Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO
INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Estudio de la influencia de los fibroblastos del estroma tumoral en el comportamiento de los carcinomas mamarios

Lucía González Llorente

Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO
INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Estudio de la influencia de los fibroblastos del estroma tumoral en el comportamiento de los carcinomas mamarios

Lucía González Llorente

RESUMEN (en Inglés)

Cancer associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant cell type in breast cancer stroma and have a series of actions promoting tumor phenotypes, including inflammatory cell recruitment. We found that 32% of breast carcinomas analyzed contained intratumoral mononuclear inflammatory cells (MICs) in the intratumoral stroma with a high MMPs (matrix metalloproteases)/TIMPs (tisullar inhibitor MMPs) expression profile (MMP11 is their better biological marker), which is associated with a higher rate of distant metastasis development (97.6%) and with high inflammatory molecular profile from tumors.

In the present study, we analized the expression by normal associated fibroblasts (NAFs) and by CAFs from breast carcinomas, of factors related with the crosstalk between the cancer cells and the tumor stroma which were all implicated in several actions promoting tumor growth, and their relationship with MMP11 expression by intratumor MICs.

NAFs and CAFs were isolated from twenty invasive breast carcinomas which were classified in order to their expression of MMP11 by intratumoral MICs. Expressions of the calcium-binding protein S100A4, growth factors (TGFβ, HGF, FGF2, FGF7, PDGFA, PDGFB, VEGFA and IGF2), inflammatory cytokines (IL6 and IL8), chemokines (CCL2, CXCL12), proteases (uPA, MMP2, MM9 and MMP11), transcription factor NFκB and TIMP1, were analyzed by PCR methods. We also explore, across co-cultures between CAFs and two breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231), the possible reciprocal influence on these molecular expressions. Likewise, Matrigel invasive tests were performed.

The results indicate that in the overall population of the study, CAFs showed higher levels of FGF7, IL6, CCL2, MMP2, MMP9 and MMP11, compared with paired NAFs. NAFs from tumors with MMP11(+) MICs showed higher expression of IL8 and FGF2, compared with tumors with MMP11(-) MICs. In addition, CAFs from tumors with MMP11(+) MICs had higher CXCL12, S100A4, HGF, VEGFA and TIMP1 compared with tumors with MMP11(-) MICs. Both CAFs types increased the expression of many of the factors when co-cultured with each of the two breast cancer cell lines. Although different induction patterns were detected in the two breast cancer cell lines after co-cultured with either one of the two CAFs types. Thus, CAFs from MMP11(-) MICs tumors express higher levels of PDGFB, CCL2, MMP9, MMP11, IL6 and IGF2, after co-cultured with MCF7, compared with tumors with MMP11(+) MICs; whereas CAFs from MMP11(+) MICs tumors express higher levels of HGF, FGF2, PDGFB, CXCL12, and uPA, after co-

cultured with MDA-MB-231 cells, compared with tumors with MMP11(-) MICs. On the other hand, both MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells overexpress many of these factors when co-cultured with both CAFs types. However, it was also remarkable the fact of that conditioned medium from both CAFs populations increased the invasive phenotype from the metastasic MDA-MB-231 cell line, but this effect was higher with the conditioned medium from CAFs from MMP-11(+) MICs tumors.

The results of this study demostrated that CAFs from MMP-11(+) MICs tumors seem specially to contribute to tumor progression. Our findings contribute to a better tumor stromal characterization in order to an improved prognostic evaluation in breast cancer.

Bibliography

- Beck AH et al., The fibromatosis signature defines a robust stromal response in breast carcinoma. Lab Invest. 2008; 88:591-601.
- Bergamaschi A et al., Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. J Pathol. 2008; 214:357-67.
- Camp JT et al., Interactions with fibroblasts are distinct in Basal-like and luminal breast cancers. Mol Cancer Res. 2011 Jan;9(1):3-13.
- Del Casar JM et al., Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat. 2009; 116: 39-52.
- Del Casar JM et al., Expression of metalloproteases and their inhibitors in different histological types of breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2010; 136: 811-9.
- Del Casar JM et al., Expression of metalloproteases and their inhibitors in primary tumors and in local recurrences after mastectomy for breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2010; 136: 1049-58.
- Finak G et al., Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. Nat Med. 2008; 14:518-27.
- Fukino K et al., Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. JAMA. 2007 ;297:2103-11.
- González LO et al., 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. 2010; 57: 862-76.
- González LO et al., Expression of metalloproteases and their inhibitors by tumor and stromal cells in ductal carcinoma in situ of the breast and their relationship with microinvasive events. J Cancer Res Clin Oncol. 2010; 136: 1313-21
- González LO et al., Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in

mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. Br J Cancer. 2007; 97: 957-63.

- González LO et al., Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. Histopathology. 2008; 53: 403-15.
- Kalluri R et al., Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer. 2006; 6:392-401.
- Kim JB et al., Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumourigenesis. Tumour Biol. 2005 ;26:173-85.
- Olsen CJ et al., Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. BMC Cancer. 2010 Aug 19;10:444.
- Potter SM et al., Influence of stromal-epithelial interactions on breast cancer in vitro and in vivo. Breast Cancer Res Treat. 2012; 131:401-11.
- Tlsty TD et al., Tumor stroma and regulation of cancer development. Annu Rev Pathol. 2006;1:119-50.
- Vizoso FJ et al., Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. Br J Cancer. 2007; 96: 903-11
- Wiseman BS et al., Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. Science. 2002; 296:1046-9

FOR-MAT-VOA-008-BIS

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Índice

Abreviaturas **1**
Introducción **6**
I. Fisiología de la mama **7**
II. Desarrollo del tumor **9**
III. Incidencia y mortalidad por cáncer de mama **13**
IV. Factores de riesgo **15**
V. Factores pronósticos y predictivos **20**
V.1 Concepto de factores pronósticos y predictivos de respuesta 20
V.2 Tamaño tumoral 21
V.3 Afectación ganglionar 21
V.4 Grado histológico 23
V.5 Sistema TNM 25
V.6 Estadío tumoral 29
V.7 Tipos histológicos 30
V.8 Invasión vascular linfática 33
V.9 Invasión vascular venosa 34
VI. Factores pronósticos biológicos y moleculares **34**
VI.1 Receptores hormonales 34
VI.2 HER2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) 35
VI.3 ki-67 36
VI.4 p53 37
VI.5 BCL-2 (linfoma de células B2) 37
VI.6 Otros factores 38
VII. Estroma tumoral **38**
VII.1 Expresión de la metaloproteasa 11 en las células inflamatorias mononucleares. 39
VII.2 Fibroblastos del estroma tumoral 43
VIII. Factores interrelación estroma-célula tumoral **44**
VIII.1 S100A4 44
VIII.2 Factor de crecimiento transformante beta 1 45
VIII.3 Factor de crecimiento de hepatocitos 47
VIII.4 Factores de crecimiento de fibroblastos 49
VIII.5 Factores de crecimiento derivados de plaquetas 51
VIII.6 Activador del plasminógeno tipo uroquinasa 52
VIII.7 Interleuquinas 54
VIII.8 Proteína quimioatrayente de monocitos 57
VIII.9 Factor derivado de células estromales 58
VIII.10 Factor nuclear de transcripción kappa B 59
VIII.11 Factor de crecimiento similar a la insulina 2 60
VIII.12 Factor de crecimiento del endotelio vascular 61
VIII.13 Metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores 62
Objetivos **68**
Material y métodos **70**
I. Selección de pacientes **71**
II. Clasificación de los tumores **71**

III. Tinción inmunohistoquímica 72
IV. Cultivos celulares 74
IV.1 Líneas celulares 74
IV.2 Obtención de cultivos primarios y cultivo de fibroblastos 75
V. Confirmación de la pureza de los cultivos de fibroblastos 76
VI. Co-cultivos 79
VII. Extracción del ARN 80
VIII. Síntesis del cDNA 82
IX. PCR a tiempo real 82
X. Ensayos de invasión 85
XI. Análisis estadístico 86
Resultados 88
I. Clasificación de las muestras según la expresión de MMP11 en las CMIs 89
II. Evaluación de las diferencias de expresión de los factores a estudio en toda la población 90
II.1 Evaluación del perfil molecular de los NAFs y los CAFs asociados. 90
II.2 Evaluación del perfil molecular de los CAFs co-cultivados con líneas celulares de cáncer de mama. 91
II.3 Evaluación del perfil molecular de las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231 y) co-cultivadas con los CAFs. 92
III. Evaluación de las diferencias de expresión de los factores a estudio en el perfil molecular de los CAFs, según la clasificación de los tumores.. 94
III.1 Reclasificación de los tumores según el grado de diferenciación histológico SBR 95
III.2 Reclasificación de los tumores según la afectación del ganglio centinela. 96
IV. Evaluación de las diferencias de expresión de los factores a estudio según la expresión de MMP11 en las CMIs intratumorales 98
IV.1 Diferencias en el perfil molecular de los NAFs..... 99
IV.2 Diferencias en el perfil molecular de lor CAFs. 99
IV.3 Diferencias en el perfil molecular comparativo entre los NAFs y los CAFs asociados. 100
IV.4 Diferencias en el perfil molecular de los CAFs co-cultivados con líneas celulares de cáncer de mama. 102
IV.5 Diferencias en el perfil molecular de las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7) co-cultivadas con los CAFs. 109
V. Análisis de la expresión proteica de los factores más diferencialmente expresados entre las poblaciones de tumores 113
VI. Análisis de la influencia de los cultivos de CAFs en la capacidad invasiva de las líneas celulares de cáncer de mama 116
Discusión 118
I. Importancia de los factores analizados 119
II. Comparación de los factores entre NAFs y CAFs 119
III. Evaluación del perfil molecular de los CAFs cocultivados con líneas celulares de cáncer de mama con diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231) la población total a estudio. 127

IV. Evaluación del perfil molecular de las líneas celulares de cáncer de mama con diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231) cocultivadas con CAFs en la población total a estudio 134
V. Influencia de varias reclasificaciones de tumores. 147
V.1 Influencia de la reclasificación de los tumores en el perfil molecular de los CAFs y los NAFs. 148
V.2 Influencia de la reclasificación de los tumores en el cambio del perfil molecular de los NAFs o los CAFs. 149
V.3 Influencia de la reclasificación de los tumores sobre el perfil molecular de los CAFs tras el cocultivo de estos con líneas tumorales de cáncer de mama que presentan diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231). 151
V.4 Influencia de la reclasificación de los tumores sobre el perfil molecular de líneas tumorales de cáncer de mama que exhiben diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231) cocultivadas con los CAFs. 154
Conclusiones 159
Bibliografía 162

Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirrubonucléico
ADNc:	ADN complementario
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC:	American Type Culture Collection
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
BRCA1:	Breast Cancer 1
BRCA2:	Breast Cancer 2
CAFs:	Fibroblastos asociados a tumor
CCL2/MCP1:	Proteina quimioatrayente de monocitos 1
CDI:	Carcinoma ductal invasivo
CDIS:	Carcinoma ductal *in situ*
CHEK2:	Cell-cycle-checkpoint kinase 2
CISH:	Hibridación *in situ* cromogénica
CLIS:	Carcinoma lobulillar *in situ*
CMIs:	Células mononucleares inflamatorias
Cp:	Punto de corte o *crossing point*
CSCs:	Células madre tumorales
cTNM:	Clasificación TNM basada en datos clínicos
CXCL12/SDF1:	Factor derivado de células estromales 1
CXCR4:	Receptor de quimiocina tipo 4
DAB:	Tetraclorhidrato de diaminobencidina
DMEM:	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
dNTPs:	Desoxinucleotidos trifosfato

ECM:	Matriz extracelular
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMMPRIN:	Inductor de las metaloproteasas de la matriz extracelular
EMT:	Transición epitelio mesenquimal
FBS:	Suero fetal bovino
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGF2/FGFb:	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
FGFR2-IIIb:	Receptor de FGF7
FISH:	Hibridación *in situ* fluorescente
FSP1:	Proteína específica de fibroblastos/S100A4
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HER2/neu:	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HGF:	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1α:	Factor inducible por hipoxia 1α
HSPG:	Heparin sulfato proteoglicanos
IFN:	Interferon
IGF:	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFIR:	Receptor de IGF
IkB:	Inhibidores de NFκB
IKK:	Complejo de quinasas IkB
IL:	Interleuquina
IR-A:	Receptor de la insulina
KGF/FGF7:	Factor de crecimiento del queratinocito
MMP:	Metaloproteasa de la matriz
Mts1/S100A4:	Metastasin

NAFs:	Fibroblastos normales próximos al tumor
NFκB:	Factor de transcripción nuclear kappa B
NHSBSP:	National Health Service Breast Screening Programme
NIH:	National Institutes of Health
OSNA:	One-step-nucleic acid amplification
PAAF:	Punción aspiración por aguja fina
PAI-1:	Inhibidor del plasminógeno 1
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKC:	Proteína quinasa C
PTEN:	Homólogo de fosfatasa y tensina
PTHrP:	Hormona paratiroidea
pTNM:	Clasificación TNM basada en datos anatomo-patológicos
RE:	Receptores de estrógenos
RP:	Receptores de progesterona
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SBR:	Scarf-Bloom-Richardson
SDHA:	Succinato deshidrogenasa subunidad A
SF/HGF:	Scatter factor
STAT-3:	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TGFβ:	Factor de crecimiento transformante beta
THS:	Terapia hormonal sustitutoria
TIMPs:	Inhibidores tisulares de MMPs
TNF:	Factor de la necrosis tumoral
Tris-HCL:	Trimetilaminometano con ácido clorhídrico

UICC:	Unio Internationalis Contra Cancrum
uPA:	Factor activador de plaquetas tipo uroquinasa
uPAR:	Receptor del factor activador de plaquetas tipo uroquinasa
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR:	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

Introducción

I. Fisiología de la mama

La diferenciación embrionaria de la glándula mamaria es semejante en el hombre y en la mujer, aunque en la glándula mamaria femenina ocurren grandes modificaciones estructurales y funcionales relacionadas con el estado hormonal y la fisiología del sistema reproductor, que la convierten en un órgano complejo. Las variaciones de la estructura histológica de la glándula mamaria se producen durante la pubertad, el ciclo menstrual, el embarazo y la menopausia. La mama de una mujer en edad fértil, no embarazada ni lactante, se denomina mama en reposo y es la que se describirá a continuación.

Del pezón se originan de seis a diez sistemas principales de conductos, cuyas ramificaciones sucesivas llegan hasta el conducto lobulillar terminal, que forma parte de la unidad estructural y funcional de la mama que es el lobulillo. En la mujer adulta, el conducto terminal se ramifica en un grupo arracimado de pequeños acinos para formar un lobulillo. Cada sistema ductal drena a través de una vía excretora independiente o conducto galactóforo (Figura 1).

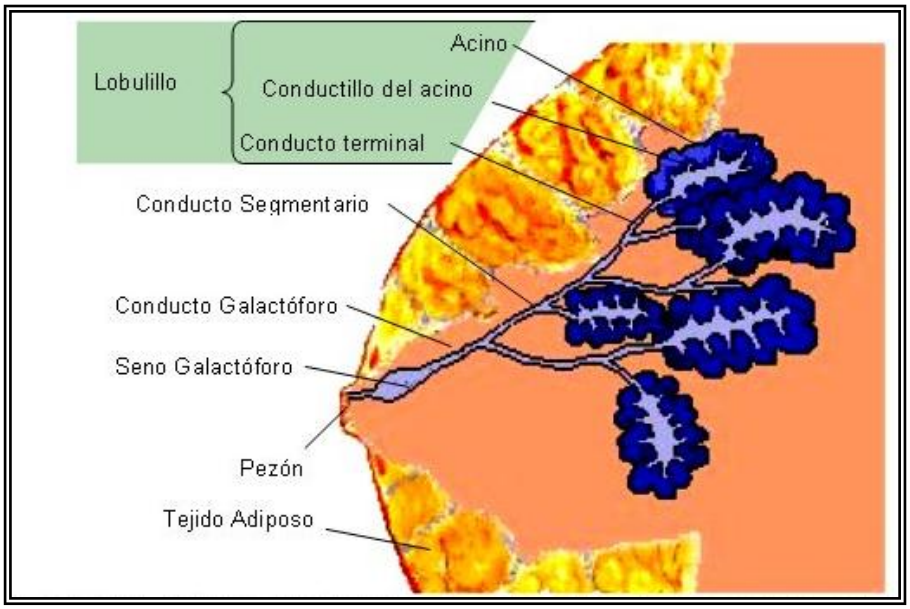

Figura 1. Anatomía del lobulillo y conductos mamarios. (Fuente: *www.mastologia.net)*

El epitelio de los conductos es diferente a cada tramo. La areola, el pezón y las desembocaduras de los conductos galactóforos principales están revestidos de un epitelio

escamoso queratinizante que se transforma súbitamente en un epitelio cúbico de doble capa. La piel aerolar circundante está pigmentada y se sustenta sobre músculo liso.

En la mama normal, los conductos y los lobulillos poseen, por debajo del epitelio de revestimiento, una capa discontinua de células aplanadas contráctiles que contienen miofilamentos: las células mioepiteliales. Dichas células ayudan en la eyección de leche durante la lactancia, y tienen un papel importante en el mantenimiento de la función y estructura normal del lobulillo y de la membrana basal. Las luces de los lobulillos están recubiertas por una segunda capa de células epiteliales (epitelio cúbico simple). Las células luminales del conducto terminal y del lobulillo producen leche, no así las que revisten el sistema de conductos principales.

La mayor parte del estroma mamario está formado por un tejido fibroconjuntivo denso entremezclado con tejido adiposo (estroma interlobulillar). Los lobulillos están rodeados de un estroma fibrovascular denso, delicado que responde a hormonas mamarias específicas y contiene linfocitos dispersos (estroma intralobulillar) (Figura 2) (Cotran, 2010).

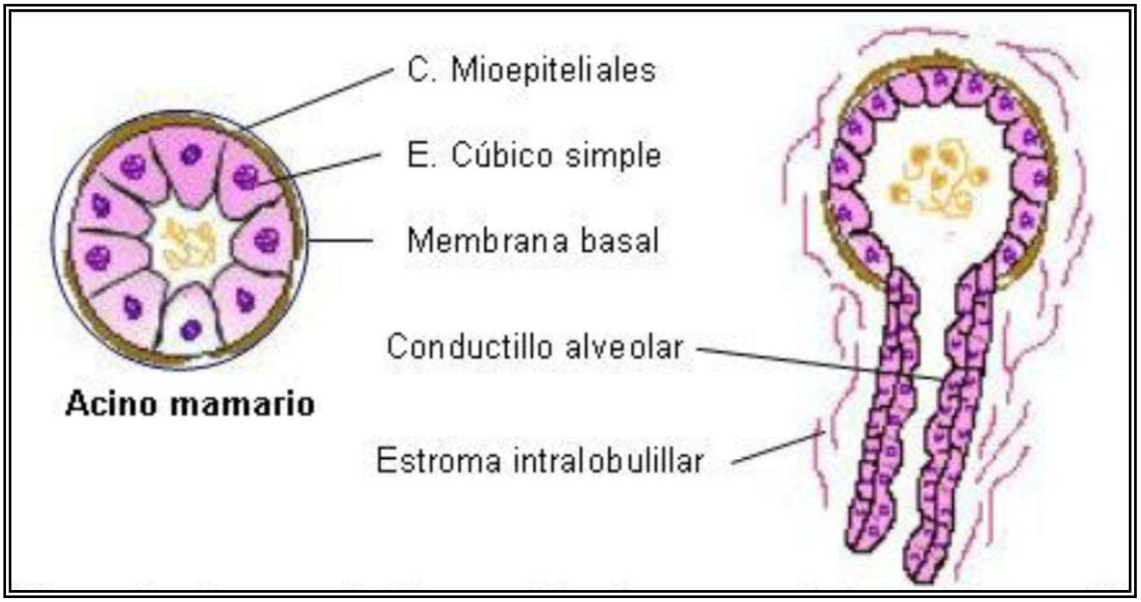

Figura 2. Capas celulares de los lobulillos mamarios. (Fuente: *www.mastologia.net*)

II. Desarrollo del tumor

Existen múltiples factores que pueden inducir la progresión del tejido normal hacia el cáncer de mama. En efecto, la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos lleva a una célula normal a adquirir características cancerosas. Las alteraciones genéticas hacen referencia a cambios en la secuencia de pares de bases del ADN (ácido desoxirrubonucléico) o a la deleción de un gen en su totalidad. Las alteraciones epigenéticas hacen referencia a cambios en la expresión de genes estructuralmente normales, principalmente producidos por metilaciones. Así, la metilación de un gen con función supresora comporta una inhibición de su expresión, resultando en una mayor activación del ciclo celular. Asimismo un déficit en la metilación de un gen activador resulta también en una mayor activación del ciclo celular, por mayor expresión de este gen (Esteller, 2008). Por lo tanto, las alteraciones genéticas y epigenéticas pueden tener las siguientes consecuencias:

- **Activación de oncogenes**, como los factores de crecimiento y sus receptores, y señales de factores reguladores de la transcripción.

- **Inactivación de genes supresores**, como p53, p16, BRCA, PTEN, etc…

- **Alteración de los genes responsables de la estabilidad del genoma**, como los genes reparadores del ADN o genes reguladores de la apoptosis (bcl2, bax…)

Esto confiere a las células tumorales la capacidad de eludir los mecanismos fisiológicos de diferenciación a la vez que generan señales de crecimiento propio y anulan los sistemas de muerte celular programada o apoptosis. Se ha descrito que las células tumorales presentan seis alteraciones esenciales en su fisiología (Figura 3) (Hanahan, et al., 2000):

- **Autosuficiencia en el crecimiento**, las células tumorales pueden generar muchas de sus propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia de la estimulación exógena.

- **Resistencia a estímulos antiproliferativos**, las células tumorales deben eludir las señales antiproliferativas para poder multiplicarse.

- **Invasión de tejidos y metástasis**, esta capacidad permite a las células tumorales escapar de la masa del tumor primario y colonizar nuevos terrenos en el cuerpo, donde los nutrientes y el espacio no son limitantes, al menso inicialmente.

- **Potencial de replicación ilimitado**, el conjunto de las propiedades que afectan al ciclo celular de las células (autosuficiencia en el crecimiento, resistencia a estímulos antiproliferativos y evasión de la apoptosis) permite una desvinculación del programa de crecimiento normal de las células.

- **Estimulación de la angiogénesis**, esta capacidad parece ser adquirida durante el desarrollo del tumor, a través de un cambio en el equilibrio de inductores e inhibidores de la angiogénesis.

- **Evasión de la apoptosis**, las células tumorales pueden adquirir esta capacidad a través de una variedad de estrategias, siendo la más frecuente una mutación en el gen supresor de tumores p53.

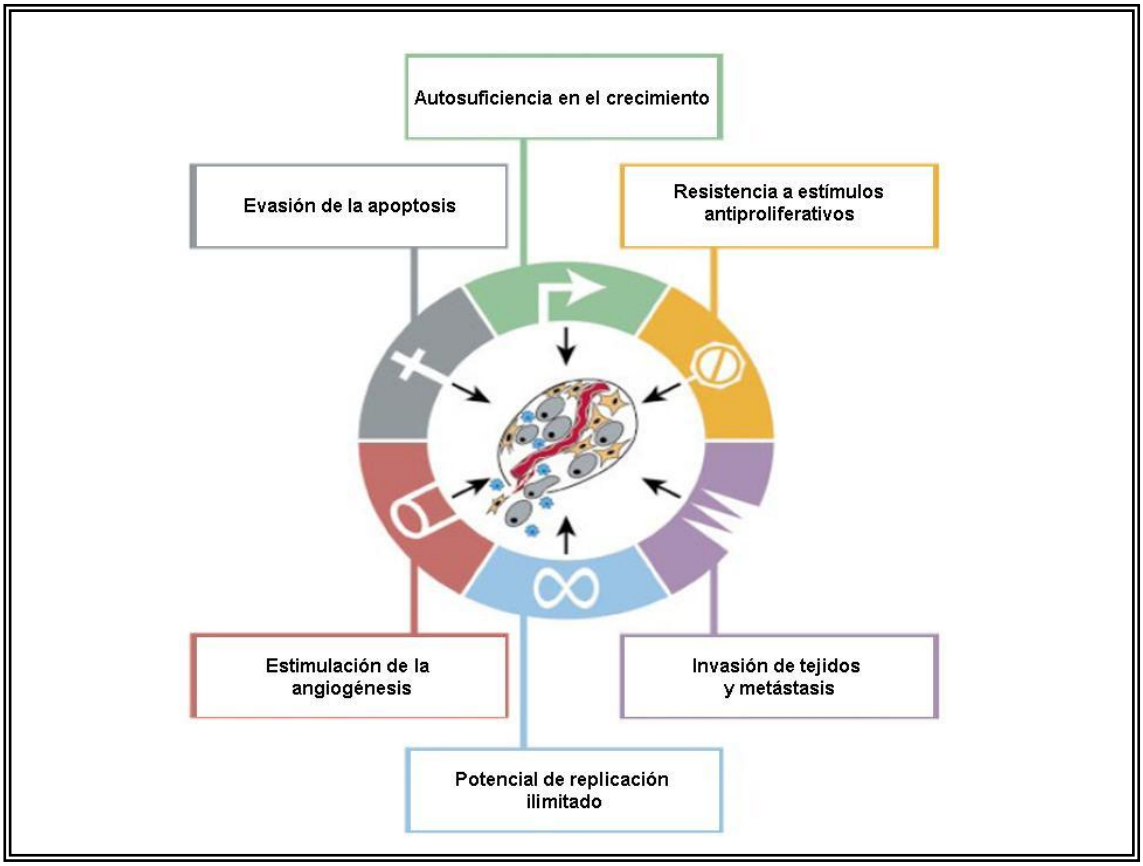

Figura 3. Alteraciones en las células tumorales. (*Fuente: modificada de Hanahan D, 2000*).

Sin embargo, la inestabilidad genómica y la inflamación mediada por las células inmunes atraídas al nicho tumoral son causas subyacentes que fomentan estas funciones distintivas. Además, la reprogramación de la energía metabólica y la evasión de la destrucción por el sistema inmune son dos nuevos conceptos que han sido recientemente añadidos la lista de características de las células tumorales (Figura 4) (Hanahan, et al., 2011).

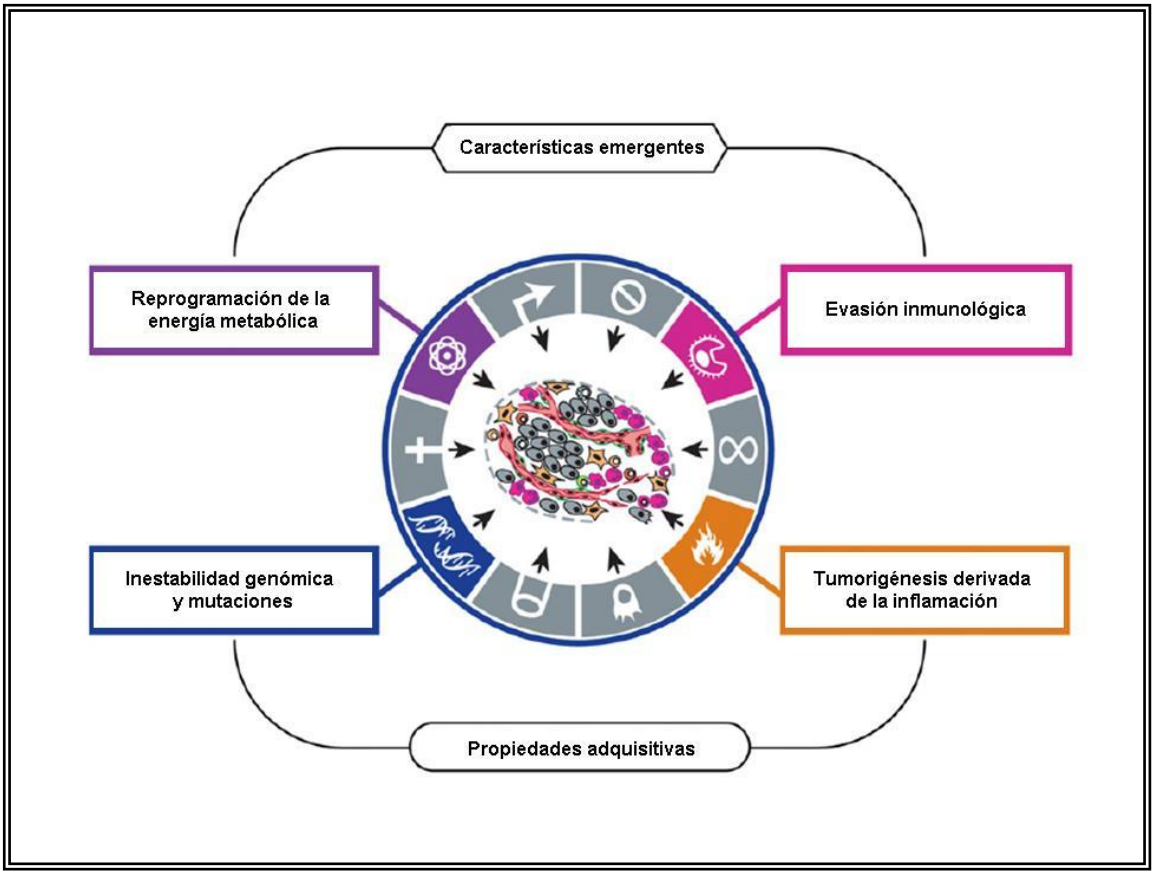

Figura 4. Nuevos conceptos de las características de las células tumorales. (*Fuente: modificada de Hanahan D, 2011*).

