



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas**

**Factores biológicos del estroma tumoral como factores predictivos del tratamiento
adyuvante clásico en el cáncer de mama**

Maria Berta Fernández González

2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Factores biológicos del estroma tumoral como factores predictivos del tratamiento adyuvante clásico del cáncer de mama.	Inglés: Stromal tumor biological factors as predictor factors of the classical treatment in breast cancer.
2.- Autor	
Nombre: Maria Berta Fernández González	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	
Órgano responsable: Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas.	

RESUMEN (en español)

Antecedentes:

Existen datos clínicos y biológicos que indican que las células inmunes del estroma tumoral actúan sobre las células cancerosas para aumentar sus propiedades proliferativas y migratorias / invasoras, y que la metaloproteasa de la matriz (MMP) -11 puede tener un papel único en el desarrollo y progresión del tumor.

Objetivos:

El objetivo del presente estudio fue confirmar si la evaluación de la expresión de esta MMP por MICs intratumorales constituye un marcador biológico útil para la evaluación pronóstica en una amplia población de pacientes con cáncer de mama invasivo que se sometieron a un largo período de seguimiento.

Materiales y Métodos:

Este estudio incluyó a 246 mujeres con un diagnóstico histológicamente confirmado de cáncer de mama invasivo temprano de tipo ductal. Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a cuatro grupos diferentes con tamaño similar y estratificados con respecto al estado nodal y al desarrollo de la enfermedad metastásica. El período medio de seguimiento en pacientes sin metástasis fue de 146 meses y 31 meses en pacientes con enfermedad metastásica. MMP11 se determinó en todos los tumores por inmunohistoquímica. Para la supervivencia libre de recaída (SLR) y el análisis de supervivencia global (SG) utilizamos el método univariado de Cox. Cox modelo de regresión se utilizó para examinar las interacciones entre los diferentes factores pronósticos en un análisis multivariante.

Resultados:

Nuestros resultados mostraron que la expresión de MMP11 por las células del estroma alcanzó una asociación significativa con el pronóstico. La expresión de MMP11 por FACs está asociada con SLR y SG acortados, pero la expresión de MMP11 por CMIs alcanzó una asociación más fuerte con SLR y SG acortados, siendo por lo tanto, el factor más potente e independiente para predecir SLR y SG.

Conclusiones:

Nuestros resultados apuntan a un importante impacto clínico de los CMI y MMP11 en el resultado de los pacientes con cáncer de mama. MMP11 expresión por CMIs de intratumor estroma debe ser incluido en los esquemas de clasificación tradicionales para proporcionar nuevos pronóstico y herramientas predictivas a los médicos.



RESUMEN (en Inglés)

Background:

There are clinical and biological data indicating that tumor stroma immune cells act on cancerous cells to increase their proliferative and migratory/invasive properties, and that matrix metalloprotease (MMP)-11 may have a unique role in tumor development and progression.

Aims:

The aim of the present study was to confirm if the evaluation of the expression of this MMP by intratumoral MICs constitutes a useful biological marker for prognostic evaluation in a wide population of patients with invasive breast cancer who underwent a long follow-up period.

Materials and Methods:

This study comprised 246 women with a histologically confirmed diagnosis of early invasive breast cancer of a ductal type. Patients were selected in accordance to four different groups with similar size and stratified with regard to nodal status and to the development of metastatic disease. The median follow-up period in patients without metastasis was of 146 months, and 31 months in patients with metastatic disease. MMP11 was determined in all tumors by immunohistochemistry. For relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) analysis we used the Cox's univariate method. Cox's regression model was used to examine the interactions between different prognostic factors in a multivariate analysis.

Results:

Our results showed that MMP11 expression by stromal cells reached a significant association with prognosis. MMP11 expression by CAFs is associated with both shortened RFS and OS, but MMP11 expression by MICs reached a stronger association with both shortened RFS and OS, being therefore, the most potent and independent factor to predict RFS and OS.

Conclusions:

Our results point to an important clinical impact of MICs and MMP11 in the outcome from patients with breast cancer. MMP11 expression by MICs from intratumor stroma should be included into traditional classification schemes to provide new prognostic and predictive tools to clinicians.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS /
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO INVESTIGACIÓN EN
CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

Al Dr. Francisco Vizoso como testimonio de mi agradecimiento por su extraordinaria dirección y apoyo, así como por su permanente confianza en este proyecto.

Al Dr. Safwan Escaf por facilitar en todo momento la materialización de este trabajo.

Al Dr. Jose Luis García Muñiz por su magisterio en todo lo relativo a la medicina y la cirugía.

A los miembros de la Unidad de Investigación del Hospital de Jove por su colaboración.

A Adela y Marisa por su amabilidad.

A mi familia, por tantas y tantas cosas...

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
I ANATOMÍA DE LA MAMA	5
II EMBRIOLOGÍA DE LA MAMA.....	6
III FISIOLÓGÍA DE LA MAMA.....	7
IV EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	8
IV.1 INCIDENCIA	8
IV.2 MORTALIDAD.....	10
V FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA	11
VI FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DEL CÁNCER DE MAMA.....	13
VI.1 CONCEPTO DE FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS.....	13
VI.2 FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS.....	13
VI.3 FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES:	15
VII CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES DE MAMA (O. M. S. 2012).....	18
VII.1 TUMORES EPITELIALES.....	18
VII.1.1 CARCINOMA INVASIVO DE MAMA.....	18
VII.1.2 TUMORES EPITELIALES Y MIOEPITELIALES	19
VII.1.3 LESIONES PRECURSORAS	19
VII.1.4 LESIONES PROLIFERATIVAS INTRADUCTALES.....	19
VII.1.5 LESIONES PAPILARES	19
VII.1.6 PROLIFERACIONES EPITELIALES BENIGNAS	20
VII.2 TUMORES MESENQUIMALES	20
VII.3 TUMORES FIBROEPITELIALES	20
VII.4 TUMORES DEL PEZÓN.....	21
VII.5 LINFOMA MALIGNO	21
VII.6 TUMORES METASTÁTICOS	21
VII.7 TUMORES DE LA MAMA MASCULINA	21
VII.8 PATRONES CLÍNICOS	21
VIII CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA	22
VIII.1 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN.....	22
VIII.2 CLASIFICACIÓN POR ESTADÍOS	26
IX CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA	27
IX.1 SUBTIPOS MOLECULARES	28

IX.1.1	TIPO LUMINAL	28
IX.1.2	HER 2 POSITIVO (10-15%).....	29
IX.1.3	BASAL-LIKE	29
IX.2	FIRMAS GENÉTICAS EN EL CÁNCER DE MAMA	30
IX.2.1	INTRODUCCIÓN	30
IX.2.2	PLATAFORMAS GÉNICAS.....	31
IX.2.2.1	Test Mamma Print (MMP).....	31
IX.2.2.2	Test Oncotipe Dx	31
IX.2.2.3	Test Endo Predict	31
IX.2.2.4	Test PAM 50 /PROSIGNA	32
X	TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA	32
X.1	TRATAMIENTO LOCALREGIONAL DEL CANCER DE MAMA.....	32
X.1.1	TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.....	32
X.1.1.1	Cirugía conservadora.....	33
X.1.1.2	Mastectomía (cirugía radical).....	37
X.1.1.3	Tratamiento quirúrgico de la axila	38
X.1.2	RADIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO EN EL CÁNCER DE MAMA 42	
X.1.2.1	Introducción	42
X.1.2.2	Indicaciones.....	42
X.1.2.3	Esquemas de radioterapia.....	43
X.1.2.4	Regiones a tratar en la radioterapia por cáncer de mama	44
X.2	TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CÁNCER DE MAMA	45
X.2.1	TRATAMIENTO ADYUVANTE EN EL CÁNCER DE MAMA.....	45
X.2.1.1	Tratamiento quimioterápico adyuvante.....	46
X.2.1.2	Tratamiento biológico adyuvante. Terapias dirigidas	47
X.2.1.3	Tratamiento endocrino adyuvante (Hormonoterapia)	49
X.2.2	TRATAMIENTO SISTÉMICO PRIMARIO EN EL CÁNCER DE MAMA. NEOADYUVANCIA	50
X.2.2.1	Indicaciones generales.....	50
X.2.2.2	Tratamiento neoadyuvante con quimioterapia en tumores de mama HER 2 negativos 50	
X.2.2.3	Tratamiento neoadyuvante con quimioterapia y agentes biológicos en tumores Her 2 positivos.....	51
X.2.2.4	Tratamiento neoadyuvante endocrino primario. Hormonoterapia neoadyuvante.....	52
XI	PAPEL DEL ESTROMA TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA	52
XI.1	INFLAMACIÓN CRÓNICA COMO PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER	52

XI.2	LAS METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y EL CÁNCER DE MAMA	54
XI.2.1	INTRODUCCIÓN	54
XI.2.2	ESTRUCTURA DE LAS METALOPROTEASAS (MMPS).....	55
XI.2.3	CLASIFICACIÓN DE LA METALOPROTEASAS (MMPS).....	56
XI.2.4	ACTIVIDAD Y REGULACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS (MMPS) 59	
XI.2.5	METALOPROTEASAS (MMP) EN EL CÁNCER DE MAMA	60
XI.3	METALOPROTEASA 11 (MMP-11) O ESTROMELISINA 3	63
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	69
I	SELECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES INCLUIDAS	70
II	ELABORACIÓN DE MALLAS DE TEJIDO Y TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	73
III	DOBLES TINCIIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	77
IV	EVALUACIÓN DE INMUNOTINCIÓN	77
V	ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS	78
4.	RESULTADOS.....	80
I	ESTUDIO PILOTO	81
II	ESTUDIO DE CONFIRMACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE MMP11 POR LAS CMIS.....	83
III	EXPRESIÓN DE MMP11 Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES	85
IV	MMP11 EXPRESIÓN Y PRONÓSTICO	85
V	ANÁLISIS MULTIVARIANTE	87
5.	DISCUSIÓN.....	88
6.	CONCLUSIONES.....	92
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	94

INTRODUCCIÓN

I ANATOMÍA DE LA MAMA

La mama es una estructura glandular, par y simétrica, de morfología hemiesférica, situada en la parte anterior del tórax, entre el esternón y una línea vertical tangente al límite anteromedial de la axila. En sentido vertical se extiende desde la tercera a la séptima costilla y tiene una prolongación hacia la axila que se denomina cola de la mama o de Spence.

La mama tiene un revestimiento cutáneo fino, con folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. La porción central está ocupada por una prominencia cilíndrica o cónica: la papila mamaria o pezón cuyo extremo libre presenta pequeñas aberturas, que son los orificios de los conductos lactíferos o galactóforos. El pezón está rodeado por una superficie pigmentada anular, la areola, en la que se localizan una pequeñas elevaciones (los tubérculos de Morgagni), que son la desembocadura de las glándulas sebáceas de Montgomery.

La glándula mamaria se encuentra revestida en el plano anterior por la fascia superficial, que la separa del tejido graso subcutáneo. Entre el tejido glandular y la piel existen tractos fibrosos (fibras de Sharpey o ligamentos de Cooper), que le dan fijación.

Esta glándula está constituida por 10 a 20 glándulas independientes (lóbulos), que se dividen en forma de racimos (lobulillos y en acinos). Los conductos procedentes de los lobulillos desembocan en los conductos lactíferos o conductos galactóforos, que convergen radialmente hacia el pezón conformando una dilatación subareolar denominada seno lactífero. En conjunto se trata de una unidad ducto-lobulillar única que confluye hacia el pezón. (Fernández-Cid A. y col. Morfología de la mama normal. En: Fernández -Cid A, editor. Patología Mamaria. Salvat editores. Barcelona: Salvat, 1982, 9-30).

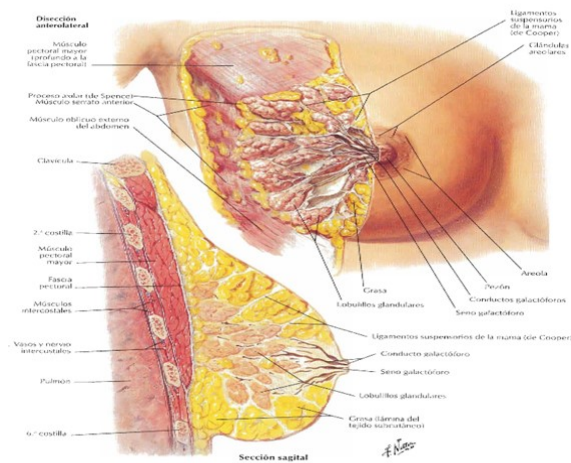


Figura 1

II EMBRIOLOGÍA DE LA MAMA

La glándula mamaria deriva del epitelio corporal externo y su tejido glandular resulta del desarrollo de glándulas sudoríparas de la piel modificadas, que adquieren la capacidad de producir leche.

En la 5ª semana del desarrollo fetal humano, en el tronco embrionario se forman las crestas mamarias ectodérmicas primitivas, que se desarrollan hasta llegar a formar las líneas mamarias, a lo largo de las cuales aparecen 8 pares de nódulos que constituirán los primordios de las glándulas mamarias.

En los humanos solamente permanecerá el cuarto par, situado en en la región prepectoral. (Hamilton Nj Boyd JD Mossman. HW Human embriology. Cambridge UK: Heffer, 1968; 428-32).

Entre la semana 7ª y 8ª se produce un crecimiento en altura y volumen de dicho primordio.

Entre las semanas 12ª y 16ª se formará el músculo liso de pezón y areola.

En la semana 16^a se forman las bandas epiteliales que constituirán la unidad ductolobulillar. A partir de la semana 27^a las hormonas placentarias inducen la canalización de los conductos lactíferos.

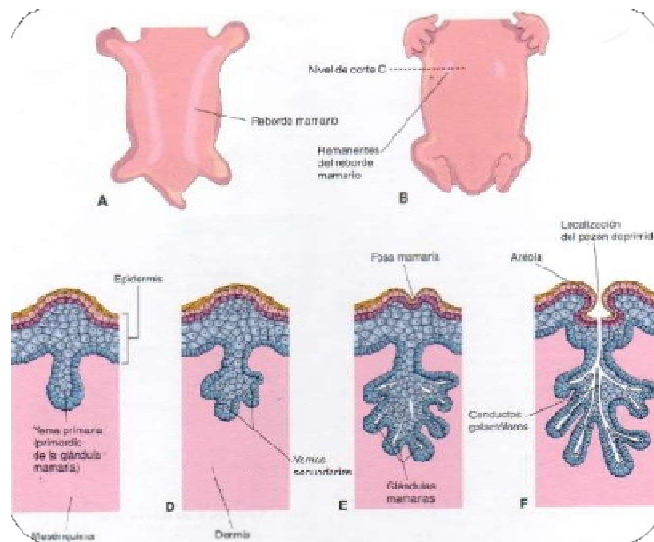


Figura 2

III FISIOLÓGÍA DE LA MAMA

Las mamas, órganos específicos de los mamíferos, están destinadas a la alimentación de las crías, y diferencian morfológicamente a la hembra del varón en la especie humana, por lo tanto constituyen un órgano sexual secundario.

Existen cuatro aspectos fundamentales en el estudio fisiológico de la mama.

1. Mamogénesis: desarrollo mamario que se produce desde los inicios de su formación hasta la madurez plena, incluyendo el estado de gestación y lactancia.
2. Lactogénesis: es la producción de leche por las células especializadas de los acinos o alvéolos glandulares de la mama.
3. Lactopoyesis: es la acción de mantener esta producción de leche durante el tiempo que se mantenga la lactancia.

4. Eyección láctea: exteriorización de la leche según demanda del recién nacido con una succión idónea.

Microscópicamente, la glándula mamaria está compuesta, a nivel de la unidad ducto-lobulillar por unos alvéolos con células productoras de leche, alrededor de los cuales se disponen células musculares lisas, tejido conectivo, grasa y vasos sanguíneos.

La producción de leche se produce cuando se liberan en la hipófisis las hormonas prolactina y oxitocina tras el estímulo succionador de la areola por el recién nacido.

La prolactina es capaz de iniciar y mantener la secreción de leche, pero necesita la acción combinada de varias hormonas para llegar a su máximo rendimiento. Deben estar presentes la hormona del crecimiento y los corticoides para que los esteroides ováricos ejerzan todo su efecto, y una vez preparada la glándula, la prolactina produzca la secreción de leche.

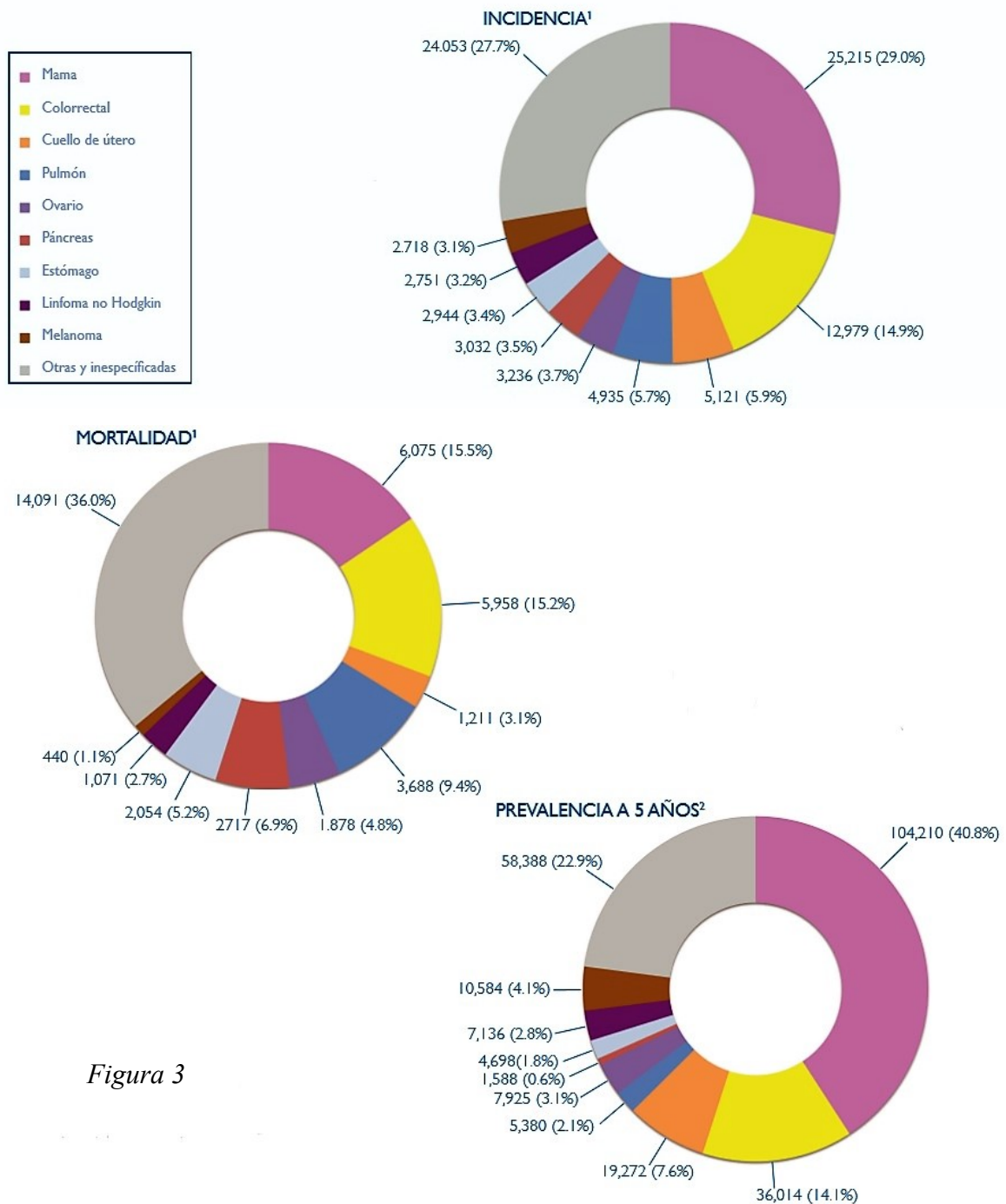
IV EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

IV.1 INCIDENCIA

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres a nivel mundial y también es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres, representando el 14 % del total de muertes y el 23 % del total de nuevos casos de cáncer (Jemal A. et al, 2011).

