folkman. (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors, *Annals of Surgery*, vol. 175, no. 3, pp. 409–416, 1972.
- 132.-J. Folkman. (1985). Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery, *Perspectives in Biology and Medicine*, vol. 29, no. 1, pp. 10–36.
- 133.-J. Folkman. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 82, no. 1, pp. 4–6.
- 134.- L. Hlatky, P. Hahnfeldt, and J. Folkman. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 94, no. 12, pp. 883–893.
- 135.- S. Sharma, M. C. Sharma, and C. Sarkar. (2005). Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*, vol. 46, no. 5, pp. 481–489.
- 136.- P. Fritz, S. Klenk, S. Goletz et al. (2010). Clinical impacts of histological subtyping primary breast cancer. *Anticancer Research*, vol. 30, no. 12, pp. 5137–5144.
- 137.- N. Weidner, J. P. Semple, W. R. Welch, and J. Folkman. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, vol. 324, no. 1, pp. 1–8.

- 138.- N. Weidner. (1995). Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 36, no. 2, pp. 169–180.
- 139.- M. D. Safwat, F. Habib, A. Elayat, N. Oweiss, S. Reffat, and S. Algaidi. (2009). Morphometric and immunohistochemical study of angiogenic marker expressions in invasive ductal carcinomas of the human breast. *Folia Morphologica*, vol. 68, no. 3, pp. 144–155.
- 140.- B. B. Da Silva, P. V. Lopes-Costa, A. R. Dos Santos et al. (2009). Comparison of three vascular endothelial markers in the evaluation of micro vessel density in breast cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, vol. 30, no. 3, pp. 285–288.
- 141.- B. Uzzan, P. Nicolas, M. Cucherat, and G.-Y. Perret. (2004). Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis, *Cancer Research*, vol. 64, no. 9, pp. 2941–2955.
- 142.- K.-C. Chou, L.-C. Chang, H.-C. Su et al. (2005). Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in mucoepidermoid carcinoma. *Journal of Medical Sciences*, vol. 25, no. 6, pp. 285–290.
- 143.- D. Wang, C. R. Stockard, L. Harkins et al., (2008). Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts,” *Biotechnic and Histochemistry*, vol. 83, no. 3-4, pp. 179–189.
- 144.- Haisan A, Rogojanu R, Croitoru C, Jitaru D, Tarniceriu C, Danciu M, Carasevici E. (2013). Digital microscopy assessment of angiogenesis in different breast cancer compartments. *Biomed Res Int*. 2013.
- 145.- Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. (2004). Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*;6.
- 146.-Weidner N. (1998). Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: evidence continues to grow. *J Pathol*;184:119–22.
- 147.-Gasparini G, Fox SB, Verderio P, et al. Determination of angiogenesis adds information to estrogen receptor status in predicting the efficacy of adjuvant tamoxifen in node-positive breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996;2:1191–8.
- 148.-Hansen S, Sorensen FB, Vach W, Grabau DA, Bak M, Rose C. (2004). Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology*;44:428–36.
- 149.- Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. (2000). The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res*;6:139–46.

- 150.-Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL.(1995). Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol*;177:275–83
- 151.- Dhakal HP, Naume B, Synnestevedt M, Borgen E, Kaaresen R, Schlichting E, Wiedswang G, Bassarova A, Giercksky KE, Nesland JM. (2008). Vascularization in primary breast carcinomas: its prognostic significance and relationship with tumor cell dissemination. *Clin Cancer Res*. Apr 15;14(8):2341-50.
- 152.- Iain L.O. Buxton & Nucharee Yokdang. (2011). Extracellular NM23 Signaling in Breast Cancer: Incommodus Verum. *Cancers (Basel)*. Sep; 3(3): 2844–2857.
- 153.- Ishikawa M, Inoue T, Shirai T, Takamatsu K, Kunihiro S, Ishii H, Nishikata T. (2014). Simultaneous expression of cancer stem cell-like properties and cancer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast cancer cells. *Cancers (Basel)*. Jul 31;6(3):1570-8.
- 154.- Mollevi DG, Aytes A, Berdiel M, Padulles L, Martinez-Iniesta M, Sanjuan X, Salazar R & Villanueva A. (2009). PRL-3 overexpression in epithelial cells is induced by surrounding stromal fibroblasts, *Molecular Cancer*., 8:46.
- 155.- Charpin C, Bouvier C, Garcia S, Martini F, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C.(1997). Automated and quantitative immunocytochemical assays of Nm23/NDPK protein in breast carcinomas. *Int J Cancer*. Aug 22;74(4):416-20.
- 156.- Lee SC, Srivastava RM, López-Albaitero A, Ferrone S, Ferris RL. (2011). Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol Res* 50(2–3): 248–254. doi: 10.1007/s12026-011-8231-0
- 157.- Chen Z, Gerhold-Ay A, Gebhard S, Boehm D, Solbach C, et al. (2012). Immunoglobulin Kappa C predicts overall survival in node-negative breast cancer. *Plos One* 7(9).
- 158.- Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, et al. (2011). The prognostic significance of B lymphocytes in invasive cancer of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 132(2): 545–553.
- 159.-Campbel MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, et al. (2010). Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 128(3).
- 160.-Tadmor T, Zhang Y, Cho HM, Podack ER, Rosenblatt JD. (2011). The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol immunother* 60(5): 609–619.
- 161.- Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Lee AH, et al. (2011) An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 127(1): 99–108.