Por otra parte, aunque aún no esté plenamente conocido el papel de las células madre tumorales, estas células parecen tener un papel en el desarrollo del tumor. Las células madre tumorales tienen una capacidad de autorrenovación constante, han perdido la capacidad de regulación del crecimiento, pero conservan la capacidad de diferenciación. Así, estas células se convierten en las proveedoras de nuevas células tumorales.

En definitiva, el tejido mamario sufre una acumulación de daños y cambios genéticos y epigenéticos, de manera que progresa a través de diferentes estadíos hasta llegar al cáncer. El modelo aceptado del desarrollo del cáncer de mama describe las fases reversibles de hiperplasia (excesivo crecimiento de células) e hiperplasia atípica (excesivo crecimiento de células anormales); cuando la hiperplasia atípica se convierte en carcinoma *in situ* (limitado a

la estructura que afecta) es probablemente irreversible y, pasado un tiempo la lesión progresa a cáncer infiltrante (invasión de los tejidos circundantes) (Kopans, 1994) (Figura 5). El tiempo que sucede entre un episodio y otro es muy variable, y aún cuando es imposible demostrar que todos los tumores evolucionan de esta manera, se considera que el proceso es evolutivo y que no existe transformación directa desde la célula normal hasta la célula cancerosa.

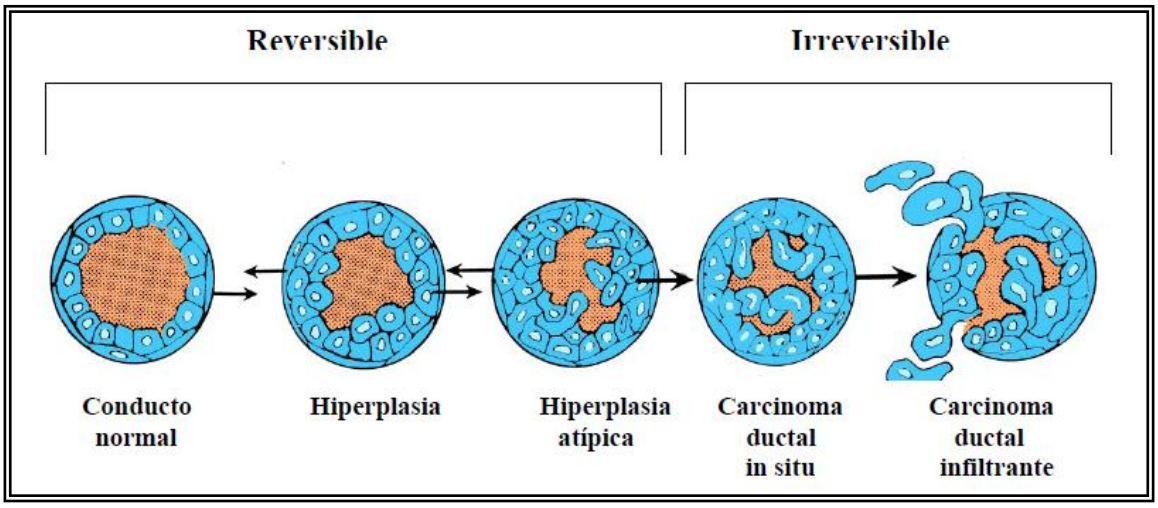

Figura 5. Modelo de crecimiento del cáncer de mama. (*Fuente: Kopans DB, 1994*).

III. Incidencia y mortalidad por cáncer de mama

La estimación a nivel mundial de la incidencia y mortalidad del cáncer realizada por la *International Agency for Research on Cancer* en el año 2008 dentro del proyecto GLOBOCAN, estima que anualmente se diagnostican 1,38 millones de nuevos casos de cáncer de mama en el mundo, siendo la neoplasia más prevalente con 5,2 milllones de supervivientes a los cinco años de diagnóstico. Representa el 23% de todos los cánceres, siendo el segundo más frecuente considerando la totalidad de los tumores en ambos sexos. Es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo, representando 458.503 muertes anuales (14% de muertes por cáncer en la mujer) (Figura 6) (Jemal, et al., 2011).

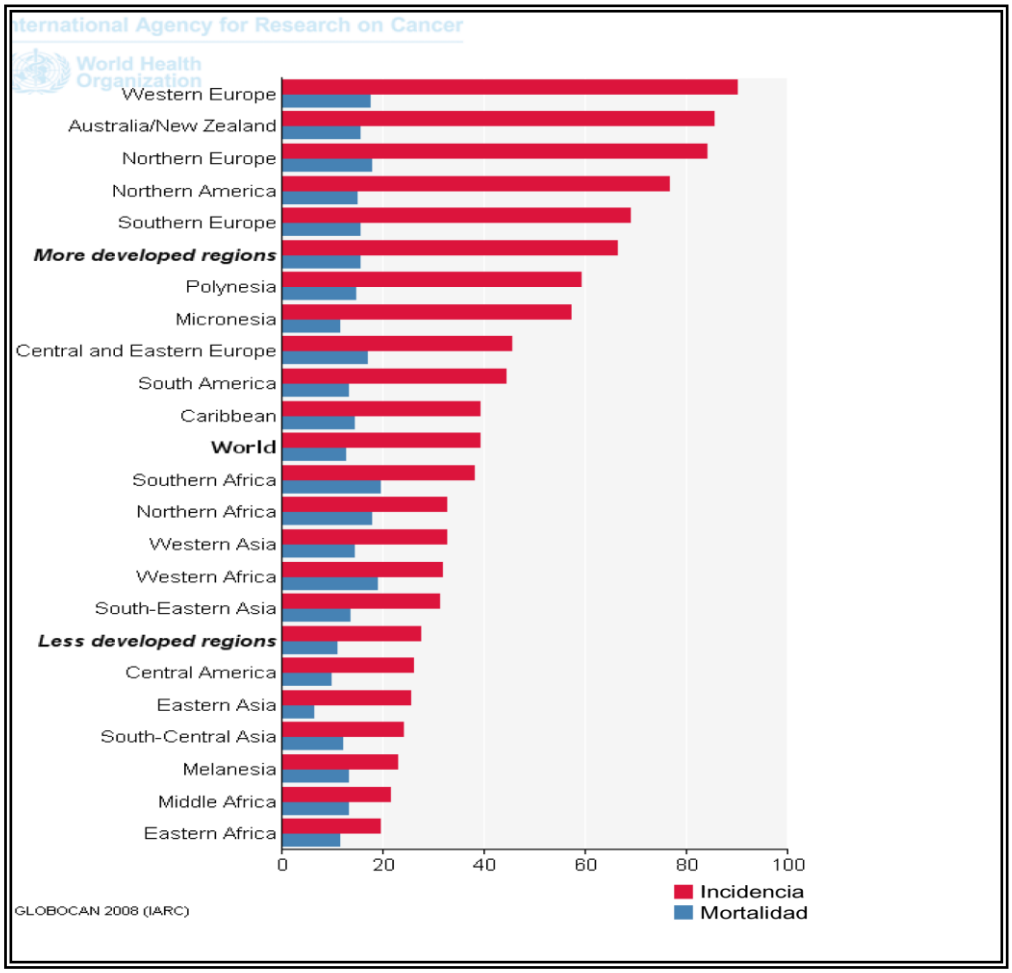

Figura 6. Resumen de la incidencia y mortalidad por cáncer de mama en 2008 (Fuente: *GLOBOCAN 2008*).

En la Unión Europea (UE), el estudio GLOBOCAN estimó 332.670 nuevos casos en 2008, lo que suponía 77,1 casos de cáncer de mama por cada 100.000 habitantes, y 89.801 fallecimientos, con 16,6 muertes por cáncer de mama por cada 100.000 habitantes.

En España, los datos del instituto nacional de estadística muestran que de los 382.047 fallecimientos acaecidos en el 2010, el 48,1% fueron mujeres, siendo las tres causas principales de mortalidad las enfermedades del sistema circulatorio (31,2% del total), seguidas por cáncer (28,1%) y por las enfermedades del sistema respiratorio (10,5%). La SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) realizó un estudio de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de neoplasias malignas en España, en el cual se estima que en el 2015 la incidencia global prevista

de cáncer en mujeres españolas sea de 85.108 casos, siendo el cáncer de mama el tumor con mayor número de nuevos casos diagnosticados (21.262 casos). En Asturias, el cáncer de mama es el tumor más frecuente en mujeres, representando el 24,5% de todos los cánceres incidentes y la primera causa de muerte por tumores, con una tasa de 36,3 por diez mil.

Debido a los programas de detección temprana y a los avances en los tratamientos, el número de mujeres que sobrevive al cáncer de mama ha aumentado significativamente en los últimos años, y de hecho, la supervivencia a los cinco años ha llegado hasta el 89% (Jemal, et al., 2011; Kim J. M., et al., 2013). Aunque estos avances han permitido reducir la mortalidad, hay todavía muchas carencias terapéuticas que resultan en recurrencia, metástasis y muerte. Así, la mayoría de las complicaciones asociadas al cáncer de mama son debidas a la metástasis del tumor primario, principalmente a través de la diseminación hematógena a órganos distantes como hueso, riñón, pulmón y cerebro (Weigelt, et al., 2005).

IV. Factores de riesgo

Un factor de riesgo es todo aquello que aumenta la probabilidad de desarrollar una enfermedad, como por ejemplo el cáncer. Los factores de riesgo más contrastados en el caso del cáncer de mama son los siguientes:

Edad: La incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, momento donde la incidencia disminuye hasta seis veces (Figura 7) (Han W., et al., 2004). Además, los tumores diagnosticados en mujeres menores de 35 años suelen ser más proliferativos y por tanto tienen peor pronóstico, tanto en lo que se refiere a tiempo libre de enfermedad como a supervivencia global (Bonnier, et al., 1995; Park B. W., et al., 2002).

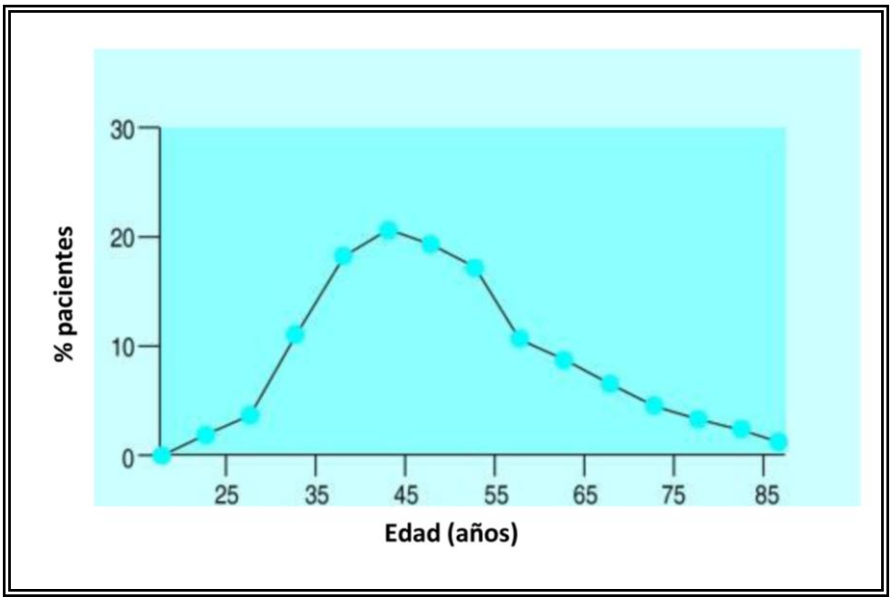

Figura 7. Porcentaje de muertes en mujeres atribuidas al cáncer de mama, según la edad. (Fuente: *Breast cáncer-epidemology, risk factors and genetics, 2000).*

Edad de menarquia y menopausia: Las mujeres que comienzan a menstruar a una edad temprana o que tienen la menopausia tardía tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer de mama. Así, un retraso de dos años en la edad de menarquía reduce un 10% el riesgo de desarrollar esta neoplasia, siendo éste un 17% mayor en mujeres que han tardado cinco años más en alcanzar la menopausia (Hsieh, et al., 1990).

Edad del primer embarazo: La nuliparidad o un primer parto a edad avanzada, aumentan la incidencia de cáncer de mama. El riesgo de cáncer de mama en las mujeres que tienen su primer hijo después de los 30 años es aproximadamente el doble que en las mujeres que tienen su primer hijo antes de los 20 años. El grupo de mayor riesgo son aquellas que tienen el primer parto después de la edad de 35, estas mujeres parecen tener un riesgo aún mayor que las mujeres nulíparas (McPherson, et al., 2000).

Historia en familiares de primer grado: La historia familiar es un factor de riesgo que depende del número de familiares afectos, de la edad de diagnóstico de los familiares, así como del grado de parentesco. El riesgo de una mujer de padecer cáncer de mama es de dos o más veces mayor si tiene un familiar de primer grado (madre, hermana o hija) que desarrollaron la enfermedad antes de los 50 años, y cuanto más joven lo haya desarrollado mayor riesgo

existe. Por ejemplo, una mujer cuya hermana desarrolló cáncer de mama con 30-39 años tiene un riesgo acumulado del 10% de desarrollar la enfermedad a los 65 años, pero el riesgo es sólo del 5% si la hermana tenía entre 50-54 años al momento del diagnóstico. El riesgo aumenta entre cuatro y seis veces si dos familiares de primer grado han desarrollado la enfermedad. Por ejemplo, una mujer con dos familiares afectados, uno menor de 50 años al momento del diagnóstico, tiene un 25% de probabilidad de desarrollar cáncer de mama a la edad de 65 años (McPherson, et al., 2000; Ottman, et al., 1983).

Mutaciones BRCA-1, BRCA-2 y Li-Fraumeni: Las mutaciones de los genes *BRCA1* o *BRCA2* (Breast Cancer -1 y -2), los cuales se encuentran en los cromosomas 17 y 13, respectivamente, se asocian con mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama u ovario. Ciertas mutaciones se producen en alta frecuencia en poblaciones definidas. Por ejemplo, un 2% de las mujeres judías Ashkenazi (descendientes de la población judía de Europa central y oriental) tienen deleciones o inserciones en BRCA1, mientras que en Islandia una deleción específica de BRCA2 representa aproximadamente la mitad de todos los cánceres de mama familiar.

Las mutaciones heredadas en otros dos genes, p53 y PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina), están asociadas a los síndromes familiares de LiFraumeni y de Cowden respectivamente, que presentan un alto riesgo de cáncer de mama, pero son poco frecuentes. Este riesgo está asociado con un deterioro de la capacidad de reparación del ADN a nivel de todos los tejidos, no tratándose por tanto de síndromes específicos de cáncer de mama (Ford, et al., 1994; Chen S., et al., 2007; Easton, et al., 1997; Struewing, et al., 1997). 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).

Factores hormonales: Los estudios epidemiológicos a gran escala sugieren que a mayor tiempo de exposición a estrógenos, mayor riesgo de 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). Entre las mujeres que usan terapia hormonal sustitutoria (THS) y las que han cesado su uso de uno a cuatro años antes, el riesgo relativo de padecer cáncer de mama aumenta por un factor de 1,023 por cada año de uso. Este incremento es consistente con el efecto de un retraso en la menopausia, debido a que el riesgo relativo de cáncer de mama aumenta por un factor de 1,028 por cada año en tardar más en alcanzar la menopausia. El riesgo de cáncer de mama parece ser mayor con el uso combinado de estrógenos y progesterona (McPherson, et al., 2000). De hecho, varios factores de riesgo como la edad avanzada, la edad menarquía y menopausia, la nuliparidad, un primer parto a edad avanzada o el uso de THS, todo ellos pueden tener como origen común el tiempo de exposición a estrógenos.

Enfermedades benignas previas en la mama: existen dos tipos de enfermedades benignas de la mama: no proliferativas y proliferativas. En el primer caso, no hay una asociación con el incremento de la incidencia de cáncer de mama, mientras que en las segundas sí. Si en una biopsia de enfermedad proliferativa no se observan atipias histológicas, el riesgo de cáncer está aumentado 1,5-2 veces, mientras que si se observa una hiperplasia con atipia, el riesgo relativo es cinco veces mayor, siendo hasta nueve veces mayor si la paciente tiene además historia familiar de primer grado (Dupont, et al., 1985).

Radiación: Se observó una duplicación del riesgo de cáncer de mama entre los adolescentes expuestos a radiación durante la Segunda Guerra Mundial. Las radiaciones ionizantes también aumentan el riesgo a lo largo de la vida, particularmente cuando la exposición es durante la formación de la mama (McPherson, et al., 2000). En un estudio realizado por *Gervais-Fagnou y col.* (1999) (Gervais-Fagnou, et al., 1999), se mostró que años después de realizar un tratamiento de la enfermedad de Hodking con radiación supradiafragmática, el riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama era 10,6 veces mayor que en mujeres sin el tratamiento.

Variación geográfica: la incidencia ajustada por edad y la mortalidad por cáncer de mama varía entre los países. La diferencia entre entre los países del Lejano Oriente y Occidente está disminuyendo, aunque el riesgo sigue siendo de hasta cinco veces mayor en los países occidentales. Los estudios de migración, demuestran que en los emigrantes, las tasas de cáncer de mama asumen la tasa del país anfitrión en una o dos generaciones, lo que indica que los factores ambientales son de mayor importancia que los genéticos (McPherson, et al., 2000).

Estilo de vida:

- Obesidad: La obesidad está asociada con un riesgo dos veces mayor de desarrollar cáncer de mama en las mujeres posmenopáusicas, mientras que contrariamente, en mujeres premenopáusicas se asocia con una incidencia reducida (McPherson, et al., 2000).

- Ingesta de alcohol: existe un incremento del 7,1% en el riesgo relativo de cáncer de mama por cada 10 gramos de alcohol ingeridos al día (Hamajima, et al., 2002), dicho riesgo parece disminuir si se acompaña de una ingesta de ácido fólico, ya que un bajo consumo de vitamina B disminuye la capacidad de reparación de ADN (Sellers, et al., 2001).

- Tabaco: La asociación entre el tabaquismo y el cáncer de mama es controvertida, aunque existen numerosos estudios que muestran una relación entre el tabaco y un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Luo, et al., 2011; Olson, et al., 2005; Boffetta, et al., 2011; Xue, et al., 2011).

- Dieta: hay evidencias de que un bajo consumo de frutas y vegetales, los cuales son alimentos ricos en vitaminas y provitaminas antioxidantes, puede influir en los estadios tumorales de iniciación, promoción y progresión (Danaei, et al., 2005; Landa,

et al., 1994). Estos nutrientes parecen estar involucrados en la modulación del estado de reducción-oxidación, de tal forma que un desequilibrio entre esos dos procesos provoca una gran acumulación de radicales libres que pueden dañar el material genético y otras estructuras celulares (Li Y., et al., 2009; Weisburger, 2002).

V. Factores pronósticos y predictivos

V.1 Concepto de factores pronósticos y predictivos de respuesta

Un factor pronóstico es aquel que aporta información sobre la evolución clínica de la enfermedad en el momento del diagnóstico, independientemente del tratamiento aplicado. En oncología, suelen ser variables relacionadas con el crecimiento, la invasión tumoral o el potencial metastático del tumor. Un buen factor pronóstico ha de cumplir, según la conferencia consenso del *National Institutes of Health* (NIH, 1991), una serie de mínimos como son: (I) aportar un valor predictivo independiente y significativo validado en la clínica; (II) que su determinación sea factible, reproducible y disponible de manera más o menos generalizada con un adecuado control de calidad; (III) que los resultados de su determinación sean interpretables por el clínico y tengan trascendencia terapéutica, y (IV) que la medida del marcador no emplee tejido necesario para la realización de otros estudios, principalmente la caracterización histológica.

Un factor predictivo aporta información relacionada con la probabilidad de respuesta a un tratamiento determinado y son variables relacionadas en distinta medida con las dianas de los tratamientos. Algunos factores, como la expresión del oncogen HER2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), 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).

Parece haber un claro acuerdo en que la afectación ganglionar, el tamaño del tumor y el grado histológico son factores pronósticos clásicos que permiten diferenciar categorías de riesgo en el cáncer (Goldhirsch, et al., 2009).

V.2 Tamaño tumoral

El tamaño macroscópico (diámetro máximo que se obtiene de la medición del tumor en al menos dos dimensiones) se considera el factor pronóstico más importante tras la afectación ganglionar, y es un factor predictivo de la presencia de metástasis axilares, tasas de recidiva y supervivencia, incluso dentro del grupo de tumores de menor tamaño (Figura 8) (Carter, et al., 1989; Rosen, et al., 1990).

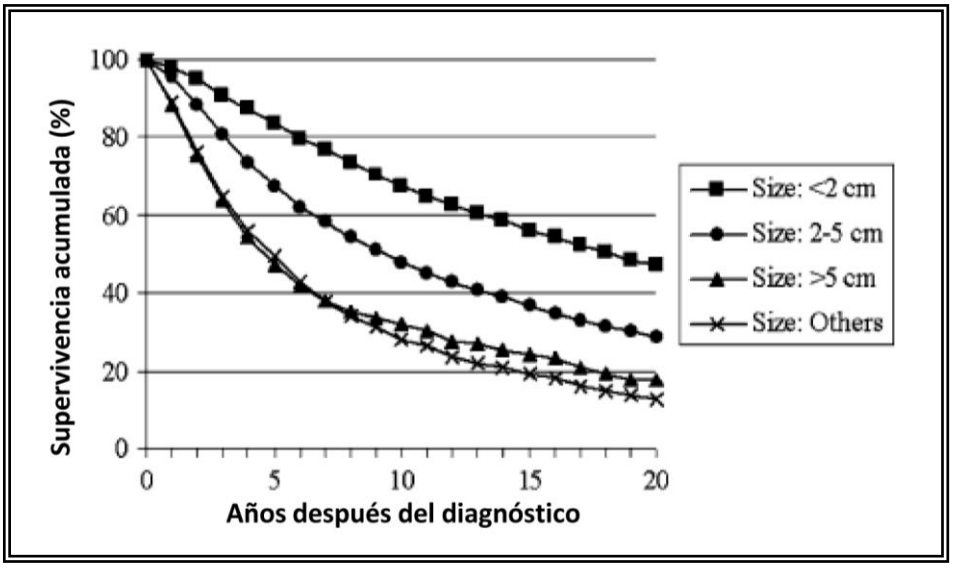

Figura 8. Supervivencia acumulada en función del tamaño tumoral en muestras de carcinoma mamario (Fuente: *An overview of prognostic factors for long - term survivors of breast cancer . 2008*).

V.3 Afectación ganglionar

La afectación ganglionar es el factor pronóstico aislado más significativo en el cáncer de mama, especialmente en los estadios precoces. 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% (Figura 9) (Lonning, et al., 2007).

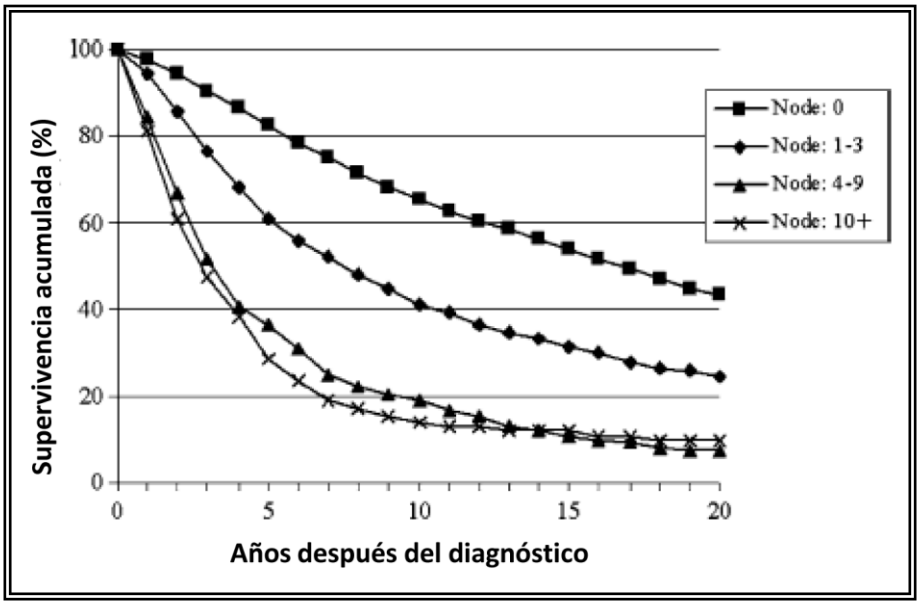

Figura 9. Supervivencia en función de número de ganglios afectos en muestras de carcinoma mamario (Fuente: *An overview of prognostic factors for long - term survivors ofbreast cancer. 2008*).

La técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela, mediante la cual se detecta y extirpa el primer ganglio de la axila que recibe la linfa de la mama, permite realizar estudios anatomopatológicos cada vez más precisos. El concepto de biopsia del ganglio centinela se basa en dos principios básicos: la existencia de un patrón ordenado y predecible de drenaje linfático a una cadena de ganglios linfáticos regionales, y el funcionamiento de un primer ganglio linfático como un filtro efectivo para las células tumorales. Los métodos actuales para evaluar la afectación del ganglio centinela durante la cirugía emplean secciones congeladas, citología por impronta o raspado, inmunocitoquímica rápida o combinaciones de los mismos, así como nuevas técnicas moleculares como el OSNA (One-step-nucleic acid amplification). La supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de estas pacientes depende de la afectación ganglionar metastásica y del número de ganglios afectos (Bocker, 2002; Mansel, et al., 2006); por ello, el estudio del GC debe ser meticuloso.

En el caso de que el ganglio linfático centinela sea positivo, se completa la disección de los ganglios linfáticos axilares debido a la posibilidad de que estos estén afectados por el tumor. Sin embargo, entre un 50 y un 68% de las pacientes el ganglio centinela es el único ganglio de la axila afectado por células tumorales (Domenech, et al., 2009; Hung, et al., 2005).

Nuestro grupo de investigación ha establecido una correlación positiva y significativa entre la expresión global de metaloproteasa 1 (MMP1) en el ganglio centinela positivo, y la afectación de los ganglios no centinela; de manera que, en ninguno de los casos de ganglio centinela con expresión negativa de MMP1 en las células mononucleares inflamatorias presentaba ganglios no centinela afectados; mientras que todos los casos de ganglios no centinela afectados mostraron una expresión positiva de MMP1 por las CMIs (células mononucleares inflamatorias) del ganglio centinela. La sensibilidad de la expresión de MMP1 por las CMIs de los ganglios centinela positivos es del 100%, con un valor predictivo negativo del 100% y una especificidad del 61,5% para predecir la afectación de los ganglios linfáticos axilares no centinela (Eiro, et al., 2013b).

V.4 Grado histológico

En la última década, el método de estadificación llamado “grado de diferenciación histológico de Scarf-Bloom-Richardson” o grado SBR (Simpson, et al., 1994) ha sido ampliamente aceptado como un potente indicador pronóstico en cáncer de mama. Consta de los siguientes parámetros:

- el grado de formación de túbulos,
- la regularidad en el tamaño, la forma y el carácter de tinción del núcleo,
- y la actividad mitótica.

El sistema de Nottingham (modificación del sistema de SBR realizada por Elston-Ellis (Fein, et al., 1997; Fitzgibbons, et al., 2000; Pinder, et al., 1994) ha sido aceptado como el más reproducible entre observadores, y adoptado por los programas de *screening* del cáncer de mama del NHSBSP (*National Health Service Breast Screening Programme*) en Inglaterra, así como por la "Association of Director of Anatomic and Surgical Pathology " de EEUU. Esta modificación proporciona un criterio más objetivo de los tres componentes de la gradación, y específicamente del contaje de mitosis.

En general, a cada uno de los parámetros se le asigna un valor comprendido entre el uno y el tres (siguiendo los criterios descritos a continuación) y la suma del valor de los tres componentes sería el grado (Bloom, et al., 1957; Elston, 1984; Elston, et al., 1991; Scarff, 1968).