En Europa, el cáncer de mama fue en 2004, el cáncer con mayor incidencia en las mujeres (29% de nuevos casos) (Althuis et al., 2005; Boyle et al., 2005)

Según el informe GLOBOCAN 2012 por parte de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), la mayor incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años en mujeres españolas es para el cáncer de mama (29%, 15,5% y 40,8%, respectivamente).



¹Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.
²Fuente: Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. Int J Cancer 2013

En ambos sexos, el cáncer con una mayor incidencia es el colorrectal (15%), el que produce una más alta mortalidad es el cáncer de pulmón (20,6%), y el que tiene una prevalencia a 5 años más alta es el cáncer de mama (17,9%).

A nivel mundial, el cáncer con mayor incidencia es el de pulmón (13%), el de mayor mortalidad el de pulmón también (19,4%) y el cáncer de mama es el que presenta la mayor prevalencia a 5 años (19,2%). Por tanto, son datos similares a los observados en nuestro país.

Una de cada 8-10 mujeres sufrirá cáncer de mama en nuestro país a lo largo de su vida.

La tasa de incidencia anual en España se ha incrementado en los últimos años, diagnosticándose 26.000 nuevos casos al año.

IV.2 MORTALIDAD

La disminución de la mortalidad asociada al cáncer de mama se atribuye a la mejora en el tratamiento de la enfermedad y a su detección temprana (DeSantis et al., 2011).

En España, entre 1980 y 2005, se produjeron 131.746 defunciones por cáncer de mama, con un cambio de tendencia descendente a partir de 1992, que persistió hasta 2005 (Vidal Lancis et al., 2010).

Alrededor de 6.000 mujeres fallecen al año por esta causa.

La supervivencia global del cáncer de mama asciende al 94% al año del diagnóstico, disminuyendo hasta el 84% a los 3 años y hasta el 78% a los 5 años del diagnóstico (Berrino et al., 2007).

V FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA

Se considera que todas las mujeres tienen riesgo de padecer cáncer de mama, ya que el 85% de las mujeres con cáncer de mama no tienen ningún factor de riesgo identificable salvo la edad.

La edad es el factor de riesgo individualmente más importante. El riesgo relativo de muerte por cáncer de mama aumenta progresivamente con la edad. El 94% de todos los tumores de mama afectan a mujeres mayores de 40 años (Han et al., 2004).

Antecedentes familiares. Las mujeres con familiares de primer grado (madre o hermana) afectadas por cáncer de mama tienen de dos a tres veces más riesgo de padecer un cáncer mamario respecto a la población general. Los factores que intervienen en estos casos pueden ser genéticos o ambientales.

Historia personal de cáncer de mama. Una mujer que padece cáncer de mama tiene entre tres y cinco veces más riesgo de desarrollar un cáncer en la otra mama, sobre todo si es joven y posee antecedente familiar de cáncer de mama. Además, las mujeres que han padecido un carcinoma in situ tienen un riesgo más elevado de desarrollar un cáncer de mama invasivo (Silverstein et al., 1998; Li et al., 2006).

Historia ginecológica y factores hormonales. La edad de la menarquia temprana, la edad del primer embarazo a término por encima de los 35 años y la edad de la menopausia tardía, ejercen un gran papel sobre la incidencia del cáncer de mama ya que la exposición a elevadas concentraciones de estrógenos endógenos aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama. El embarazo parece tener un doble efecto: a corto plazo se asocia con un incremento del riesgo inicial debido al aumento de hormonas circulantes, pero a largo plazo constituye un

factor protector como consecuencia de la maduración del tejido mamario, que se traduce en una menor tasa de proliferación del mismo (Pike et al., 2004). El riesgo de padecer un cáncer de mama parece aumentar durante la época de ingesta de anticonceptivos orales, sobre todo cuando el tratamiento supera los 10 años.

Existen varios estudios que apoyan el hecho de que la lactancia materna reduce el riesgo de cáncer de mama, en proporción directa con la duración de la misma (a mayor duración de la lactancia, menor riesgo de cáncer de mama). Sin embargo, los beneficios de la lactancia materna en la prevención del cáncer de mama es, en la actualidad un tema de debate (Yang et al., 2008).

Susceptibilidad genética. Se estima que entre el 5% y el 10% de casos de cáncer de mama son debidos a mutaciones en genes de alta penetrancia, de las cuales el 20- 25% ocurren en los genes BRCA-1 y -2 (Breast Cancer -1 y -2) (Chen et al., 2007). El riesgo de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida en portadoras de mutación en el gen BRCA-1 es superior al 60%, y supera al 50% en portadoras de la mutación en el gen BRCA-2 (Antoniou et al., 2006). Otros genes de alta penetrancia son: p53, ATM (ataxia telangiectasia mutated), PTEN (phosphatase and tensin homolog), STK11 (serine-threonine kinase 11) (Wooster et al., 2003). Algunos genes de menor penetrancia, como el recientemente identificado gen CHEK2 (cell-cycle-checkpoint kinase 2) (Meijers-Heijboer et al., 2002), podrían expresarse siguiendo un modelo poligénico (Pharoah et al., 2002).

Presencia de lesiones premalignas. Determinadas lesiones benignas de la mama, como las lesiones proliferativas con atipia, pueden aumentar el riesgo relativo de cáncer de mama.

Factores ambientales. El estatus socioeconómico alto (que refleja distintos patrones reproductivos) y el empleo de programas de cribado poblacional influyen en el riesgo de desarrollar cáncer de mama. La influencia de hábitos de vida como la actividad física y los factores dietéticos, como la ingesta de grasas, alcohol o fitoestrógenos, xenoestrógenos organoclorados y otros contaminantes

como el DDT de los pesticidas utilizados en numerosos alimentos o los parabenes de los productos cosméticos son también considerados factores de riesgo (Friedenreich et al., 2008). Además, la exposición a radiaciones ionizantes, principalmente en edades jóvenes, incrementa el riesgo (Boyd et al., 2003).

VI FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DEL CÁNCER DE MAMA.

VI.1 CONCEPTO DE FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

Los factores pronósticos nos aportan información clínica de la enfermedad en el momento del diagnóstico independientemente del tratamiento. Se relacionan directamente con la mayor o menor agresividad del tumor.

Los factores predictivos nos aportan información sobre la capacidad de respuesta o resistencia tumoral a un tratamiento concreto. Algunos factores, como la expresión del oncogen HER2/neu, son tanto factores pronósticos como predictivos de respuesta al tratamiento, pero no necesariamente los factores pronósticos de supervivencia han de ser también predictivos ni viceversa (Subramaniam et al., 2005).

VI.2 FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS

-**Tamaño tumoral:** el tamaño macroscópico (diámetro máximo que se obtiene de la medición del tumor en al menos dos dimensiones) Se considera uno de los más importantes factores pronósticos independientemente de la afectación ganglionar (Rosen et al., 1991). Se ha demostrado que los tumores de mayor tamaño se

acompañan de intervalos más breves hasta la recurrencia de la enfermedad y conllevan una menor supervivencia.

-Afectación ganglionar, o ganglios linfáticos axilares afectos: es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama. Se sabe que existe una correlación directa entre el número de ganglios afectados por la enfermedad y la supervivencia. El 30% de las pacientes con ganglios negativos recidivan a los 10 años, mientras que la tasa de recurrencia de pacientes con ganglios positivos supera el 70% (Lonning et al., 2007).

En la afectación axilar podemos encontrar distintos grados:

1. Macrometástasis (con tamaño superior a 2 mm).
2. Micrometástasis (con tamaño de 0,2 a 2 mm).
3. Células tumorales aisladas (menores de 0,2 mm).

-Tipo histológico: El subtipo histológico más frecuente de cáncer de mama es el carcinoma ductal invasivo (CDI), que supone el 80% del total, el segundo en frecuencia es el carcinoma lobulillar invasivo (CLI), con un 10%. Hay otros subtipos menos frecuentes, como son los tumores papilares, los mucinosos, los medulares y los adenoideos quísticos, todos ellos asociados a un pronóstico bastante bueno, mientras que los subtipos micropapilar y metaplásico se relacionan con peor pronóstico.

El cáncer de mama inflamatorio es una entidad clínica que se caracteriza por edema y eritema cutáneo al infiltrarse la dermis por el tumor, pero no se considera un subtipo histológico independiente. (Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortovagyi G. Inflammatory breast cancer; a review. J Clin Oncol 1992; 10:1014-24).

-Grado histológico (SBR): Este parámetro se calcula según la escala de Scarf-Bloom-Richardson (SBR) modificado, que tiene en cuenta los siguientes

parámetros histopatológicos: porcentaje de formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y actividad mitótica. A cada uno de los tres factores anteriormente señalados se les asigna una puntuación de 1 a 3. La calificación total alcanzada puede variar de 3 a 9. Una calificación de 3 a 5 etiqueta a los carcinomas como un tumor de grado I (bien diferenciado), 6 ó 7 como grado II (moderadamente diferenciado), y 8 ó 9 como grado III (poco diferenciado).

(Simpson JF. Page DL. Am. J. Clin. Pathol. Oct. 1994; 102: 53-8).

-Índice pronóstico de Nottingham (NPI): tiene en cuenta las características pronósticas más importantes de un tumor: el tamaño, el estado de los ganglios linfáticos y el grado histológico.

La fórmula para obtenerlo es la siguiente:

$NPI = 0,2 \times \text{tamaño tumoral} + \text{estadio de los ganglios} + \text{grado histológico}$.

El tamaño tumoral se expresa en centímetros, y tanto el estadio de los ganglios linfáticos como el grado histológico cuentan con una puntuación de 1 a 3. El valor más pequeño del NPI, tiene el mejor pronóstico.

-Invasión angiolinfática y perineural: la invasión angiolinfática se define como la presencia de émbolos tumorales intraendoteliales en el tejido que rodea al tumor. Es un factor predictivo de mal pronóstico, de recurrencia precoz y metástasis a distancia (Mirza et al., 2002; Schoppmann et al., 2004; Lee et al., 2006).

VI.3 FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES:

-Receptores hormonales (Receptores estrogénicos, RE y Receptores de progesterona, RP):

Los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) han sido de los primeros factores moleculares en usarse en la práctica clínica (Maass et al., 1975;

Wittliff, 1984), pues contribuyen en la regulación de la proliferación y diferenciación celular mamaria. Se recomienda la determinación de estos receptores en el tumor primario, recurrencias y en las lesiones metastáticas (Allred et al., 2009; Hammond et al., 2010), ya que es imprescindible para la selección de pacientes que se beneficiarán de un tratamiento hormonal, mejorando así el pronóstico y la supervivencia de estas pacientes. La expresión de estos factores se asocia con una menor agresividad tumoral. Entre el 55-65% de los cánceres de mama y el 45-55% de sus metástasis expresan los receptores estrógenos y entre el 55-60% responden a la administración de terapia hormonal (Cui et al., 2005). Se considera que la presencia conjunta de receptores de estrógeno y progesterona en un mismo tumor, aumenta la probabilidad de respuesta a la hormonoterapia, desde un 55% en pacientes con única expresión del receptor de estrógeno, a un 75-80% (Wittliff, 1984). La expresión del receptor de progesterona es considerada al menos tan importante como la de los receptores de estrógeno para predecir la respuesta del cáncer de mama, así la pérdida de expresión del receptor de progesterona por las células tumorales está asociada con un peor pronóstico (McGuire et al., 1986).

Una disminución en la expresión de RE, la baja o no expresión de RP y la positividad del receptor Her-2 se asocian con una menor probabilidad de respuesta a cualquier tipo de terapia hormonal (Rastelli et al., 2008). Los tumores que sobreexpresan Her2-neu/c-erbB2 son resistentes al tratamiento hormonal y, por tanto, requieren el bloqueo de la vía de Her-2, además de la deprivación estrogénica (Shou et al., 2004; Osborne et al., 2005).

-Oncogen c-Erb B2: El protooncogen c-erbB2 se encuentra en el cromosoma 17, pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y codifica una proteína-receptor tirosina-quinasa transmembrana (Her2/neu o receptor Her2). Se considera que dicho receptor está sobreexpresado si se observa positividad de tres cruces (3+) en la determinación por inmunohistoquímica de la expresión de la proteína Her2/neu en las células

tumorales o, en casos de menor positividad (2+), si la hibridación in situ fluorescente (FISH) es positiva, es decir, si se observan amplificación de las copias del gen c-erbB2 en las células tumorales.

La sobreexpresión de Her2/neu se correlaciona con un peor pronóstico, un menor tiempo libre de enfermedad y supervivencia global, la presencia de metástasis ganglionares, hormono-independencia, una mayor capacidad proliferativa y una resistencia al tratamiento con tamoxifeno. Sin embargo, este factor no ha sido relacionado con la edad, el tamaño tumoral ni el grado histológico (Dandachi et al., 2004; Viani et al., 2007).

Desde los años 80 hasta la actualidad, se ha acreditado el valor pronóstico y predictivo de Her2/neu (Ferretti et al., 2007; Shah et al., 2011) y, su determinación está universalmente aceptada en la práctica clínica, reconociéndose imprescindible para la estrategia terapéutica.

-Índice de proliferación celular Ki-67: El antígeno Ki-67, identificado por Gerdes y cols. en 1991, fue descrito como una proteína nuclear tipo no histona. La localización de la proteína Ki-67 es variable y heterogénea durante las diferentes fases del ciclo celular. Durante el inicio de la fase G1 se observa una débil tinción que progresivamente aumenta por condensación en gránulos situados alrededor del nucleolo. Durante las fases S y G2 se encuentra principalmente en la región del nucleolo y alrededor de la heterocromatina. Cuando la membrana nuclear se rompe durante la mitosis temprana, Ki-67 muestra una intensa expresión asociada a la condensación de los cromosomas en el citoplasma. Su medición puede realizarse por técnicas inmunohistoquímicas con el anticuerpo monoclonal MIB-1. Se considera un tumor con baja actividad proliferativa cuando existe menos de un 10% de células tumorales positivas; si es superior al 20%, el tumor es de alta actividad proliferativa.

La expresión de Ki-67 se correlaciona directamente con el grado histológico (grado de diferenciación), la invasión vascular venosa, y las metástasis ganglionares. Sin embargo, se correlaciona inversamente con la presencia de receptores hormonales, y otros indicadores de proliferación (Brown et al., 1996).

Por lo tanto, Ki-67 puede ser considerado un factor pronóstico en cáncer de mama puesto que una expresión elevada se asocia a un peor pronóstico y a un menor tiempo libre de enfermedad; además de un factor predictivo de respuesta a tratamiento hormonal adyuvante (Viale et al., 2008).

-P53: El gen TP53 o antioncogen p53, localizado en el cromosoma 17p13, es un estabilizador genómico que actúa como inhibidor de la progresión del ciclo celular y facilita la muerte celular programada. Concretamente, la proteína interviene en el control del ciclo celular en el paso G0 (en reposo) a G1 (en proliferación activa), como mediadora de la diferenciación, de la reparación del ADN y de la apoptosis. Las mutaciones de la proteína p53 llevan a una pérdida en la regulación del ciclo celular, encontrándose en el 20% de los cánceres de mama.

Existe una asociación significativa entre la sobre-expresión de la proteína p53 mutada y el tiempo libre de enfermedad, pudiendo además predecir la respuesta al tratamiento con tamoxifeno (Erdem et al., 2005; Dookeran et al., 2010); sin embargo, si se considera el estatus hormonal de la paciente, p53 no parece tener impacto sobre el tiempo libre de enfermedad ni la supervivencia (Rossner et al., 2009).

VII CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES DE MAMA (O. M. S. 2012)

VII.1 TUMORES EPITELIALES

VII.1.1 CARCINOMA INVASIVO DE MAMA

- CDI: Carcinoma ductal invasivo de mama (NST).

- CLI: Carcinoma lobulillar invasivo de mama.
- Carcinoma tubular.
- Carcinoma cribiforme.
- Carcinoma con hallazgos medulares.
- Carcinoma con diferenciación apocrina.
- Carcinoma con diferenciación de células en anillo de sello.
- Carcinoma micropapilar invasivo.
- Carcinoma metaplásico.
- Carcinoma con hallazgos neuroendocrinos.
- Otros menos frecuentes.

VII.1.2 TUMORES EPITELIALES Y MIOEPITELIALES

- Adenoma pleomórfico.
- Adenomioepitelioma.
- Carcinoma adenoide quístico.

VII.1.3 LESIONES PRECURSORAS

- Carcinoma ductal in situ
- Carcinoma lobulillar in situ.
- Hiperplasia lobulillar atípica.

VII.1.4 LESIONES PROLIFERATIVAS INTRADUCTALES

- Hiperplasia ductal usual.
- Lesiones de células columnares (atipia epitelial plana).
- Hiperplasia ductal atípica.

VII.1.5 LESIONES PAPILARES

- Papiloma intraductal (con hiperplasia atípica, CDIS, o CLIS).
- Carcinoma intraductal papilar.
- Carcinoma papilar encapsulado.
- Carcinoma papilar sólido (in situ o invasivo).

VII.1.6 PROLIFERACIONES EPITELIALES BENIGNAS

- Adenosis esclerosante.
- Adenosis apocrina.
- Adenosis microglandular.
- Cicatriz radial/lesión esclerosante compleja.
- Adenomas.

VII.2 TUMORES MESENQUIMALES

- Fascitis nodular.
- Miofibroblastoma.
- Fibromatosis tipo desmoide.
- Tumor miofibroblástico inflamatorio.
- Lesiones vasculares benignas.
- Hiperplasia estromal pseudoangiomatosa.
- Tumor de células granulosas.
- Neurofibroma.
- Schwannoma.
- Angiolipoma.
- Rabdomiosarcoma.
- Osteosarcoma.
- Leiomioma/leiomiosarcoma.

VII.3 TUMORES FIBROEPITELIALES

- Fibroadenoma.
- Tumor phyllodes.
- Hamartoma.

VII.4 TUMORES DEL PEZÓN

- Adenoma del pezón.
- Adenoma siringomatoso.
- Enfermedad de Paget.

VII.5 LINFOMA MALIGNO

- Linfoma difuso B de células grandes.
- Linfoma Burkitt.
- Linfoma de células T.
- Linfoma de células B extranodal o tipo MALT.
- Linfoma folicular.

VII.6 TUMORES METASTÁTICOS

VII.7 TUMORES DE LA MAMA MASCULINA

- Ginecomastia.
- Carcinoma in situ y carcinoma invasivo.

VII.8 PATRONES CLÍNICOS

- Carcinoma inflamatorio.
- Carcinoma de mama bilateral.

VIII CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA

Es el sistema utilizado por la UICC (Unio Internationalis Contra Cancrum) y la AJCC (American Joint Committee on Cancer) para la clasificación de los tumores sólidos. Creado por Pierre Denoix entre 1943 y 1952, se ha actualizado en diferentes ocasiones para el cáncer de mama, hasta la actual edición, publicada en 2012.

VIII.1 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

T: Tamaño del tumor primario.

N: Afectación ganglionar.

M: Presencia o no de metástasis a distancia.

c: Estadiaje basado en datos clínicos.

p: Estadiaje basado en la anatomía patológica.

y: Estadiaje realizado tras tratamiento neoadyuvante.

r: Recidivas locales o recurrencias.