- 162.-Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's role in cancer suppression and promotion. *Science* 331(6024): 1565–1570. doi: 10.1126/science.1203486
- 163.- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29: 235–271.
- 164.- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21(2): 137–148.
- 165.- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11): 991–998.
- 166.- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795): 1960–1964.
- 167.- Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, et al. (2009) In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27(35): 5944–5951.
- 168.-Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, et al. (2006) Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 94(2): 275–280.
- 169.- Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, et al. (2008) Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T cells in cancer nests is a statistically relevant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 113(6): 1387–1395.
- 170.- Ashida A, Boku N, Aoyagi K, Sato H, Tsubosa Y, et al. (2006) Expression profiling of esophageal squamous cell cancer patients treated with definitive chemoradiotherapy: clinical implications. *Int J Oncol* 28(6): 1345–1352.
- 171.-Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, et al. (2003) CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of the patients with esophageal squamous cell cancer. *Cancer Res* 63(7): 1555–1559.
- 172.-Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T, et al. (2011) The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin Immunol* 141(3): 338–347.
- 173.- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, et al. (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348(3): 203–213.
- 174.- Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, et al. (2001) Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell cancer: clinicopathological demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61(13): 5132–5136.

- 175.- Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, et al. (2004) CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28(1): e26–31.
- 176.-Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, et al. (2011) Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 29(15): 1949–1955.
- 177.- Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, et al. (2011) CD8+ cytotoxic T cell and FOXP3+ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 130(2): 645–655.
- 178.- Chen Z, Chen X, Zhou E, Chen G, Qian K, Wu X, Miao X, Tang Z (2014). Intratumoral CD8⁺ cytotoxic lymphocyte is a favorable prognostic marker in node-negative breast cancer. *PLoS One*. Apr 17;9(4).
- 179.- Anz D, Eiber S, Scholz C, Endres S, Kirchner T, et al. (2011) In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8+ to FOXP3+ cells is characteristic for the medullary subtype. *Histopathology* 59(5): 965–974.
- 180.- Pollard JW. (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol*. 84(3):623–630.
- 181.- Coussens LM, Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*. 420(6917):860–867.
- 182.- Lewis CE, Pollard JW.(2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 66(2):605–612.
- 183.- Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C.(2014). High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Oncotargets Ther*. Aug 21;7:1475-80.
- 184.- Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Yagmurdu MC, Bal N, Demirhan B.(2006). Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: correlations with prognostic parameters. *J Exp Clin Cancer Res*;25(3):365–372.
- 185.- Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, et al. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res*;65(12): 5278–5283.
- 186.- Ueno T, Toi M, Saji H, et al. (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res*;6(8): 3282–3289.
- 187.-Wyckoff J, Wang W, Lin EY, et al. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*.;64(19):7022–7029.

- 188.- Horak C.E., Mendoza A., Vega-Valle E., Albaugh M., Graff-Cherry C., McDermott W.G., Hua E., Merino M.J., Steinberg S.M., Khanna., Steeg P.S. (2007). Nm23-H1 Suppresses Metastasis by Inhibiting Expression of Lysophosphatidic Acid Receptor EDG2. *Cancer Res*; 67:11751-11759.
- 189.- Du J, Sun C, Hu Z, Yang Y, Zhu Y, Zheng D, Gu L, Lu X. (2010). Lysophosphatidic acid induces MDA-MB-231 breast cancer cells migration through activation of PI3K/PAK1/ERK signaling. *PLoS One*. Dec 30;5(12).
- 190.- Van Leeuwen FN, Olivo C, Grivell S, Giepmans BN, Collard JG, Moolenaar WH. (2003). Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*. Jan 3;278(1):400-6. Epub 2002 Oct 21.
- 191.- Mhaweche-Fauceglia P, Dulguerov P, Beck A, Bonet M, Allal AS. (2007). Value of ezrin, maspin and nm23-H1 protein expressions in predicting outcome of patients with head and neck squamous-cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *J Clin Pathol*. 60:185–189.
- 192.- Valdman A, Fang X, Pang ST, Nilsson B, Ekman P, Egevad L. (2005). Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue. *Eur Urol*. 48:852–857.
- 193.- Weng WH, Ahlen J, Astrom K, Lui WO, Larsson C. (2005). Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. ;11:6198–6204
- 194.- Fernando H, Martin TA, Douglas-Jones A, Kynaston HG, Mansel RE, Jiang WG. (2010). Expression of the ERM family members (ezrin, radixin and moesin) in breast cancer. *Exp Ther Med*. Jan;1(1):153-160. Epub 2010 Jan 1.
- 195.- Miranti CK, Brugge JS.(2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol*;4:E83–90. [PubMed: 11944041]
- 196.- Romer LH, Birukov KG, Garcia JG. (2006) Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ Res*;98:606–16. [PubMed: 16543511]
- 197.- Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. (2007). *J Cell Physiol* .213:565–73.
- 198.- Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans*;32:416–20.
- 199.- Provenzano PP, Keely PJ. (2009). The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression. *Cell Adh Migr*. Oct-Dec;3(4):347-50. Epub 2009 Oct 3.
- 200.- Hsu NY, Chen CY, Hsu CP, Lin TY, Chou MC, Chiou SH, Chow KC.(2007). Prognostic significance of expression of nm23-H1 and focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. Jul;18(1):81-5.
- 201.- Gautam A, Li ZR and Bepler G. (2003). RRM1-induced metastasis suppression through PTEN regulated pathways. *Oncogene* 10:2135-2142.