- Formación de túbulos:
  - > 75% del tumor constituido por túbulos 1
  - 10-75% del tumor constituido por túbulos 2
  - < 10% del tumor constituido por túbulos 3
- Pleomorfismo nuclear:
  - núcleos pequeños y uniformes 1
  - moderada variabilidad en forma y tamaño 2
  - marcado aumento de tamaño y variabilidad 3
- Índice mitótico :
  - 0-9 mitosis/10 hpf 1
  - 10-19 mitosis/10 hpf 2
  - 20 ó > mitosis/ 10 hpf 3

Elston y Ellis han fijado como consenso el contaje mitótico por 10 campos de gran aumento, preferiblemente en las zonas peor diferenciadas, de la periferia del tumor, como el método estándar para la valoración de las mitosis (Fein, et al., 1997). La calificación total alcanzada puede variar de tres a nueve. Una calificación de tres a cinco etiqueta a los carcinomas como un tumor de grado I (bien diferenciado), seis o siete como grado II (moderadamente diferenciado), y ocho o nueve como grado III (poco diferenciado).

V.5 Sistema TNM

El sistema de clasificación TNM es el método de estadiaje de neoplasias, desarrollado por la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) en colaboración con la UICC (*Unio Internationalis Contra Cancrum*), basado en la extensión del tumor primario (T), la presencia o ausencia del tumor en los ganglios regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis distantes (M). Desde su primera edición en 1954, se ha actualizado en diferentes ocasiones para el cáncer de mama, hasta la actual séptima edición, publicada en 2010 (Edge SB B.D., 2010). Dicha clasificación incluye un estadiaje basado en datos clínicos (cTNM) y patológicos (pTNM).

Tumor Primario (T)	
TX	El tumor primario no se puede evaluar.
T0	No evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma *in situ*.
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal *in situ*.
Tis (LCIS)	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.**

* La invasión de la dermis sólo no clasifica al tumor como T4.

** La definición de Carcinoma Inflamatorio es fundamentalmente clínica. Implica la presencia de eritema y edema (piel de naranja) difuso de la mama asociado o no a una masa palpable subyacente. Estos cambios deben afectar a la mayor parte de la piel de la mama (la presencia de estos cambios asociados de forma limitada a un tumor localmente avanzado no implica el diagnóstico de carcinoma inflamatorio). La presencia de linfáticos dérmicos infiltrados sin los cambios clínicos descritos no implica por si solo el diagnóstico de carcinoma inflamatorio.

La detección clínica de los ganglios es realizada por estudios de imagen (excluyendo la linfogammagrafía) o por exploración física con características de alta sospecha o posible macrometástasis basado en la punción aspiración por aguja fina (PAAF).

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 sí 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.

La clasificación pN está basada en la disección axilar con o sin estudio del ganglio centinela y se usa en conjunción con una valoración patológica de la T.

Ganglios linfáticos regionales (pN)	
pNX	Cuando no son evaluables (no extirpados o por cirugía previa).
pN0	No afectación histológica, sin estudios adicionales para células tumorales aisladas.
pN0(i-)	No afectación ganglionar histológica, hematoxilina e inmunohistoquímica negativas.
pN0(i+)	Presencia de células tumorales aisladas por hematoxilina o inmunohistoquímica, ninguna agrupación> 0.2 mm.
pN0(mol-)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular negativo (RT-PCR).
pN0(mol+)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular positivo (RT-PCR).
pN1mi	Micrometástasis (> 0.2 mm, < 2.0 mm).
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y/o en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos.
pN1b	Metástasis en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos, o afectación clínicamente aparente de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar.
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos (al menos un depósito tumoral > 2.0 mm).
pN2b	Metástasis clínicamente aparente en ganglios de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar.
pN3	Metástasis en > 10 ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas clínicamente negativas de la mamaria interna; o en ganglios supraclaviculares ipsitaleterales.
pN3a	Metástasis en más de 10 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral > 2,0mm), o metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares.

pN3b	Metástasis en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas de la mamaria interna detectadas por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparentes.
pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsitaleterales.

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.

V.6 Estadío tumoral

Las diversas combinaciones de las subcategorías de T, N, y M definen los siguientes cuatro estadíos designados como I, II, III, y IV en orden ascendente de gravedad (Tabla 1).

Estadío	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

Tabla 1. Definición del estadío tumoral en función del TNM.

V.7 Tipos histológicos

La clasificación histológica de los tumores malignos nos permite obtener una información imprescindible para el diagnóstico de la lesión, ayudando a determinar el pronóstico de la paciente y consiguiendo un mayor conocimiento de la evolución natural de la enfermedad. Se pueden agrupas en carcinomas invasivos o no invasivos:

CARCINOMAS NO INVASIVOS (*in situ*)

Se caracterizan por un crecimiento de las células tumorales limitado a los conductos y los lobulillos, sin llegar a invadir las estructuras adyacentes. Se pueden clasificar en ductal o

lobulillar en función de las características citológicas y el patrón de crecimiento que presente la muestra.

Carcinoma intraductal (o carcinoma ductal *in situ*, CDIS). Afección no invasiva en la que se encuentran células anormales en el revestimiento de un conducto de la mama. El CDIS representa aproximadamente del 10-15% de todas las neoplasias y constituye entre un 20-30% de las lesiones detectadas mamográficamente. El CDIS se ha dividido en cinco suptipos: comedocarcinoma, sólido, cribirforme, papilar y micropapilar. El comedocarcinoma se caracteriza por núcleos grandes, presencia de numerosas mitosis y necrosis central. Los otros subtipos en cambio, se caracterizan por presencia de núcleos monomórficos, pocas o ninguna mitosis y la ausencia de necrosis (Cotran, 2010).

Dentro de CDIS también se encuentra la enfermedad de Paget del pezón, la cual es una rara manifestación del cáncer de mama (1 al 2% de los casos) y se debe a la extensión de la neoplasia hasta el pezón. El pronóstico depende de la extensión del carcinoma subyacente.

Se ha observado desde hace ya algún tiempo que algunos casos de CDIS evolucionan a cáncer invasivo (Cotran, 2010), indicando la importancia de un diagnóstico y tratamiento adecuado para esta patología.

La mastectomía como tratamiento para el CDIS es curativa en más del 95% de los casos. La rara recidiva y/o muerte normalmente son debidas a un CDIS residual en conductos del tejido adiposo subcutáneo no extirpados durante la intervención o focos ocultos de invasión que no se detectaron al hacer el diagnóstico (Cotran, 2010).

Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS). Este término describe una patología caracterizada por una proliferación sólida de células pequeñas dentro de los lobulillos de la mama (y de forma ocasional en los conductos). Este tipo de carcinoma siempre es un hallazgo casual en las biopsias realizadas por otra causa, por lo que es bastante infrecuente (1-6% de todos los carcinomas). El CLIS es bilateral y generalmente se localiza en múltiples áreas de la mama, es decir, es multicéntrico. El CLIS es más común en mujeres jóvenes, y del 80 al 90% de los casos

se producen antes de la menopausia. Por sus características y su similitud con el carcinoma lobulillar, se ha sugerido que el CLIS no es una neoplasia real sino un marcador de riesgo de cáncer de mama. Las mujeres con CLIS desarrollan carcinomas invasivos con una frecuencia similar a la de las mujeres con CDIS no tratado.

CARCINOMAS INVASIVOS

La mayoría de estos tumores parecen tener origen en la sección terminal de los conductos, independientemente de su tipo histológico, Se dividen en siete grupos.

Carcinoma ductal infiltrante. Es el tipo histológico más común, ya que supone el 70-80% de los tumores infiltrantes de la mama. Este tipo de carcinoma no posee características histológicas típicas. A la palpación, se caracterizan por el hallazgo de un nódulo duro y habitualmente metastatizan en la axila lo que implica un peor pronóstico en comparación con otros tipos histológicos.

Carcinoma lobulillar infiltrante. Es un tumor relativamente infrecuente (5-10% de los carcinomas de mama), bilateral y multicéntrico. La principal característica histológica de los carcinomas lobulillares es el patrón de células infiltrantes en hilera, con frecuencia de sólo una célula de anchura (“fila india”); existen variantes como el “anillo de sello” de peor pronóstico que el patrón clásico. Además, los carcinomas lobulillares tienen un patrón metastásico diferente en comparación con otros cánceres de mama.

Carcinoma medular. Este tumor se caracteriza por células grandes con núcleos pleomórficos y frecuentes mitosis, una gran infiltración linfoidea y un borde de crecimiento expansivo (no infiltrante). Todos los carcinomas medulares están mal diferenciados. El CDIS es mínimo o no existe. Nunca se halla una invasión linfática o vascular.

Carcinoma mucinoso (coloide). Es un tipo infrecuente (1-6% de todos los carcinomas de mama). Es de crecimiento lento y puede alcanzar tamaños grandes diagnosticándose fundamentalmente en mujeres mayores. Son crepitantes a la palpación y están formados por

una masa mucinosa separada por tabiques. Cuando el tumor es predominantemente mucinoso, puede tener un buen pronóstico (Mansour, et al., 1989).

Carcinoma tubular. Representaban sólo el 2% de todos los carcinomas de mama antes del cribado con mamografía, aunque su frecuencia ha aumentado y representan hasta el 10% de los carcinomas de menos de 1 cm de diámetro. Se detectan mediante mamografías, las células presentan baja actividad mitótica y moderada atipia.

Carcinoma metaplásico. Incluye una amplia variedad de tipos raros de cáncer de mama (<1% de todos los casos). Dada la heterogeneidad de los tipos tumorales y su rareza, el cuadro clínico y el pronóstico no han sido aún descritos en detalle.

Carcinoma inflamatorio de seno. Es un cáncer poco común, Representa aproximadamente del uno al tres por ciento de todos los cánceres de seno. En este tipo de tumor, las células cancerosas obstruyen los vasos linfáticos de la piel del seno, lo que conlleva la aparición de edema, eritema y aumento de temperatura local (conocido como “piel de naranja”) que puede llegar a afectar a la totalidad de la glándula. El cáncer inflamatorio de seno progresa con rapidez, usualmente en sólo semanas o meses, presentándose en el estadío III o en el estadío IV al momento del diagnóstico, lo que depende de que el cáncer se haya extendido sólo a los ganglios linfáticos cercanos o a otros tejidos también (Dushkin, et al., 2011); (Díaz, 1990).

V.8 Invasión vascular linfática

La invasión de vasos linfáticos que rodean a un carcinoma ductal infiltrante, es un método reproducible, con una concordancia inter-observador del 85%, que se correlaciona estrechamente con la afectación de los ganglios linfáticos loco-regionales y, por lo tanto, proporciona información pronóstica del estadio ganglionar (SJ., 1997). Otra aplicación importante de la afectación vascular linfática en el carcinoma infiltrante de mama es que resulta un potente predictor de recurrencia local tras el tratamiento quirúrgico conservador y tras la mastectomía (Fitzgibbons, et al., 2000).

V.9 Invasión vascular venosa

La diseminación tumoral a distancia puede realizarse por vía hematógena, afectando principalmente a pulmones, hígado y hueso. Nuevos marcadores específicos del endotelio, como D2-40, hacen que sea posible distinguir entre la invasión vascular venosa y la invasión vascular linfática. Aunque se siga determinando, la presencia de invasión vascular venosa perdió significación estadística en un estudio al compararse con la invasión vascular linfática (Van den Eynden, et al., 2006).

VI. Factores pronósticos biológicos y moleculares

VI.1 Receptores hormonales

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. El 70%-80% de carcinomas muestra positividad para RE, siendo negativos en los carcinomas apocrinos, medulares, metaplásicos y en más del 90% de los carcinomas poco diferenciados. Se considera que la presencia conjunta de RE y RP en un mismo tumor, aumenta la probabilidad de respuesta a la hormonoterapia, desde un 55% en pacientes con única expresión del RE, a un 75-80% en los casos de expresión de ambos receptores (Wittliff, 1984). La ausencia de receptores hormonales se ha asociado a mayor tasa de recurrencias, menor supervivencia global, mayor riesgo de diseminación a distancia y metástasis cerebrales, en un grupo de enfermas sin afectación ganglionar (Arens, et al., 2005).

VI.2 HER2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)

La sobreexpresión del receptor de membrana HER-2/neu, se detecta entre el 15% y el 30% de los carcinomas de mama. El método de detección es inmunohistoquímico (IHQ) y semicuantitativo, obteniéndose una gradación que va del uno al tres, si bien se puede determinar también por técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (Fisher, et al., 2000), o su equivalente CISH (hibridación *in situ* cromogénica).

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, resistencia a la homonoterapia, 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 (Figura 10) (Dandachi, et al., 2004; Viani, et al., 2007).

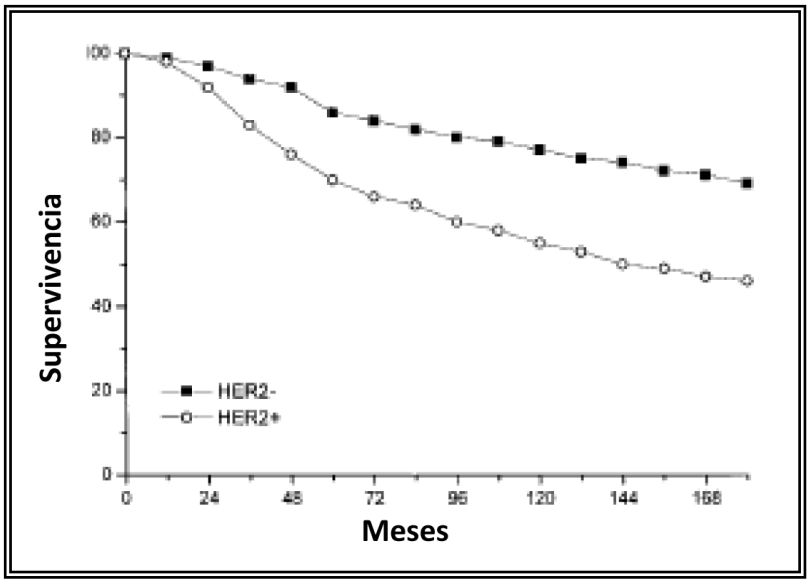

Figura 10. Supervivencia en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo o negativo (Fuente: *HER2 positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors. 2002*)

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 (Osborne, et al., 2005; Shou, et al., 2004).

VI.3 ki-67

El antígeno Ki-67, identificado por Gerdes y cols., en 1991, fue descrito como una proteína nuclear de tipo no histona. La localización de la proteína Ki-67 es variable y heterogénea durante las diferentes fases del ciclo celular, y así 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, pero 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, que desaparece en la anafase y la telofase. Su medición puede realizarse por IHQ con el anticuerpo monoclonal MIB-1. Se considera que un tumor tiene 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 como la proporción de células en la fase S del ciclo celular (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 es un factor predictivo de respuesta a tratamiento hormonal adyuvante (Viale, et al., 2008).

VI.4 p53

El gen TP53 o supresor tumoral 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, esta proteína interviene en el control del ciclo celular en el paso de 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, y se encuentra hasta en un 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; Osborne, et al., 2005); 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).

VI.5 BCL-2 (linfoma de células B2)

El gen bcl-2 codifica una proteína intramitocondrial (Bcl-2) implicada en la supresión de la muerte celular programada o apoptosis. Este gen se expresa en el tejido normal mamario pero su expresión disminuye a medida que los tumores progresan desde un carcinoma *in situ* hacía un carcinoma invasivo. Un metaanálisis reciente, apoya el valor pronóstico de la expresión de Bcl-2, medida por IHQ, mostrando su independencia del tamaño tumoral, del estado de afectación de los ganglios linfáticos axilares y del grado tumoral (Callagy, et al., 2008). La utilidad clínica de Bcl-2 como marcador pronóstico independiente, necesita aún ser confirmada en estudios prospectivos.

VI.6 Otros factores

Otros factores moleculares, como otros miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o de la familia del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), como los marcadores de la capacidad invasiva uPA/PAI-1 (inhibidor del plasminógeno-1) (Sgier, et al., 2010) y catepsina D, o marcadores de la angiogénesis, han sido estudiados como posibles factores pronósticos. En muchos de estos factores aún no se ha establecido rutinariamente su utilidad en los análisis y su significado, pero otros factores moleculares como el uPA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa) y su inhibidor PAI-1 son considerados el indicador pronóstico más potente conocido dentro de los nuevos factores pronósticos derivados de la biología molecular del cáncer de mama, para predecir la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total de las pacientes con cáncer de mama, y es utilizado en diferentes países como factor pronóstico validado (Sgier, et al., 2010).

VII. Estroma tumoral

Clásicamente, la evaluación de los factores pronósticos de los tumores se ha realizado únicamente en las células epiteliales malignas. Al principio de los años 70, la obra de Folkman (Folkman, 1971) sacó a la luz el papel esencial de los vasos sanguíneos en el desarrollo tumoral, lo que ha tenido un interés creciente en la caracterización del papel del estroma tumoral.

El estroma tumoral, compuesto por una variedad de tipos celulares no-epiteliales (células inflamatorias, células que componen la vasculatura y fibroblastos), está alterado tanto en su composición celular, como en el fenotipo de su matriz extracelular y de los fibroblastos que lo componen (Arnold, et al., 2002; Potter, et al., 2012). La influencia de las células del estroma tumoral sobre las células tumorales comienza a ser en la actualidad conocida. Bajo condiciones fisiológicas el estroma actúa como una importante barrera a la transformación de las células

epiteliales (Bhowmick, et al., 2005). No obstante, también se ha demostrado que el compartimento estromal abriga cambios en respuesta a lesiones epiteliales emergentes, y tiene un papel destacado en la iniciación del cáncer y su progresión, incluyendo el reclutamiento de nuevas células estromales que estimulan el crecimiento y la remodelación de la matriz extracelular (Bhowmick, et al., 2005; Kim J. B., et al., 2005; Olsen, et al., 2010; Tlsty, et al., 2006). En este sentido, existen estudios que indican que, por ejemplo, mientras el tipo de expresión génica de las células epiteliales malignas mamarias generan grupos asociados con la expresión de RE o el estado de HER2 (Perou, et al., 2000; Sorlie, et al., 2001), la expresión de genes del estroma tumoral genera grupos más relacionados con el pronóstico en el cáncer de mama (Finak, et al., 2008).

Por ello, es de gran interés caracterizar el fenotipo del estroma tumoral, con el objetivo de encontrar nuevos marcadores que puedan predecir la evolución de los pacientes.

VII.1 Expresión de la metaloproteasa 11 en las células inflamatorias mononucleares.

Para mejorar la caracterización del estroma tumoral que rodea el cáncer de mama y su impacto en las metástasis a distancia, nuestro grupo de investigación se realizó un estudio de la expresión de diferentes metaloproteasas de la matriz (MMPs) y de sus inhibidores (TIMPs) por las células estromales. En ese estudio, se encontró que el 32% de los carcinomas de mama analizados eran infiltrados por las CMIs que exhibían un alto perfil de expresión de MMPs/TIMPs, el cual estaba asociado con una elevada tasa de desarrollo posterior de metástasis a distancia (97,6%). En cambio, las pacientes cuyos CMIs infiltrantes exhibían un bajo perfil de expresión de MMPs/TIMPs tenían una menor propensión a desarrollar metástasis (26,9%). La MMP más diferencialmente sobreexpresada en los CMIs fue la MMP11, cuya expresión se encontró en el 85,7% de los casos con alto perfil de expresión de MMP/TIMP

en las CMIs y sólo en el 4,6% de los casos con bajo perfil de expresión (Figura 11) (Gonzalez L. O., et al., 2007). Esto indica que la expresión de MMP11 por las CMIs del estroma tumoral podría ser un marcador de la evolución de esas pacientes. Además en el 97,6% de los casos infiltrados por células inflamatorias mononucleares que exhibían un alto perfil de expresión de MMPs/TIMPs y desarrollaron metástasis a distancia, se caracterizan por la expresión de MMP11 por las CMIs, lo que representó el factor independiente más potentemente asociado con la supervivencia libre de enfermedad (Gonzalez L. O., et al., 2010a; Gonzalez L. O., et al., 2007; Vizoso, et al., 2007).

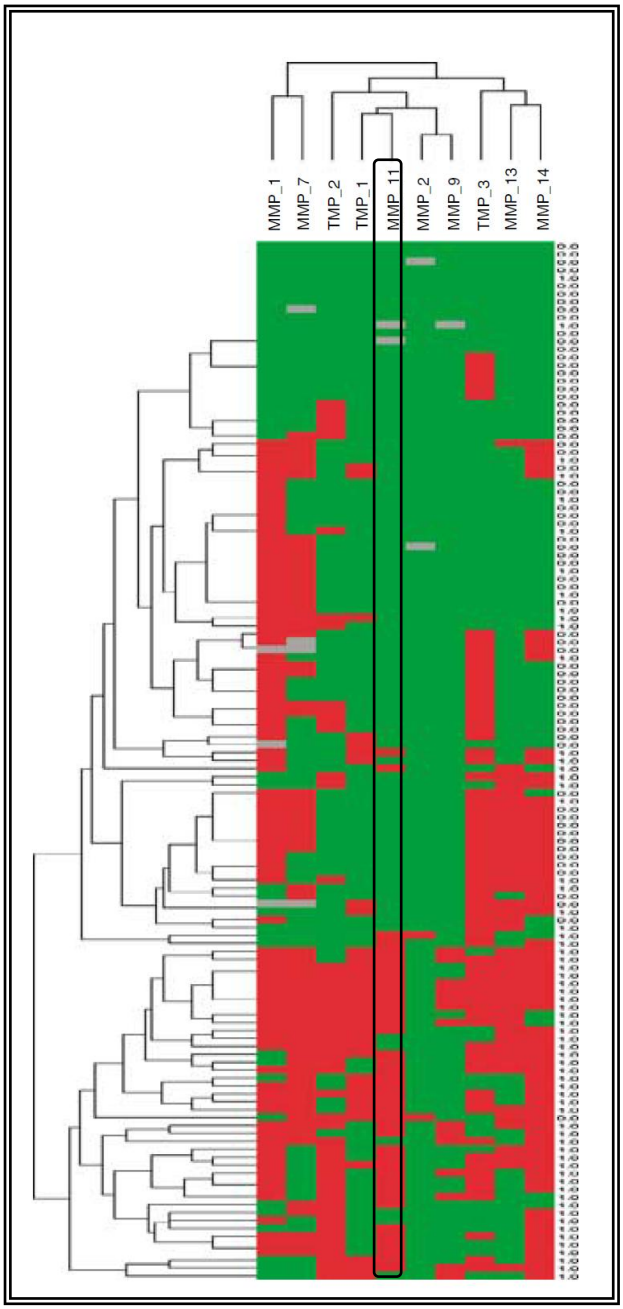

Figura 11. Cluster jerárquico no supervisado de la expresión de MMPs/TIMPs en las CMIs intratumorales de carcinomas mamarios. Columnas: MMPs/TIMPs; lineas: tumores. Rojo: expresión positiva; verde: expresión negativa: gris: falta de dato. (Fuente: *Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer, BJC (2007) 96, 903–911).*

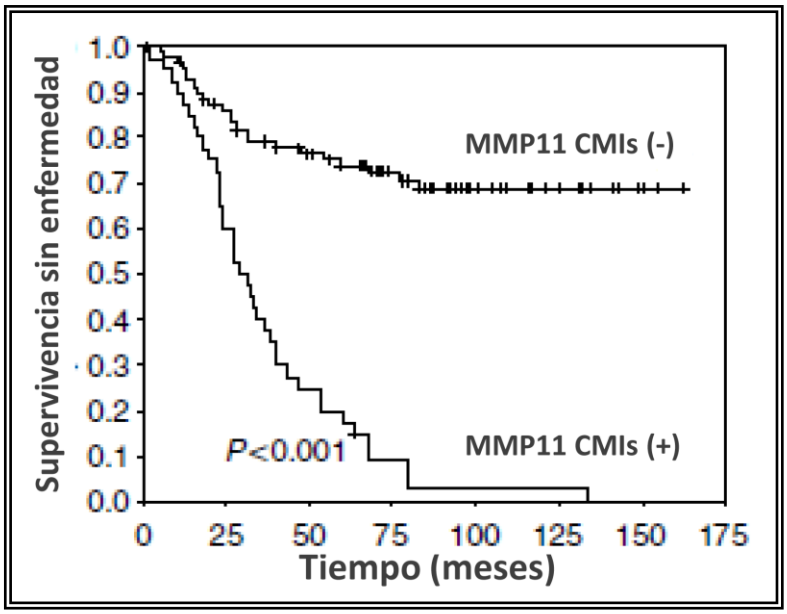

Figura 12. Supervivencia libre de enfermedad en muestras de carcinoma mamario. (Fuente: *Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer, BJC (2007) 96, 903–911).*

En un estudio posterior se analizó la relación existente entre las metástasis a distancia y la expresión de varios factores asociados con la inflamación y la progresión tumoral. Para ello, se dividió a una población de pacientes con cáncer de mama en grupos de acuerdo con la expresión de la MMP11 por las CMIs intratumorales y la metástasis a distancia (Eiro, et al., 2012a), y se observó una diferencia en la expresión de varios factores entre los grupos a estudio. Entre los factores que estaban sobreexpresados en el grupo con MMP11 positiva para las CMIs y metástasis a distancia, se encontraban las interleuquinas (ILs) 1, 5, 6, 17 y NFκB (factor de transcripción nuclear kappa B), todos ellos factores relacionados con la progresión tumoral y asociados a mal pronóstico. En definitiva, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la expresión de MMP11 por las CMIs del estroma intratumoral identifica un grupo de tumores con un perfil de expresión elevado de moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio, y que se asocia con un peor pronóstico, mostrando por ello una nueva clasificación de los tumores.

VII.2 Fibroblastos del estroma tumoral

Se ha demostrado que los fibroblastos estromales asociados a los tumores adoptan un fenotipo alterado, caracterizado por un incremento de su capacidad proliferativa y una elevada secreción de proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento y proteasas (Kalluri, et al., 2006; Tyan, et al., 2011; Zhang F., et al., 2005). Este fenómeno ha sido observado, entre otros tipos de tumores, en cáncer de mama, donde los fibroblastos derivados del tumor exhiben características biológicas diferentes a las de los fibroblastos procedentes del tejido mamario no tumoral (Allinen, et al., 2004; Casey, et al., 2009; Hawsawi, et al., 2008; Kunz-Schughart, et al., 2002; Orimo, et al., 2005; Trimis, et al., 2008). Esto sugiere que el estroma tumoral no desempeña un papel meramente estructural y pasivo en la progresión del cáncer. De hecho, en los últimos años se han ido acumulando evidencias de que los cambios en el comportamiento del estroma y su interacción con las células tumorales están íntimamente ligadas con el proceso de tumorigénesis, invasión tumoral y metástasis (Camp, et al., 2011; Klausner, et al., 2002; Liotta, et al., 2001; Wiseman, et al., 2002). Así, se ha demostrado que diferentes tipos de células malignas, como las de origen mamario, reclutan activamente fibroblastos en el interior de los tumores, y que este reclutamiento es esencial para la generación del microambiente idóneo para el crecimiento tumoral (Sloane, et al., 2005). Por otra parte, ha sido demostrado que los fibroblastos del estroma tumoral afectan al crecimiento, diferenciación e invasión de las células epiteliales normales y malignas de mama, siendo estos considerados como células inmunocompetentes (Bhowmick, et al., 2004; Elenbaas, et al., 2001; Holliday, et al., 2007; Kleer, et al., 2008; Kunz-Schughart, et al., 2002; Lebret, et al., 2007; Lin H. J., et al., 2008; Studebaker, et al., 2008). Además, varias evidencias han mostrado que el estroma y sus productos pueden ser oncogénicos, ya que pueden transformar las células adyacentes, en ausencia de células epiteliales malignas, para inducir cambios fenotípicos y genómicos en las células epiteliales (Tlsty, et al., 2001). Como ejemplo de esta capacidad oncogénica, se ha observado que cuando se expone el estroma a

carcinógenos por irradiación, éste acelera la formación y progresión de tumores epiteliales de mama (Barcellos-Hoff, et al., 2000). Así mismo, la variabilidad de las características biológicas del estroma tumoral contribuye a la heterogeneidad clínica y biológica del cáncer de mama (Bacac, et al., 2006; Beck, et al., 2008; Bergamaschi, et al., 2008; Fukino, et al., 2007; Patocs, et al., 2007; Rozenchan, et al., 2009; West, et al., 2005).

VIII. Factores interrelación estroma-célula tumoral

A continuación se describen algunos de los factores implicados en la interrelación estroma-célula tumoral en el cáncer de mama, y cuya expresión ha sido relacionada con la progresión tumoral.