T_m ó (n°): En el caso de lesiones múltiples. Se describen con la T del foco mayor y como subíndice “m” o el número de lesiones entre paréntesis

Tabla 1.

Tumor Primario (T)	
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No evidencia tumoral
Tis	Carcinoma in situ.
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal "in situ".
Tis (CLIS)	Carcinoma Lobulillar "in situ".
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin tumor. La enfermedad de Paget asociada a tumor se clasifica de acuerdo al tamaño del tumor.
T1	Tumor < 2 cm. en su mayor dimensión.
T1mic	Microinvasión < 0.1 cm. en su mayor dimensión.
T1a	Tumor > 0.1 cm. pero no > 0.5 cm. en su mayor dimensión.
T1b	Tumor > 0.5 cm. pero no > 1 cm. en su mayor dimensión.
T1c	Tumor > 1 cm. pero no > 2 cm. en su mayor dimensión.
T2	Tumor > 2 cm. pero no > 5 cm. en su mayor dimensión.
T3	Tumor > 5 cm. en su mayor dimensión.
T4*	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica y/o piel.
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir el músculo pectoral mayor.
T4b	Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama.
T4c	Ambos T4a y T4b.
T4d	Carcinoma inflamatorio.

Tabla 2.

Ganglios linfáticos regionales (cN)

NX	Cuando no se pueden evaluar (p.e. Cirugía previa).
N0	No metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en ganglios homolaterales móviles.
N2	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos o agrupados, o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes en ausencia de afectación clínica axilar.
N2a	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos entre si o a otras estructuras.
N2b	Metástasis sólo en ganglios homolaterales de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes y en ausencia de afectación clínica evidente axilar.
N3	Metástasis en ganglios infraclaviculares homolaterales, o en cadena mamaria interna homolateral clínicamente aparentes en presencia de afectación axilar clínicamente evidente; o metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales con o sin afectación axilar o de la mamaria interna.
N3a	Metástasis en ganglios infraclaviculares y axilares homolaterales.
N3b	Metástasis en cadena mamaria interna y axilar homolateral.
N3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales.

Tabla 3.

Metástasis a distancia (M)

MX	No se pueden evaluar.
M0	No metástasis a distancia.
cM0(i+)	No evidencia clínica ni radiológica de metástasis pero presencia de depósitos de células tumorales detectadas en sangre circulante, médula ósea u otro tejido ganglionar no regional que es < 0,2mm en un paciente sin signos ni síntomas de metástasis.
M1	Metástasis a distancia presentes.

VIII.2 CLASIFICACIÓN POR ESTADÍOS

Las diversas combinaciones de las subcategorías de T, N, y M definen los siguientes cuatro estadios designados como I, II, III, y IV en orden ascendente de gravedad (*Tabla 4*).

Tabla 4: Clasificación del estadio tumoral en función del TNM.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1b	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1b	N1mi	M0
IIA	T0	N1c	M0
	T1b	N1c	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

IX CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

En las últimas décadas se ha comprobado que tumores de mama semejantes desde el punto de vista de sus factores pronósticos clásicos, como son la morfología y la histología, se comportan de forma muy distinta. Esta diferencia entre los mismos, se establece a nivel molecular, ya que presentan distinto comportamiento biológico, expresan genes diferentes y tienen distinta sensibilidad a los tratamientos.

Todo ello nos ha llevado a una nueva clasificación basada en la evaluación de la expresión génica de estos tumores mediante micromatrices, o lo que es lo mismo, sondas de oligonucleótidos dirigidas a todas las secuencias de ADN del genoma humano. Con ellas se consigue lo que se conoce como “mapa de calor”, donde los colores indican el nivel de expresión génica formando un autentico retrato molecular de la enfermedad.

Esta clasificación aparece por primera vez en un artículo de la revista Nature publicado por el Dr. Charles Perou en el año 2000 (Perou C., Sorlie T., Eisen M. et. al Molecular portraits of human of human tumors. Nature 2000; 406:747-52). En este artículo, según un estudio realizado con microarrays de expresión génica, define cinco subtipos de cáncer de mama:

Luminal A, luminal B, HER 2 positivo y Basal-like.

Esta clasificación ha sido posteriormente modificada y acotada, hasta que en el Consenso de St. Gallen 2015 se ultima la clasificación actualmente vigente, y los grupos quedan establecidos como:

- triple negativo.
- Her 2 positivo receptor hormonal positivo y receptor hormonal negativo.
- tumores con receptores hormonales positivos (luminales), donde se diferencia entre tumores luminales con alta expresión del receptor y baja proliferación

(luminal A); tumores luminales con grado intermedio; y tumores luminales con baja expresión del receptor y alta proliferación (luminal B). (Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A et al. Tailoring therapies Improving the Management of early breast cancer: St. Gallen International expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals Oncology* 00:1-14).

IX.1 SUBTIPOS MOLECULARES

IX.1.1 TIPO LUMINAL

Estos tumores se caracterizan por la alta expresión de genes asociados a las células epiteliales luminales del ducto mamario. Se trata de un grupo muy frecuente de tumores que expresan receptores hormonales, principalmente de estrógenos y también expresan queratinas de bajo peso molecular (CK 7, CK8 y CK18).

Representan el 75-80 % de los carcinomas de mama.

Se han descrito dos subgrupos con diferente pronóstico:

- **Luminal A (50-60 %):** Son los tumores de mama más frecuentes y tienen una baja expresión de genes proliferativos y alta expresión de genes luminales, como el receptor de estrógeno y el de progesterona. En inmunohistoquímica tienen alto grado de positividad para receptores hormonales de estrógenos y progesterona y el Ki 67 es bajo.

Se caracterizan también por la ausencia de sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (Her 2). Son tumores con grado histológico bajo y su pronóstico es excelente.

(Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *Internacional (Ludwig) Breast Cancer Study Group. J Clin Oncology*1992; 10(7):1049-56).

- **Luminal B (10-20 %):** Son tumores con un mayor número de mutaciones y de alteraciones cromosómicas, por lo que suelen tener un Ki 67 alto. Expresan receptores hormonales de estrógenos y progesterona, aunque suelen tener menor expresión del receptor de progesterona. (Prat A, Cheang MCU, Martín M et al: Prognostic Significance of Progesterone Receptor-Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2013; 31: 203-9). También expresan el receptor de Her 2.

Presentan un fenotipo agresivo, con alto grado histológico, invasión linfovascular extensa, mala respuesta a quimioterapia y cierta resistencia a la hormonoterapia.

IX.1.2 HER 2 POSITIVO (10-15%)

Su principal característica es la amplificación o sobreexpresión de genes relacionados con el receptor HER 2 (human epidermal growth factor receptor-2). Esta sobreexpresión se detecta mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Si la expresión es moderada, debe comprobarse si está amplificado mediante técnicas de inmunofluorescencia (FISH).

Poseen numerosas alteraciones cromosómicas. Son tumores altamente proliferativos, con grado histológico elevado.

Presentan peor pronóstico que los subtipos luminales A y B, aunque con los recientes tratamientos diana específicos con anticuerpos monoclonales, su evolución ha mejorado sustancialmente en los últimos años. Además tienen una elevada respuesta a quimioterapia. (Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A et. al. Tailoring therapies-improving the Management of early breast cancer; St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast cancer 2015. *Annals of Oncology* 2015).

IX.1.3 BASAL-LIKE

Son tumores aneuploides, con el mayor número posible de alteraciones cromosómicas, así como gran número de mutaciones. Se asocia con la expresión

de genes característicos de las células mioepiteliales y basales del acino mamario. Expresan queratinas de alto peso molecular (CK5/6, CK14 y CK17). Constituyen un 10-15% de los carcinomas de mama.

Se caracterizan por su negatividad a los receptores hormonales de estrógenos y progesterona y por la ausencia de amplificación de HER 2; el tipo basal-like es por ello considerado como un fenotipo **“triple negativo”**.

Son tumores de mal pronóstico clínico, a pesar de la buena respuesta al tratamiento quimioterápico, debido a que esta respuesta al tratamiento suele ser de corta duración, lo que representa la denominada paradoja del triple negativo. Los triple negativos incluyen también un grupo de tumores denominados **“claudin low”** con propiedades muy parecidas a los tumores derivados de las stem-cells, que tienen baja expresión de moléculas de adhesión. A este variado grupo pertenecen el carcinoma medular y el carcinoma metaplásico.

IX.2 FIRMAS GENÉTICAS EN EL CÁNCER DE MAMA

IX.2.1 INTRODUCCIÓN

Dado que el cáncer de mama, gracias a las campañas de cribado poblacional, se diagnostica en estadios cada vez más iniciales, en ciertos casos los factores pronósticos clásicos como son la afectación ganglionar, el tamaño del tumor o el grado histológico, incluso los relacionados con la biología del tumor, como la expresión de receptores hormonales y del factor de crecimiento de membrana Her-2, nos pueden resultar insuficientes a la hora de decidir la necesidad de instaurar un tratamiento quimioterápico adyuvante. Hablaríamos del amplio grupo de pacientes con cáncer de pequeño tamaño (estadios T1 y T2), con receptores hormonales positivos (luminales) y sin expresión para el receptor de membrana HER 2. En estos casos resulta muy útil la determinación de perfiles

genéticos que se pueden llevar a cabo por novedosas técnicas como son los ADN microarrays (gene chip) o la Polymerase Chain Reaction (PCR).

IX.2.2 PLATAFORMAS GÉNICAS

IX.2.2.1 Test Mamma Print (MMP)

Desarrollado por el Netherland Cancer Institute en 2002. Se trata de un método basado en matrices de ADN (arrays), que expresan 70 genes. Los resultados de la prueba clasifican a los tumores en dos grupos, de alto o de bajo riesgo.

Los de alto riesgo tienen una supervivencia libre de metástasis menor al 90 % en 10 años. Los de bajo riesgo tienen una supervivencia libre de metástasis mayor al 90 % en 10 años.

IX.2.2.2 Test Oncotype Dx

Desarrollado por Genomic Health Inc. Es un test basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Cuantifica la expresión de 21 genes. Permite agrupar a las pacientes según el riesgo de recidiva tumoral, en tres niveles. Riesgo bajo, intermedio o alto.

IX.2.2.3 Test Endo Predict

Es una plataforma génica basada en valores de Rt-PCR cuantificada, que maneja un panel de 8 genes y que diferencia dos grupos de pacientes, todas ellas con cáncer de mama precoz, receptor estrogénico positivo y HER2 negativo, un grupo de pacientes tendrá un buen pronóstico y las otras mal pronóstico en cuanto al riesgo de recaídas.

Es importante destacar que este test ha demostrado ser eficaz tanto en muestras quirúrgicas como en biopsias preoperatorios del tumor (Müller BM, Brase JC, Haufe F et al. Comparison of the RNA-based Endopredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections. J. Clin Pathol 2012; 660-2).

IX.2.2.4 Test PAM 50/PROSIGNA

Este test presentado en 2009 por el profesor Charles M. Perou mide la expresión de 50 genes específicamente seleccionados. Más recientemente esta plataforma fue mejorada con una nueva tecnología (nCounter), que tiene fácil aplicación en clínica y que puede ser utilizada a nivel local, sin necesidad de centralizarlo en un laboratorio.

El test puede determinar cuales son las pacientes con bajo riesgo de recidiva a 10 años que no precisan tratamiento quimioterapico adyuvante y también puede determinar el grupo de pacientes que no precisan terapia hormonal más de 5 años dado su bajo riesgo de recidiva.

X TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

El tratamiento del cáncer de mama ha ido evolucionando históricamente, y desde un tratamiento local, cuyo eje principal era la cirugía basada en técnicas quirúrgicas agresivas y mutilantes, se ha cambiado a un enfoque multidisciplinar en el que el cáncer de mama es considerado una enfermedad sistémica y la cirugía se complementa con tratamientos locales como la radioterapia y sistémicos como la quimioterapia, la hormonoterapia y las terapias dirigidas.

X.1 TRATAMIENTO LOCORREGIONAL DEL CANCER DE MAMA

X.1.1 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

En las últimas décadas, este tratamiento basado en la extirpación del tumor y en el freno de su extensión hacia el drenaje linfático propio de la mama, que es la

axila; ha ido evolucionando hacia una cirugía cada vez más conservadora , evitando así gran parte de los efectos secundarios que conllevan las cirugías más agresivas.

X.1.1.1 Cirugía conservadora

Su principal objetivo es poder preservar la mama, consiguiendo un resultado estético aceptable con el máximo control de la enfermedad. Para ello, se realiza la extirpación tumoral completa con márgenes aceptables de tejido peritumoral, se denomina tumorectomía o lumpectomía. Si la extirpación es amplia y abarca todo un segmento de la mama, con vértice dirigido hacia el complejo areola-pezones, hablaremos de segmentectomía. Se denomina cuadrantectomía a la extirpación de un cuadrante entero de la mama, incluyendo la piel del mismo. (Manual de Práctica Clínica en Senología .20015. 3ª Edición. Capítulo 30).

Este tipo de cirugía estaría contraindicada en determinados casos:

- en gestantes que precisen realizar radioterapia antes de finalizar el embarazo.
- en casos de microcalcificaciones extensas en las pruebas de imagen.
- en lesiones multicéntricas.
- en aquellos casos de márgenes afectados en los que se ha realizado una reexcisión y continúa teniendo márgenes positivos. (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Breast Cancer.2015).

- Localización de lesiones no palpables:

La evolución en los últimos años hacia un diagnóstico de lesiones en estadios iniciales y con tamaño cada vez más pequeño, nos plantea la dificultad añadida de reseccionar lesiones no palpables en numerosas ocasiones.

Cuando los tumores son diagnosticados en estos estadios iniciales en los cuales presentan tamaños muy pequeños, se viene realizando la localización preoperatoria de la lesión por métodos de imagen como son el marcaje con arpón y la ecografía.

También es importante la localización exacta de la zona en que se ha llevado a cabo la B.A.G. (biopsia con aguja gruesa) o la B.A.V (biopsia asistida por vacío)

en lesiones no palpables. En estos casos resulta muy útil la colocación inmediata de marcadores metálicos guiada radiológicamente, como el marcador Hidromark (Compuesto de titanio rodeado por gel) o semillas radiactivas que se localizarán en el momento de la intervención quirúrgica mediante métodos de imagen como son la esteroataxia y la ecografía en el primer caso, y mediante sonda gamma las semillas radioactivas.

Otro método para la localización de lesiones no palpables mediante gammacámara, es la inyección de un trazador isotópico como el tecnecio 99 (ROLL, Radioguided Ocult Lesion Localisation). (Paganelli G, Luini A., Veronesi U. Radioguided Ocult lesion Localitation (ROLL) in breast cancer: maximizing efficacy , minimizing mutilation. *Annals Oncology* 2002; 13 : 1839-40).

- Cirugía oncoplástica:

Esta cirugía engloba una serie de procedimientos que constituyen un nuevo enfoque en el manejo del cáncer de mama, aportando a la mujer una importante mejora en su calidad de vida al conseguir una importante disminución del impacto de su imagen corporal sin descuidar el control locorregional de la enfermedad.

Sus principales objetivos se centran en preservar el contorno mamario, conseguir una óptima simetrización respecto a los volúmenes mamarios, disminuir la visibilidad de las cicatrices y optimizar la mama para conseguir una irradiación idónea con el mínimo daño posible , evitando así graves lesiones por radiodermatitis en mamas con importante ptosis.

Al mismo tiempo, estas técnicas consiguen ampliar las indicaciones del tratamiento conservador a procesos más extensos, incluso a lesiones multifocales o multicéntricas. (Audretsch W, Rezal M, Kolotas C, et al. Tumor specific immediate reconstruccion in breast cancer patients. *Perspect. Plastic Surg.* 1998; 11:91-106).

El resultado estético de una tumorectomía depende, principalmente, del tipo de incisión utilizada y del volumen mamario extirpado. Estos dos objetivos se podrán conseguir utilizando abordajes de baja visibilidad y patrones

oncoplásticos que permitan la extirpación del volumen mamario necesario para un control óptimo de la enfermedad evitando la deformidad gracias a técnicas de remodelación adecuadas.

Abordajes de baja visibilidad:

Estos abordajes consiguen realizar resecciones adecuadas a través de incisiones poco visibles. Estas incisiones deben mantener la integridad del envoltorio mamario para evitar deformidades y despazamientos del complejo areola-pezones. (Acea Nebril B. Cirugía Oncológica de la mama. Técnicas oncoplásticas y reconstructivas. ed. Elsevier, Barcelona 2013; 2: 11-21).

Los más utilizados son:

-Abordaje periareolar (Round-block). Un abordaje muy utilizado desde hace tiempo por su buen resultado cosmético, especialmente en el contexto de patología benigna.

-Abordaje inframamario. El surco inframamario constituye un abordaje óptimo, ya que normalmente, la ptosis mamaria oculta el surco. Su principal limitación se encuentra en conseguir la remodelación del contorno del polo inferior, difícil de conseguir en extirpaciones locales con movilización de tejido del cuadrante interointerno. (Acea Nebril B. Los segmentos mamarios. Un modelo para la prevención de deformidades en la cirugía conservadora del cáncer de mama . Cir. Esp. 2011; 89 (9): 574-80).

-Abordaje axilar. Indicado principalmente en los tumores de CSE y cola de Spence. Permite la extirpación del tumor y también la estadificación ganglionar gracias a su proximidad a la axila. Se realiza una pequeña incisión en la línea axilar anterior.

- Abordaje torácico lateral (ATL). Además de permitir una extirpación local o total de la mama, permite el acceso a una reconstrucción con dorsal ancho.

Patrones oncoplásticos:

La localización del tumor a extirpar, así como las características de la mama en cuanto a tamaño de la misma y grado de ptosis que presenta, van a condicionar el tipo de cirugía indicada en cada caso.

Existen siete patrones básicos de técnicas oncoplásticas, que pueden abarcar todas las localizaciones tumorales y características mamarias posibles.

- Mamoplastia vertical de pedículo superior (de rama única).
- Mamoplastia vertical de pedículo superior (de doble rama).
- Mamoplastia vertical de pedículo inferior (de doble rama).
- Mamoplastia circular (periareolar o Round -Block).
- Mamoplastia lateral.
- Mamoplastia horizontal.
- Mamoplastia de rotación inferior.

(Acea Nebril B. Cirugía oncológica de la mama. Técnicas oncoplásticas y reconstructivas. Ed.Elsevier, Barcelona 2013 ; 5: 49-54).

- Tratamiento conservador después del tratamiento neoadyuvante:

Aunque en un principio el tratamiento neoadyuvante preoperatorio se limitaba a los casos en los cuales no era técnicamente posible el tratamiento quirúrgico inicial (carcinomas inflamatorios o localmente avanzados) y su enfoque era más bien el de una terapia paliativa; con posterioridad las indicaciones se fueron ampliando a estadios más precoces, como son los tumores mayores de 2 centímetros en los que la desproporción entre el volumen tumoral y el mamario no permite una cirugía conservadora.

Últimamente se ha llegado a afirmar que cualquier tumor con buena respuesta a terapia sistémica puede ser un buen candidato a la cirugía conservadora tras neoadyuvancia, por muy pequeño que sea el tamaño del tumor.

Las contraindicaciones para una cirugía conservadora tras terapia sistémica primaria serían:

- Tumoración residual mayor a 5 cm.
- Enfermedad multicéntrica.
- Carcinoma inflamatorio.
- Microcalcificaciones extensas.
- Afectación de la piel o de la pared torácica.
- Imposibilidad de tratamiento radioterápico.

(Chen A M, Mesic- Bernstam F, Hunt KK, et al. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy. Cancer 2005; (4): 689-95).