VIII.1 S100A4

En humanos hay cerca de 20 miembros de la familia S100, los cuales están distribuidos de forma específica en los diferentes tejidos. Los primeros miembros de esta familia fueron descubiertos por Moore en 1965 en el cerebro bovino (Garrett, et al., 2006) y recibieron el nombre de S100 por ser 100% solubles en sulfato de amonio saturado. Se caracterizan además por ser proteínas ácidas, diméricas, de bajo peso molecular (aproximadamente entre 10 a 20 kD) y por ser fijadoras de calcio.

Entre los miembros de esta familia se encuentra la proteína S100A4, la cual ha sido clonada por distintos grupos bajo diversos nombres como metastasin (Mts1), proteína específica de fibroblastos (FSP1), entre otros. Las proteínas diana de S100A4 se localizan tanto intracelular como extracelularmente, teniendo por tanto un papel en ambos compartimentos. La proteína S100A4 necesita de una modificación conformacional producida tras su unión al calcio, para poder interaccionar y generar sus efectos biológicos (Garrett, et al., 2006).

Respecto a su papel intracelular, S100A4 interactúa con varias dianas, entre ellas el supresor tumoral p53, o la isoforma A de la miosina II no muscular. Se ha observado que las células que expresan S100A4 muestran más elongaciones durante la quimiotaxis, lo que sugiere que S100A4 puede modular el fenotipo metastático a través de la regulación de la motilidad celular y de la función de miosina IIA (Garrett, et al., 2006; Schmidt-Hansen, et al., 2004a). Además, el supresor tumoral p53 está involucrado en varias vías implicadas en la progresión tumoral (apoptosis, angiogénesis, diferenciación celular y movilidad), siendo su expresión potenciada a través de S100A4 (Schmidt-Hansen, et al., 2004a).

Además de la interacción con proteínas intracelulares, se ha mostrado que a nivel extracelular S100A4 estimula la producción de varias MMPs (Garrett, et al., 2006; Olsen, et al., 2010; Schmidt-Hansen, et al., 2004b), así como del uPA, por lo que promueve la metástasis por inducción de la remodelación de la matriz extracelular, facilitando con ello la angiogénesis y la invasión tumoral (Garrett, et al., 2006; Schmidt-Hansen, et al., 2004a; Schmidt-Hansen, et al., 2004b).

Debido a su participación en el desarrollo tumoral, S100A4 ha sido utilizado como un marcador pronóstico en varios tumores humanos, incluidos el cáncer de esófago de células escamosas, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de vejiga o cáncer gástrico (Schmidt-Hansen, et al., 2004a; Semov, et al., 2005). Se ha observado además una relación entre la expresión de S100A4 y un mal pronóstico en varios tipos de tumores de mama (Cabezon, et al., 2007; Garrett, et al., 2006).

VIII.2 Factor de crecimiento transformante beta 1

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) es una proteína perteneciente a la superfamilia TGFβ de las citoquinas. Los miembros de esta superfamilia son reguladores

multifuncionales de la proliferación y diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares. Las isoformas TGFβ1, 2 y 3 comparten una alta homología de secuencia de aminoácidos, tienen distintos patrones de expresión y sus funciones son mediadas por los mismos receptores (Sporn, et al., 1992). Además de actuar como mitógenos, estas proteínas también juegan un papel crucial en el desarrollo embrionario, en la morfogénesis, en la regulación bifuncional de la proliferación celular, en el sistema inmune, en la reparación de tejidos y en la hematopoyesis, entre otros muchos procesos (Halper, 2010; Pasche, 2001).

TGFβ1 es una citoquina inmunosupresora y antiinflamatoria, además de un regulador central de la función y proliferación de células T (Lin W. W., et al., 2007). Es además un potente agente fibrogénico, que induce la producción de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, desregula la expresión de MMPs, y aumenta la síntesis de inhibidores de proteasas. Por estas habilidades TGFβ1 es la isoforma más común y potente (Halper, 2010).

Es generalmente aceptado que TGFβ1 ejerce múltiples papeles en las células epiteliales de la mayoría de tumores humanos, como su participación en el crecimiento celular, incrementando la migración celular e iniciando cambios en la morfología celular (Bierie, et al., 2006). En estadíos tempranos de la tumorigénesis, TGFβ1 actúa como supresor tumoral, en cambio cuando el tumor está más desarrollado, los cambios genéticos y/o bioquímicos inducen a TGFβ1 a estimular la progresión tumoral por su actividad pleiotrópica tanto en las células tumorales como en las células estromales no malignas (Akhurst, et al., 2001; Gregoire, et al., 1995; Kalluri, et al., 2006).

Se han observado altos niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de TGFβ1 en tumores de mama, los cuales han sido asociados con un incremento de la densidad microvascular. Existen además varios estudios que relacionan la expresión de esta proteína con el grado de progresión tumoral y con un mal pronóstico de la enfermedad (Akhurst, et al., 2001; Elenbaas, et al., 2001; Farina, et al., 1998).

Por otro lado, existe una relación del TGFβ1 con el desarrollo de metástasis de mama en hueso. TGFβ1 es liberado de la matriz ósea durante la reabsorción, aumentando la invasión tumoral en hueso por la promoción de la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) producida por las células tumorales, la cual es fuertemente asociada con la reabsorción ósea en modelos humanos y animales (Farina, et al., 1998). Se ha observado además que el bloqueo de TGFβ1 en las células tumorales de mama resulta en una disminución de la osteólisis, en una menor migración tumoral al hueso y una mayor supervivencia en ratones (Yin, et al., 1999).

TGFβ1 juega un papel importante en las interacciones estroma-epitelio, creando un ambiente favorable para la invasión y metástasis de la célula epitelial. De hecho, estudios recientes han mostrado que la expresión del receptor de TGFβ1 es mayor en el estroma de mujeres con cáncer de mama de alto estadío (Korkaya, et al., 2011). Se ha observado también que la sobreexpresión de TGFβ1 y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) por los fibroblastos promueve el crecimiento hiperplásico o tumorigénico del epitelio de la mama (Korkaya, et al., 2011; Stuelten, et al., 2005).

TGFβ1 puede ser activado por varios factores como uPA, plasmina o algunas MMPs. De manera recíproca, su expresión por las células tumorales induce un aumento de expresión de MMP9 por los fibroblastos (Bhowmick, et al., 2004; Elenbaas, et al., 2001; Stuelten, et al., 2005).

VIII.3 Factor de crecimiento de hepatocitos

El HGF o “Scatter factor” (SF) es una adipoquina o adipocitoquina, ya que aún siendo producida en múltiples sitios, es sintetizada y secretada por adipocitos y células adiposas estromales. Esta proteína es un factor de crecimiento pleiotrópico no solo para hepatocitos, también para otros tipos celulares. Dentro de sus efectos biológicos se incluyen la proliferación celular, la motilidad, la invasividad, la morfogénesis y la angiogénesis, mayormente de forma

paracrina (Nakamura, et al., 1997; Sheen-Chen, et al., 2005; Taniguchi, et al., 1995; Vona-Davis, et al., 2007).

Se ha descrito la expresión de HGF en varios órganos, incluyendo glándulas mamarias, pulmón, riñón e hígado (Sheen-Chen, et al., 2005). Varios estudios han confirmado que los tumores de mama presentan altos niveles de HGF comparado con tejidos normales. Es más, los niveles en suero de HGF están frecuentemente incrementados en pacientes con cáncer de mama con recurrencia, siendo este aumento más marcado en pacientes con metástasis hepática (Eichbaum, et al., 2007; Elenbaas, et al., 2001; Kuperwasser, et al., 2004; Parr, et al., 2004; Taniguchi, et al., 1995; Vona-Davis, et al., 2007).

Se ha observado que los fibroblastos son la mayor fuente de HGF. De esta forma, en estadíos tempranos de cáncer de mama, la expresión de esta proteína es típicamente detectada, aunque a bajos niveles, en el estroma de hiperplasias y carcinomas *in situ*. Sin embargo, en estadíos más avanzados (carcinomas invasivos), la expresión de HGF está a menudo incrementada en las células epiteliales, facilitando así la estimulación de la proliferación de forma paracrina y autocrina (Elenbaas, et al., 2001; Parr, et al., 2004; Taniguchi, et al., 1995).

Como se ha descrito anteriormente, en tumores de mama la sobreexpresión de TGFβ1 y HGF por los fibroblastos promueve el crecimiento hiperplásico o tumorigénico del epitelio normal de la mama. Se ha demostrado que HGF puede estimular la producción de varios factores como es el caso de la MMP9 (Stuelten, et al., 2005), o de uPA, el cual puede a su vez activar pro-HGF, ya que éste muestra una alta homología con el plasminógeno (McMahon, et al., 2008; Sgier, et al., 2010). Existen otros factores inductores del HGF como el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), el TGFβ o la IL6 (Nakamura, et al., 1997; Sun, et al., 2005; Taniguchi, et al., 1995; Wang Y. D., et al., 2002).

VIII.4 Factores de crecimiento de fibroblastos

En vertebrados, la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) consiste en al menos 22 miembros (Ornitz, et al., 2001), los cuales participan en diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación, supervivencia celular, migración y curación de heridas (Goldfarb, 1996).

Los FGFs median las respuestas celulares por unión y activación de cuatro receptores tirosín-quinasa y un receptor soluble, produciendo una gran diversidad de respuestas biológicas en diferentes tipos celulares, esenciales en el mantenimiento de la comunicación normal epitelio/estroma y de la homeostasis (Halper, 2010; Tarkkonen, et al., 2012).

Factor de crecimiento de fibroblastos 2 o básico

El factor de crecimiento de fibroblastos 2 o básico (FGF2 o FGFb) es una proteína de 18 KDa. Entre sus funciones fisiológicas se encuentran la inducción de la diferenciación, supervivencia y regeneración neuronal, y la modulación del desarrollo y diferenciación embrionaria (Li Z., et al., 2010). Es además una proteína angiogénica tanto *in vitro* como *in vivo*, y tiene un importante papel en el mantenimiento de los tejidos y en la cicatrización de las heridas (Hewala, et al., 2010; Kalluri, et al., 2006; Ritter, et al., 2008).

Existen varias vías del proceso angiogénico en las que FGF2 está involucrado. Una de esas vías es por estimulación de la síntesis del activador del plasminógeno y otras proteasas involucradas en la angiogénesis. Además, FGF2 estimula la migración y la síntesis de ADN en las células endoteliales *in vitro.* (Bos, et al., 2005).

FGF2 ha sido identificado en una gran variedad de células y tejidos malignos, entre los cuales se encuentran el cáncer de próstata y el cáncer de mama (Giulianelli, et al., 2008). Es más, se ha observado una concentración significativamente mayor de FGF2 en suero de pacientes con cáncer de mama respecto a sus controles normales (Granato, et al., 2006; Hewala, et al., 2010).

Debido a su afinidad por la heparina, FGF2 exhibe una fuerte unión a los proteoglicanos de la matriz extracelular donde suele estar secuestrado. Por ello, su biodisponibilidad es limitada, y su liberación es en parte regulada por las MMPs y otras proteasas extracelulares, las cuales llevan a cabo la degradación de la matriz extracelular y, con ello, la liberación de varios factores, entre los que se incluye el FGF2 (Bos, et al., 2005; Halper, 2010).

Factor de crecimiento de fibroblastos 7

El factor de crecimiento de fibroblastos 7 o factor de crecimiento del queratinocito (FGF7 o KGF) es un péptido de 22KDa descubierto en 1989 como parte de una investigación para identificar factores solubles en el tejido estromal que pudiesen aumentar el crecimiento de las células epiteliales. El FGF7 fue originalmente aislado a partir de fibroblastos procedentes de pulmón de embrión humano, y posteriormente se ha confirmado su presencia en el estroma mamario.

El FGF7 está originado en fibroblastos, y su receptor está localizado en células epiteliales y mioepiteliales (Bhowmick, et al., 2004; Palmieri, et al., 2003), por lo que se considera un mediador paracrino en la proliferación y migración de la célula epitelial (Palmieri, et al., 2003; Zang, et al., 2000).

Varios estudios han confirmado que el FGF7 actúa como un potente mitógeno para las células de la glándula mamaria. En uno de estos estudios, se observó que la administración sistémica de FGF7 en ratas resulta en una hiperplasia epitelial mamaria ductal, con un exceso de formación de nuevos ductos. El FGF7 también actúa como mitógeno en cultivos primarios de epitelio mamario (Ulich, et al., 1994; Zang, et al., 2000).

Además de su relación con tumores mamarios, se han detectado mayores niveles de ARNm del FGF7 en muestras de cáncer de páncreas y colon respecto a sus respectivos controles normales (Siddiqi, et al., 1995; Watanabe, et al., 2000).

Existen varios factores que tienen la capacidad de estimular la expresión del FGF7 en las células estromales. Por ejemplo, tratamientos con la IL1 y la IL6, aumentan la transcripción y la síntesis proteica del FGF7 en fibroblastos (Finch, et al., 2006).

VIII.5 Factores de crecimiento derivados de plaquetas

Los PDGFs son una familia de glicoproteínas catiónicas identificadas a finales de 1970 como componentes del suero responsables de la proliferación de células mesenquimales, y cuya producción era debida a las plaquetas. Los PDGFs son potentes mitógenos y quimioatrayentes para varios tipos celulares como células mesenquimales, fibroblastos, células vasculares del músculo liso y células glomerulares mesangiales. Además, los PDGFs están involucrados en la reparación del tejido normal después de un daño, ya que su papel fisiológico es controlar el crecimiento del tejido conectivo (Ariad, et al., 1991; Bos, et al., 2005; Gehmert, et al., 2010).

La familia PDGF consiste en cuatro ligandos codificados por cuatro genes diferentes: PDGFA, PDGFB, PDGFC y PDGFD (Heldin, et al., 2002). El PDGF mitogénicamente activo es un dímero de dos cadenas polipeptídicas las cuales han sido identificadas como PDGFA (PDGF1) y PDGFB (PDGF2), unidas por puentes disulfuro (Ariad, et al., 1991).

En general, los efectos de PDGFs en la promoción tumoral son principalmente autocrinos, estromales y angiogénicos (Hermanson, et al., 1992). Se ha observado un incremento de la expresión de PDGFA y B en varias líneas tumorales de mama, así como en otras líneas celulares malignas no hematopoyéticas como melanoma, cáncer de ovario y cáncer de próstata (Ariad, et al., 1991; Bronzert, et al., 1987; Elenbaas, et al., 2001).

En el cáncer, los PDGFs y sus receptores estimulan el brote microvascular por atracción de pericitos y células del músculo liso durante la angiogénesis (Bos, et al., 2005). Se ha observado además, que la expresión de ARNm de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y PDGFs por RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) es mayor

en el tejido tumoral que en el tejido normal en cáncer de mama, y que estas expresiones están significativamente relacionadas con el grado de angiogénesis y la metástasis ganglionar (Bauer, et al., 1985; Chua, et al., 1985). Es más, altos niveles de PDGFs en el plasma predicen una baja supervivencia en pacientes con cáncer de mama, y puede ser un marcador pronóstico en pacientes con estadíos tempranos y tardíos de cáncer de mama (Ariad, et al., 1991; Seymour, et al., 1993).

Por otro lado, los PDGFs son considerados factores de resistencia, ya que su expresión por las células tumorales en cáncer de mama tiene un efecto adverso en respuesta a la quimioterapia (Seymour, et al., 1993).

Los PDGFA y PDGFB son capaces de inducir la liberación de componentes de la matriz y de varios factores de crecimiento de los fibroblastos como el IGF1 (factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1), el HGF y el FGF2, los cuales subsecuentemente pueden también modular el crecimiento tumoral y/o el ambiente tumoral (de Jong, et al., 1998a; b; Halaban, 1996; Pierce, et al., 1995).

VIII.6 Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

El uPA pertenece a la familia de las serín-proteasas, y juega un papel esencial en la fisiología normal reproductiva, la curación de heridas, la angiogénesis y la remodelación tisular (Carriero, et al., 2009; De Cremoux, et al., 2009). En cuanto a su relación con el cáncer, la expresión de uPA y de su receptor (uPAR) ha sido detectada tanto en fibroblastos como en células epiteliales en diferentes muestras de carcinomas humanos (Elenbaas, et al., 2001). La activación de uPA se produce tras la unión de Pro-uPA a su receptor uPAR (Sgier, et al., 2010) anclado a la membrana, iniciándose así la proteólisis principalmente del plasminógeno inactivo, el cual se convierte en plasmina activa.

La plasmina tiene la capacidad de degradar varias proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, la fibrina, la laminina y los proteoglicanos. También activa la pro-colagenasa tipo

IV que, a su vez, degrada el colágeno produciendo con ello una mayor degradación de la matriz y la liberación de otros factores de crecimiento que se encuentran en la ECM (matriz extracelular) (Elenbaas, et al., 2001; Foekens, et al., 1992), y de MMPs como la MMP9 (Andreasen, et al., 1997; Huang H. Y., et al., 2010). El uPA y la plasmina también pueden estimular factores de crecimiento debido a la activación proteolítica de formas latentes de varios factores como el HGF, el TGFβ y el FGF2 (Andreasen, et al., 1997). Así mismo, existen varios factores de crecimiento que inducen la expresión del uPA en fibroblastos, como el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el PDGF y el FGF2 (Sieuwerts, et al., 1999).

Se ha descrito la existencia de una elevada expresión de componentes del sistema uPA en diferentes tipos tumorales, como el cáncer de mama y el cáncer de colon, entre otros. Unos altos niveles de actividad del uPA están correlacionados con la invasividad tumoral y es un indicador pronóstico independiente de metástasis y recurrencia, particularmente en el caso del cáncer de mama (Chen J., et al., 2001; Duffy, et al., 1998; Duffy, et al., 1988; Duffy, et al., 1990; Knoop, et al., 1998; McMahon, et al., 2008; Thomssen, et al., 2009), ya que aumenta la migración de las células tumorales gracias a la degradación de la ECM, lo que permite a las células tumorales tener acceso a la circulación sistémica y colonizar varios órganos (Moreau, et al., 2011). Además, la expresión del uPA y de la MMP13 se relaciona con la transición de CDIS a CDI (carcinoma ductal invasivo) (Radisky, et al., 2007).

Además de la migración, uno de los papeles más importantes del uPA en la progresión tumoral es la estimulación de la proliferación. Una de las vías es por inhibición de la apoptosis, además de por la inducción de cascadas de señalización proliferativas como, por ejemplo, a través de la vía de STAT-3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3). (Wolff, et al., 2011).

Debido a los resultados obtenidos en diferentes estudios, el uPA y su inhibidor PAI-1 son considerados el indicador pronóstico más potente conocido dentro de los nuevos factores pronósticos derivados de la biología molecular del cáncer de mama, para predecir la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total de las pacientes con cáncer de mama,

y el factor predictivo más exacto de metástasis en tumores con ganglios linfáticos negativos (Sgier, et al., 2010).

VIII.7 Interleuquinas

Las ILs son una familia de polipéptidos pertenecientes a la familia de las citoquinas. Muchas de las interleuquinas han sido relacionadas con diferentes tumores, entre ellas la IL6 y la IL8, cuyos niveles circulantes han sido hallados alterados en varios subtipos tumorales, incluyendo el cáncer de mama, comparado con controles sanos (Benoy, et al., 2004; Meyers, et al., 2005; Tsimberidou, et al., 2008). Es más, los niveles en suero de ambas citoquinas han sido asociadas con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Benoy, et al., 2004; Yao C., et al., 2007). De hecho, los niveles de estas citoquinas en el inicio del tratamiento son indicadores de la respuesta a la terapia y del pronóstico de las pacientes con recurrencia de cáncer de mama (Yokoe, et al., 1997).

Interleuquina 6

Es una potente citoquina inflamatoria pleiotrópica, inicialmente identificada como un factor derivado de células T, inductor de la maduración terminal de las células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Camporeale, et al., 2012; Guo, et al., 2012; Lin W. W., et al., 2007). La IL6 tiene un importante papel en una gran variedad de actividades biológicas relacionadas con los procesos inflamatorios normales, los mecanismos de defensa inmune y la modulación del crecimiento celular (Guo, et al., 2012). Además de en las células inmunes, la IL6 puede ser expresada por diferentes tipos celulares como fibroblastos y células tumorales en respuesta a una amplia variedad de estímulos, como infección bacteriana o viral, inflamación u otras citoquinas inflamatorias (Hugo, et al., 2012).

La mayoría de los genes diana de la IL6 están involucrados en la progresión del ciclo celular y la supresión de la apoptosis, lo cual subraya la importancia de la IL6 en la formación del tumor. Además, la IL6 incrementa la capacidad de migración de las células endoteliales, un paso clave

en la angiogénesis y diseminación de los tumores sólidos (Lin W. W., et al., 2007; Yao J. S., et al., 2006). Múltiples estudios han señalado a la IL6 como un potente factor de crecimiento para varios tumores, entre ellos el cáncer de mama (Berger, 2004; Garcia-Tunon, et al., 2005; Lin W. W., et al., 2007; Salgado, et al., 2003; Sansone, et al., 2007; Sasser, et al., 2007), y se ha observado que altos niveles en suero de la IL6 en pacientes con cáncer de mama están relacionados con el estadío tumoral y con un pronóstico desfavorable en mujeres con metástasis, mostrándose como un factor con valor pronóstico independiente (Bachelot, et al., 2003; DeMichele, et al., 2003; Knupfer, et al., 2007; Kozlowski, et al., 2003; Olsen, et al., 2010; Plante, et al., 1994; Salgado, et al., 2003; Zhang G. J., et al., 1999).

La IL6 ha sido también relacionada con la resistencia a tratamientos antitumorales. En un estudio realizado en cáncer de mama se mostró que las células tumorales sensibles al tratamiento con quimioterapia no expresan IL6; en cambio, aquellas células tumorales de mama resistentes a varios agentes quimioterápicos producen altos niveles de IL6 (Conze, et al., 2001). Además, esta citoquina permite a la célula tumoral escapar de la muerte celular inducida por la quimioterapia.

El papel de la IL6 ha sido relacionado con otros factores. Así, se ha demostrado que la IL6 regula la proliferación de las células tumorales a través de la activación de factores de crecimiento del epitelio, HGF y otros factores (Badache, et al., 2001; Grant, et al., 2002; Sun, et al., 2005; Wang Y. D., et al., 2002). Además, la IL6 estimula la angiogénesis y la vascularización tumoral a través de la regulación en la síntesis de VEGF (Dankbar, et al., 2000; Guo, et al., 2012).

El éxito en los tratamientos con medicamentos que antagonizan la señalización de IL6 ha supuesto el mayor soporte del papel patológico de este factor en el cáncer (Duan, et al., 2006).

Interleuquina 8

La IL8 o CXCL8 es una citoquina de la familia de las quimiocinas y fue originalmente identificada como un quimioatrayente para neutrófilos, jugando un papel en la activación del sistema inmune (Sozzani, et al., 1996; Walz, et al., 1987; Yoshimura, et al., 1987). Es secretada por una variedad de células estromales como fibroblastos y células endoteliales, además de por otros tipos celulares como las células epiteliales (Ingerslev, et al., 2010; Korkaya, et al., 2011).

Se ha detectado una expresión de IL8 en líneas procedentes de varios tumores, entre ellos de cáncer de mama (Kozlowski, et al., 2003; Moore, et al., 1999; Xu, et al., 2000). Esta citoquina actúa no sólo a favor de la invasión y diseminación metastásica, sino que también es un potente inductor de la angiogénesis y del crecimiento tumoral (Chavey, et al., 2008; Koch, et al., 1992; Strieter, et al., 1992). De hecho, la expresión de la IL8 es inducida por VEGFA, y ambos son modulados por la hipoxia (Kunz, et al., 1999; Rofstad, et al., 2002). Por otro lado, la IL8 ejerce su actividad angiogénica en parte por la inducción de la expresión de MMP2 y MMP9 (Li A., et al., 2005a; Opdenakker, et al., 2001).

La concentración de IL8 se encuentra incrementada en muestras tumorales de cáncer de mama respecto a muestras de tejido benigno (Abranches, et al., 2011; Green, et al., 1997). De hecho, varios estudios muestran un incremento de la concentración de IL8 en suero en pacientes con cáncer de mama y una correlación positiva con el estadío de la enfermedad (Benoy, et al., 2004; Kozlowski, et al., 2003), y con el potencial metastático (Chavey, et al., 2007). Los niveles elevados de IL8 circulante han sido relacionados con una mala respuesta a la quimioterapia sistémica en pacientes con cáncer de ovario. Así mismo, *Yokoe y cols.* (Yokoe, et al., 2000) describen la existencia de altos niveles de IL8 circulante en aquellos pacientes con cáncer de mama que no responden a la terapia.

VIII.8 Proteína quimioatrayente de monocitos

La proteina quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1 o CCL2) es una citoquina de la familia de las quimiocinas, y regula el reclutamiento de monocitos, macrófagos y otras células inflamatorias a lugares donde existe una daño o infección (Christopherson, et al., 2001; Zlotnik, et al., 2006).

Se ha observado la expresión de CCL2 en una gran variedad de tumores y líneas celulares tumorales, incluyendo el melanoma, los gliomas, los sarcomas, el cáncer de ovario, el cáncer de vejiga y de mama (Graves, et al., 1992; Kuratsu, et al., 1993; Negus, et al., 1995; Sciacca, et al., 1994; Valkovic, et al., 1998). Sin embargo, CCL2 no es sólo producido por las células tumorales, sino también por las células estromales tales como fibroblastos, células endoteliales y monocitos (Tsuyada, et al., 2012; Ueno, et al., 2000; Valkovic, et al., 1998). Debido a que varios tipos celulares dentro del microambiente tumoral expresan y responden a CCL2, éste exhibe un efecto promotor del crecimiento paracrino y autocrino (Steiner, et al., 2012).

Los niveles de CCL2 han sido relacionados con un alto grado tumoral en cáncer de mama (Chavey, et al., 2007). Los niveles elevados de CCL2 desencadenan el reclutamiento de macrófagos, linfocitos B y linfocitos T al tumor (Chavey, et al., 2007; Lebrecht, et al., 2004; Wilson, et al., 2002), lo que está relacionado con un mal pronóstico (Goede, et al., 1999). Además, tiene un valor pronóstico significativo para la supervivencia libre de enfermedad (Dwyer, et al., 2007). Se ha mostrado también una asociación entre una elevada expresión de CCL2 y la afectación ganglionar (Lebrecht, et al., 2004), la expresión de factores angiogénicos (Saji, et al., 2001; Ueno, et al., 2000; Wilson, et al., 2002) y la activación de MMPs en pacientes con cáncer de mama (Saji, et al., 2001). Además, la proteína CCL2 ha sido relacionada con varios factores que aumentan el crecimiento de las células endoteliales, como VEGF o IL8 en tumores de mama primarios (Dwyer, et al., 2007).

CCL2 también influye en la metástasis ósea. Células metastásicas de cáncer de mama inducen la liberación de CCL2 y de otras citoquinas inflamatorias por los osteoblastos, creando así un microambiente favorable para el crecimiento tumoral (Kinder, et al., 2008). La liberación de CCL2 por los osteoblastos es también quimiotáctico para los osteoclastos y lidera el desarrollo osteolítico de la lesión mestastásica, así como la degradación de la matriz ósea debido a las acciones de reabsorción de los osteoclastos (Bussard, et al., 2010; Kinder, et al., 2008).

Por todo esto, CCL2 es considerado un factor pronóstico potencial, diana terapéutica, o ambos, en pacientes con cáncer de mama (Dwyer, et al., 2007; Murphy, et al., 2011; Salcedo, et al., 2000; Valkovic, et al., 1998).

VIII.9 Factor derivado de células estromales

El factor derivado de células estromales 1 (SDF1 o CXCL12) es una citoquina de la familia de las quimiocinas. Fue inicialmente clonado a partir de médula ósea murina y caracterizado como un factor estimulante del crecimiento de células B (Nagasawa, et al., 1994; Shirozu, et al., 1995). El CXCL12 ejerce sus efectos a través de su receptor CXCR4 (receptor de quimiocina tipo 4), el cual es el único receptor fisiológico para CXCL12. Este factor participa en la quimiotaxis (Fernandis, et al., 2004; Libura, et al., 2002; Orimo, et al., 2005), la hematopoyesis (Nagasawa, et al., 1998; Zou, et al., 1998), la vasculogénesis (Tachibana, et al., 1998; Yamaguchi, et al., 2003), la diseminación tumoral y la metástasis (Geminder, et al., 2001; Muller, et al., 2001; Phillips, et al., 2003). En situaciones normales, CXCL12 es liberado a los sitios que han sufrido una lesión, induciendo la regeneración tisular (Askari, et al., 2003; Ceradini, et al., 2004; De Falco, et al., 2004; Schober, et al., 2003).

El CXCL12 está constitutivamente expresado en varios órganos incluyendo hueso, pulmón, hígado, cerebro y timo; además se expresa en células estromales como osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales de médula ósea (Aust, et al., 2001; Yun, et al., 2003). Se ha observado también su expresión en varias líneas celulares (Kang H., et al., 2005b), así como en

tumores de pacientes con cáncer de mama, siendo más abundante en tumores con ganglios linfáticos positivos, en tumores de pacientes con recidivas o en aquellos de pacientes con metástasis o que no sobreviven. (Kang H., et al., 2005a; Kang H., et al., 2005b). También se ha observado que el nivel de expresión de CXCL12 en el suero ha sido asociado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Burger, et al., 2006; Chu, et al., 2010; Kang H., et al., 2005b).

Su alta expresión en ganglios linfáticos, médula ósea, hígado y pulmón, parece deberse a que contribuye a la migración de las células de cáncer de mama a los ganglios linfáticos y subsecuentemente a la formación de metástasis en órganos distantes (Kang Y., et al., 2003; Muller, et al., 2001; Zlotnik, 2006a; b; Zlotnik, et al., 2006). De hecho, el uso de anticuerpos neutralizantes para el receptor de esta quimiocina, reducen la metástasis en modelos animales de cáncer de mama (Muller, et al., 2001).

VIII.10 Factor nuclear de transcripción kappa B

La familia Rel/NFκB está formada por cinco factores de transcripción: p65 (Rel-A), Rel-B, c-Rel, p50 (NFκB1) y p52 (NFκB2) los cuales comparten un dominio de 300 aminoácidos, situado en su extremo N-terminal, y que es denominado dominio de homología Rel (Rel Homology Domain o RHD) (Ghosh, et al., 1998). Este dominio media la dimerización y el transporte nuclear de las proteínas NFκB, así como su unión a secuencias específicas del ADN denominadas elementos kb, los cuales forman parte de promotores y potenciadores de la transcripción. La familia de factores de transcripción NFκB es esencial en las respuestas inmunes innatas y adaptativas, la supervivencia celular y la inflamación entre otras funciones biológicas (Ghosh, et al., 2002; Hayden, et al., 2004).

En la mayoría de las células, las proteínas de la familia NFκB, forman homo o heterodímeros que están secuestrados en el citoplasma por moléculas inhibidores de NFκB (IkB). La activación de NFκB por diferentes señales, como los inductores el TNFα (factor de necrosis tumoral α) o la

IL1, resulta en la activación del complejo de quinasas IkB (IKK), que fosforila a las moléculas inhibidoras IkB, produciéndose la translocación nuclear de los complejos proteicos de NFκB (Ducut Sigala, et al., 2004; Ghosh, et al., 2002). Una vez en el núcleo, modulan la expresión de genes involucrados en la inflamación, la degradación de la matriz extracelular, la adhesión celular, la angiogénesis y la prevención de la muerte celular, teniendo por ello un importante papel en la progresión tumoral (Baeuerle, et al., 1994; Beg, et al., 1996; Siebenlist, et al., 1994; Verma, et al., 1995; Whiteside, et al., 1997).

Se ha observado una activación constitutiva de NFκB en diferentes tipos de tumores como por ejemplo en cáncer de mama (Ahmed, et al., 2006; Nakshatri, et al., 1997; Sovak, et al., 1997), de ovario (Huang S., et al., 2000), hepatocarcinoma (Stathopoulos, et al., 2008), cáncer de pulmón (Stathopoulos, et al., 2008) o de páncreas (Jackson L., et al., 2006). Se ha observado además que los tumores con activación constitutiva de NFκB, muestran normalmente una mayor resistencia a la quimioterapia (Dolcet, et al., 2005).

Tras su activación, NFκB aumenta la expresión de varios factores, entre los que se encuentran algunas proteinasas como uPA (Bhat-Nakshatri, et al., 1998), varias metaloproteasas (Bond, et al., 1999; Bond, et al., 1998; Nozaki, et al., 2000), y citoquinas como la IL6 y la IL8 (Anderson, et al., 2000; Georganas, et al., 2000). De hecho, ha sido recientemente observado un mecanismo de retroalimentación positivo mantenido por la IL6 a través de la activación de STAT3, el cual a su vez activa NFκB (Iliopoulos, et al., 2009; Iliopoulos, et al., 2010).

VIII.11 Factor de crecimiento similar a la insulina 2

Los IGFs son péptidos con una masa molecular de alrededor de 7,5 kDa que tienen una estructura homóloga a la proinsulina. Existen 2 tipos de IGFs, el IGF1 o somatomedina C y el IGF2 (Daughaday, et al., 1989).

Ambos IGFs se expresan, tanto en el desarrollo como en la vida adulta, en gran variedad de tejidos entre los que se incluyen músculo, pulmón, hígado, riñones y cerebro (Daughaday, et

al., 1989). Dentro del sistema nervioso, los IGFs y sus receptores se expresan en gran cantidad durante el desarrollo embrionario lo que sugiere un importante papel de estos factores durante los procesos de diferenciación neuronal, sinaptogénesis y mielinización (Feldman, et al., 1997; Sara, et al., 1990).

IGF2 es un potente mitógeno para una gran variedad de células normales y transformadas, incluidas fibroblastos y células epiteliales, ya que su expresión no es específica del estroma; además se ha detectado su expresión en varias líneas celulares de cáncer de mama (Elenbaas, et al., 2001; Giani, et al., 1996).

Se ha observado una alta expresión de IGF2 en varios tipos tumorales como en cáncer de colon (Li S. R., et al., 2004b), hepatocarcinoma (Lamas, et al., 1991), cáncer de ovario (Sayer, et al., 2005) y cáncer de mama (Giani, et al., 2002; Sayer, et al., 2005), entre otros. De hecho, se ha observado una mayor expresión de este factor en el estroma de carcinomas mamarios invasivos respecto al tejido normal (Shekhar, et al., 2001; Singer, et al., 1995), y se asocia con la progresión tumoral en este tumor (Cullen, et al., 1992).

Además, IGF2 puede inducir la angiogénesis por estimulación de la migración y la diferenciación morfológica de las células endoteliales (Lee O. H., et al., 2000), siendo además capaz de inducir la expresión de VEGF en cultivos a través del aumento de expresión del factor inducible por hipoxia 1α (HIF-1α) (Feldser, et al., 1999; Zelzer, et al., 1998).

La participación del sistema IGF ha sido también descrita en la promoción de la invasión tumoral a través de la regulación de varias MMPs (Samani, et al., 2007), así como de la expresión de uPA (Dunn, et al., 2000).

VIII.12 Factor de crecimiento del endotelio vascular

La angiogénesis y la vasculogénesis son procesos complejos en los cuales están involucrados diferentes sistemas de señalización, siendo el principal sistema la familia de los VEGFs y sus receptores. Este sistema está compuesto por una familia de glicoproteínas, con al menos seis

tipos de VEGFs descritos (VEGFA, B, C, D, E y el factor de crecimiento placentario P1GF) (Ferrara, et al., 1997). El VEGFA es la isoforma más común y más estudiada, por lo que normalmente se describe como VEGF (Halper, 2010).

El VEGF, es una citoquina multifuncional que puede ser secretada por una gran variedad de células, tanto estromales como tumorales, y tiene un papel esencial en la vasculogénesis y angiogénesis (Fox, et al., 2001; Kalluri, et al., 2006). Se ha observado una alta expresión de este factor en varios tipos de tumores humanos, incluyendo cáncer de pulmón (Han H., et al., 2001), de esófago (Kleespies, et al., 2005) y colorrectal (Des Guetz, et al., 2006), en los cuales se ha sugerido que la expresión del VEGF está asociada con la progresión tumoral.

De hecho, además de su papel en la formación de nuevos vasos, se ha mostrado que el VEGF es capaz de estimular la proliferación de las células tumorales. En cáncer de mama, el VEGF aumenta la proliferación y la migración de células tumorales (Bachelder, et al., 2002; Liang, et al., 2006). Es más, la expresión del VEGF en cáncer de mama ha sido relacionada con una menor supervivencia (Mohammed, et al., 2007).

La expresión de otros factores puede aumentar la disponibilidad del VEGF en el tumor. Así, la expresión de la MMP9 produce una mayor degradación de la matriz extracelular, liberando VEGF e incrementando con ello su biodisponibilidad (Bergers, et al., 2000). También se ha observado que CCL2 aumenta la expresión génica del VEGF, existiendo una relación recíproca entre ambos factores de manera que VEGF induce la liberación de CCL2 (Marumo, et al., 1999; Yamada, et al., 2003).

VIII.13 Metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores

Las MMPs son enzimas proteolíticas que poseen dos átomos de zinc en el sitio activo de la molécula, y su familia cuenta con 26 miembros (Brinckerhoff, et al., 2000; Demers, et al., 2005; Overall, et al., 2002). Todas ellas presentan características muy similares e incluso se superponen en la especificidad por sustratos.

La expresión de las MMPs es inducida por una variedad de estímulos externos tales como las citoquinas y los factores de crecimiento, incluyendo interferones (IFNs), ILs, FGFs, VEGFs, TNFα o TNFβ , EGFs y el inductor de metaloproteasas de la matriz extracelular (EMMPRIN) (Sternlicht, et al., 2001). Las MMPs son sintetizadas como zimógenos (precursores inactivos), y para su activación enzimática, es necesaria la ruptura del enlace cisteína-zinc, mediante la proteolisis del pro-péptido por otras MMPs o serín-proteasas, o mediante un cambio conformacional de la proteína (inducido por compuestos organomercuriados, urea, detergentes o especies reactivas de oxígeno). La actividad de las MMPs es regulada por sus inhibidores endógenos, los TIMPs. Sus 4 miembros (TIMP1, 2, 3 y 4) son proteínas capaces de inactivar las MMPs a través de su unión directa y reversible al dominio catalítico de las MMPs (Brew K., et al., 2000).

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 establecida la implicación de las MMPs en el desarrollo del cáncer (Shuman Moss, et al., 2012), como el de mama (Del Casar, et al., 2010; Eiro, et al., 2013a; Eiro, et al., 2012a; Eiro, et al., 2013b; Fernandez-Garcia, et al., 2014; Garcia, et al., 2010; Gonzalez L. O., et al., 2010b; Vizoso, et al., 2007), el colorrectal (Gonzalez L., et al., 2012)](Gonzalez L., et al., 2012; Herszenyi, et al., 2012), de próstata (Escaff, et al., 2011; 2010; Fernandez-Gomez, et al., 2011) y el hepatocarcinoma (Altadill, et al., 2009), entre otros.

Durante la invasión tumoral, las MMPs parecen tener diversas funciones, probablemente debido a su preferencia de sustrato. Existen datos que desafían el clásico dogma que establece que las MMPs promueven la metástasis exclusivamente mediante la modulación de la remodelación de la matriz extracelular; se describe, así, la influencia de las MMPs en el comportamiento de la célula tumoral *in vivo* como consecuencia de su capacidad para escindir los factores de crecimiento, los receptores de superficie de la célula, las moléculas de adhesión

celular, así como las quimioquinas o citoquinas (Fingleton, et al., 2001; Manes, et al., 1999; Stetler-Stevenson, 1999).

Así pues, la transcripción de las MMPs puede ser inducida por citoquinas pro-inflamatorias como la IL1, IL6, IFNs y TNFα, o por factores de crecimiento como EGF, FGF y TGFβ o por EMMPRIN, todos ellos a su vez regulados por NFκB (Sternlicht, et al., 2001). Por otra parte, si bien la primera función de las MMPs es la degradación de la ECM, actualmente se considera que cumplen un papel importante en el procesamiento de moléculas bioactivas tales como los factores de crecimiento, las citoquinas, las quimioquinas y sus respectivos receptores (Gill, et al., 2008).

Las MMPs pueden modular la expresión de los mediadores de la inflamación, pudiendo establecer los gradientes de quimioquinas necesarios para la quimiotaxis de las células inflamatorias (Manicone, et al., 2008). De esta forma, las MMPs son capaces de regular el comportamiento celular de diferentes formas (Figura 13); estos mecanismos incluyen la alteración de las interacciones célula-matriz y célula-célula; la liberación, activación o inactivación de moléculas de señalización paracrina o autocrina; y la activación o inactivación de receptores de la superficie celular (Sternlicht, et al., 2001).

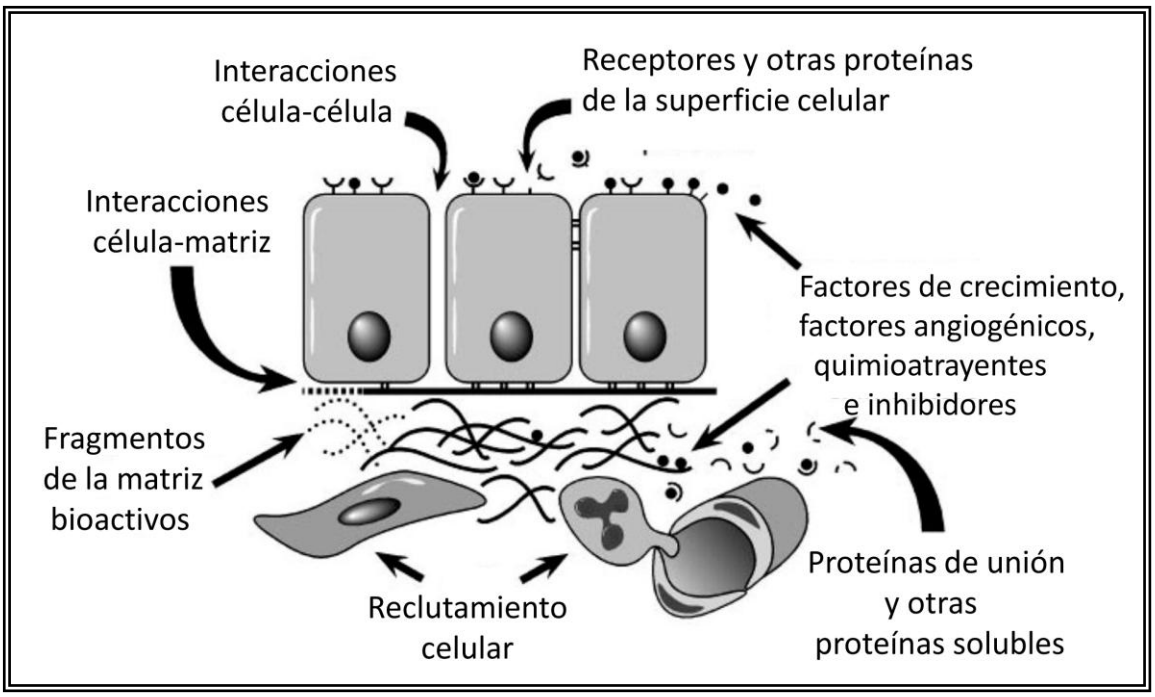

Figura 13. Mecanismos potenciales de la señalización celular mediada por MMPs. (Fuente: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, Annu Rev Cell Dev Biol. (2001) 17:463-516).

En definitiva, las citoquinas activan la expresión de las MMPs, mientras que estas últimas aumentan la inflamación en el tejido. Los TIMPs pueden modular las vías de señalización críticas para la inflamación y el cáncer independientemente de la inhibición de las MMPs (Manicone, et al., 2008).

Varias metaloproteasas, incluídas las gelatinasas, MMP2 (gelatinasa A) y MMP9 (gelatinasa B), están altamente expresadas en tumores de varios orígenes y especies (Liotta, et al., 1980). Ambas degradan componentes de la membrana basal, particularmente colágeno IV, además de una amplia variedad de otras sustancias pericelulares, tales como la laminina y la fibronectina. Las gelatinasas también están involucradas en la degradación del colágeno fibrilar después de su degradación inicial por colagenasas (Lynch, et al., 2002; Sternlicht, et al., 2001).

En tumores de cáncer de mama invasivos, los niveles de estas dos MMPs están asociados con un pronóstico desfavorable (Rouyer, et al., 1994). Es más, en este tipo de tumor, una alta actividad de MMP2 está relacionada con la presencia de metástasis ganglionar y baja supervivencia en estadíos tempranos (Iwata, et al., 1996; Onisto, et al., 1995; Wadowska-

Jaszczynska, et al., 2011), y altos niveles de MMP9 en suero y tejido están asociados con la invasión tumoral y metástasis (Nabeshima, et al., 2002).

Existen otras metaloproteasas asociadas a la progresión tumoral, como la MMP11 (o Estromalisina 3), la cual fue originalmente identificada por su sobreexpresión en carcinomas primarios de mama (Basset, et al., 1990). Esta MMPs tiene como sustratos los colágenos tipo IV, V, IX y X, la laminina, la elastina, la fibronectina, la caseína y proteoglicanos. Durante la tumorogénesis, la función celular de la MMP11 es favorecer la supervivencia de las células cancerosas en el microambiente del estroma por la disminución de la muerte celular de las células tumorales a través de la apoptosis y la necrosis (Boulay, et al., 2001). Es más, la sobreexpresión de la MMP11 ha sido asociada con una mayor agresividad tumoral y un pronóstico desfavorable en cáncer de mama (Ahmad, et al., 1998; Basset, et al., 1997; Chenard, et al., 1996), teniendo una mayor expresión en los carcinomas mamarios invasivos respecto a los carcinomas *in situ* (Ma X. J., et al., 2009).

En algunos tumores humanos, la expresión de MMP11 ha sido observada principalmente en los fibroblastos estromales que rodean a las células epiteliales malignas, lo que sugiere una promoción de la tumorogénesis de una manera paracrina. Además de su expresión por fibroblastos, se ha observado que la expresión de la MMP11 por las CMIs del estroma intratumoral identifica un grupo de tumores con un perfil de expresión elevado de moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio, y que se asocia con un peor pronóstico (Eiro, et al., 2012a).

Los TIMPs son proteínas multifactoriales que pueden inducir la proliferación celular o inhibir la apoptosis, la migración celular, la invasión y la angiogénesis (Jiang Y., et al., 2002; Van Damme, et al., 2004; Wurtz, et al., 2005). El TIMP1 es un factor de gran interés ya que juega un papel en la invasión tumoral y la angiogénesis. Por un lado, TIMP1 inhibe las MMPs, y así puede influir en el crecimiento tumoral y la invasión. Por otro lado, ha sido demostrado que TIMP-1 puede promover el crecimiento celular,la tumorogénesis y la angiogénesis, e inhibir la apoptosis en

varios tipos celulares, incluyendo líneas celulares de cáncer de mama (Alexander, et al., 1996; Bigelow, et al., 2009; Hayakawa, et al., 1992; Li G., et al., 1999; Liu, et al., 2003).

De esta forma, numerosos estudios han demostrado una asociación entre una alta expresión de TIMP1 en el tumor y un mal pronóstico. Esta asociación ha sido descrita en varios tumores, incluyendo cáncer de mama, de colon y de pulmón entre otros (Castello, et al., 2002; Gouyer, et al., 2005; Kuvaja, et al., 2008; Lipton, et al., 2007; Lipton, et al., 2008; McCarthy, et al., 1999; Nakopoulou, et al., 2002a; Ree, et al., 1997; Schrohl, et al., 2003; Schrohl, et al., 2004; Wurtz, et al., 2008b). Se ha observado también que el TIMP1 reduce la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con quimioterapia *in vitro* (Wurtz, et al., 2008b).

Todos estos datos apoyan el uso potencial de TIMP1 como un biomarcador predictivo para la respuesta terapéutica en pacientes y la supervivencia al cáncer (Wurtz, et al., 2008b).

Objetivos

1.- Analizar la expresión de factores relacionados con la interrelación tumor/estroma e implicados en la promoción del crecimiento tumoral en los fibroblastos normales próximos al tumor (NAFs) y los fibroblastos asociados a tumor (CAFs).

2.- Determinar el perfil molecular de los NAFs y los CAFs según las características clínicas clásicas.

3.- Analizar el perfil molecular de los NAFs y los CAFs según el pronóstico por la clasificación por la expresión de MMP11 en las células mononucleares inflamatorias (CMIs).

4.-Estudiar la influencia de las líneas celulares de cáncer de mama de distintos grados de agresividad sobre el perfil molecular de los CAFs.

5.-Estudiar la influencia de los CAFs sobre el perfil molecular de las líneas celulares de cáncer de mama de distintos grados de agresividad.

6.-Evaluar la influencia de los CAFs sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares de cáncer de mama.

Material y métodos

I. Selección de pacientes

Se seleccionaron muestras tumorales de 20 mujeres diagnosticadas con cáncer ductal invasivo de mama de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión descritos seguidamente. De 10 de las 20 pacientes incluidas en el estudio se obtuvieron también muestras de tejido mamario no tumoral localizados al menos a 2 cm del tumor.

Criterios de inclusión: en el presente estudio se han incluido pacientes con diagnóstico histológico probado de cáncer ductal infiltrante de mama mediante estudio de biopsia con aguja gruesa. En este grupo de pacientes establecimos, además, los siguientes criterios de inclusión: a) firma del consentimiento informado específico para participar en el estudio por parte de la paciente o de su representante legal; b) tumores de tamaño T1 (<2 cm) o T2 (2-5 cm); c) disponibilidad de suficiente muestra tisular del cáncer de mama, después de reservar aquella necesaria para los estudios anatomo-patológicos de rutina.

Criterios de exclusión: se han excluido de este estudio las pacientes que han cumplido alguno de los siguientes puntos: a) historia anterior de neoplasias, a excepción de: cáncer de piel no-melanoma, carcinoma de cérvix uterino “in situ”, carcinoma ductal “in situ” o lobulillar “in situ” de mama; y b) pacientes que hayan recibido algún tipo de tratamiento antineoplásico previo a la cirugía.

Este estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación de la Fundación Hospital de Jove y por el Comité Ético de ensayos clínicos del Principado de Asturias.

II. Clasificación de los tumores

Los casos fueron clasificados en dos grupos, en cuanto a su agresividad biológica basada en la clasificación taxonómica estándar (grado de diferenciación histológico SBR y HER2) y también en cuanto a la clasificación de nuestro Grupo de investigación basada en un fenotipo

altamente metastásico caracterizado por la elevada expresión de MMP11 en las CMIs (Gonzalez L. O., et al., 2010a; Gonzalez L. O., et al., 2007; Vizoso, et al., 2007). Así, en cuanto a nuestra clasificación, tanto los NAFs (fibroblastos normales próximos al tumor) como los CAFs (fibroblastos asociados a tumor) fueron divididos según procediesen de tumores con la MMP11 positiva o negativa por las CMIs.

III. Tinción inmunohistoquímica

Para realizar la clasificación de los tumores en base a la expresión de MMP11 en las CMIs se realizaron tinciones inmunohistoquímicas de las muestras tumorales a estudio. Así mismo, la confirmación de la expresión proteica de los factores más significativamente diferenciales entre los CAFs y entre los NAFs divididos según la expresión de MMP11 en CMIs, se realizó también por este tipo de tinción.

Las muestras de tejidos se fijaron en formol tamponado al 4% durante un mínimo de 24h. Posteriormente, se realizó un estudio macroscópico, incluyendo en parafina las secciones representativas para el diagnóstico anatomo-patológico. Para su inclusión en parafina se llevó a cabo el siguiente proceso: Formol 15'- Alcohol 70% 30'- 70% 30'- 96% 30'- 96% 30'- 100%ºC 30'-100% 30'- 100% 45'- Xilol 60'- Xilol 60'-Xilol 60'.

Tras la obtención de los bloques de tejido y con la ayuda de un microtomo (Leica Micosystems GmbH, Wetzlar, Alemania), se cortaron las muestras a un grosor de 3 µm que fueron colocadas sobre laminillas. Sobre estas secciones se realizó el estudio inmunohistoquímico, utilizando para ello anticuerpos específicos frente a las diferentes proteínas a estudio en cada caso: MMP11, S100A4, HGF, FGF2, IL8, CXCL12, VEGFA y TIMP1 (Tabla 2).

Previo a la inmunotinción se realizó el desparafinado y desenmascaramiento antigénico. Para el desparafinado las secciones fueron introducidas en Xilol durante un tiempo no inferior a 30 minutos, y posteriormente re-hidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol etílico

(100%, 96%, 80%, 70% y posteriormente en solución acuosa) durante 3 min. cada uno, y por último en tampón de lavado (Tris tampón salino con Tween 20) durante 5 min. Algunas de las muestras fueron sometidas a desenmascaramiento antigénico por calor utilizando, según el anticuerpo, tampón citrato a pH6 o el tampón Tris-HCL (Trimetilaminometano con ácido clorhídrico) a pH9.

Las laminillas con los cortes se introdujeron en los contenedores especiales del teñidor automático, dónde se realizó la técnica inmunohistoquímica siguiendo estos pasos: a) lavado en tampón ; b) bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min.; c) incubación con anticuerpo primario (según el anticuerpo usado) (Tabla 2); d) 2 lavados en tampón de lavado (Wash Buffer, Dako) para eliminar el exceso de anticuerpo; e) incubación de los cortes con un sistema de polímeros de dextrano durante 30 min. (EnVision^{TM} Detection Kit, Dako), el cual 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); f) 2 lavados con tampón de lavado; g) visualización del marcaje inmunohistoquímico con tetraclorhidrato de diaminobencidina (Hamajima, et al.) (Dako) durante 5 min (repetición de los pasos f y g).; h) contratinción con hematoxilina de Harris durante 2 min. y finalmente, i) lavado con tampón de lavado deshidratación con concentraciones crecientes de alcoholes y montaje con la ayuda de un montador automático para su posterior observación al microscopio óptico Olympus BX51.

Con el objetivo de amplificar en mayor medida la señal en algunas de las tinciones, fue utilizado un protocolo similar al anterior, pero con la introducción de un *linker* (EnVisionTM Flex Mouse, DAKO) (Tabla 2), capaz de amplificar la unión del anticuerpo y la consiguiente señal. Así, en la técnica inmunohistoquímica antes descrita, se incluye una incubación con el *linker* (durante 15 minutos) tras la del anticuerpo primario y se utiliza un sistema de visualización específico (EnVisionTM FLEX/HRP, DAKO, durante 30 minutos) antes de la incubación con el cromógeno DAB.

Se incluyeron controles negativos y positivos para asegurar la especificidad de la técnica.

Estas secciones fueron observadas por el patólogo, que determinó la positividad o no de las CMIs para cada factor a estudio.

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Dilución del Ac	Tiempo incubación	Uso de Linker	Casa comercial (referencia)
MMP11	No Tto	1:400	60´	No	Neomarker (MS-1035)
S100A4	pH 6	1:200	30´	No	Santa Cruz (sc-377059)
HGF	pH 9	1:100	60´	Sí	Santa Cruz (sc-37442)
FGF2	pH 6	1:40	60´	No	R&D Systems (AF-208-NA)
IL8	No Tto	1:20	60´	No	R&D Systems (AF-233-NA)
CXCL12	pH 9	1:20	60´	Sí	Santa Cruz (sc-28876)
TIMP1	pH 6	1:100	60´	Sí	Neomarker (MS-608)

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica.

IV. Cultivos celulares

IV.1 Líneas celulares

Se han utilizado dos líneas celulares de tumores mamarios humanos de diferente agresividad procedentes de la ATCC (American Type Culture Collection): MCF7, de menor agresividad (receptores hormonales positivos) y MDA-MB-231, de mayor agresividad (receptores hormonales negativos).

La línea celular MCF7 fue cultivada usando medio Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) F-12 (Lonza, ref. BE12-719F), mientras que la línea celular MDA-MB-231 fue cultivada con medio DMEM alto en glucosa (Sigma, ref. D6429). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS) (PAA, ref. A15-151) y 1% penicilina-estreptomicina (Gibco, ref. 15140). Se mantuvieron en incubadores con condiciones estándar de 37ºC de temperatura en atmosfera húmeda (95%) y un 5% CO_2.

IV.2 Obtención de cultivos primarios y cultivo de fibroblastos

Tras la obtención de las muestras procedentes de tejido mamario, éstas se almacenaban en DMEM F-12 con 1% de penicilina/estreptomicina siendo procesadas en un máximo de 48 horas después de su extracción. Los CAFs fueron obtenidos a partir de las muestras tumorales, mientras que los NAFs fueron obtenidos del tejido mamario no tumoral localizado al menos a 2 cm del tumor, a partir de las muestras de las mismas pacientes que en el caso de los CAFs.

Las muestras fueron disgregadas mecánicamente hasta conseguir explantes de 1mm de diámetro aproximadamente, y posteriormente colocadas en placas de cultivo celular de seis pocillos (Costar, ref. 3516), donde previamente se había puesto un medio de cultivo DMEM F-12 con 10% FBS y 1% penicilina-estreptomicina.

Posteriormente, se llevo a cabo la disgregación enzimática mediante la adición de Colagenasa A (Roche, ref. 10103586001) a una concentración final de 1 mg/ml en cada uno de los pocillos. La incubación fue realizada durante 48 horas a 37ºC en el incubador.