La prueba de imagen considerada de elección para valorar la respuesta al tratamiento neoadyuvante y poder indicar así una cirugía conservadora, es la Resonancia Magnética.

X.1.1.2 Mastectomía (cirugía radical)

La mastectomía como técnica quirúrgica, consiste en la extirpación completa de la glándula mamaria. Indicada en el caso de no poder realizarse una cirugía conservadora, dada la desproporción entre el tamaño de la mama y el tamaño tumoral. También tiene indicación cuando no es posible el tratamiento complementario con radioterapia, e incluso por deseo expreso de la paciente , que se debe respetar siempre.

- Mastectomía clásica:

Esta técnica, propuesta por Halsted a finales del siglo XIX como tratamiento curativo del cáncer de mama, ha sufrido diferentes modificaciones a lo largo de los años. Para realizar una extirpación completa del tejido mamario , se realiza una disección adecuada de los colgajos dérmicos , a nivel de piel se debe alcanzar la fascia superficial anterior y se incluye, en profundidad, la aponeurosis del músculo pectoral mayor . La incisión vertical que propuso Halsted está en desuso, siendo ahora la más utilizada la incisión transversal en huso de Stewart,

con mayor o menor oblicuidad según la localización de tumor (más oblicua cuando el tumor está localizado en cuadrantes inferointernos o superoexternos).

- Mastectomía preservadora de piel, MPP (skin-sparing mastectomy):

Esta técnica se caracteriza por conservar el envoltorio cutáneo de la mama, y mantener los contornos mamarios.

Precisa cicatrices de baja visibilidad, lo cual se ve muy favorecido por una técnica de reconstrucción inmediata. La selección cuidadosa de los pacientes resulta fundamental para el éxito de la cirugía.

Se realiza una extirpación completa de la glándula mamaria y del complejo areola-pezones (CAP), por lo que se trata de una técnica muy segura desde el punto de vista oncológico. (Carlson GW. Technical advances in skin spring mastectomy. *Int. Journal of Surgical Oncology*, 2011).

- Mastectomía preservadora de piel y pezón , MPPP (nipple- sparing mastectomy):

Esta técnica permite conservar el envoltorio cutáneo y del complejo areola -pezón (CAP). Sus indicaciones principales son: tumores alejados del CAP o en mastectomía reductora de riesgo bilateral.

El hecho de preservar el CAP aumenta la dificultad en la técnica, ya que debe hacerse una limpieza exhaustiva del tejido retroareolar para evitar las recidivas a nivel del tejido glandular residual de la zona. (De Alcantara Filho P, Capko D, Barry JM, et al. Nipple-sparing mastectomy for Breast Cancer and risk-reducing surgery: the Memorial Sloan -Kettering Cancer Center experience . *Annals of Surgery Oncology* 2011, 18 (11): 3117-22).

X.1.1.3 Tratamiento quirúrgico de la axila

El factor pronóstico más importante a día de hoy en el cáncer de mama, sigue siendo el estado de los ganglios linfáticos axilares. Esta estadificación se realizaba clásicamente mediante una linfadenectomía axilar reglada (niveles ganglionares I y II de los tres niveles de Berg), y el estudio histológico de los mismos .

Actualmente, si el estado de los ganglios axilares lo permite, la técnica diagnóstica a realizar es la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC), que supone una importante disminución de la morbilidad a las pacientes.

- Linfadenectomía:

El vaciamiento axilar o linfadenectomía se ha limitado en la actualidad a los casos en los que existe afectación tumoral ganglionar diagnosticada ya previamente a la cirugía (mediante BAG guiada por ecografía) o a los casos en los que la biopsia selectiva del ganglio centinela nos indica la presencia de macrometástasis.

La referencia anatómica principal en la cirugía del vaciamiento axilar es el músculo pectoral menor, el cual marca los límites de los 3 niveles ganglionares existentes en este territorio (niveles ganglionares de Berg).

Otra importante referencia anatómica la constituye la vena axilar, límite superior de la linfadenectomía y principal estructura anatómica a preservar. A la vena axilar se accede abriendo la aponeurosis delto-pectoral.

También se debe preservar el nervio del serrato mayor (nervio de Charles Bell) y el paquete vasculonervioso subescapular, que incluye el nervio del músculo dorsal ancho. (Fábregas R. Tratamiento quirúrgico del Cáncer de Mama Invasor. Mastología. A. Fernández-Cid et al. 2ª edición, 2000; 569-79).

- Biopsia selectiva de ganglio centinela:

Se considera ganglio centinela al primer ganglio que recibe el drenaje linfático aferente desde un tumor primario. Por lo tanto, este ganglio sería el primero en presentar metástasis en el caso de existir diseminación linfática del tumor desde la mama.

La técnica más aceptada actualmente para la localización del ganglio centinela, es la inyección de radiocoloides (en Europa los más utilizados son nanocoloides de albúmina marcados con ^{99m}Tc) a nivel peri o intratumoral (inyecciones profundas) o cutáneo-areolares (inyecciones superficiales).

La localización en gammagrafía del ganglio centinela, está directamente relacionada con el éxito de su identificación intraoperatoria. (Marchal F, Rauch P, Morel O, MayerJC, Olivier P, Leroux A, et al. Results of preoperative lymphoscintigraphy for breast cancer are predictive of identification of axillary centinela lymph nodes. World J. Surgery 2006; 30: 1-6).

La detección de las partículas gamma que marcan al GC se realiza por medio de una gammacámara portátil en el quirófano. De este modo se puede llevar a cabo la extirpación del mismo y, de forma intraoperatoria, realizar su estudio anatomopatológico.

El estudio del ganglio centinela puede llevarse a cabo por varios procedimientos, todos ellos válidos según las circunstancias y el centro donde nos encontremos:

-Estudio histológico clásico mediante cortes por congelación y tinción con hematoxilina-eosina (H-E). Según el sistema TNM, se pueden clasificar las metástasis, de acuerdo a su diámetro, en 3 grupos:

< 0,2 mm (células tumorales aisladas).

> 0,2 y < de 2 mm (micrometástasis).

> 2 mm (macrometástasis).

-Citología por raspado o impronta citológica. No es el método recomendado dada su baja sensibilidad.

-Estudio molecular (OSNA. One Step Nucleic Acid Amplification). Es el método recomendado en las guías para el estudio intraoperatorio del ganglio centinela. Cuantifica el número de copias de ARN-m de la citoqueratina 19 (CK-19). Así la macrometástasis se corresponde con un número de copias igual o superior a 5.000; la micrometástasis tendrá valores comprendidos entre 250 y 5.000 copias. Finalmente, valores inferiores a 250 copias se consideran negativos.

Recientemente se ha introducido el concepto de Carga Tumoral Total, que se refiere a la suma del número de copias de ARNm- CK19 de cada uno de los ganglios centinela. Estudios realizados por Peg y colaboradores, recomiendan la linfadenectomía axilar en cifras superiores a 15.000 copias. (Peg V, Espinosa-

Bravo M, Vieites B, et al. Intraoperative molecular análisis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 139(1):87-93).

La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) se considera actualmente la técnica de elección para una correcta estadificación del cáncer de mama evitando los efectos secundarios a la cirugía de linfadenectomía axilar como son el linfedema, infecciones y alteraciones de sensibilidad del miembro superior, e incluso impotencia funcional del mismo.

Los criterios de inclusión para la realización de la técnica de BSGC, según el consenso de la SESPM de 2013, son los siguientes, tanto en la mujer como en el varón:

(Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, et al. Consenso sobre la BSGC en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev. Senología y Pat. Mamaria* 2014; 27(1): 43-53).

- Carcinomas invasivos T1, T2 y T3 con axila negativa (tanto desde el punto de vista clínico, como radiológico e histológico).
- Carcinoma intraductal con indicación de mastectomía.
- En casos de alto riesgo de microinfiltración (alto grado).

Las contraindicaciones para la realización de la misma son:

- Afectación ganglionar mediante pruebas de imagen y biopsia preoperatoria compatible con metástasis de carcinoma mamario.
- Radioterapia axilar previa (con dosis superiores a 50 Gy).
- Carcinoma localmente avanzado con infiltración ganglionar, sin tratamiento sistémico primario.
- Carcinoma inflamatorio.

Según el mismo consenso, no son criterios de exclusión:

- Biopsia excisional previa.
- Cirugía previa con fines cosméticos.

- Tumores multicéntricos ni multifocales.
- Cirugía conservadora con BSGC previa.
- Mujeres gestantantes o lactantes, previa retirada de lactancia por 24 horas .
- Pacientes con neoadyuvancia previa.

X.1.2 RADIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO EN EL CÁNCER DE MAMA

X.1.2.1 Introducción

El cáncer de mama es la principal indicación de irradiación en el mundo. Este tratamiento se basa en el uso de rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células tumorales o impedir que éstas crezcan. Tiene indicación en todas las fases de la enfermedad, desde los estadios más precoces hasta la enfermedad avanzada, incluso como tratamiento paliativo.

X.1.2.2 Indicaciones

Las principales indicaciones del tratamiento de cáncer de mama con radioterapia , son :

- Como tratamiento adyuvante. Cuando se utiliza en estadios iniciales, tanto en carcinoma invasivo como en carcinoma in situ, tras cirugía conservadora, la radioterapia consigue disminuir las recidivas locales en dos tercios de las pacientes, consiguiendo también una mejor supervivencia global. (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15 year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005; 366: 2087-106).
- Tumores localmente avanzados, cuando no es posible la resección incluso después del tratamiento con quimioterapia sistémica primaria (neoadyuvancia).
- Como tratamiento paliativo en casos de cáncer de mama metastático.

Las localizaciones más frecuentes de metástasis a distancia por cáncer de mama son a nivel óseo, pulmonar, hepático y cerebral.

La radioterapia juega un importante papel en las metástasis óseas (las más frecuentes con un 70% del total). Su objetivo se centra en paliar el dolor y en prevenir las fracturas patológicas. Las principales localizaciones están en columna vertebral, pelvis, costillas y huesos largos.

Un 5% de los pacientes con metástasis óseas pueden desarrollar una compresión medular, cuadro de nefastas consecuencias que constituye una verdadera urgencia. Ante esta sospecha debe realizarse una RM urgente y comenzar de forma inmediata tratamiento con triple terapia: Corticoterapia inmediata, cirugía en los casos en que sea necesaria, y tratamiento radioterápico con esquemas de fraccionamientos altos (una fracción de 8 Gy, o 10 sesiones de 3 Gy).

También las metástasis cerebrales tienen indicación de radioterapia, utilizándose técnicas de radioterapia externa para las metástasis múltiples y radiocirugía asociada a una irradiación holocraneal convencional en los casos de metástasis únicas, principalmente las de localización en la zona central cerebral.

X.1.2.3 Esquemas de radioterapia.

Se recomienda hacer una planificación 3D con imagen de TAC y simulación virtual previa al tratamiento.

Se irradia mediante campos tangenciales segmentados, evitando las áreas cardíaca y pulmonar en la medida de lo posible. La dosis total adecuada es de 45-50 Gy, con dosis diaria de 1,8-2 Gy, a todo el volumen mamario y una sobredosificación (boost) de 10-16 Gy en el lecho tumoral.

Es importante marcar el lecho con clips metálicos para poder delimitar de forma precisa el volumen de la sobredosificación y así evitar irradiar un volumen de mama excesivo.

La sobredosificación en el lecho de tumorectomía, cuando existe indicación, se hará bien con técnicas de radioterapia interna (braquiterapia); con radioterapia externa (electrones o fotones); o, si se dispone, con radioterapia intraoperatoria.

(Blanco I, Moriyón C, Peláez I. Guía Práctica de Patología Mamaria “Bruno Salvadori” 1ª Edición. 2009).

Esta sobreimpresión está indicada sobretodo en pacientes menores de 70 años y según estudio de la EORTC realizado en más de 5.000 pacientes, produjo, en 20 años de seguimiento, una reducción importante en el número de recidivas locales, principalmente en el grupo de pacientes menores de 40 años.

(Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P et al. Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast conserving therapy of early breast cancer: 10 year results of the randomized boost versus no boost. EORTC 22881-10882. J. Clin. Oncology 2007).

X.1.2.4 Regiones a tratar en la radioterapia por cáncer de mama

- Glándula mamaria:

- Mama restante tras cirugía conservadora. La combinación de ambos tratamientos proporciona tasas de control local y tiempo de supervivencia equivalentes a la mastectomía en estadios iniciales (I y II).

- Tumor: En las situaciones que no puede llevarse a cabo la cirugía, como son: tumor localmente avanzado, paciente con comorbilidades que la contraindican por su alto riesgo, o simplemente por negativa de la propia paciente, se puede indicar la sobreimpresión directa del tumor primario con dosis superior a la del boost que se realiza sobre el lecho tumoral (20-30 Gy).

- Pared Torácica:

Está indicada tras cirugía radical en tumores de gran tamaño o cuando existe afectación ganglionar. También tiene indicación en el caso de recidivas locales, principalmente en la zona de cicatriz de mastectomía, que previamente no habían sido irradiadas. La técnica más estandarizada es la de 2 campos de fotones opuestos, tangenciales a la pared torácica.

- Regiones ganglionares:

- Área supraclavicular: Se incluyen los ganglios supraclaviculares y el nivel III del apex axilar. Su irradiación está indicada en tumores localmente avanzados, afectación ganglionar (N2a, o en caso de N1a con otros factores de mal pronóstico), linfadenectomía insuficiente o afectación supraclavicular.

Se emplea un campo anterior directo con dosis total de 45-50 Gy.

- Área axilar (niveles axilares I y II): Indicada en casos de linfadenectomía incompleta o de no haberse realizado linfadenectomía. También en casos de enfermedad axilar voluminosa.

Se emplean dos campos opuestos (anterior y posterior), con dosis 50-60 Gy.

- Cadena mamaria interna: Indicada si hay evidencia clínica de la enfermedad a ese nivel. Técnica poco utilizada por su toxicidad a nivel cardiaco y pulmonar.

X.2 TRATAMIENTO SISTÉMICO EN EL CÁNCER DE MAMA

X.2.1 TRATAMIENTO ADYUVANTE EN EL CÁNCER DE MAMA

Se considera tratamiento adyuvante aquel que acompaña o complementa a un tratamiento considerado como principal o curativo.

En el cáncer de mama el tratamiento sistémico adyuvante tiene como objetivo la erradicación de depósitos tumorales micrometastásicos que ya podrían estar presentes con anterioridad al tratamiento curativo locorregional radical.

Existen tres tipos de tratamientos sistémicos adyuvantes:

- tratamiento quimioterápico.
- tratamiento endocrino (hormonoterapia).
- tratamiento biológico o terapias dirigidas.

Clásicamente la afectación axilar era la que marcaba la pauta para decidir si estaba indicado el tratamiento sistémico con quimioterapia. Actualmente, la indicación de estos tratamientos viene marcada por las características biológicas del tumor primario. Como ya hemos comentado anteriormente, el cáncer de mama es una entidad heterogénea con 4 subgrupos moleculares, que presentan un comportamiento clínico diferente.

Según los datos de expresión de receptores de membrana (receptores hormonales y Her 2 neu) y el índice de proliferación celular Ki 67 , que se obtienen con pruebas de inmunohistoquímica (IHQ), se ha podido llevar a cabo una sencilla clasificación propuesta por Cheang et al. (Luminal A, Luminal B, Her 2 positivo y triple negativo).(Cheang MC, Chia SK, Voduc E, et al. Ki 67 index, HER 2 status and prognosis of patient with luminal B breast cancer.J Natl Cancer Inst 2009; 101 (10): 736-50).

Según las guías de consenso internacionales (NCCN, St Gallen y ESMO), la indicación de tratamiento adyuvante con quimioterapia viene marcada por un grado histológico alto, Ki 67 elevado, baja expresión de receptores hormonales , sobreexpresión del receptor de membrana HER2 y perfil triple negativo.

X.2.1.1 Tratamiento quimioterápico adyuvante

Los fármacos más frecuentemente utilizados son las antraciclinas y taxanos.

Existen diferentes esquemas de tratamiento con duración de 6 ciclos administrados cada 21 días.

- Esquemas con antraciclinas:

Eran los esquemas utilizados en los años 70-80. Actualmente los esquemas que solamente llevan antraciclinas están prácticamente en desuso. Los más utilizados son FAC (5-FU, adriamicina y ciclofosfamida) o FEC (5-FU, epirubicina y ciclofosfamida). La toxicidad más importante es la cardíaca.

- Esquemas con antraciclinas y taxanos :

Son los esquemas más utilizados en los últimos años. La introducción de los taxanos comienza en la década de los 90 para los casos de enfermedad metastásica y ya a partir de los años 2000 se establece su uso en neoadyuvancia.

Los más utilizados son: administración secuencial de AC (antraciclinas) seguido de docetaxel trisemanal; AC seguido de paclitaxel semanal . O también tratamiento concomitante TAC (docetaxel, adriamicina, ciclofosfamida).

(Ginés J, Sabater E, Martorell C, et al. Efficacy of taxanes as adjuvant treatment of breast cancer: a review and meta-analysis of randomised clinical trials. Clin. Transl. Oncol. 2011; 13 (7):485-98).

Los taxanos presentan como toxicidad asociada alopecia, artromialgias, hematotoxicidad y neurotoxicidad.

- Esquemas sin antraciclinas:

Los más utilizados son docetaxel, carboplatino, TC (docetaxel, ciclofosfamida).

Actualmente se plantea la posibilidad de que los taxanos desplacen a las antraciclinas en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama HER 2 negativo, puesto que el beneficio de las antraciclinas parece limitado a los tumores con sobreexpresión de HER2.

- Esquemas con nuevos agentes quimioterápicos (capecitabina):

Existen numerosos estudios, algunos de ellos pendientes de resultados, para evaluar la efectividad del tratamiento adyuvante con estos nuevos fármacos.

X.2.1.2 Tratamiento biológico adyuvante. Terapias dirigidas

- Trastuzumab:

Este fármaco es un anticuerpo monoclonal humanizado cuyo mecanismo de acción se basa en el reconocimiento y unión al dominio extracelular del receptor HER 2, impidiendo su unión con cualquier otro EGFR. Activa la unión de HER2 con células citotóxicas y promueve la degradación del complejo.

El beneficio del uso de este fármaco en tratamiento adyuvante, asociado a la quimioterapia está demostrado en varios ensayos que evalúan la incorporación del mismo en paciente con receptores Her2 positivos . La mayor parte de las pacientes incluidas en estos estudios tienen afectación ganglionar, pero en 2 de ellos (el HERA y el BCIRG 006) también incluyen un importante porcentaje de pacientes sin afectación ganglionar. Se llega por tanto a la conclusión de que en pacientes HER2 positivas, aún sin afectación ganglionar, pero con factores de riesgo, el tratamiento adyuvante debe incluir quimioterapia adecuada y trastuzumab. (Picaart-Gebhart MJ, Procter, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 -positive breast cancer, N. Engl. J. Med. 2005; 353(16): 1659-72). (Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2 - positive breast cancer. New England J. Med. 2011; 365 (14): 1273-83).

La incorporación del trastuzumab al tratamiento de quimioterapia en tumores HER2 positivos, ha reducido a la mitad el riesgo de recaída.

La principal toxicidad del trastuzumab es la cardíaca, aunque se ha demostrado que esta toxicidad revierte después de suspenderlo en un plazo de tiempo relativamente corto.

- Lapatinib:

Este fármaco es un inhibidor dual del dominio tirosina-quinasa de EGFR y HER2. Recientemente ha sido aprobada su utilización junto con la capecitabina para el cáncer de mama metastático. Se están realizando estudios para evaluar su papel en adyuvancia.

- Pertuzumab:

Es un anticuerpo monoclonal que bloquea al receptor HER2 en un epítipo diferente al trastuzumab. Dado que ambos tienen un mecanismo de acción que se complementa, su administración conjunta ha demostrado ser eficaz en primera línea de enfermedad avanzada .