Tras la digestión, las muestras fueron centrifugadas a 1400 rpm durante 5 min y, posteriormente, sembradas en la misma placa donde se realizó la disgregación. El medio de cultivo utilizado para su propagación fue DMEM F-12 suplementado con 10% de FBS, 1% penicilina-estreptomicina, insulina (Gibco, ref. 12585-014) a una concentración final de 5

µg/ml, hidrocortisona (Sigma, ref. H2270) a una concentración final de 1 µg/ml y EGF (Invitrogen, ref. PHG0311) a una concentración final de 5 ng/ml.

Los primeros días tras la disgregación de la muestra, se observaba en el cultivo una mezcla de células con morfología epitelial más redondeadas, junto con otras de morfología fibroblastoide más alargadas. A medida que se continuaba con el cultivo de las muestras, las células de tipo epitelial iban desapareciendo y siendo sustituidas por las más alargadas y con aspecto de fibroblastos, lo que posteriormente sería confirmado por citometría de flujo.

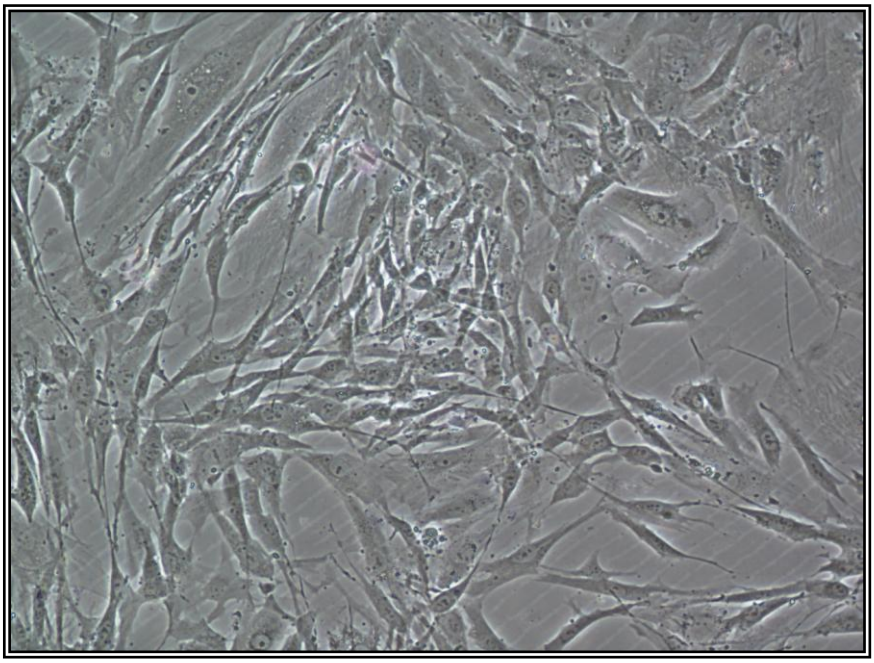

Figura 14: Cultivo de fibroblastos de carcinoma mamario (40x)

V. Confirmación de la pureza de los cultivos de fibroblastos

La comprobación de la pureza de los cultivos de fibroblastos (ausencia de células epiteliales) se realizó mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo primario CD90 clon AS02 (Dianova, ref CP28-200UG), el cual es específico de fibroblastos (Kisselbach, et al., 2009; Saalbach, et al., 1996). Previo a su utilización en los cultivos de carcinoma mamario a estudio,

se confirmó la especificidad de este anticuerpo mediante la tinción inmunohistoquímica de los cultivos de fibroblastos con desmina, vimentina y α-actina (Tabla 3), siendo éstos positivos para los dos últimos factores (Figura 15). Así mismo, la tinción positiva de α-actina en un alto porcentaje de los fibroblastos implica que muchos de los mismos habrían adquirido un fenotipo de miofibroblastos (fibroblastos activos). Éstos representan una subpoblación de fibroblastos con un fenotipo similar al de las células del músculo liso, debido a que expresan α-actina del músculo liso en su citoesqueleto y desempeñan una participación muy importante durante la embriogénesis, organogénesis, inflamación, reparación y cicatrización. Además, este tipo celular resulta fundamental en los diferentes procesos de regeneración y reparación (fibrosis) que ocurren en los distintos órganos (Cassiman, et al., 2002; Desmouliere, 1995; Kalluri, et al., 2003; Phan, 2002).

Anticuerpo primario	**Recuperación antigénica**	**Dilución del Ac**	**Tiempo incubación**	**Casa comercial (referencia)**
Vimentina	pH6	1:100	30´	Dako (M7020)
α-actina	pH9	Listo para uso	30´	Dako (IS611)
Desmina	pH6	Listo para uso	30´	Dako (IS606)

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica.

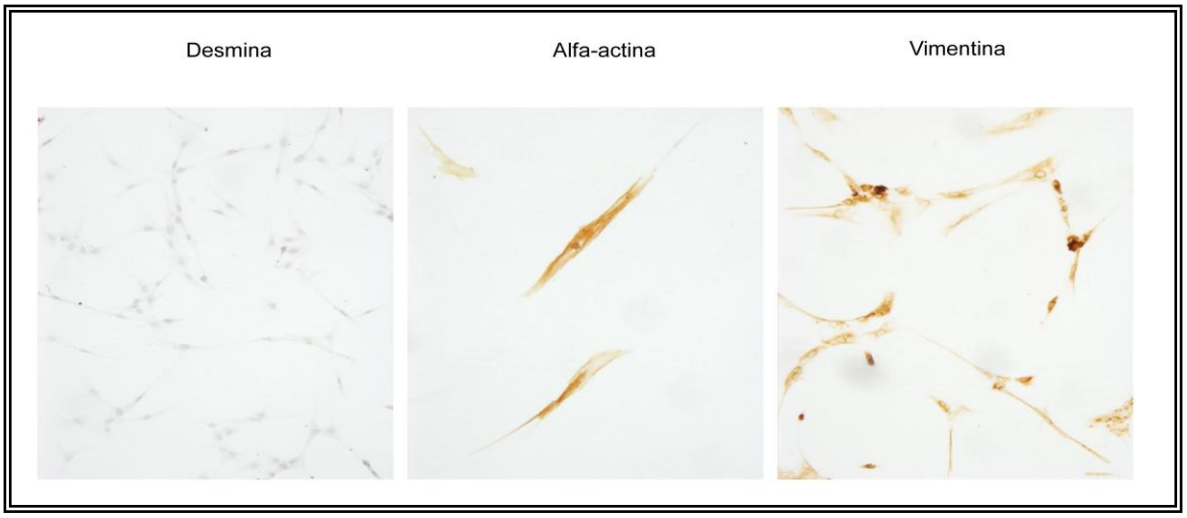

Figura 15. Ejemplos de tinción inmunohistoquímica de cultivos de fibroblastos de muestras de mama (200X).

Tras la confirmación de la especificidad del anticuerpo CD90 AS02, se llevo a cabo la confirmación de la pureza de los cultivos de fibroblastos mediante citometría de flujo. Para ello, las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS 1x (tampón fosfato salino) y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario CD90 clon AS02 a una dilución de 1:50 (4 µg/ml) durante 45 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS 1x y la incubación con el anticuerpo secundario (RnD, ref. 0103) durante 30 minutos. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo "Analizador Celular Cytomics FC500" (Beckman Coulter).

Los resultados de citometría muestran que en las poblaciones celulares a estudio, al menos el 80% de las células estaban marcadas, lo que implica que estas células expresan el antígeno CD90, confirmando así que son fibroblastos.

Estos datos, que coincidieron con los resultados de la tinción inmunohistoquímica utilizada para la confirmación de la pureza de los cultivos de fibroblastos, confirman que la obtención de los cultivos primarios de fibroblastos llevada a cabo mediante el cultivo de las muestras, fue adecuado.

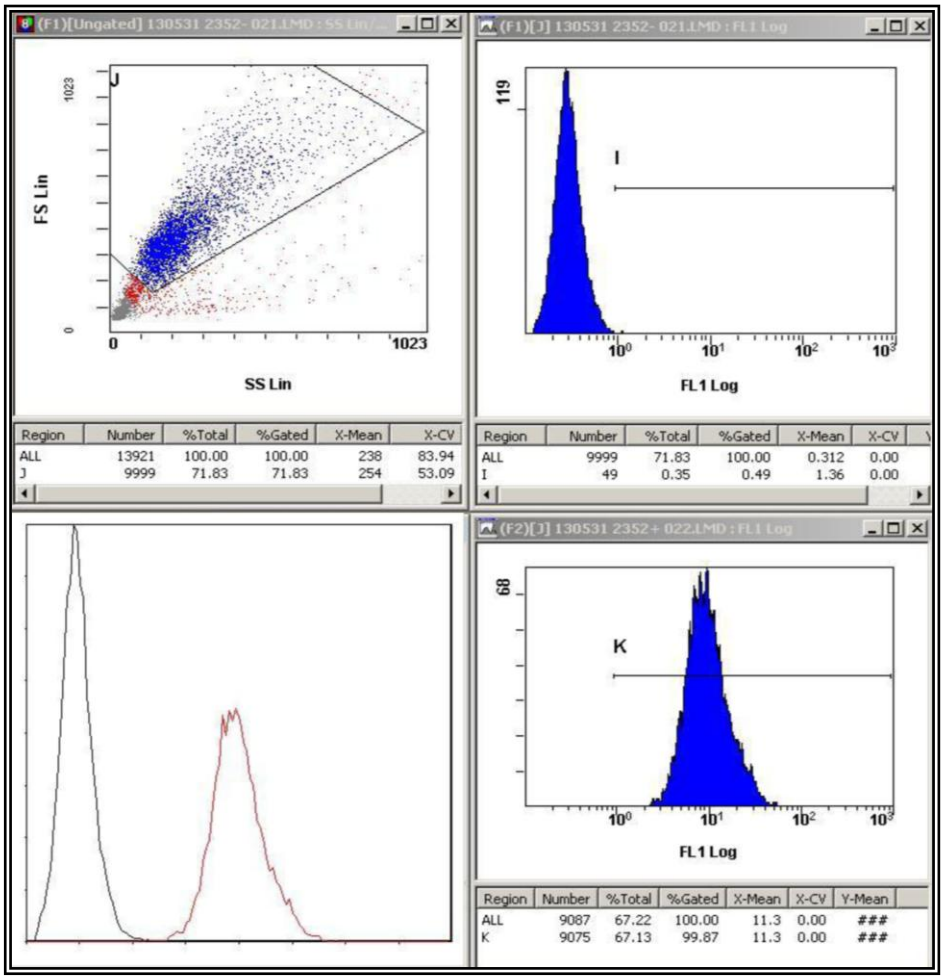

Figura 16. Ejemplo del análisis por citometría de flujo de una población de fibroblastos de carcinoma de mama. En la parte superior de izquierda a derecha se muestra una selección de la población celular según el tamaño (Sell, et al.) y la complejidad celular (SS) y el control negativo de la muestra a estudio. En la parte inferior se muestra la superposición del control negativo y la muestra con expresión positiva para CD90 y un ejemplo de una muestra con expresión positiva para CD90.

VI. Co-cultivos

Para la realización de los co-cultivos se utilizaron placas de cultivo de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific, ref. 10380932) en los que se sembraron los distintos cultivos primarios de las muestras de mama, e insertos de 0.24 µm de diámetro de poro (Nunc, ref. N68404018) en los que se sembraron las líneas celulares comerciales de cáncer de mama, MCF7 o MDA-MB-231.

Se procedió al contaje celular de los fibroblastos, sembrando $2x10^4$ células en los pocillos de la placa. Posteriormente, se realiza el mismo contaje con ambas líneas celulares comerciales de mama, sembrando $2x10^4$ células en cada uno de los insertos. Cada línea celular es co-cultivada por duplicado con cada una de las muestras.

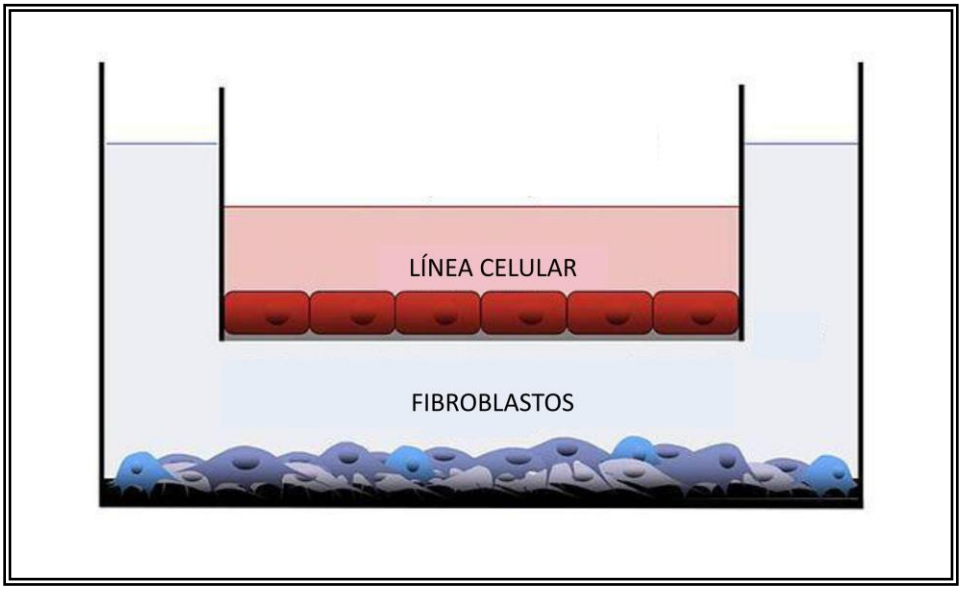

Figura 17. Modelo de co-cultivo *in vitro*.

El medio utilizado para los co-cultivos fue DMEM F-12 suplementado con 10% de FBS y 1% penicilina-estreptomicina. Se cultivaron en los incubadores en condiciones estándar de 37°C en atmósfera húmeda (95%) y un 5% CO_2 durante 72 horas; tras este tiempo, las muestras fueron tripsinizadas para posteriormente realizar la extracción de su ARN (ácido ribonucleico).

VII. Extracción del ARN

Tras eliminar el medio de la placa de cultivo, se procedió a la tripsinización de las células; tras ser recogidas, las células fueron centrifugadas a 1400 rpm durante 5 min. Todo el proceso posterior fue realizado con el "Rneasy Mini Kit" (Qiagen, ref. 50974104), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras fueron resuspendidas en 350µl de tampón RLT; a partir de este momento se continua con el protocolo del producto: a) a las células sumergidas

en el tampón RLT se le añadió etanol al 70% en un volumen 1:1; b) la mezcla se pasó a través de una columna mediante centrifugación a 8000g durante 15 seg; c) se añadieron 700 µl de tampón de lavado y se centrifugó 15 seg a 8000g; d) se añadió 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 seg a 800g; e) se incubó con 10 µl Dnasa y 70µl tampón RDD durante 30-45 min a temperatura ambiente; f) se añadió 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 seg a 8000g; g)se añadió 500 µl de tampón RPE y se centrifugó durante 15 seg a 8000g; g) el ARN se eluyó añadiendo a la columna 20 µl de agua libre de ARNasa y centrifugando durante 1 min a 8000g.

La concentración y la calidad del ARN extraído, se comprobó mediante espectofotometríacon un espectofotometro NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Wilmington, US) (Figura 18). La relación de absorbancias 260/280 nm fue utilizada como índice de calidad.

Por último, las muestras de ARN fueron almacenadas a -80ºC hasta su uso.

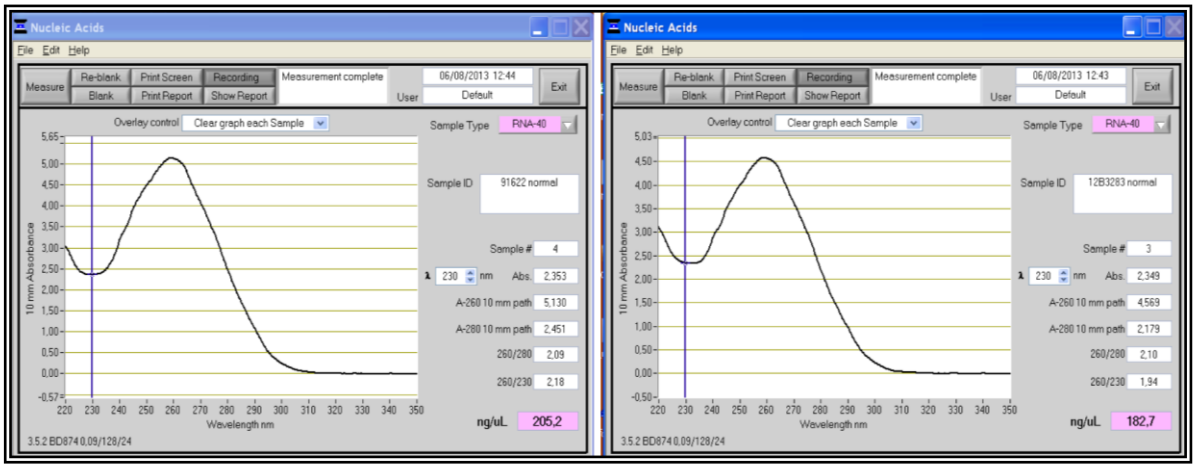

Figura 18. Captura de imagen del espectofotometro NanoDrop® para analizar los la calidad del ARN extraído.

VIII. Síntesis del cDNA

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de ADN monocatenario o complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN monocatenario catalizada por la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo esta reacción se utilizó el Kit comercial "Transcriptor First Strand ADNc Síntesis Kit" (Roche, ref. 4896866001), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se preparó la mezcla de 10 µl de ARN (20 ng/µl) con 1 µl de oligo dT (100mM) y 2 µl de hexámeros *random* (600 pmol/ µl). La reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización a 65° C durante 10 min. en un termociclador convencional. Una vez terminada la incubación se colocó inmediatamente en hielo para evitar su renaturalización.

Posteriormente se agregaron 4 µL del *tampón de reacción* (5X), 0,5 µL de inhibidor de nucleasas de ARN (40 U/µl), 2 µl de la mezcla de desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) (10mM) y 0,5 µL de enzima transcriptasa reversa (20 U/µl).

La mezcla se incubó bajo las siguientes condiciones: 10 min. a 25ºC, 120 min. a 37ºC, 5 min. a 85ºC y finalmente a 4ºC hasta su uso.

IX. PCR a tiempo real

Para la realización de las PCRs a tiempo real se utilizaron placas customizadas (Roche, ref. 5532914001). Los genes utilizados en el diseño de la placa aparecen especificados en la Tabla 4, siendo los genes de referencia β-actina, GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y SDHA (Succinato deshidrogenasa subunidad A).

Gen	Referencia
S100A4	110779
TGFβ	101210
HGF	108357
bFGF	118274
FGF7	113109
PDGFA	110648
PDGFB	110713
uPA	109571
IL6	113614
IL8	103136
CXCL12	110618
CCL2	141156
NFkB	100646
MMP2	103899
MMP9	139820
MMP11	103163
TIMP1	103847
VEGFA	140392
IGF2	113548
GAPDH	101128
β-ACTINA	101125
SDHA	102136

Tabla 4. Referencias de los genes utilizados para el estudio.

Se utilizó un termociclador LigthCycler 480 (Roche). Cada una de las reacciones fue preparada con la mezcla de 10 µl de ADNc y 10 µl de LightCycler® 480 Probes Master (Roche, 4887301001). Posteriormente, el termociclador fue programado de acuerdo a las siguientes condiciones:

1. Preincubación: 10 min a 95°C
2. 45 ciclos de amplificación, cada uno consistente en:
    a. Desnaturalización: 10 seg a 95°C
    b. Anillamiento: 30 seg a 60°C
    c. Extensión: 1 seg a 72°C
3. Enfriamiento: 30 seg a 40ºC

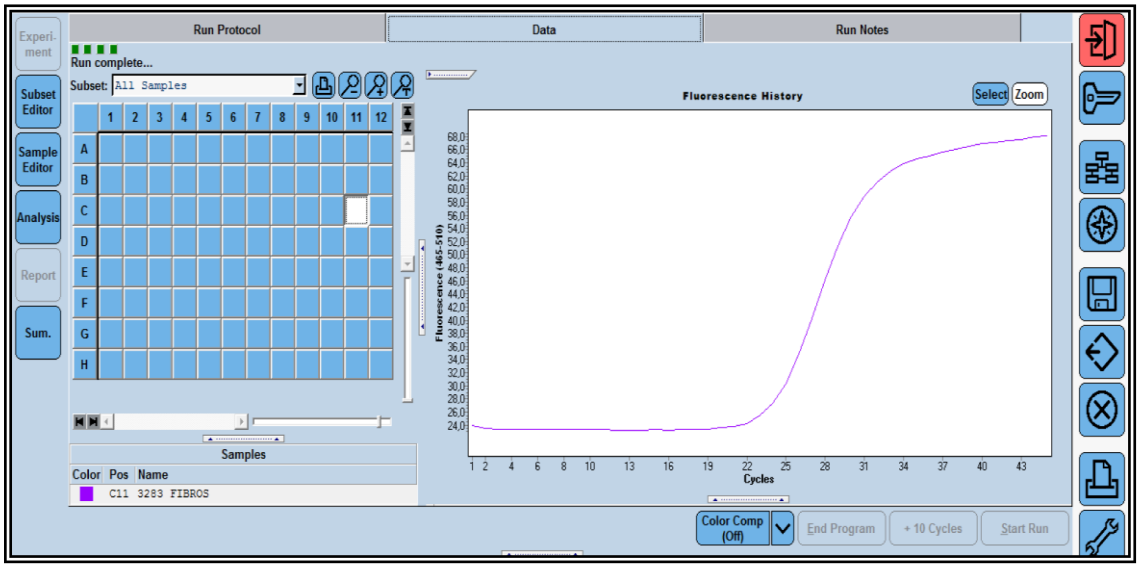

Figura 19. Captura de imagen del termociclador LigthCycler 480 (Roche) para analizar los resultados obtenidos por PCR semicuantitativa.

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica, se seleccionó el método de cuantificación relativa avanzada, en el cual el punto de corte o *crossing point* (Cp), que corresponde a la fracción de número de ciclo en el que la fluorescencia generada sobrepasa la

línea umbral, se calcula automáticamente mediante el software LightCycler como el primer máximo de la segunda derivada de la curva. Para ello se utilizó la combinación de los genes de referencia SDHA y β-actina, ya que de acuerdo con el estudio realizado por *Gur-Dedeoglu B. y col.* (2009) (Gur-Dedeoglu, et al., 2009), el uso combinado de estos genes como factores de normalización minimiza la variabilidad de la muestra y aumenta la precisión y la resolución de la normalización de la expresión génica en estudios de cáncer de mama.

X. Ensayos de invasión

La determinación de la invasión celular se llevó a cabo mediante el análisis del número de células que fueron capaces de atravesar una fina capa de Matrigel. Para los ensayos de invasión se utilizaron cámaras de invasión BD Biocoat Matrigel^{TM} (Cultek, ref. 45354480). Las líneas celulares utilizadas para estos ensayos fueron MCF7 y MDA-MB-231.

Para ello se sembraron $2x10^4$ células de los cultivos de fibroblastos en medio DMEM F-12 suplementado con 3% de FBS a 37ºC en placas de 24 pocillos durante 48 horas. Este medio fue recogido y separado según los cultivos de fibroblastos pertenecieran al grupo de tumores con la MMP11 negativa o positiva en las CMIs, utilizándose como quimioatrayente en los ensayos de invasión, por lo que este medio se puso en la parte inferior de las cámaras de invasión. Se utilizó, además, un control para cada una de las líneas, en los cuales el medio utilizado como quimioatrayente no había estado en contacto previo con ninguno de los cultivos. En la parte superior de las cámaras de invasión se sembraron $2x10^4$ células, las cuales fueron incubadas durante 48 horas en medio DMEM F-12 suplementado con 1% de FBS a 37ºC. Cada uno de los ensayos fue realizado por duplicado.

Tras la incubación, las células que no habían invadido la membrana se retiraron con un bastoncillo de algodón, y los filtros fueron fijados con 10% Acético / 10% Metanol durante 15 min. a temperatura ambiente y teñidos con una solución de 1% cristal violeta (Thermo Fisher

Scientific, ref. 10626621)/ 20% etanol durante 15 min. Finalmente, se contó el número de células que había invadido la membrana en un microscopio invertido a 40x aumentos, en 10 áreas diferentes seleccionadas al azar para cada uno de los ensayos.

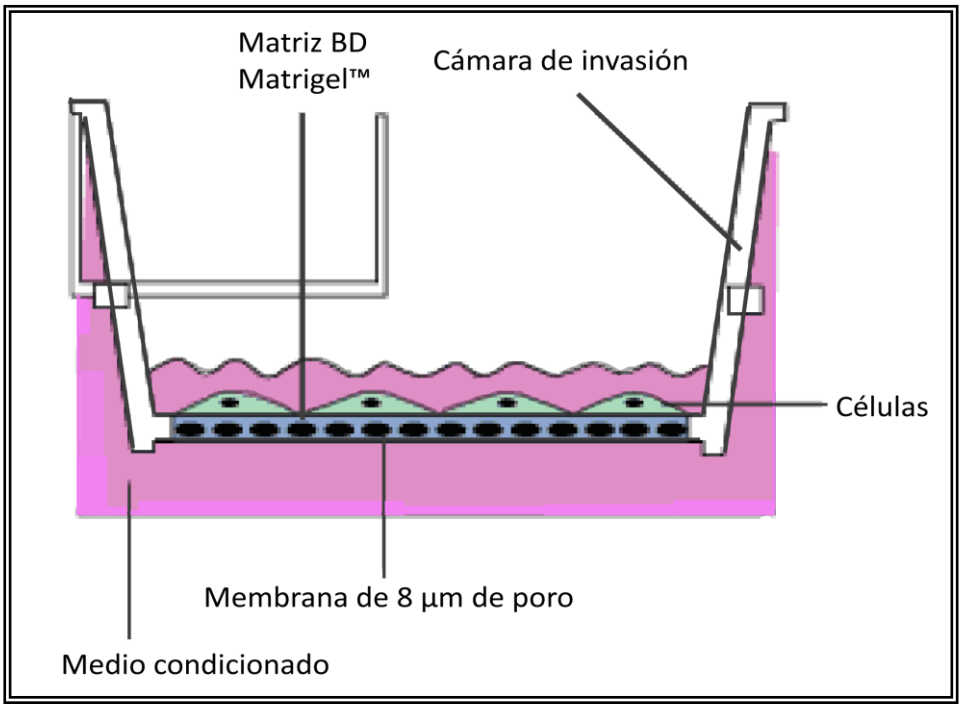

Figura 20. Modelo de ensayo de invasión con BD Biocoat Matrigel™.

XI. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de PCR y de los ensayos de invasión, el primer paso fue comprobar si los datos seguían una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En los casos de comparación de dos muestras poblacionales independientes, tanto para los resultados de PCR como los ensayos de invasión se aplicó la prueba t-Student si dichas poblaciones seguían una distribución normal, confirmando además la homogeneidad de la distribución de varianzas mediante la prueba de Levene. Si la distribución resultaba ser no normal, se llevaron a cabo pruebas no paramétricas. La prueba U de Mann-Withney permitió afirmar si las diferencias de las medianas eran significativas o no en dichos casos.

Para los casos de comparación de más de dos muestras poblacionales, se realizó el test de Anova en aquellos casos en los que las poblaciones seguían una distribución normal, y Kruskal-Wallis en los casos en que la distribución no cumplía esa condición.

Se utilizó el programa SPSS 19.0 para realizar los cálculos estadísticos. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de *p* era igual o inferior a 0,05.

Resultados

I. Clasificación de las muestras según la expresión de MMP11 en las CMIs

En este estudio se incluyeron 20 pacientes con cáncer de mama que fueron clasificados en grupos de mejor o peor pronóstico según la expresión de la MMP11 en las CMIs. Para ello se realizaron tinciones inmunohistoquímicas de las muestras a estudio, confirmando que 8 de las muestras mostraban tinción positiva para MMP11 en las CMIs (grupo de mal pronóstico) y las 12 restantes eran negativas (grupo de buen pronóstico).

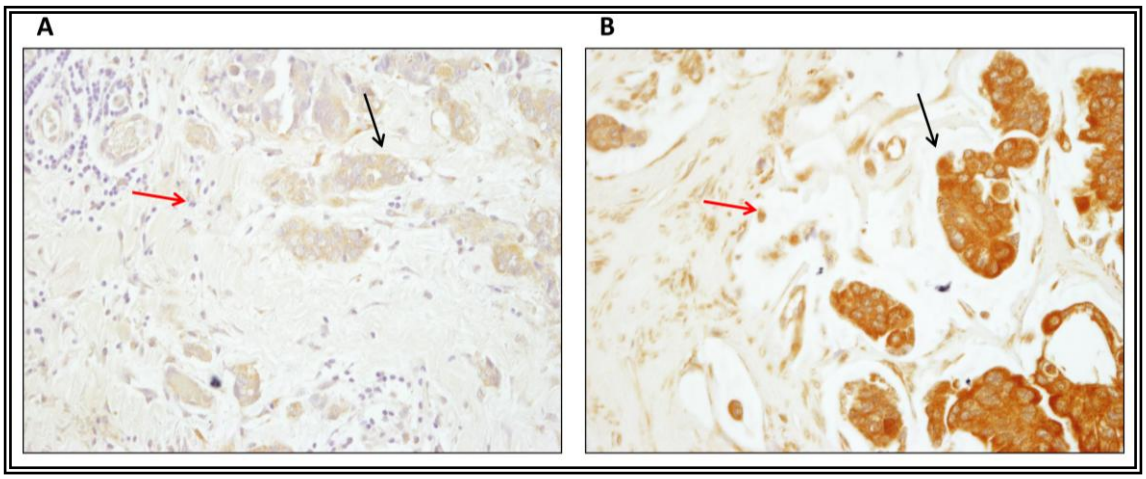

Figura 21. Ejemplos de tinción inmunohistoquímica de la proteína MMP11 en muestras de carcinoma mamario (200X). (A) Tinción negativa para MMP11; (B) Tinción positiva para MMP11, donde se pueden observar monocitos (flecha roja) y células tumorales (flecha negra) con tinción positiva para esta MMP.

II. Evaluación de las diferencias de expresión de los factores a estudio en toda la población

II.1 Evaluación del perfil molecular de los NAFs y los CAFs asociados.

Inicialmente, se analizaron las diferencias de expresión entre los NAFs y los CAFs procedentes de las muestras de carcinoma mamario mediante PCR a tiempo real. Como muestra la Figura 22, se encontraron diferencias significativas entre los perfiles moleculares de ambas poblaciones de fibroblastos. Los NAFs muestran una expresión significativamente mayor de S100A4, TGFβ, PDGFB, FGF2 y TIMP1, comparado con los CAFs. Sin embargo, los CAFs muestran una expresión significativamente mayor de FGF7, IL6, CCL2, MMP2, MMP9 y MMP11, en comparación con los NAFs.

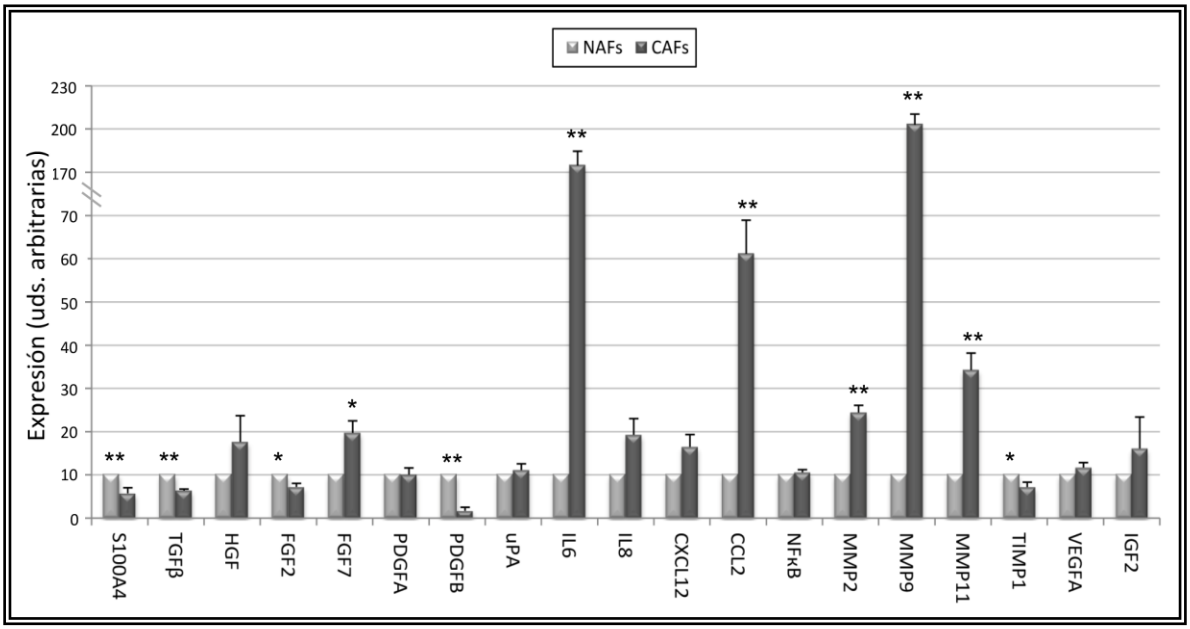

Figura 22. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio entre los NAFs y los CAFs asociados. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los NAFs. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

II.2 Evaluación del perfil molecular de los CAFs co-cultivados con líneas celulares de cáncer de mama.

Una vez estudiado el perfil molecular de los CAFs, se analizó la influencia en sus niveles de expresión del co-cultivo con las distintas líneas celulares de cáncer de mama de distinta agresividad mediante PCR a tiempo real. Los resultados muestran que los CAFs co-cultivados con la línea tumoral MCF7 (Figura 23), la cual posee un bajo potencial metastásico, presentan una mayor expresión de TGFβ, HGF, IL8, MMP2 y VEGFA, mientras que los niveles de CCL2, NFκB y MMP11, se redujeron en comparación a los niveles basales de los CAFs.

En el caso de los CAFs co-cultivados con la línea tumoral de alto poder metastásico MDA-MB-231, (Figura 24) muestran una mayor expresión de S100A4, TGFβ, HGF, IL6, IL8, MMP2 y VEGFA, mientras que la expresión de PDGFA, CCL2 y NFκB fue menor en comparación con la expresión basal de los CAFs.

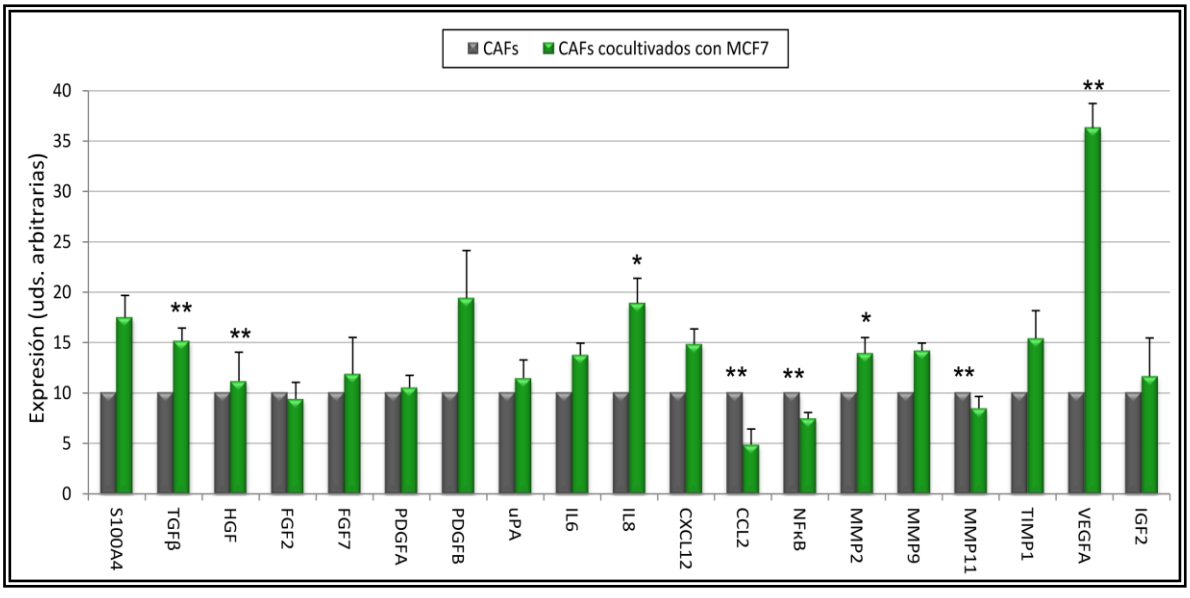

Figura 23. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores entre los CAFs y los CAFs co-cultivados con la línea tumoral MCF7. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

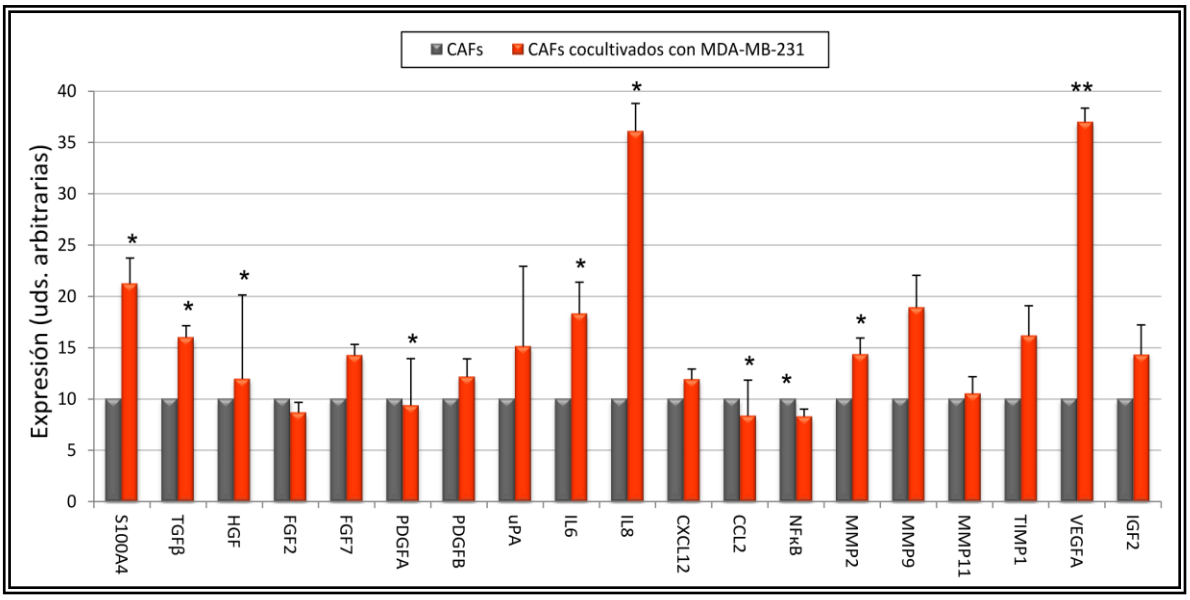

Figura 24. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores entre los CAFs y los CAFs co-cultivados con la línea tumoral MDA-MB-231. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

II.3 Evaluación del perfil molecular de las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231 y) co-cultivadas con los CAFs.

Así mismo, se evaluó la influencia que tiene en los niveles de expresión de las líneas celulares de cáncer de mama, el co-cultivo con los CAFs. Los resultados obtenidos tras el análisis de PCR a tiempo real mostraron que en la línea celular MCF7 co-cultivada con los CAFs (Figura 25) se producía un incremento significativo de varios de los factores estromales estudiados (S100A4, TGFβ, FGF2, FGF7, PDGFB, uPA, IL6, IL8, MMP2, MMP11, TIMP1, VEGFA e IGF2), respecto a sus niveles basales, así como una disminución de la expresión de PDGFA y CXCL12.

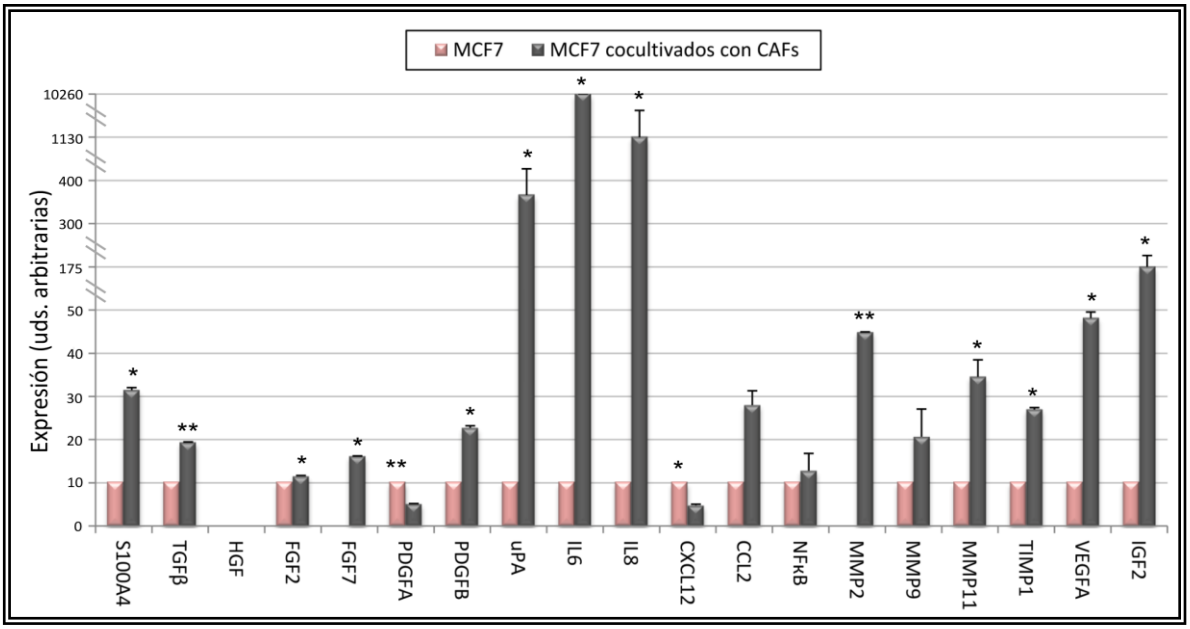

Figura 25. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio en la línea tumoral MCF7 sola o co-cultivada con los CAFs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en la línea MCF7 sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

En el caso de la línea celular MDA-MB-231, se observó (Figura 26) un incremento significativo de S100A4, TGFβ, FGF7, PDGFA, PDGFB, uPA, IL6, IL8, MMP2, MMP9, MMP11, TIMP1 y VEGFA, respecto a sus niveles basales, en cambio, no se observó la disminución en la expresión de ninguno de los factores a estudio.

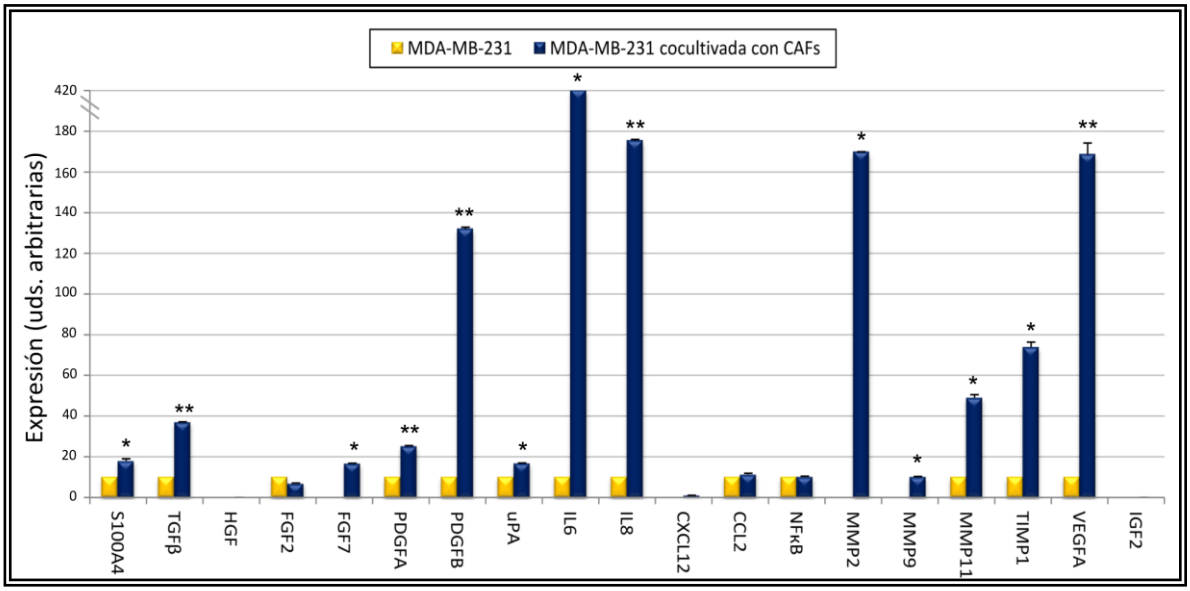

Figura 26. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio en la línea tumoral MDA-MB-231 sola o co-cultivada con los CAFs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en la línea MDA-MB-231 sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

III. Evaluación de las diferencias de expresión de los factores a estudio en el perfil molecular de los CAFs, según la clasificación de los tumores.

Se analizó la posible existencia de variabilidad en los resultados al agrupar a los tumores según las características intrínsecas del tumor o las características del estroma. Para ello, se realizó el análisis de los niveles de expresión de los CAFs agrupando los casos según el grado de diferenciación histológico SBR, según la afectación del ganglio centinela, o según la expresión de HER2. En cuanto la reclasificación según la expresión de HER2, el análisis no se pudo realizar debido a que el número de casos positivos era muy bajo (n=2) para poder considerarlo como una representación significativa de la población a estudio.

III.1 Reclasificación de los tumores según el grado de diferenciación histológico SBR

Como se muestra en la Figura 27 los NAFs de tumores que poseen un grado de diferenciación histológico SBR I-II tienen niveles significativamente más elevados de PDGFB, uPA, MMP9 e IGF2, en comparación con los tumores con grado SBR III.

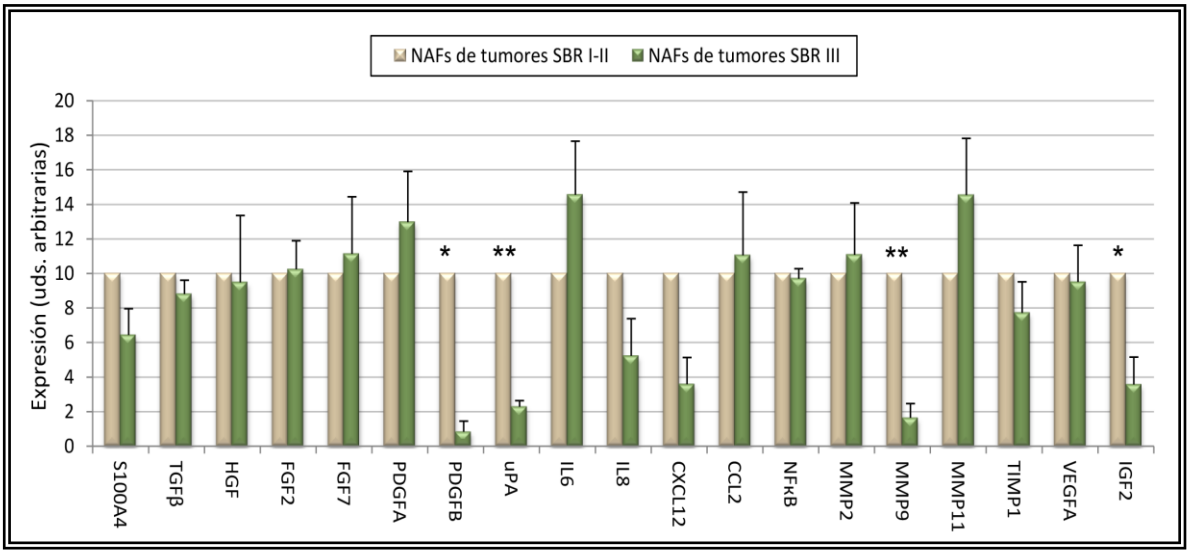

Figura 27. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio entre los NAFs de tumores con grado histológico SBRI o SBRII, respecto a los NAFs de tumores con grado histológico SBRIII. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los NAFs de tumores con SBRI o SBRII. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

En el caso de los CAFs, se observó (Figura 28) una mayor expresión significativa de IL6, MMP11 e IGF2, en los CAFs de tumores que poseen un grado de diferenciación histológico SBR I-II, respecto a los CAFs con SBRIII.

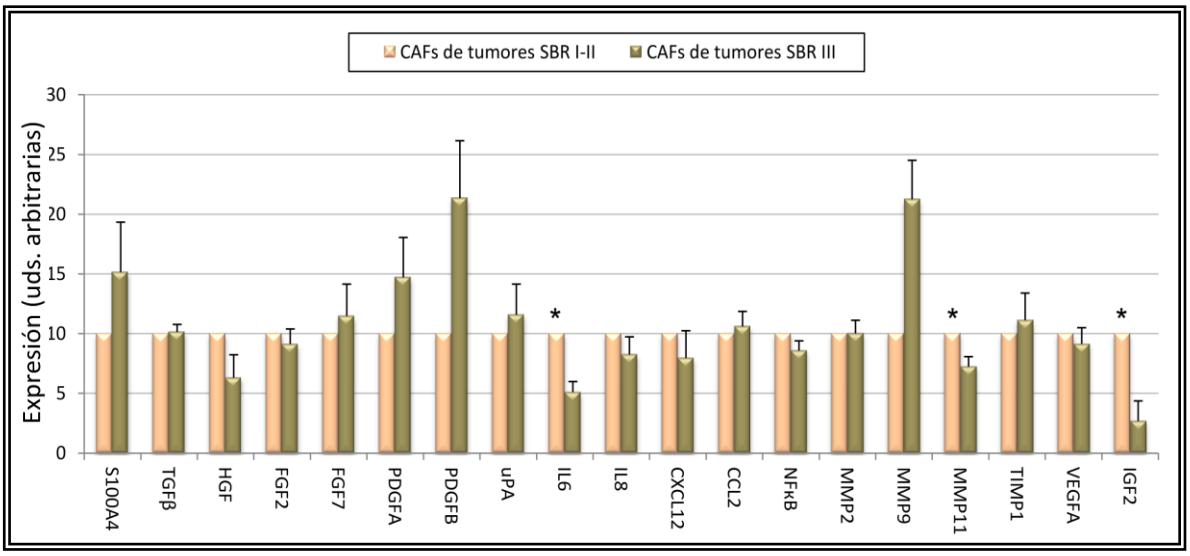

Figura 28. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio entre los CAFs de tumores con grado histológico SBRI o SBRII, respecto a los CAFs de tumores con grado histológico SBRIII. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs de tumores con SBRI o SBRII. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

III.2 Reclasificación de los tumores según la afectación del ganglio centinela.

En el caso de los NAFs agrupados según la afectación del ganglio centinela, se observó (Figura 29) que los NAFs procedentes de tumores con el ganglio centinela negativo poseen niveles de expresión más elevados de IL8, respecto a los NAFs procedentes de tumores con el ganglio centinela positivo.

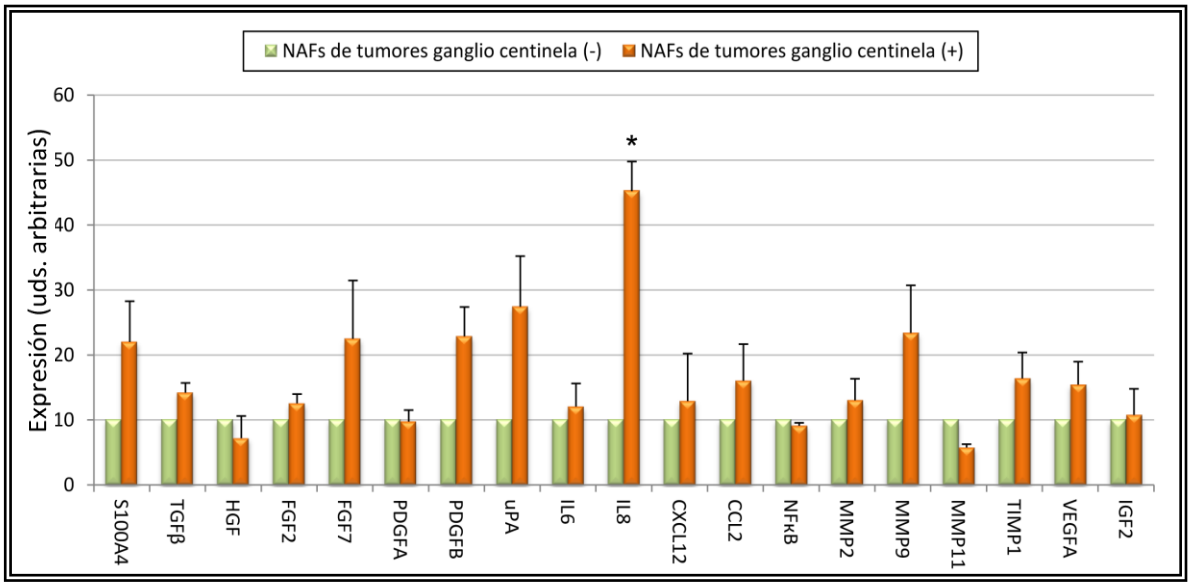

Figura 29. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio entre los NAFs de tumores con el ganglio centinela negativo, respecto a los NAFs de tumores con el ganglio centinela positivo. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los NAFs de tumores con el ganglio centinela negativo. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

Como muestra la Figura 30, los CAFs procedentes de tumores con el ganglio centinela negativo poseen expresiones más elevadas de MMP9 e IGF2, comparados con los CAFs asociados a tumores con el ganglio centinela positivo, mientras que la expresión de PDGFB, MMP2 y TIMP1, fue significativamente mayor en este último grupo de CAFs.

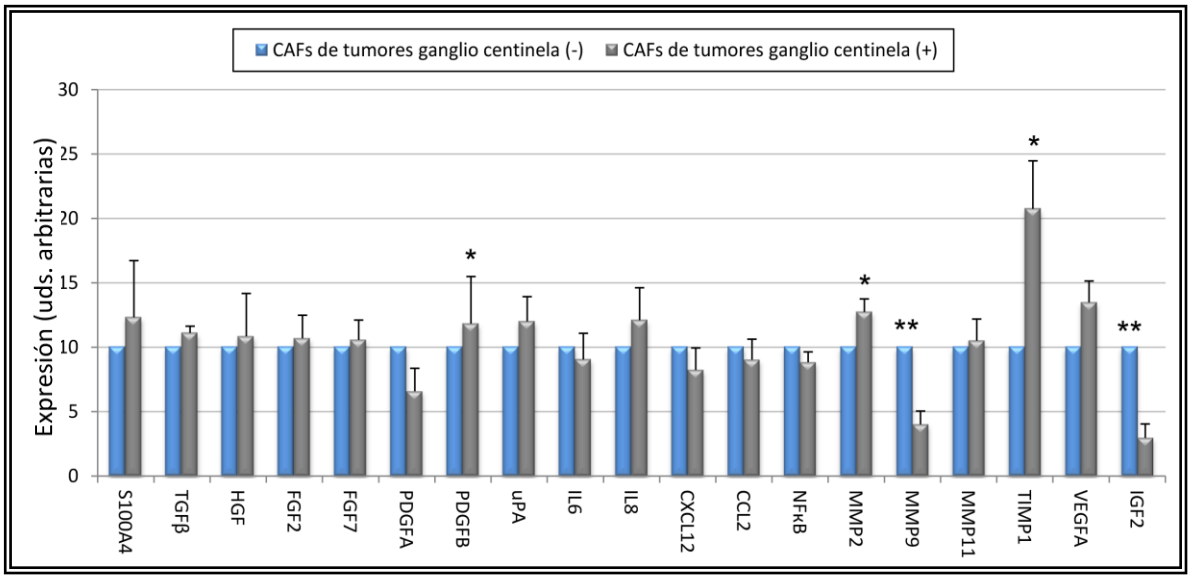

Figura 30. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio entre los CAFs de tumores con el ganglio centinela negativo, respecto a los CAFs de tumores con el ganglio centinela positivo. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs de tumores con el ganglio centinela negativo. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

IV. Evaluación de las diferencias de expresión de los factores a estudio según la expresión de MMP11 en las CMIs intratumorales

En este estudio se analizó la posible influencia de la reclasificación de los tumores según la expresión de la MMP11 por las CMIs intratumorales. Se analizaron las diferencias en los niveles de expresión de los distintos factores según los distintos grupos de NAFs y los CAFs, además de las diferencias en los niveles de expresión de las líneas tumorales MDA-MB-231 y MCF7 tras ser co-cultivadas con los distintos grupos de CAFs.

IV.1 Diferencias en el perfil molecular de los NAFs.

La reclasificación de los NAFs según la expresión de MMP11 en las CMIs (Figura 31), mostró que los NAFs procedentes de tumores positivos para MMP11 en las CMIs poseen niveles de expresión más elevados de IL8 y FGF2, comparados con los NAFs asociados a tumores negativos para MMP11 en las CMIs, mientras que la expresión de PDGFA fue significativamente mayor en este último grupo de NAFs.