X.2.1.3 Tratamiento endocrino adyuvante (Hormonoterapia)

- Hormonoterapia adyuvante en pacientes pre o perimenopáusicas:

- Tamoxifeno: históricamente, este fármaco ha sido el agente hormonal más utilizado en el cáncer de mama. Su mecanismo de acción consiste en la unión al receptor de membrana estrogénico y provocando una inhibición reversible.

En las mujeres premenopáusicas, se continúa recomendando su uso durante 5 años, en dosis de 20 mgr. /día (vía oral), a todas las pacientes con receptores hormonales positivos, independientemente del estatus nodal o del tamaño tumoral. También se ha demostrado que tiene efecto preventivo sobre tumores contralaterales si estos tienen RH positivos. (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 year survival: an overview of the randomized trials . Lancet. 2005; 365. 1687- 717). Es el tratamiento de elección en pacientes pre o perimenopáusicas con dudas a cerca de si existe función ovárica residual tras la amenorrea secundaria a la quimioterapia.

- Supresión de la función ovárica y amenorrea quimioinducida: Se consigue mediante maniobras definitivas como la ooforectomía o la irradiación ovárica, o reversibles como la administración de análogos LHRH. Existen datos retrospectivos que la apoyan como indicación en pacientes jóvenes que no experimentan amenorrea con la quimioterapia adyuvante.

- Hormonoterapia adyuvante en pacientes postmenopáusicas:

Durante varias décadas el Tamoxifeno ha sido el tratamiento de elección también en pacientes menopáusicas, pero en los últimos años se han introducido en la práctica clínica de este grupo de pacientes los inhibidores de la aromatasa de última generación (Anastrozol, Letrozol y Exemestrano), también vía oral, con dosis de 1 mg/día, 2,5 mg/día y 25 mg/día respectivamente.

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la conversión de andrógenos en estrógenos, disminuyendo así los niveles de estrógenos circulantes de forma considerable.

Se han realizado varios estudios con gran número de pacientes para evaluar el beneficio de la incorporación de estos fármacos respecto al Tamoxifeno, desde el principio del tratamiento, tras 2-3 años de tratamiento (terapia secuencial), o al terminar los 5 años de tratamiento con Tamoxifeno (terapia de continuación). (Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J, et al: Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen. J Clin Oncol 2007; 25: 2664-70).

X.2.2 TRATAMIENTO SISTÉMICO PRIMARIO EN EL CÁNCER DE MAMA. NEOADYUVANCIA

X.2.2.1 Indicaciones generales

- Casos en los que la cirugía primaria no es posible, como es el carcinoma inflamatorio o localmente avanzado .
- Cuando se quiere favorecer la cirugía conservadora en casos que no es posible por la mala relación entre el volumen de la mama y el tumor. No se pueden incluir en este grupo tumores con presencia de microcalcificaciones extensas ya que condicionarían imposibilidad del cambio del volumen quirúrgico).
- Una indicación más controvertida sería la utilización de la terapia sistémica primaria en tumores en los que se sabe una respuesta óptima teniendo en cuenta sus características biológicas o moleculares, aunque se trate de tumores en estadios muy precoces (tratamiento oncológico personalizado).

X.2.2.2 Tratamiento neoadyuvante con quimioterapia en tumores de mama HER 2 negativos

Estos tumores no sobreexpresan el receptor de membrana HER 2 y no presentan respuesta a tratamientos biológicos (terapias dirigidas) como el trastuzumab. En

este grupo se incluyen los tumores triple negativo y los tumores con baja expresión del receptor estrogénico y alta tasa de proliferación (tumores luminal B). Este grupo de tumores presentan tasas de respuesta patológica completa a quimioterapia más alta y no son candidatos a tratamiento hormonal. (Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, et al. Basal -like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J. Clin Pathol* 2006; 59(7):729-35).

Los regímenes de quimioterapia indicados para este grupo de pacientes son los que combinan antraciclinas y taxanos y se prolongan más de 4 meses.

Los más utilizados son:

-AC (adriamicina y ciclofosfamida) cada 21 días por 4 ciclos y docetaxel cada 21 días por 4 ciclos.

-TAC (docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida) cada 21 días por 6 ciclos.

X.2.2.3 Tratamiento neoadyuvante con quimioterapia y agentes biológicos en tumores Her 2 positivos

Este grupo de tumores que tradicionalmente estaba asociado a mal pronóstico, ha experimentado el más importante cambio respecto a su tratamiento en los últimos años. La introducción del anticuerpo monoclonal trastuzumab, que inactiva selectivamente la cascada de señalización celular desencadenada por HER2 ha supuesto un cambio radical en el tratamiento del cáncer de mama.

En el ámbito de la neoadyuvancia, se pudo comprobar mediante estudios, que al añadir este fármaco al tratamiento quimioterápico ya existente, la tasa de respuesta patológica completa se elevaba de forma llamativa. (Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial). *Lancet* 2010; 375(9712): 377-84).

X.2.2.4 Tratamiento neoadyuvante endocrino primario.

Hormonoterapia neoadyuvante

El tratamiento endocrino primario está indicado en pacientes postmenopáusicas que cumplan los siguientes criterios:

- Siempre en caso de tumores con receptores hormonales positivos.
- Pacientes frágiles, que por edad o comorbilidad no son candidatas a un tratamiento quimioterápico.
- Pacientes con tumores localmente avanzados, donde no es posible la cirugía.
- Pacientes con un potencial beneficio de la reducción tumoral de cara a la cirugía y con un perfil molecular que indica sensibilidad específica al tratamiento hormonal. (RE de alta expresión, grado histológico bajo, HER2 negativo y Ki 67 bajo).

Los inhibidores de la aromatasa, son los fármacos más indicados en este tratamiento, y dentro de este grupo, el letrozol a dosis de 2,5 mg/día, vía oral.

El tiempo de tratamiento recomendado es de 4-6 meses, aunque este tiempo puede variar en relación a un control clínico- radiológico de la respuesta cada 2 meses.

XI PAPEL DEL ESTROMA TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA

XI.1 INFLAMACIÓN CRÓNICA COMO PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER

Clásicamente se ha relacionado el origen del cáncer de mama con alteraciones o mutaciones de las células epiteliales. Sin embargo, existen pruebas que apoyan la

hipótesis de que la inflamación crónica participa activamente en las condiciones que favorecen el cáncer en general y el cáncer de mama en particular.

Estas teorías dan a las células del estroma tumoral un papel fundamental en el origen y la progresión del cáncer, incluyendo el reclutamiento de nuevas células estromales que a su vez estimulan crecimiento y la remodelación de la matriz extracelular (Bhowmick and Moses , 2005; Kim et al ; Tlsty and Coussens, 2006).

Los tumores no solamente están compuestos por células epiteliales, se componen también de una variada proporción de células que constituyen el estroma tumoral, como son los fibroblastos, células endoteliales y diferentes tipos de células inflamatorias.

En condiciones fisiológicas , las células del estroma actúan como una barrera que limita la transformación de las células epiteliales (Bhowmick and Moses, 2005).

Pero la excesiva proliferación de las células tumorales, lleva a una situación de hipoxia y necrosis que estimula la liberación de factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular y proteasas por parte de las células estromales. (Kalluri and Zeisberg, 2006).

En los últimos años se han ido acumulando evidencias que apoyan la teoría de que cambios en el comportamiento del estroma y su interacción con las células tumorales están íntimamente ligadas con el proceso de oncogénesis, invasión tumoral y metástasis .(Klausner, 2002; Liotta and Kohn, 2001; Wiseman and Werb, 2002).

Estudios clínicos clásicos realizados por el grupo de investigación del Dr. Vizoso han dejado claro el importante papel de los fibroblastos y de las células mononucleares inflamatorias (CMIs) del estroma a la progresión tumoral. (Vizoso et al, British J. Cancer 2007, del Casar et al, Breast Cancer Res, 2009). En relación con estos estudios, se ha descrito que un 32 % de los carcinomas de mama presentan en el estroma tumoral células mononucleares inflamatorias (CMIs), mostrando un perfil molecular elevado de metaloproteasas (MMPs) y

sus inhibidores (TIMPs), que son proteínas implicadas en el proceso de progresión tumoral. También se ha descrito que el 97,6 % de esos mismos casos desarrollaron metástasis a distancia, lo que representa un factor independiente muy potentemente asociado con la supervivencia libre de enfermedad (SLE). (González et al, Br. J Cancer 2007; Vizoso et al, Br J Cancer 2007; González et al, Histopathology 2010).

XI.2 LAS METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y EL CÁNCER DE MAMA

XI.2.1 INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular (ECM) del ser humano está formada por gran cantidad de componentes que se clasifican en 3 grupos:

- proteínas estructurales (colágeno y elastina),
- proteoglicanos y glucosaminoglicanos.
- proteínas de adhesión (fibronectina y elastina).

Estos componentes se encuentran interconectados entre sí y requieren de una familia de enzimas proteolíticos denominadas **metaloproteasas (MMPs)**, cuya misión es degradar las proteínas de la matriz extracelular (ECM) y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión. También degradan moléculas de la superficie celular reguladoras del comportamiento celular en diversas vías.

Intervienen así en procesos fisiológicos que requieren un importante recambio tisular, como son el crecimiento óseo, la angiogénesis o la cicatrización de heridas. (Cascales Angosto M, Alvarez-Gómez JA, An. R. Acad. Nad. Farm., 2010, 76(1): 59-84).

XI.2.2 ESTRUCTURA DE LAS METALOPROTEASAS (MMPS)

- Las metaloproteasas (MMPs), poseen una organización estructural básica integrada por un péptido de señal que participa en su secreción, un propéptido que interviene en el mantenimiento de la forma latente y un sitio activo que contiene zinc.

- Para su activación catalítica depende del zinc, requiere calcio como cofactor, un pH neutro o ligeramente alcalino y la rotura catalítica de su propéptido.

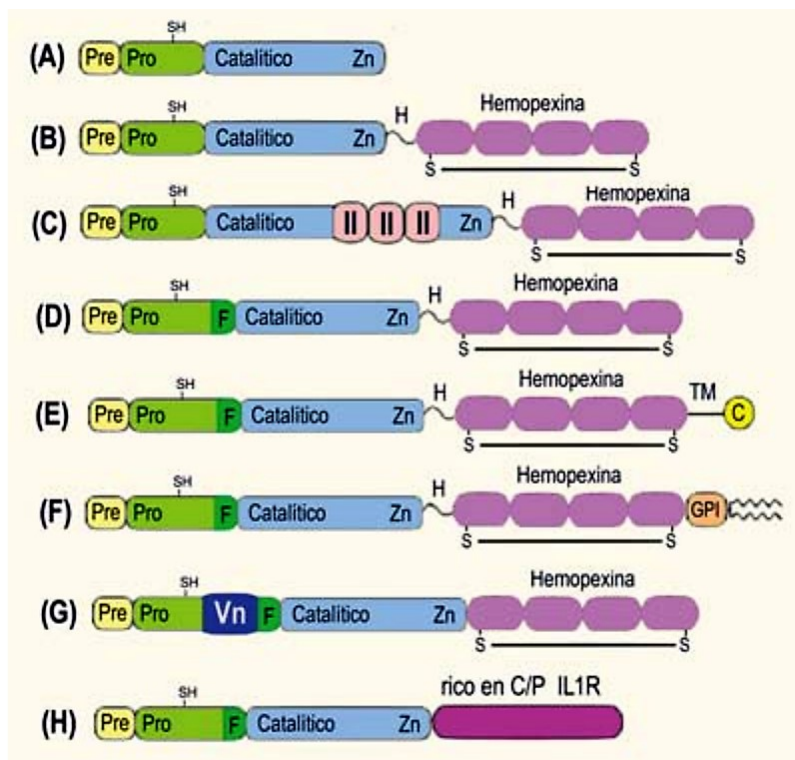


Figura 4. Estructura de las MMPs.

(A) Dominios mínimos de las MMPs (MMP7/ matrilisina, MMP26/endometasa).
 (B) MMP que contienen sólo un dominio hemopexina (MMP1/colagenasa1, MMP8/colagenasa 2, MMP13/colagenasa 3, MMP18/ colagenasa 4, MMP3/estromelisina 1, MMP10/ estromelisina 2, MMP12/metaloelastasa, MMP19/RASI 1, MMP20/enamelisina, MMP22/CMMP, MMP27).

(C) MMP que se unen a gelatina (MMP2/gelatinasa A, MMP9/gelatinasa B). (D) MMP secretadas activadas por furina (MMP11/estromelisin 3, MMP28/epilisina).

(E) MMP transmembrana (MMP14/MT1-MMP, MMP15/MT2-MMP, MMP16/MT3-MMP, MMP24/MT5-MMP).

(F) MMP ligadas a GPI (MMP17/MT4-MMP, MMP25/MT6-MMP).

(G) MMP con un dominio inserto similar a la vitronectina (MMP21/XMMP). (H)

MMP con un dominio rico en cisteína/prolina receptor IL-1 (MPP23).

Pre, secuencia señalizadora;

Pro, propéptido con un zinc libre que se une al tiol (SH);

F, sitio susceptible a la furina;

Zn, sitio catalítico de unión al Zn;

II, insertos de fibronectina que se unen al colágeno,

H, región bisagra;

TM, dominio transmembrana;

C, cola citoplasmática;

GPI dominio de anclaje del glicofosfatidil inositol;

C/P, cisteína/prolina;

IL-1R, receptor de la IL-1;

Vn, dominio similar a la vitronectina.

Dominio hemopexina contiene cuatro repeticiones con un enlace disulfuro.

(Fuente: Cascales Angosto M, Alvarez-Gómez JA, An. R. Acad. Nad. Farm. , 2010, 76(1): 59-84).

XI.2.3 CLASIFICACIÓN DE LA METALOPROTEASAS (MMPS)

- Inicialmente las MMPs se clasificaban, en base a los sustratos que degradan, en: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisin, metaloproteasas de membrana (MT-MMP) y un grupo heterogéneo de MMP.

- Actualmente se emplea un sistema numérico basado en el orden en que se identificaron, que llega hasta el número 28.

Tabla 5. Metaloproteasas de la matriz de origen humano.

Tipo de MMP	MMP	Nombre de la enzima	Peso molecular (kDa)	Substrato
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa - I	57* 47 A	Colágenos (I, II, III, VII, and X), proteoglicanos, entactina, ovostatina, MMP-2, MMP-9.
	MMP-8	Colagenasa-2/ colagenasa de neutrófilo	85* 64 A	Colágenos (I, II, III, VII, VIII and X), fibronectina, proteoglicanos.
	MMP-13	Colagenasa-3	60* 48 A	Colágenos (I, II, III, VII, VIII and X), tenascina, plasminogeno, aggrecano, fibronectina, osteonectina, MMP-9
	MMP-18	Colagenasa-4	53* 51 A	Colágeno tipo I
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa-A	72* 66 A	Gelatina, colágeno (IV, V, VII VI, IX and X), elastina, fibronectina.
	MMP-9	Gelatinasa-B	92* 86 A	Colágenos (IV, V, VII, X, and XIV), gelatina, entactina, elastina, fibronectina, osteonectina, plasminógeno, proteoglicanos.
Estromelisinias	MMP-3	Stromelisinina1	60* 52 A	Colágenos (IV, V, and IX), gelatina, aggrecano, laminina, elastina, caseína, osteonectina, fibronectina, ovostatina, entactina, plasminógeno.
	MMP-10	Stromelisinina 2	53* 47 A	Colágenos (I, II, IV and V), gelatina, caseína, elastina, fibronectina.
	MMP-11	Stromelisinina 3	60* 47 A	Colágenos (IV, V, IX and X), laminina, elastina, fibronectina, caseína, proteoglicanos.

Matrisilinas	MMP-7	Matrisilina	28* 19 A	Colágeno IV, gelatina, fibronectina, laminina, elastina, caseína, transferrina.
	MMP-26	Matrisilina -2	29	Colágeno IV, fibronectina, fibrinógeno, gelatina, pro-MMP9.
MT-MMP (MMP de membrana)	MMP-14	MT1-MMP	66* 54 A	Colágenos (I, II, III), gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, entactina, pro-MMP2.
	MMP-15	MT2-MMP	76	Fibronectina, gelatina, vitronectina, entactina, laminina, pro-MMP-2
	MMP-16	MT3-MMP	65* 63 A	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina, pro- MMP-2.
	MMP-17	MT4-MMP	65* 63 A	Pro-MMP2, fibrinógeno, gelatina.
	MMP-24	MT5-MMP	73	Fibronectina, pro-MMP2, proteoglicanos, gelatina.
	MMP-25	MT6-MMP	62	Pro-MMP2, pro-MMP9, colágeno IV, gelatina, fibronectina, Proteína A.
Otras enzimas	MMP-12	Metaloelastasa de macrófago	54* 45 A	Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, fibronectina, vitronectina, laminina, entactina, fibrina/fibrinógeno.
	MMP-19	RASI I	59	Colágenos (I, IV) gelatina, fibronectina, laminina.
	MMP-20	Enamelisina	56	Amelogenina, aggrecano.
	MMP-21		65	
	MMP-22		58* 53 A	
	MMP-23		44	gelatina
	MMP-27		59	
MMP-28	Epilisina	59		

XI.2.4 ACTIVIDAD Y REGULACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS (MMPS)

Las MMPs se sintetizan en forma de zimógenos (proenzimas inactivos) y son activados por proteólisis.

La regulación de la actividad proteolítica de las MMP se encuentra estrictamente controlada en diferentes niveles. La transcripción genética es el principal nivel que regula las cantidades de MMP recién sintetizadas, mientras que la actividad proteolítica de estas enzimas se controla mediante la activación del zimógeno y la inhibición por parte de los inhibidores tisulares presentes en el microambiente celular, conocidos como **inhibidores tisulares de la MMPs (TIMPs)**.

-La familia de los Inhibidores Tisulares de las MMPs (TIMPs) está integrada por 4 miembros que se unen reversiblemente al sitio de las MMP. La inhibición de las MMPs mediada por los TIMPs garantiza la integridad de los tejidos y la homeostasis, aspecto fundamental en procesos fisiológicos caracterizados por el recambio continuo de los componentes de la matriz extracelular, como son la formación ósea, la ovulación, el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. Sin embargo se ha demostrado también que la expresión de TIMP-1 en células de ciertos tipos de cáncer como pueden ser el cáncer gástrico y el cáncer de mama, se asocia a una peor evolución de los pacientes.

La evidencia experimental actual señala que la actividad excesiva de las MMP contribuye a la progresión de diversas enfermedades como la artritis, la arterioesclerosis, úlceras gástricas e incluso el cáncer.

Diversos estudios han demostrado que células cancerígenas de bajo potencial maligno adquieren propiedades de malignidad cuando sobreexpresan ciertas MMPs. En cambio la malignidad de ciertas células puede disminuirse cuando se reprime la expresión de MMPs.

Las MMPs desempeñan un papel esencial en la degradación del tejido conectivo estromal y los componentes de la membrana basal, que son elementos clave en la

invasión tumoral y las metástasis. Así, ha sido establecido la implicación de las MMPs en el desarrollo del cáncer (Shuman Moss et al., 2012).

Otro mecanismo con un importante papel sobre la progresión tumoral es la angiogénesis y también a este nivel juegan una importante labor las MMPs ya que liberan o activan moléculas que actúan como estimuladores o inhibidores del proceso de angiogénesis.

Finalmente las MMPs también actúan inhibiendo el mecanismo de apoptosis final de las células metastásicas, favoreciendo así su diseminación a otros órganos.

Parece demostrada la implicación de las MMPs en el desarrollo y progresión diferentes tipos de cáncer como el de mama (Vizoso et al., 2007) (del Casar et al, Breast Cancer res, 2009); el colorrectal (Gonzalez et al., 2012; Herszenyi et al., 2012); de próstata (Fernandez-Gomez et al., 2011) y el hepatocarcinoma (Altadill et al., 2009), entre otros.

XI.2.5 METALOPROTEASAS (MMP) EN EL CÁNCER DE MAMA

En condiciones fisiológicas hay un equilibrio entre las MMPs y sus inhibidores TIMPs. Gianelli y col. explican que el desequilibrio entre estos componentes sería el responsable de la actividad proteolítica que favorece las metástasis. (Giannelli G, Erriquez R, Fransvea E, et al. Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. Int J Cancer 2004; 109: 782-5).

Sin embargo, los inhibidores tienen otras funciones biológicas como la regulación de las proMMPs, angiogénesis, proliferación celular y apoptosis.

En cultivos de líneas celulares de cáncer de mama, la sobreexpresión de estas enzimas y sus inhibidores está asociada con un fenotipo más agresivo. (Figueira RC, Gomes LR, Neto JS, Silva FC, Silva ID, Sogayar MC. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. BMC Cancer 2009; 9: 20).

Al estudiar el lugar de expresión de las MMPs y sus inhibidores, se encontró aumento de MMPs-1, 7 y 14 y de TIMPs-1, 2 y 3 en el centro del tumor, comparado con menor expresión en la periferia. Esta diferencia puede deberse a la mayor densidad celular o a diferentes mecanismos de interacción entre células tumorales y la población de fibroblastos y otras células residentes en estas dos áreas del tumor.

MMP-7 fue expresada positivamente por fibroblastos del frente invasivo, y esta presencia se asoció significativamente con tumores de gran tamaño y poca diferenciación.

MMP-1 se asocia con ganglios linfáticos positivos.

MMP-2 se sobreexpresa en estadios tempranos del tumor, mientras que la **MMP 9** se sobreexpresa en estadios más avanzados.

MMP-1, 7, 9, 13, 14 y **TIMP-1** se han relacionado con parámetros de tumores más agresivos, ganglios positivos, receptores de estrógenos negativos e inflamación peritumoral.

MMP-9, 13 y **TIMP-3**, expresados por fibroblastos del centro del tumor se asocian con la presencia de metástasis a distancia. Estos estudios pueden resultar relevantes para obtener información sobre la conducta del tumor. (Coronato S, laguens, di Giromalo V. medicina (B. Aires) 2012; 72(6): 495-502).

Niveles elevados de **MMP-7** y **14** y del **inhibidor TIMP-3** se hallaron en fibroblastos y células mononucleares de ganglios linfáticos metastásicos.

MMPs-2 y **9** están involucradas en el crecimiento y metástasis del cáncer de mama y su sobreexpresión está correlacionada significativamente con tumores más agresivos y de mal pronóstico.

La alta expresión de **MMP-7** en cáncer de mama aumenta la probabilidad de metástasis, (Vizoso FJ, González LO, Corte MD, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. Br J Cancer 2007; 96: 903-11).

MMP-11 se expresa en células estromales peritumorales y está asociada con la progresión del tumor y metástasis.

MMP-18 está asociada con microinvasión y juega un papel esencial durante la transición de lesiones in situ a carcinoma ductal de mama.

Niveles elevados de **MMP 14** y bajos de TIMP-2 son marcadores de mal pronóstico. (Têtu B, Brisson J, Wang CS, et al. The influence of MMP- 14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. Breast Cancer Res 2006).

La expresión de **MMP-1, 3 y 7** y **los inhibidores 1 y 3** en carcinomas mamarios de diferente tipos histológicos puede ser variable (sobrexpresión en los carcinomas ductales y débil expresión en los carcinomas tubulares, lobulillares, papilares, medulares y mucinosos). Este hallazgo sugiere una diferencia en la histogénesis del carcinoma mamario (del Casar JM, González-Reyes S, González LO, et al. Expression of metalloproteases and their inhibitors in different histological types of breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2010; 136: 811-9).

La determinación de **MMPs-2 y 9** en suero puede ser utilizada como un factor pronóstico de la enfermedad, siendo más elevadas en pacientes con estadio avanzado del tumor, con ganglios positivos y ausencia de receptores para estrógenos.(Patel S, Sumitra G, Koner BC, Saxena A. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. Clinical Biochemistry 2011; 44: 869-72).

MMP-13 tiene un papel central en la activación de la cascada, incrementando la capacidad invasora de las células malignas.

Los TIMPs, independientemente de su función inhibidora de MMPs, interactúan con proteínas de la superficie celular, modulan señales de transducción y regulan la apoptosis.

En cáncer de mama, la expresión de TIMP-1 por las células epiteliales está asociada a mal pronóstico, (Liu XW, Taube ME, Jung KK, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. Cancer Res 2005).

Baja expresión de TIMP-3 fue correlacionada con tumores de alto grado histológico y nuclear mientras que su sobreexpresión es índice de buen pronóstico. (Mylona E, Magkou C, Giannopoulou I, et al. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-3 protein in invasive breast carcinoma: relation to tumor phenotype and clinical outcome. Breast Cancer Res 2006).

XI.3 METALOPROTEASA 11 (MMP-11) O ESTROMELISINA 3

Esta endopeptidasa se expresa en células estromales peritumorales y está asociada con la progresión del tumor y metástasis. Pertenece al grupo de las estromelisininas , cuya acción consiste en degradar determinados tipos de colágeno (colágenos IV, V, IX y X), así como determinadas proteínas como laminina, elastina, fibronectina, caseína y proteoglicanos.

La MMP11 desempeña un papel en la implantación embrionaria, la ontogénesis de órganos, la involución de tejidos, los procesos de reparación (Okada A. et al., 1997), (Rio MC., 2005), (Tan J. et al., 2014) y numerosas enfermedades como la aterosclerosis, la artritis reumatoide y el cáncer (Schonbeck U. et al., 1999),

(Basset P. et al., 1997). Se ha demostrado que MMP11 tiene un papel paracrino en el desarrollo de la glándula mamaria posnatal(Tan J. et al., 2014).

En relación con el cáncer de mama, determinados estudios clínicos demostraron una importante contribución de la metaloproteasa 11 (MMP-11) y de las células mononucleares inflamatorias

(CMI) del estroma a la progresión tumoral y en los procesos de invasión y metástasis.

Ha sido descrito por el grupo del Dr. Vizoso que un 32% de los carcinomas mamarios presentan en el estroma tumoral células mononucleares inflamatorias (CMI) mostrando un perfil molecular elevado de MMPs y sus inhibidores (TIMPs) (estromelisina3 o MMP11, matrilisina o MMP7, gelatinasa-B o MMP9, colagenasa3 o MMP13, metaloproteasa de membrana tipo I o MMP14, TIMP-1 y TIMP-2). (Gonzalez et al., 2007). Además se ha descrito que el 97,6% de esos casos, caracterizados por la expresión de MMP11 por las CMI, desarrollaron metástasis a distancia, lo que representó el factor independiente más potentemente asociado con la supervivencia libre de enfermedad. (Gonzalez et al., 2007; Vizoso et al., 2007; Gonzalez et al., 2010). También cabe destacar que esa asociación fue detectada cuando se consideró por separado los tumores con fenotipo luminal A y los de tipo basal-like (Gonzalez et al., 2009). Asimismo, se pudo comprobar la existencia de diferentes fenotipos de las CMI ya en las fases más iniciales de la transformación maligna, cuando esas células inflamatorias rodean los ductos neoplásicos de los carcinomas “in situ” de mama (Gonzalez et al., 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es la neoplasia que más frecuentemente afecta a las mujeres en los países industrializados (28% de todos los cánceres). Por otra parte, a pesar de su creciente incidencia, la mortalidad ha sido bastante estable durante varios años, siendo hoy en día la segunda causa de muerte por cáncer (Torre LA., 2012. CA Cancer J Clin.2015). Sin embargo, la predicción del desarrollo de metástasis a distancia sigue siendo un desafío. El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que abarca una variedad de entidades patológicas y una amplia gama de comportamientos clínicos, incluso en grupos de pacientes que parecen ser clínicamente similares. Esto se debe, en parte, a la complejidad de los tejidos y a la variedad de células que componen esos tumores. Los tumores no están compuestos exclusivamente por células cancerosas, sino también por células estromales (como las células inflamatorias) que pueden influir profundamente en la progresión del tumor hacia un fenotipo maligno (Marsh T.et al., 2013) (Hiero N.et al., 2012).

Las células inmunes son uno de los componentes celulares más prevalentes del microambiente tumoral y uno de los más reactivos. En estudios anteriores, se investigó la expresión de las metaloproteasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs) por células inflamatorias mononucleares intratumorales (CMI) en el cáncer de mama, con el fin de caracterizarlos y estudiar su impacto en el desarrollo de metástasis a distancia. Las MMP desempeñan un papel esencial en la degradación del tejido conectivo del estroma y de los componentes de la membrana basal, elementos clave en la invasión y metástasis tumoral. En un estudio anterior, se encontró que el 32% de la población de carcinoma de mama que contenía CMI intratumorales con un alto perfil de expresión de MMPs / TIMPs tenía una mayor tasa de desarrollo de metástasis a distancia (97,6%) en comparación con tumores con una expresión baja (26,9%). En tumores con un alto perfil de expresión de MMPs/TIMPs, la MMP11 (también conocido como estromelisin 3) fue el factor más expresado por las CMI (González L.O. et al., 2007). Este es un hallazgo relevante, porque se sabe que las MMPs y TIMPs ejercen poderosas influencias en el microambiente local durante la tumorigénesis y la progresión tumoral.

Por lo tanto, se investigó la relación entre la MMP11 y los factores asociados a la inflamación y la progresión tumoral en una población de cáncer de mama, lo que demuestra que los tumores con MMP11 positivos en CMIs intratumorales (MMP11 (+) CMIs) muestran una regulación de la inflamación relacionados con genes (Eiró N. et al. 2012; Eiró N. et al. 2013). En otro estudio, hemos demostrado que la combinación de IL-1 β , IL-6 y IL-10 expresión por las CMIs alcanzó una asociación importante con la expresión de MMP11 por las CMIs y con el pronóstico (Fernández García B. et al.2016). Además, recientemente se encontró que la expresión de MMP11 por las CMIs se asocia con un fenotipo agresivo de fibroblastos asociados al cáncer (FACs) que contribuyen a la progresión tumoral, sobreexpresando factores pro-tumorales, como CXCL12, TIMP-1, VEGFA, S100A y HGF (González L.O. et al. 2015). Por lo tanto, las células del estroma, como las células inflamatorias y los FACs, actúan a su vez sobre las células tumorales para aumentar sus propiedades proliferativas y migratorias / invasivas.

Todos estos datos parecen indicar que la expresión de MMPs por las células inflamatorias del estroma tumoral está asociado con el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama. El objetivo del presente estudio es analizar, en una amplia población de pacientes con cáncer de mama invasivo con un largo período de seguimiento, si la expresión de MMPs por las células mononucleares inflamatorias (CMIs) del estroma intratumoral podría ser utilizada como marcador biológico útil para la evaluación pronóstica del cáncer de mama.

Los objetivos de la presente tesis son:

1. Realizar un estudio piloto sobre el valor pronóstico de las MMPs por el estroma tumoral de cara a predecir el desarrollo de metástasis a distancia en pacientes con cáncer de mama que han recibido el tratamiento clásico establecido.
2. En base a los resultados del objetivo 1, se seleccionará el factor pronóstico más potente y se analizará su impacto pronóstico global en una población más amplia de pacientes con cáncer de mama.
3. Estudio del valor pronóstico de la respuesta a tratamiento con quimioterapia del marcador identificado en el objetivo 1.
4. Estudio del valor pronóstico de la respuesta a tratamiento con hormonoterapia del marcador identificado en el objetivo 1.

MATERIAL Y MÉTODOS

I SELECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES INCLUIDAS

Este estudio incluyó a mujeres con un diagnóstico histológicamente confirmado de cáncer de mama invasivo temprano de tipo ductal tratado entre 1991 y 2012, algunos de los cuales habían sido previamente incluidos en nuestros estudios preliminares sobre la expresión de MMPs y TIMPs en cáncer de mama (González L.O. et al. 2010), (Vizoso F.J. et al. 2007), (Del Casar JM et al. 2009), (Eiró N. et al. 2015). Se seleccionaron mujeres con los siguientes criterios de inclusión: carcinoma ductal invasivo, tamaño del tumor T1 o T2 y un seguimiento mínimo de diez años para las pacientes sin recurrencia tumoral. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: enfermedad metastásica en la presentación, historia previa de cualquier tipo de tumor maligno, cáncer de mama bilateral en la presentación, haber recibido cualquier tipo de terapia neoadyuvante, desarrollo de recurrencia locorregional durante el período de seguimiento, un segundo cáncer primario y ausencia de suficiente tejido en los bloques de parafina utilizados para el análisis.

De los pacientes que cumplían los criterios de selección, se incluyeron 100 pacientes en el estudio piloto (objetivo 1) y 246 pacientes en el estudio de confirmación del valor pronóstico del marcador identificado en el estudio piloto (objetivo 2 a 4). Las pacientes fueron seleccionadas al azar de acuerdo a cuatro grupos de tamaño similar y estratificado con respecto al estado nodal y el desarrollo de metástasis a distancia, siendo esta última la variable clave del estudio. Así, se incluyó un número importante de casos tanto en los subgrupos de pacientes con ganglios positivos como en los ganglios negativos para garantizar el poder estadístico del análisis de supervivencia. Las características de las pacientes incluidas en cada estudio y divididas en los dos grupos principales, con o sin recurrencia (desarrollo de metástasis a distancia), se enumeran en las *Tablas 6 y 7*.

Tabla 6. Características basales de 100 pacientes con cáncer de mama incluidas en el estudio piloto.

Características	Sin recurrencia N (%)	Con recurrencia N (%)
Casos totales	50	50
Mediana edad (años)		
≤55	27 (54)	25 (50)
>55	23 (46)	25 (50)
Estado menopáusico		
Pre-menopausia	14 (28)	14 (28)
Post-menopausia	36 (72)	36 (72)
Tamaño tumoral		
T1	30 (60)	22 (44)
T2	20 (40)	28 (56)
Estado nodal		
N-	32 (64)	22 (44)
N+	18 (36)	28 (56)
Estadío tumoral		
I	22 (44)	11 (22)
II	27 (54)	26 (52)
III	1 (2)	13 (26)
Grado histológico		
Bien diferenciado	22 (44)	14 (28)
Moderadamente diferenciado	15 (30)	20 (40)
Poco diferenciado	13 (26)	16 (32)
Estado HER2		
Negativo	35 (70)	38 (76)
Positivo	15 (30)	12 (24)
Receptor estrógenos		
Negativo	15 (30)	28 (56)
Positivo	35 (70)	22 (44)
Receptor progesterona		
Negativo	16 (32)	34 (68)
Positivo	34 (68)	16 (32)
Subtipos moleculares		
Luminal A	25 (50)	14 (28)
Luminal B	14 (28)	11 (22)
Her2	5 (10)	5 (10)
Triple-negativo	6 (12)	20 (40)
Radioterapia adyuvante		
No	38 (76)	29 (58)
Si	12 (24)	21 (42)
Tratamiento adyuvante		
Tamoxifeno	16 (32)	22 (44)
Quimioterapia	19 (38)	12 (24)
Quimioterapia + Tamoxifeno	12 (24)	8 (16)
Sin tratamiento	3 (6)	8 (16)

Tabla 7. Características basales de 246 pacientes con cáncer de mama incluidas en el estudio de confirmación del valor pronóstico del marcador.

Características	Sin recurrencia N (%)	Con recurrencia N (%)
Casos totales	123	123
Mediana edad (años)		
≤55	63 (51.2)	61 (49.6)
>55	60 (48.8)	62 (50.4)
Estado menopáusico		
Pre-menopausia	32 (26.0)	34 (27.6)
Post-menopausia	91 (74.0)	89 (72.4)
Tamaño tumoral		
T1	70 (56.9)	49 (39.8)
T2	53 (43.1)	74 (60.2)
Estado nodal		
N-	68 (55.3)	47 (38.2)
N+	55 (44.7)	76 (61.8)
Estadio tumoral		
I	41 (33.3)	23 (18.7)
II	75 (61.0)	65 (52.8)
III	7 (5.7)	35 (28.5)
Grado histológico		
Bien diferenciado	43 (35.0)	27 (22.0)
Moderadamente diferenciado	39 (31.7)	58 (47.2)
Poco diferenciado	41 (33.3)	38 (30.9)
Estado HER2 *		
Negativo	85 (96.1)	82 (66.7)
Positivo	37 (30.1)	31 (25.2)
Receptor estrógenos		
Negativo	37 (30.1)	46 (36.6)
Positivo	86 (69.9)	77 (63.4)
Receptor progesterona		
Negativo	45 (37.4)	60 (48.8)
Positivo	78 (62.6)	63 (51.2)
Subtipos moleculares		
Luminal A	57 (46.7)	44 (38.9)
Luminal B	34 (27.9)	35 (31.0)
Her2	12 (9.8)	9 (8.0)
Triple-negativo	19 (15.6)	25 (20.1)
Radioterapia adyuvante		
No	77 (62.6)	59 (48.0)
Si	46 (37.4)	64 (52.0)
Tratamiento adyuvante		
Tamoxifeno	42 (34.1)	22 (17.9)
Quimioterapia	34 (27.6)	44 (35.8)
Quimioterapia + Tamoxifeno	38 (30.9)	38 (30.9)
Sin tratamiento	9 (7.3)	19 (15.4)

* 1 caso desconocido sin recurrencia y 10 casos desconocidos con recurrencia. HER-2: human epidermal growth factor receptor 2.

Las mujeres fueron tratadas de acuerdo con las pautas utilizadas en nuestra Institución. En el estudio de confirmación del valor pronóstico del marcador, los pacientes se sometieron a mastectomía radical modificada o resección amplia con linfadenectomía axilar, y 110 pacientes (44,7%) recibieron radioterapia postoperatoria. Aunque los criterios de tratamiento han sufrido algunos cambios, la mayoría de los pacientes fueron tratados de acuerdo con los criterios de tratamiento adyuvante sistémico descritos anteriormente (Corte MD et al., 2006). En la población estudiada, 78 (31,7%) pacientes recibieron quimioterapia, 64 (26,0%) pacientes recibieron tamoxifeno y 76 (30,9%) pacientes recibieron ambos tipos de terapia sistémica. El período medio de seguimiento en pacientes sin metástasis fue de 146 meses y 31 meses en pacientes con enfermedad metastásica. El estudio se adhirió a las regulaciones nacionales y fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de nuestra Institución.

II ELABORACIÓN DE MALLAS DE TEJIDO Y TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

En el estudio piloto, con el fin de determinar la expresión de diferentes factores en las muestras de tejidos de los pacientes a estudio, hemos elaborado mallas de tejido o “array” de tejido que nos ha permitido procesar hasta 32 muestras de pacientes a la vez. Las muestras de los tejidos se fijaron en formol tamponado al 4% durante un mínimo de 24h. Tras esto, se realizó un estudio macroscópico, incluyendo en parafina las secciones representativas para el diagnóstico anatomopatológico. Para su inclusión se llevó a cabo el siguiente proceso: Formol

15' - Alcohol 70°C 30' - 70°C 30' - 96°C 30' - 96°C 30' - 100°C 30' - 100°C 30' - 100°C 45' - Xilol 60' - Xilol 60' - Xilol 60'.

Tras la obtención de bloques de tejido y con la ayuda de un microtomo (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), se cortaron muestras a un grosor de 5 μm , siendo posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina para seleccionar las zonas más representativas. Usando éstos como mapa en los bloques de parafina correspondientes, elaboramos el array mediante “manual tissue microarray” (Modelo MTA-1, Beecker instruments, Sun Praerie, Wisconsin, USA), se extrajo un cilindro del bloque receptor, que es rellenado por otro cilindro con el tejido extraído del bloque donante. Al mismo tiempo de la realización del array, se rellenó una plantilla con la situación de cada cilindro y su número de biopsia correspondiente. Cada uno de los casos es introducido en el array por duplicado. Una vez incluidos todos los casos, el bloque fue introducido en una estufa a 60°C para la correcta unión de los cilindros al resto del bloque de parafina, realizando posterior enfriamiento de este, y se obtuvieron secciones de 5 μm de espesor. Los cortes son recogidos en portaobjetos pretratados específicos para su uso en el inmunoteñidor (Figura 5). En el caso del estudio de confirmación, se realizaron las tinciones sobre cortes del bloque con tumor sin realizar arrays de tejido.



Figura 5: (a) Elaboración de “array” mediante “manual tissue array”; (b) Tinción inmunohistoquímica realizada sobre un “array”.

Sobre estas secciones, se realizó el estudio inmunohistoquímico (IHQ) utilizando para ello anticuerpos específicos frente a MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MMP-14. Previo a la inmunotinción, se realizó el desparafinado y desmascaramiento antigénico, para lo que pueden existir dos opciones, ausencia de tratamiento o pre tratamiento con calor (*Tabla 8*).

En el primer caso las secciones fueron introducidas en Xilol durante un tiempo no inferior a 30 minutos, y posteriormente pre hidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 96%, 80%, 70% y posteriormente, con solución acuosa) durante tres minutos cada uno y por último en tampón de lavado durante 5 minutos. El pre tratamiento con calor se realizó mediante un sistema automatizado PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca), el cual consta de dos tanques, uno de ellos con una solución de recuperación antigénica Tris-EDTA, pH9 (Targer Retrieval Solution, Dako), mientras el otro contiene como solución de recuperación antigénica tampón citrato, pH6 (Target Retrieval Solution, Dako) usando uno u otro dependiendo de las características del anticuerpo primario. Este sistema provocó el calentamiento de las muestras a 95°C durante 20 minutos, atemperándolas posteriormente hasta 65°C. Finalmente, y al igual que en el caso de no tratamiento, las secciones se mantuvieron un mínimo de 5 minutos en tampón de lavado.

Los cortes se introdujeron en los contenedores especiales del teñidor automático, donde se realizó la técnica inmunohistoquímica siguiendo estos pasos: a) lavado en tampon; b) de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% durante 5 min c) incubación con anticuerpos primarios (tiempo dependiente del anticuerpo usado) (*Tabla 8*); d) el exceso de anticuerpo se elimina realizando un lavado en tampon (Wash Buffer, Dako); e) lavado en tampon; f) incubación de los cortes con el sistema de polímeros de dextrano durante 30 min. (En Vision™ Detection Kit, Dako). El sistema de polímeros de dextrano se basa en la utilización de un polímero de alto peso molecular, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de peroxidasa y anticuerpo

secundario (inmunoglobulinas anti-ratón/conejo); g) lavados con tampon; h) la visualización del marcaje inmunohistoquímico se realiza con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) (Dako) durante 7 min y 30 seg.; i) contratinción con hematoxilina de Harris durante 2 min,; j) las muestras se lavaron, se deshidrataron con alcoholes crecientes y se montaron con la ayuda de un montador automático para posteriormente ser observadas al microscopio óptico Olympus BX51.

Tabla 8: Anticuerpos utilizados para las tinciones inmunohistoquímicas.

Antibody	Antigen retrieval	Dilution	Incubation (min)	Source (Cat. No.)
MMP-1	pH6	1:200	30	Thermo (Rb-1536)
MMP-2	-	1:50	120	Thermo (MA5-806-P0)
MMP-7	-	1:50	30	Thermo (MA5-14215)
MMP-9	-	1:100	60	Thermo (MA1-12894)
MMP-11	-	1:1000	60	Thermo (MA5-11234)
MMP-13	pH9	1:50	120	Thermo (MA5-14238)
MMP-14	-	1:200	60	GeneTex (GTX61603)

III DOBLES TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Se realizaron métodos de inmunotinción doble en muestras seleccionadas aleatoriamente con el sistema de tinción BenchMark ULTRA (Ventana-Roche, Rotk-470 reus, Suiza). Las secciones de tejido embebidas en parafina se pretrataron a 95°C durante 52 min. en tampón (pH 8), y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: MMP11 (1: 1000 a 40°C durante 80 min.) y Cytokeratin AE1 / AE3 (listo para usar (Roche), 24 min.) específico para las células cancerosas, o el marcador α -SMA (preparado para el uso (Roche), 40 min) específico para fibroblastos, o el marcador CD45 (listo para usar, clon 2B11PD7 / 26 Roche), 36 min) específico para los CMIs. Los sistemas de detección utilizados fueron UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit y UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche).

IV EVALUACIÓN DE INMUNOTINCIÓN

Un patólogo certificado (LOG), ajeno al resultado clínico de los pacientes, realizó el examen histológico y la valoración de la expresión de cada proteína por los diferentes tipos celulares. En cada caso, la inmunoreactividad se clasificó en dos categorías dependiendo del porcentaje de células teñidas por campo (negativas: 0-10% células positivas, positivas: > 10% células positivas) en cada tipo celular (células cancerosas, FACs y CMIs) Independientemente de la intensidad de tinción. Cada campo evaluado (objetivo x40) contenía al menos diez FACs y diez CMIs, como se estableció en estudios previos (Fernández García B. et al ,2016). Las células estromales se distinguieron de las células cancerosas en base al tamaño celular (estas últimas son de mayor tamaño). Los subconjuntos de células

estromales se distinguieron principalmente por morfología (los FACs son células en forma de huso, mientras que las CMIs son células redondas pequeñas). Adicionalmente, mientras que las células cancerosas se disponen formando patrones acinares o trabeculares, las células estromales se dispersan por todo el tejido. Para confirmar que la morfología descrita es de acuerdo con el tipo de célula, se utilizaron marcadores específicos para distinguir las células cancerosas (Cytokeratin AE1 / AE3), fibroblastos asociados al cáncer (α -SMA) y células inflamatorias mononucleares (CD45Ro).

La tinción para ER y PgRs se puntuó de acuerdo con el método descrito por Allred et al. (Allred DC et al., 1998) y la tinción HER-2 de acuerdo con los criterios utilizados para el Herceptest. Además, se establecieron los siguientes subtipos: tipo luminal A (RE +, RPg +, HER2-), luminal tipo B (RE +, RPg +, HER2 + / RE +, RPg-, HER2 + / RE +, RPg-, HER2-), HER2 + (RE -, RPg-, HER2 +), y triples negativos (RE-, RPg-, HER2-). (Nielsen TO et al. ,2004).

V ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Las diferencias en los porcentajes se calcularon con la prueba de chi cuadrado. Para la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y el análisis de supervivencia global (SG), se utilizó el método univariante de Cox. El modelo de regresión de Cox se utilizó para examinar las interacciones entre los diferentes factores pronósticos en un análisis multivariante. Sólo los parámetros que alcanzan significación estadística para SLR en el análisis univariante (así como el estado nodal) se incluyeron en el análisis multivariante. El valor de $p \leq 0,05$ se consideró

significativo. El programa PASW Statistics 18.0 se utilizó para todos los cálculos (SPSS Inc, Chicago, IL, USA.).

RESULTADOS

I ESTUDIO PILOTO

La mayoría de las MMPs fueron expresadas por las células tumorales, observándose una mayor variabilidad en la expresión por las células estromales. Considerando la importancia clínica de los fenotipos estromales según la expresión de MMPs, y dado que existe un interés en la práctica de proporcionar información pronóstica fácil, analizamos el posible valor de todos estos marcadores biológicos del estroma. Los resultados mostraron que varias expresiones de MMPs, por diferentes células del estroma, se asocian con el pronóstico (*Tabla 9*). De ellos, la expresión de MMP-11 por CMI y fue el factor pronóstico más potentes para predecir el resultado clínico.

Tabla 9.

Factor	N° (neg /pos)	RECURRENCIA			SUPERVIVENCIA GLOBAL		
		Frecuencia evento	HR IC(95%)	RR IC(95%)	Frecuenci a evento	HR IC(95%)	RR IC(95%)
FACs							
MMP-1	20/80	10/52	1.7 (0,8-3,4)		5/39	2.4 (0.9-6)	
MMP-2	76/24	44/18	1.3 (0,7-2,3)		32/12	1.1 (0.6-2.3)	
MMP-7	28/72	15/47	1.5 (8,8-2,8)		12/32	1.3 (0.6-2.5)	
MMP-9	87/13	45/17	3.3*** (1.9-6)	1.9* (1.09-3.5)	31/13	3.9*** (2-7.8)	2.1* (1.05-4.2)
MMP-11	29/71	9/53	4*** (2-8.2)	2.5 (1.2-5.3)	6/38	4*** (1.9-10)	3* (1.1-7.3)
MMP-13	48/52	23/39	1.7* (1.04-3)	----	18/25	1.5 (0.8-2.7)	
MMP-14	15/85	9/53	1.3 (0.6-2.7)		6/38	1.4 (0.6-3.4)	
CMI s							
MMP-1	37/63	19/43	1.4 (0.8-2.5)		14/30	1.4 (0.7-2.7)	
MMP-2	97/1	61/1	1.6 (0.2-11.7)		43/1	2.1 (0.3-15)	
MMP-7	48/52	25/37	1.7* (1.05-2.9)	---	20/24	1.4 (0.7-2.5)	
MMP-9	90/10	50/12	3.5*** (1.8-6.8)	---	37/7	2,8* (1.2-6.6)	---
MMP-11	69/31	28/34	6.4*** (3.6-11)	3.9*** (2.1-7.4)	20/24	6*** (3.1-11)	5*** (2.5-9.7)
MMP-13	70/30	35/27	1.7* (1.05-2.9)	---	27/17	1.4 (0.8-2.6)	
MMP-14	44/56	17/45	3.4*** (1.9-6)	2.3** (1.2-4.1)	13/31	3** (1.6-5.9)	2* (1.04-4.1)

II ESTUDIO DE CONFIRMACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE MMP11 POR LAS CMIS

En el presente estudio se investigó la relevancia de la expresión de MMP11 por CMIs intratumorales para el pronóstico del cáncer de mama.

La evaluación de la expresión de MMP11 se realizó por inmunohistoquímica, debido a la necesidad de identificar qué tipo celular contribuyó a su expresión tumoral. El doble-tinciones de MMP11 con marcadores específicos para las células cancerosas, FACs y CMIs (*Figura 6*), mostró que la descripción morfológica realizada previamente para cada tipo de célula correspondió a cada uno, como lo demuestran los marcadores específicos.

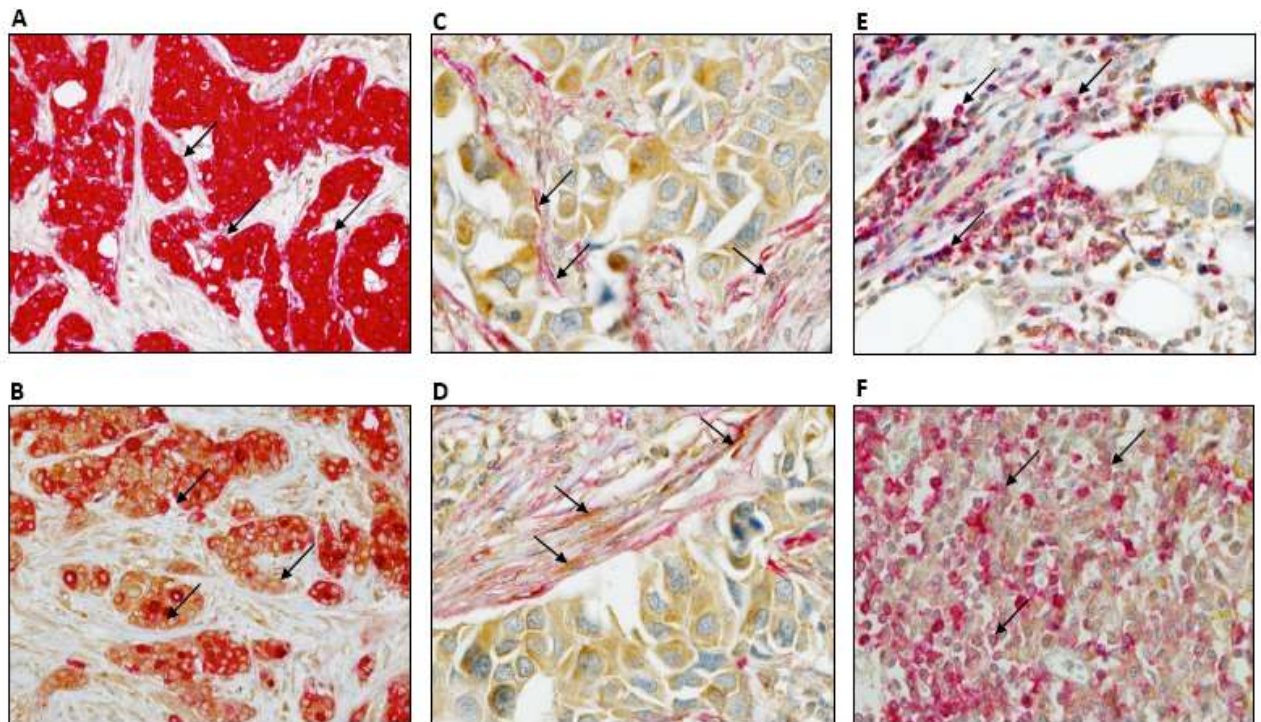


Figura 6. Imagen representativa de la doble tinción inmunohistoquímica para MMP11 con diferentes marcadores específicos para cada tipo celular. Tinción de

citoqueratina AE1/AE3 (rojo) específica de las células tumorales en combinación con MMP11 (marrón), **(A)** Expresión negativa de MMP11 por las células tumorales y **(B)** Expresión positiva de MMP11 por las células tumorales. Tinción de α -SMA (rojo) específica de los fibroblastos asociados a tumor (FACs) en combinación con MMP11 (marrón), **(C)** Expresión negativa de MMP11 por los FACs y **(D)** Expresión positiva de MMP11 por los FACs. Tinción de CD45 (rojo) específica de las CMIs en combinación con MMP11 (marrón), **(E)** Expresión negativa de MMP11 por las CMIs y **(F)** Expresión positiva de MMP11 por las CMIs. El tipo celular de interés está indicado por flechas en cada tinción.

Como se muestra en la *Tabla 10*, la expresión de MMP11 por células cancerosas se observó en el 93,5% de los casos, lo que limita el valor pronóstico de la expresión de MMP11 por este tipo de células. Sin embargo, la expresión de este factor se extendió más ampliamente en las células estromales: FACs y CMIs. En los casos positivos, se encontró al menos el 60% de las FACs o CMI positivas, en cada campo evaluado.

Tabla 10: Frecuencia de expresión de MMP11 por cada tipo celular.

	Células tumorales N (%)	FACs N (%)	CMIs N (%)
Expresión negativa de MMP11	16 (6.5)	71 (28.9)	155 (63.0)
Expresión positiva de MMP11	230 (93.5)	175 (71.1)	91 (37.0)
Total	246 (100)	246 (100)	246 (100)

III EXPRESIÓN DE MMP11 Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES

El análisis de la expresión de MMP11 por cada tipo de célula según las diferentes características clinicopatológicas de los pacientes y tumores mostró que las pacientes postmenopáusicas tuvieron un porcentaje significativamente mayor de casos con expresión positiva de MMP11 por fibroblastos (número de casos positivos): 135 (75%) ; (P = 0,040) que las pacientes premenopáusicas. Además, los tumores T2 tuvieron un porcentaje significativamente mayor de casos con MMP11 positiva : 57 (44,9%), (p = 0,012) que los tumores T1 y Tumor de grado III presentaron un porcentaje significativamente mayor de casos con MMP11 positivos (54,8%), p = 0,002) que otros grados del tumor.

Sin embargo, no se encontraron otras asociaciones significativas entre las características clínico-patológicas y la expresión de tipo celular (datos no presentados).

IV MMP11 EXPRESIÓN Y PRONÓSTICO

Se analizó la relación entre MMP11 expresión por cada tipo de célula y el pronóstico (Figura 2). Hemos encontrado que la expresión de MMP11 por células cancerosas no se asoció significativamente con SLR (p = 0,089) o SG (p = 0,245) (Figura 7A). Sin embargo, la expresión de MMP11 por las células del estroma alcanzó una asociación significativa con el pronóstico. Concretamente, la expresión de MMP11 por FACs está asociada con SLR acertado (p = 0,0001; $X^2 = 21,9$) y SG (p = 0,0001, $X^2 = 17,6$) (Figura 7B), pero la expresión de MMP11 por CMIs (P = 0,0001, $X^2 = 90,5$) y SG (p = 0,0001; $X^2 = 62,0$) (Figura 7C).

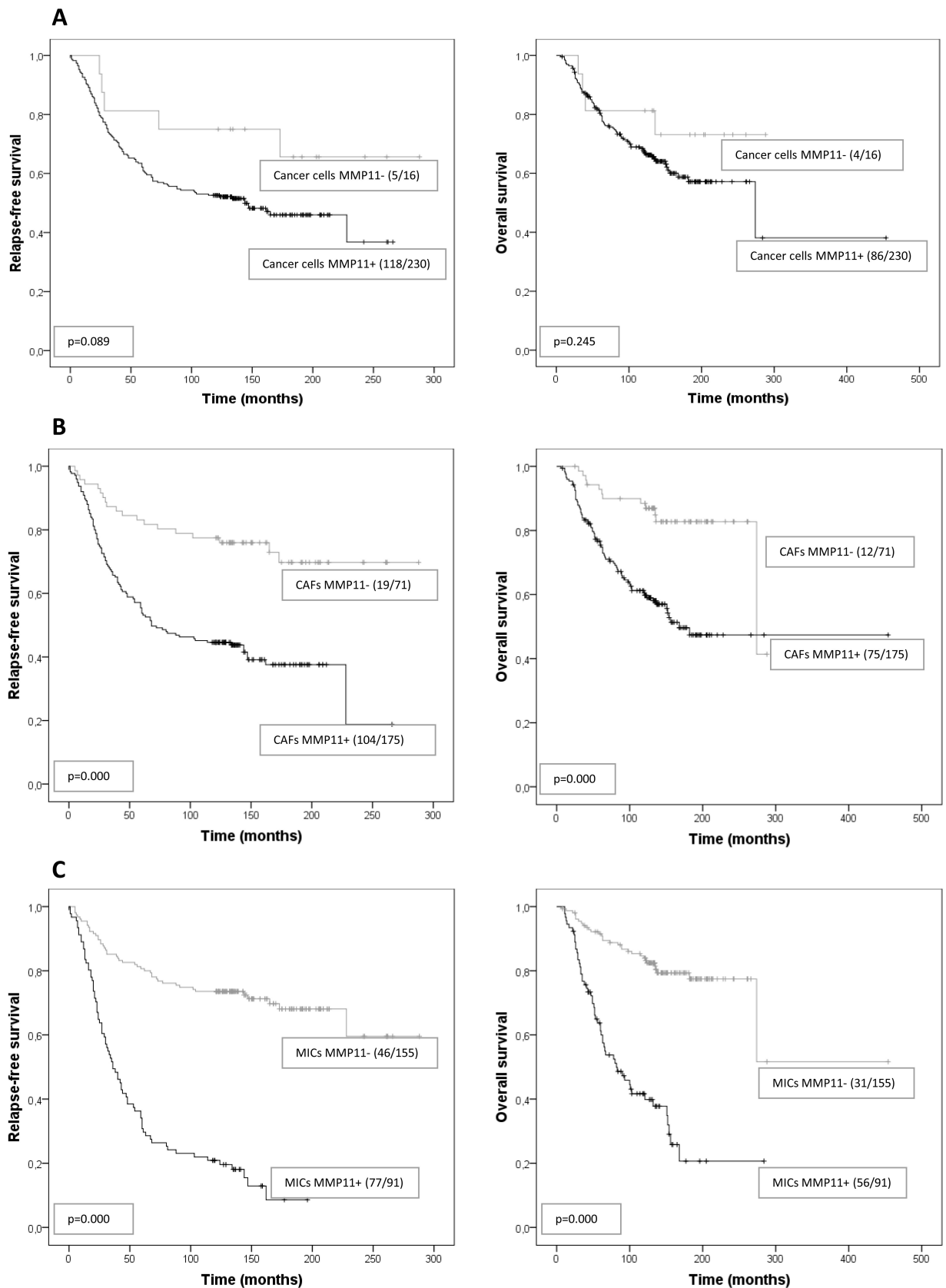


Figura 7. Significación pronóstica de la MMP11 en carcinomas mamarios. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recidiva y la supervivencia global, como función de la expresión de MMP11 por: (A) Células tumorales, (B)

FACs, o (C) CMIs. El ratio del número de eventos/casos totales está indicado en cada gráfica.

V ANÁLISIS MULTIVARIANTE

El análisis multivariante según el modelo de Cox, en la población total de pacientes, demostró que el estadio tumoral era significativo e independientemente asociado con la SLR (estadio II del tumor: (riesgo relativo (RR) (intervalo de confianza = 0.44 Además, este mismo análisis también demostró que la expresión de MMP11 por CMIs era significativa e independientemente asociada con SLR ($p = 0,004$) 4,57 (3,08-6,77); $p = 0,0001$).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que la expresión de MMP11 por CMI de estroma intratumoral es el indicador pronóstico más potente en pacientes con cáncer de mama invasivo. Por lo tanto, nuestros datos señalan la importancia de MMP11 y los componentes celulares de estroma tumoral en la progresión del cáncer de mama.

MMP11 (también conocido como estromelisin-3) pertenece a la familia de enzimas extracelulares MMPs (Basset P. et al., Nature 1990). La MMP11 desempeña un papel en la implantación embrionaria, la ontogénesis de órganos, la involución de tejidos, los procesos de reparación (Okada A. et al., 1997), (Rio MC., 2005), (Tan J. et al., 2014) y numerosas enfermedades como la aterosclerosis, la artritis reumatoide y el cáncer (Schonbeck U. et al., 1999), (Basset P. et al., 1997). Curiosamente, se ha demostrado que MMP11 tiene un papel paracrino en el desarrollo de la glándula mamaria posnatal (Tan J. et al., 2014). Durante este proceso, la bifurcación del extremo final y la ramificación lateral del conducto a nivel global, presentan un aumento del compartimento epitelial y requieren la invasión del epitelio a través de la almohadilla de grasa conectiva circundante separada por membranas basales dispersas y maduras, respectivamente. Estos procesos se acompañan de una remodelación intensa del estroma. Expansión e invasión epitelial similares y remodelación estromal son características de los tumores malignos (Lanigan F et al., 2007), (Khialeeva E. et al., 2011). Por lo tanto, MMP11 tiene una función paracrina durante el desarrollo de la glándula mamaria que podría aprovecharse para promover la progresión del tumor, exponiendo un nuevo vínculo entre el desarrollo y la malignidad.

MMP11 fue identificado originalmente como una proteína altamente expresada en las células estromales de cáncer de mama invasivo en comparación con el de fibroadenoma (Basset P. et al., 1990). Estudios posteriores evaluaron la expresión de MMP11, además del cáncer de mama (Eiró N. et al 2012), (Vizoso FJ et al., 2007), (Eiró N. et al, 2015), (Rouyer N. et al., 1994), (Eiró N. et al., 2013), en la mayoría de los carcinomas humanos invasivos, tales como cáncer de pulmón (Anderson IC. Et al., Cancer Res 1995), cáncer de laringe(Li Z. et al., 2015), cáncer colorrectal (porte H. et al., 1995), (Tian X et al., 2015), (González L.O. , 2012),

cáncer de próstata (Escaff S. et al., 2010), (Nonsrijun N. et al., 2013), carcinoma epidermoide oral (Hsin CH. et al. , 2014) y Colangiocarcinoma (Tongtawee T., 2015); y la alta expresión de MMP11 se correlacionó con un fenotipo agresivo y un mal resultado clínico. Además, estudios recientes parecen indicar que la MMP11 es un nuevo gen del biomarcador del cáncer de mama en el cáncer de mama, que puede facilitar el diagnóstico y el tratamiento en las terapias clínicas del cáncer de mama (Fu J. et al., 2015), (Akkiprik M. et al., 2015). Nuestros resultados en una amplia población de pacientes con cáncer de mama confirman nuestros informes anteriores que apuntan a un gran impacto pronóstico de la expresión MMP11 intratumoral CIMs de carcinomas de mama (González L.O. et al., 2010), (Vizoso FJ., 2007), (Eiró N. et al., 2015). Este hallazgo apoya la relevancia reconocida del estroma en la progresión tumoral y, el papel de la expresión de MMP11 por el microambiente tumoral. Con respecto a esto, en un estudio anterior, utilizando modelos de tumorigénesis de ratón, el estroma MMP11 se encontró a favor de la supervivencia de células cancerígenas y la implantación durante los primeros pasos invasivos de los tejidos conectivos adyacentes (Boulay A. et al. , 2001). Además, en otro estudio anterior (Eiró N. et al., 2012) observamos que los tumores con CIMs que expresan MMP11 están asociados con una alta proporción de células inmunitarias [(CD68 +) macrófagos / (CD3 +) células T + (CD20 +) células B], en el frente invasivo de carcinomas de mama, que a su vez está directamente asociado con una mayor probabilidad de desarrollo de metástasis a distancia. Este hallazgo parece relevante porque el frente invasor es el área donde tienen lugar algunas de las interacciones más importantes entre las células cancerosas y el estroma tumoral. La degradación del tejido conectivo del estroma y los componentes de la membrana basal son elementos clave en la invasión y metástasis del tumor. Las enzimas proteolíticas de varias clases (metaló, aspártico, cisteína, serina y treonina) ejecutan la descomposición de los elementos de la matriz. Sin embargo, algunos componentes, particularmente los colágenos intersticiales, son muy resistentes a los ataques proteolíticos, siendo degradados sólo por las MMPs (Nelson AR. et al., 2000). Sin embargo, en comparación con otras MMPs, la MMP11 tiene un

potencial proteolítico relativamente débil (Murphy G. et al., 1993). La MMP11 es capaz de catalizar la degradación de los inhibidores de serina proteasa, alfa 1-antitripsina (A1AT), e insulina-como factor de crecimiento de unión a la proteína-1 (IGF-BP-1) (Pei D. et al., 1994), (Manes S, et al., 1997) y esto probablemente sólo desempeñe un papel indirecto en la remodelación de la matriz extracelular, que es diferente de otras MMP. Estas propiedades especiales indican que la MMP11 podría desempeñar algunas funciones únicas en el desarrollo de tumores malignos y la progresión. Existen otros mecanismos que podrían explicar la especial relevancia de la MMP11 en la progresión tumoral. Por lo tanto, mientras que la mayoría de las MMP se secretan como proenzimas que necesitan activación extracelular, MMP11 se procesa intracelularmente y se secreta como una enzima activa. Esto también sugiere que esta endopeptidasa puede tener un papel único en el desarrollo del tumor y la progresión (Pei D. et al., 2009), (Peruzzi D. et al., 2009), (Brasse D. et al., 2010). Además, en un estudio realizado por Boulay et al. (Boulay A. et al., 2001), se reveló un papel nuevo e inesperado para esta MMP, puesto que en la tumorigénesis inducida por MMP11 la proliferación de células cancerígenas no aumentó, pero la muerte de células cancerosas disminuyó, a través de apoptosis y necrosis, lo que indica que la función de la MMP11 es favorecer la supervivencia de las células cancerosas en el ambiente estromal.

En resumen, todos los datos informados indican un papel multidimensional, y también un papel biológico único de la MMP11 en la progresión del cáncer, y los resultados del presente trabajo señalan hacia un importante impacto clínico de la MMP11 en el resultado de los pacientes con cáncer de mama. Como se mostró en este estudio, la determinación de MMP11 por CMIs intratumorales se realizó mediante inmunohistoquímica, método frecuentemente utilizado en los laboratorios de anatomía patológica. Por lo tanto, estas evidencias nos llevan a proponer la expresión de MMP11 por CMIs intratumorales como un marcador biológico útil para el pronóstico del cáncer de mama que podría ser incluido en los esquemas de clasificación tradicionales, para proporcionar un nuevo pronóstico y herramienta predictiva para los clínicos.

CONCLUSIONES

1. El estudio piloto ha mostrado que la expresión de MMP11 por las CMIs puede ser un marcador pronóstico de las MMPs de cara a predecir el desarrollo de metástasis a distancia en pacientes con cáncer de mama.
2. La expresión de MMP11 por las CMIs es un factor pronóstico independiente y potente en cuanto a la predicción de desarrollo de metástasis a distancia en pacientes con cáncer de mama.
3. El valor pronóstico de la expresión de MMP11 por las CMIs es independiente del tratamiento con quimioterapia.
4. El valor pronóstico de la expresión de MMP11 por las CMIs es independiente del tratamiento con hormonoterapia.

BIBLIOGRAFÍA

- Altadill, A., M. Rodriguez, L. O. Gonzalez, S. Junquera, M. D. Corte, M. L. Gonzalez-Diequez, et al. (2009). "Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma." *Dig Liver Dis* 41(10): 740-748.
- Althuis, M. D., J. M. Dozier, W. F. Anderson, S. S. Devesa and L. A. Brinton (2005). "Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997." *Int J Epidemiol* 34(2): 405-412.
- Allred, D. C., R. W. Carlson, D. A. Berry, H. J. Burstein, S. B. Edge, L. J. Goldstein, et al. (2009). "NCCN Task Force Report: Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer by Immunohistochemistry." *J Natl Compr Canc Netw* 7 Suppl 6: S1-S21; quiz S22-23.
- Antoniou, A. C. and D. F. Easton (2006). "Risk prediction models for familial breast cancer." *Future Oncol* 2(2): 257-274.
- Berrino, F., R. De Angelis, M. Sant, S. Rosso, M. Bielska-Lasota, J. W. Coebergh, et al. (2007). "Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study." *Lancet Oncol* 8(9): 773-783.
- Boyd, N. F., J. Stone, K. N. Vogt, B. S. Connelly, L. J. Martin and S. Minkin (2003). "Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature." *Br J Cancer* 89(9): 1672-1685.
- Boyle, P. and J. Ferlay (2005). "Cancer incidence and mortality in Europe, 2004." *Ann Oncol* 16(3): 481-488.
- Brown, R. W., C. D. Allred, G. M. Clark, C. K. Osborne and S. G. Hilsenbeck (1996). "Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer." *Clin Cancer Res* 2(3): 585-592.
- Cui, X., R. Schiff, G. Arpino, C. K. Osborne and A. V. Lee (2005). "Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy." *J Clin Oncol* 23(30): 7721-7735.
- Chen, S. and G. Parmigiani (2007). "Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance." *J Clin Oncol* 25(11): 1329-1333.
- Dandachi, N., O. Dietze and C. Hauser-Kronberger (2004). "Evaluation of the clinical significance of HER2 amplification by chromogenic in situ hybridisation in patients with primary breast cancer." *Anticancer Res* 24(4): 2401-2406.
- DeSantis, C., R. Siegel, P. Bandi and A. Jemal (2011). "Breast cancer statistics, 2011." *CA Cancer J Clin* 61(6): 409-418.
- Dookeran, K. A., J. J. Dignam, K. Ferrer, M. Sekosan, W. McCaskill-Stevens and S. Gehlert (2010). "p53 as a marker of prognosis in African-American women with breast cancer." *Ann Surg Oncol* 17(5): 1398-1405.
- Erdem, O., A. Dursun, U. Coskun and N. Gunel (2005). "The prognostic value of p53 and c-erbB-2 expression, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma." *Tumori* 91(1): 46-52.
- Fernandez-Gomez, J., S. Escaf, L. O. Gonzalez, A. Suarez, S. Gonzalez-Reyes, J. Gonzalez, et al. (2011). "Relationship between metalloprotease expression in tumour and stromal cells and aggressive behaviour in prostate carcinoma: Simultaneous high-throughput study of multiple metalloproteases and their inhibitors using tissue array analysis of radical prostatectomy samples." *Scand J Urol Nephrol* 45(3): 171-176.
- Ferretti, G., A. Felici, P. Papaldo, A. Fabi and F. Cognetti (2007). "HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend." *Curr Opin Obstet Gynecol* 19(1): 56-62.
- Friedenreich, C. M. and A. E. Cust (2008). "Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects." *Br J Sports Med* 42(8): 636-647.
- Gonzalez, L., N. Eiro, L. O. Gonzalez, A. Andicoechea, E. Barbon, J. L. Garcia-Muniz, et al. (2012). "Effect of the expression of matrix metalloproteases and their tissue inhibitors on survival of patients with resectable colorectal cancer." *Dig Dis Sci* 57(8): 2063-2071.

- Gonzalez, L. O., M. D. Corte, S. Junquera, R. Gonzalez-Fernandez, J. M. del Casar, C. Garcia, et al. (2009). "Expression and prognostic significance of metalloproteases and their inhibitors in luminal A and basal-like phenotypes of breast carcinoma." *Hum Pathol* 40(9): 1224-1233.
- Gonzalez, L. O., M. D. Corte, J. Vazquez, S. Junquera, R. Sanchez, A. Vina, et al. (2008). "Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast." *Histopathology* 53(4): 403-415.
- Gonzalez, L. O., S. Gonzalez-Reyes, L. Marin, L. Gonzalez, J. M. Gonzalez, M. L. Lamelas, et al. (2010). "Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumour stromal mononuclear inflammatory cells and those at the invasive front of breast carcinomas." *Histopathology* 57(6): 862-876.
- Gonzalez, L. O., I. Pidal, S. Junquera, M. D. Corte, J. Vazquez, J. C. Rodriguez, et al. (2007). "Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse." *Br J Cancer* 97(7): 957-963.
- Hammond, M. E., D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerty, S. Badve, et al. (2010). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer." *Arch Pathol Lab Med* 134(6): 907-922.
- Han, W., S. W. Kim, I. A. Park, D. Kang, Y. K. Youn, S. K. Oh, et al. (2004). "Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer." *BMC Cancer* 4: 82.
- Herszenyi, L., I. Hritz, G. Lakatos, M. Z. Varga and Z. Tulassay (2012). "The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer." *Int J Mol Sci* 13(10): 13240-13263.
- Lee, A. H., S. E. Pinder, R. D. Macmillan, M. Mitchell, I. O. Ellis, C. W. Elston, et al. (2006). "Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma." *Eur J Cancer* 42(3): 357-362.
- Li, C. I., K. E. Malone, B. S. Saltzman and J. R. Daling (2006). "Risk of invasive breast carcinoma among women diagnosed with ductal carcinoma in situ and lobular carcinoma in situ, 1988-2001." *Cancer* 106(10): 2104-2112.
- Lonning, P. E., S. Knappskog, V. Staalesen, R. Chrisanthar and J. R. Lillehaug (2007). "Breast cancer prognostication and prediction in the postgenomic era." *Ann Oncol* 18(8): 1293-1306.
- Maass, H., B. Engel and G. Trams (1975). "Steroid hormone receptors in human breast cancer and the clinical significance." *J Steroid Biochem* 6(5): 743-749.
- McGuire, W. L. and G. M. Clark (1986). "Role of progesterone receptors in breast cancer." *CA Cancer J Clin* 36(5): 302-309.
- Meijers-Heijboer, H., A. van den Ouweland, J. Klijn, M. Wasielewski, A. de Snoo, R. Oldenburg, et al. (2002). "Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations." *Nat Genet* 31(1): 55-59.
- Mirza, A. N., N. Q. Mirza, G. Vlastos and S. E. Singletary (2002). "Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years." *Ann Surg* 235(1): 10-26.
- Osborne, C. K., J. Shou, S. Massarweh and R. Schiff (2005). "Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer." *Clin Cancer Res* 11(2 Pt 2): 865s-870s.
- Pharoah, P. D., A. Antoniou, M. Bobrow, R. L. Zimmern, D. F. Easton and B. A. Ponder (2002). "Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention." *Nat Genet* 31(1): 33-36.
- Pike, M. C., C. L. Pearce and A. H. Wu (2004). "Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary." *Oncogene* 23(38): 6379-6391.
- Rastelli, F. and S. Crispino (2008). "Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer." *Tumori* 94(3): 370-383.

- Rosen, P. P., S. Groshen and D. W. Kinne (1991). "Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study." *J Clin Oncol* 9(9): 1650-1661.
- Rossner, P., Jr., M. D. Gammon, Y. J. Zhang, M. B. Terry, H. Hibshoosh, L. Memeo, et al. (2009). "Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival." *J Cell Mol Med* 13(9B): 3847-3857.
- Schoppmann, S. F., G. Bayer, K. Aumayr, S. Taucher, S. Geleff, M. Rudas, et al. (2004). "Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer." *Ann Surg* 240(2): 306-312.
- Shah, S. and B. Chen (2011). "Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution." *Patholog Res Int* 2011: 903202.
- Shou, J., S. Massarweh, C. K. Osborne, A. E. Wakeling, S. Ali, H. Weiss, et al. (2004). "Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 96(12): 926-935.
- Shuman Moss, L. A., S. Jensen-Taubman and W. G. Stetler-Stevenson (2012). "Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis." *Am J Pathol* 181(6): 1895-1899.
- Silverstein, M. J., M. D. Lagios, S. Martino, B. S. Lewinsky, P. H. Craig, P. J. Beron, et al. (1998). "Outcome after invasive local recurrence in patients with ductal carcinoma in situ of the breast." *J Clin Oncol* 16(4): 1367-1373.
- Subramaniam, D. S. and C. Isaacs (2005). "Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer." *Curr Treat Options Oncol* 6(2): 147-159.
- Viale, G., A. Giobbie-Hurder, M. M. Regan, A. S. Coates, M. G. Mastropasqua, P. Dell'Orto, et al. (2008). "Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole." *J Clin Oncol* 26(34): 5569-5575.
- Viani, G. A., S. L. Afonso, E. J. Stefano, L. I. De Fendi and F. V. Soares (2007). "Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials." *BMC Cancer* 7: 153.
- Vidal Lancis, C., J. M. Martinez-Sanchez, M. Mateos Mazon and M. Peris Tuser (2010). "[Breast cancer mortality trend in Spain and its autonomous communities during the period 1980-2005]." *Rev Esp Salud Publica* 84(1): 53-59.
- Vizoso, F. J., L. O. Gonzalez, M. D. Corte, J. C. Rodriguez, J. Vazquez, M. L. Lamelas, et al. (2007). "Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer." *Br J Cancer* 96(6): 903-911.
- Wittliff, J. L. (1984). "Steroid-hormone receptors in breast cancer." *Cancer* 53(3 Suppl): 630-643.
- Wooster, R. and B. L. Weber (2003). "Breast and ovarian cancer." *N Engl J Med* 348(23): 2339-2347.
- Yang, L. and K. H. Jacobsen (2008). "A systematic review of the association between breastfeeding and breast cancer." *J Womens Health (Larchmt)* 17(10): 1635-1645.