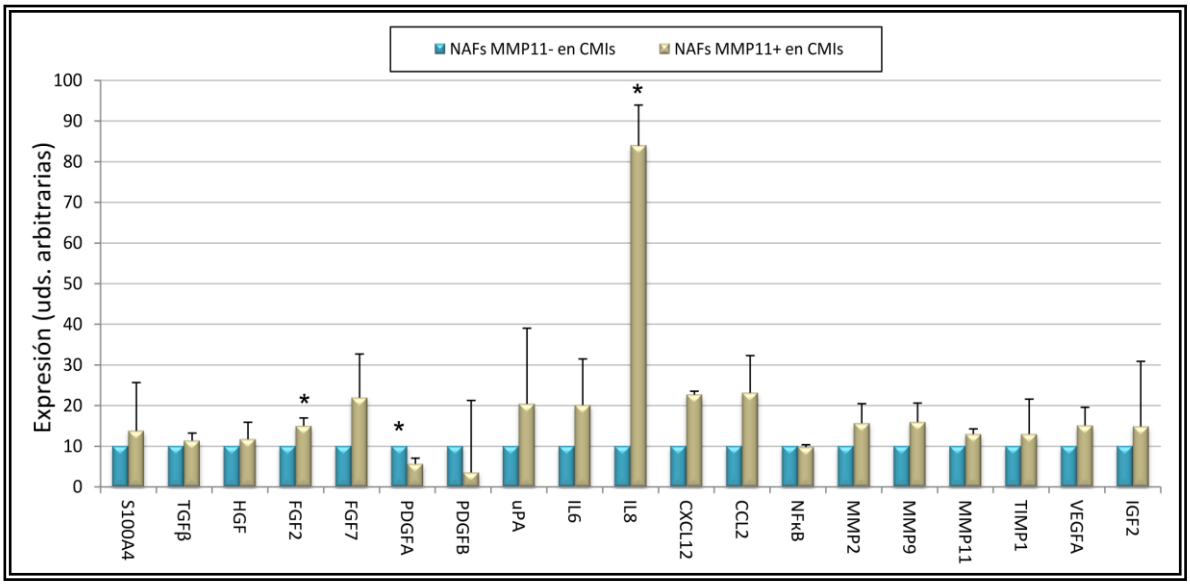

Figura 31. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los factores a estudio en los NAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión de los NAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los NAFs de tumores MMP11(-) para las CMIs. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

IV.2 Diferencias en el perfil molecular de lor CAFs.

La reclasificación de los CAFs según la expresión de MMP11 en las CMIs (Figura 32), mostró que los CAFs procedentes de tumores positivos para MMP11 en las CMIs poseen niveles de expresión más elevados de CXCL12, S100A4, HGF, VEGFA y TIMP1, comparados con los CAFs asociados a tumores negativos para MMP11 en las CMIs, mientras que la expresión de PDGFB y CCL2 fue significativamente mayor en este último grupo de CAFs.

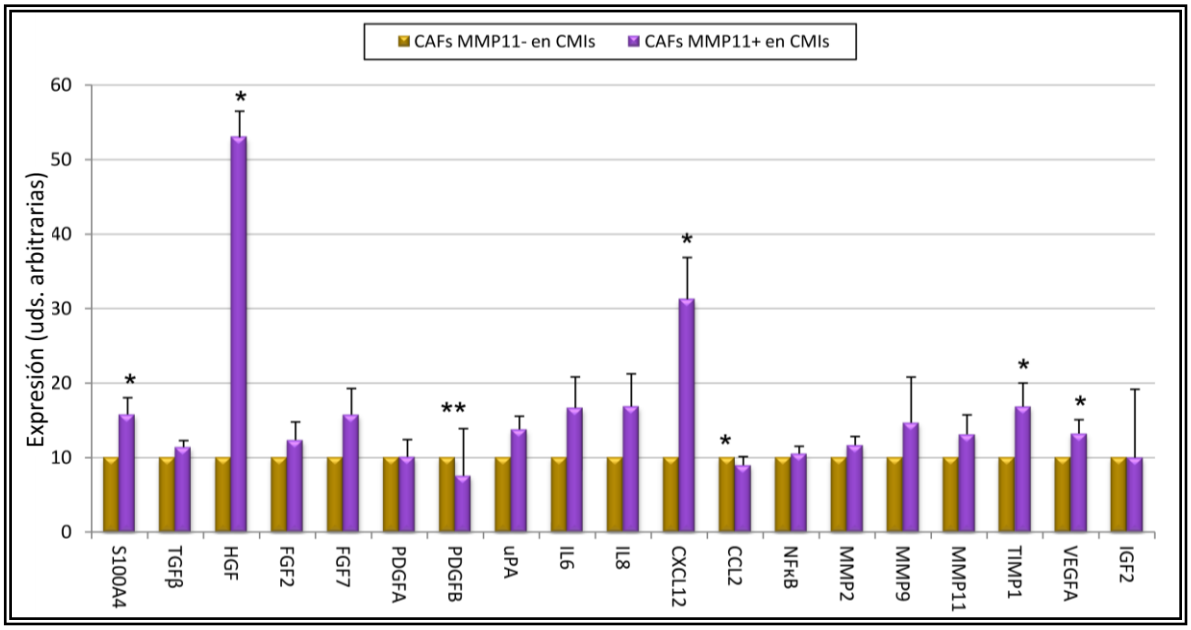

Figura 32. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los factores a estudio en los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión de los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs de tumores MMP11(-) para las CMIs. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

IV.3 Diferencias en el perfil molecular comparativo entre los NAFs y los CAFs asociados.

A continuación, se analizó la influencia de la reclasificación de los tumores en las diferencias entre los NAFs y los CAFs. En el caso de los tumores negativos para MMP11 en las CMIs, los resultados obtenidos tras el análisis de la PCR a tiempo real mostró que, tal como se indica en la Figura 33, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs tienen niveles de expresión más elevados de FGF7, IL6 e IL8, CCL2, MMP2, MMP9 y MMP11, pero menores niveles de expresión de TGFβ y FGF2 , en comparación con los NAFs asociados a tumores MMP11(-) en las CMIs.

En el caso de los tumores positivos para MMP11 en las CMIs (Figura 34), los resultados indican que los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs poseen mayores niveles de expresión de FGF7, IL6, CXCL12, CCL2, MMP2 y MMP11, pero menores niveles de expresión de S100A4, TGFβ, PDGFB y TIMP1, en comparación con los NAFs asociados a tumores MMP11(+) en los CMIs.

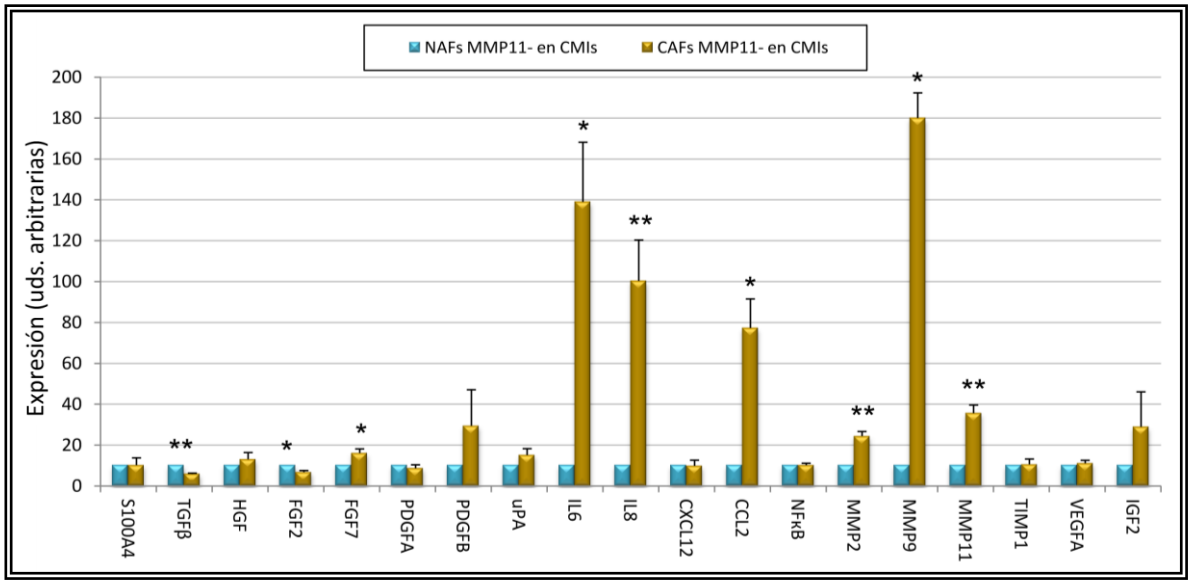

Figura 33. Análisis de los resultados de PCR a tiempo real de los factores a estudio, entre los NAFs y los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los NAFs. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

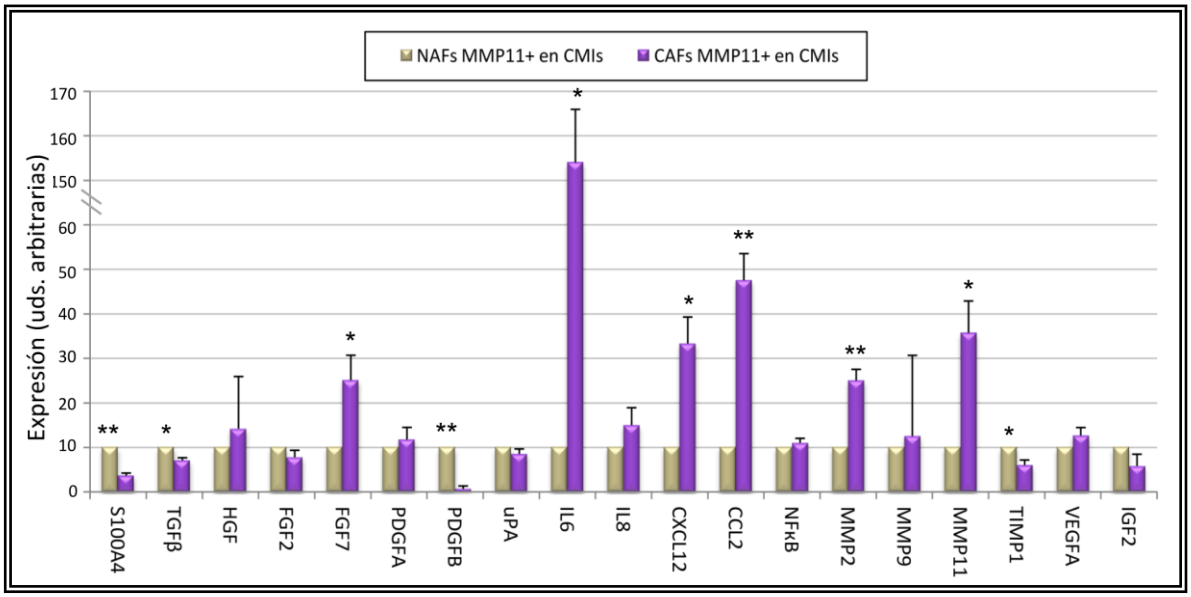

Figura 34. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los factores a estudio, entre los NAFs y los CAFs asociados procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los NAFs. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

IV.4 Diferencias en el perfil molecular de los CAFs co-cultivados con líneas celulares de cáncer de mama.

Se analizaron las diferencias existentes entre el perfil molecular de los CAFs y los CAFs co-cultivados con la línea celular MCF7, según la expresión de la MMP11 por las CMIs intratumorales. Los resultados muestran que los CAFs procedentes de tumores con MMP11(-) en las CMIs y co-cultivados con MCF7 presentan una mayor expresión de TGFβ y VEGFA, mientras que los niveles de CCL2 y NFκB se redujeron en comparación a los niveles basales de expresión de los CAFs MMP11(-) solos (Figura 35).

Con respecto a los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs co-cultivados con MCF7 (Figura 36), éstos muestran una expresión más elevada de TGFβ, PDGFB y VEGFA, y una

menor expresión de CCL2, NFκB y MMP11, en comparación con los niveles basales de esta misma población de CAFs no co-cultivados.

En el caso de los CAFs procedentes de tumores la MMP11(-) para las CMIs co-cultivados con la línea tumoral de alto poder metastásico MDA-MB-231, la Figura 37 muestra que éstos presentan una mayor expresión de IL8 y VEGFA en comparación con los niveles basales de los CAFs de tumores MMP11(-) para las CMIs solos.

Así mismo, como muestra la Figura 38, la comparación de la expresión de los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs co-cultivadas con MDA-MB-231 respecto a la expresión basal de estos CAFs solos, se observó un aumento de expresión de TGFβ y VEGFA, y una menor expresión de NFκB tras realizar los co-cultivos.

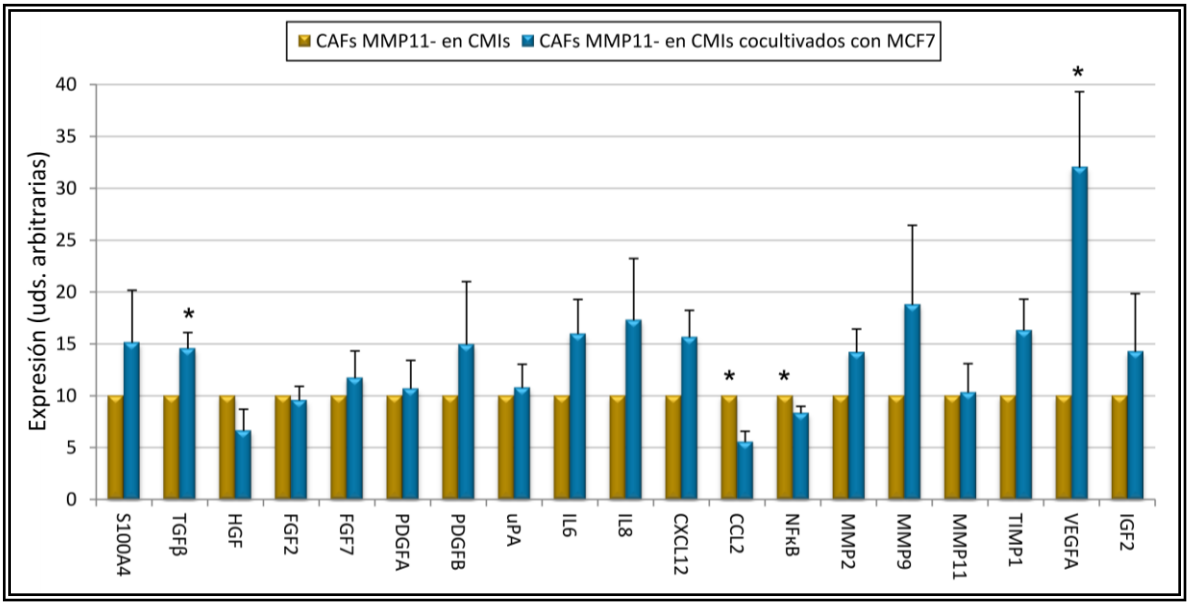

Figura 35. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio en los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión tras ser co-cultivados con la línea tumoral MCF7. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

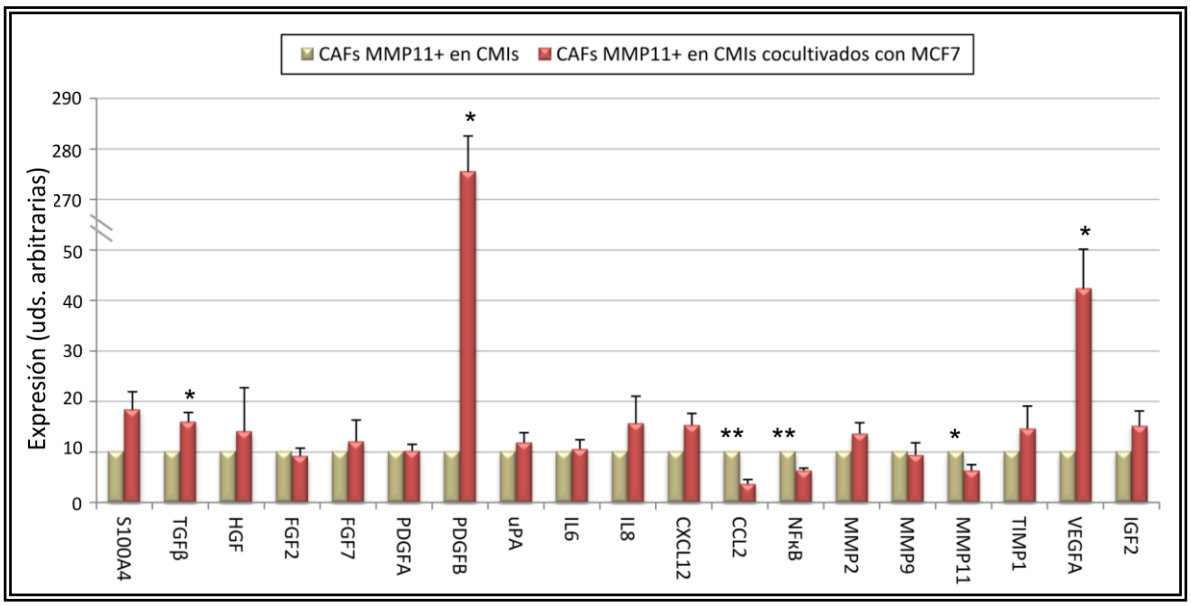

Figura36. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio en los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión tras ser co-cultivados con la línea tumoral MCF7. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

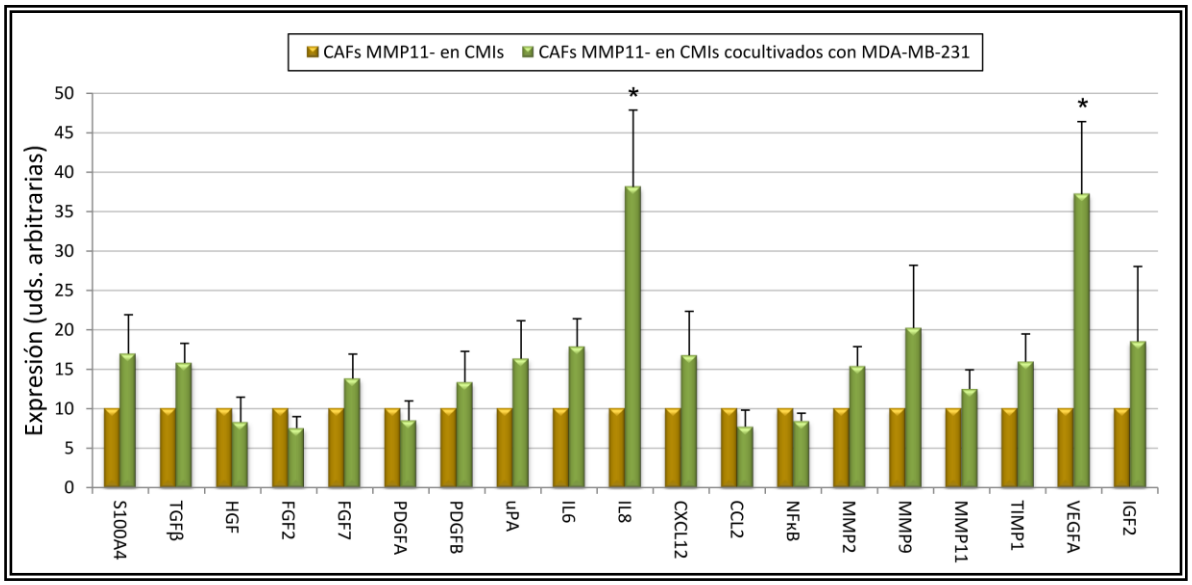

Figura37. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio en los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión tras ser co-cultivados con la línea tumoral MDA-MB-

231. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

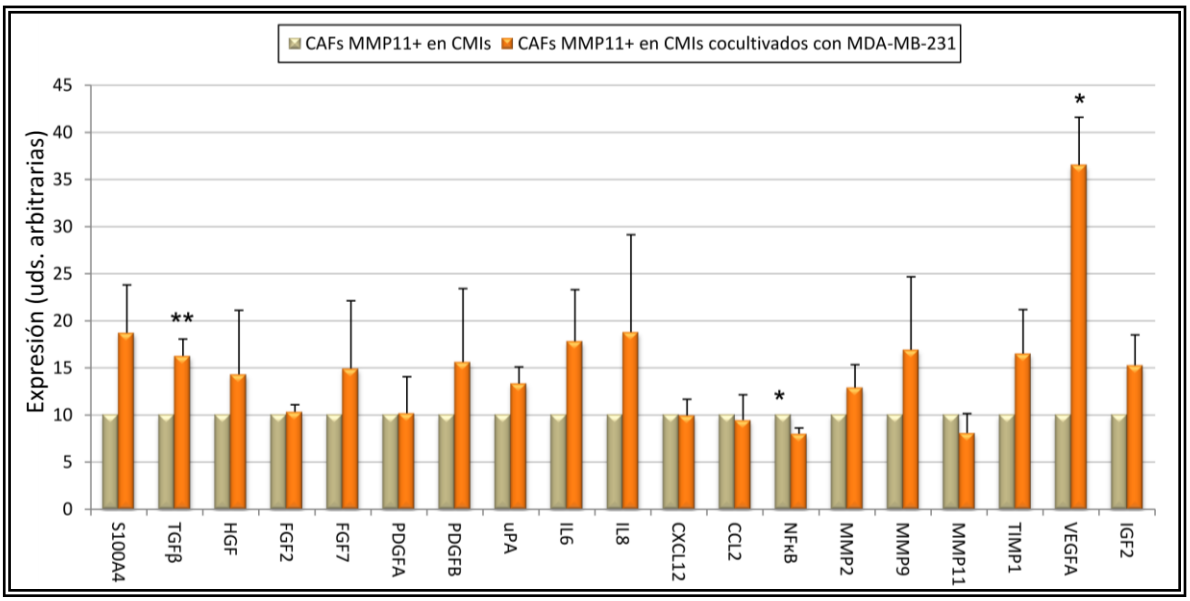

Figura 38. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio en los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión tras ser co-cultivados con la línea tumoral MDA-MB-231. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

Posteriormente, se analizaron las diferencias en los niveles de expresión de los factores entre los CAFs de las distintas poblaciones de tumores, después de ser co-cultivados con la línea tumoral MCF7. Los resultados indican (Figura 39) que los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, expresan niveles más altos de PDGFB, CCL2, MMP9, MMP11, IGF2 e IL6, pero tienen niveles más bajos de expresión de S100A4 y CXCL12, en comparación con los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs.

Sin embargo, en el caso de los co-cultivos de los CAFs con la línea tumoral MDA-MB-231 (Figura 40), los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs mostraron niveles más bajos de HGF, FGF2, PDGFB, CXCL12 y de uPA, pero tuvieron niveles de expresión más altos de IGF2 y MMP9, en comparación con los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs.

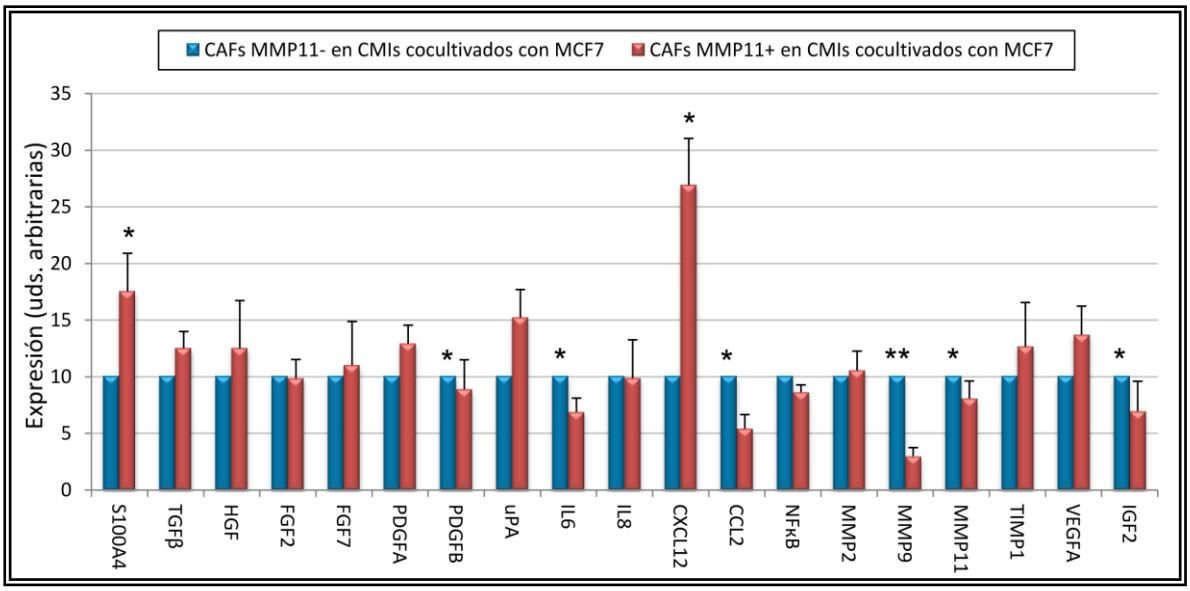

Figura 39. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio en los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión de los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs, tras ser ambos tipos co-cultivados con la línea tumoral MCF7. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs co-cultivados con MCF7. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

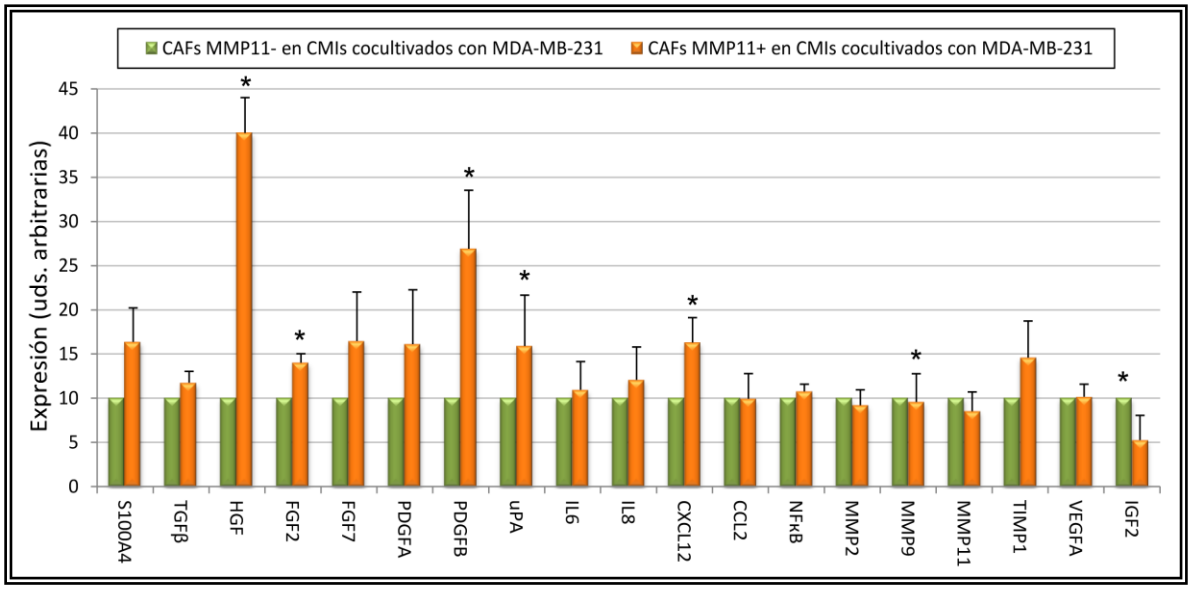

Figura 40. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio en los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, comparado con los niveles de expresión de los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para

las CMIs, tras ser ambos tipos co-cultivados con la línea tumoral MDA-MB-231. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs co-cultivados con MDA-MB-231. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

Finalmente, se analizaron las diferencias en la expresión de los factores a estudio en las distintas poblaciones de CAFs según la línea celular tumoral con la que fueran co-cultivadas. Se observó que los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs experimentaban un aumento en la expresión del TIMP1 tras ser co-cultivados con la línea tumoral de menor agresividad MCF7 respecto al co-cultivo de éstos con la línea de mayor agresividad MDA-MB-231; en cambio, cuando éstos eran co-cultivados con la línea celular MDA-MB-231, se producía un aumento en la expresión de la IL8 y CXL12 respecto a los CAFs co-cultivados con la línea MCF7 (Figura 41).

En cuanto a los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs (Figura 42), éstos experimentaron un aumento en la expresión de CXCL12 tras ser co-cultivados con la línea tumoral MCF7 respecto a los co-cultivados con la línea MDA-MB-231. Sin embargo, esta población de CAFs experimentaba una mayor expresión de FGF2, PDGFB, NFkB y MMP9 cuando era co-cultivada con la línea tumoral de mayor agresividad MDA-MB-231.

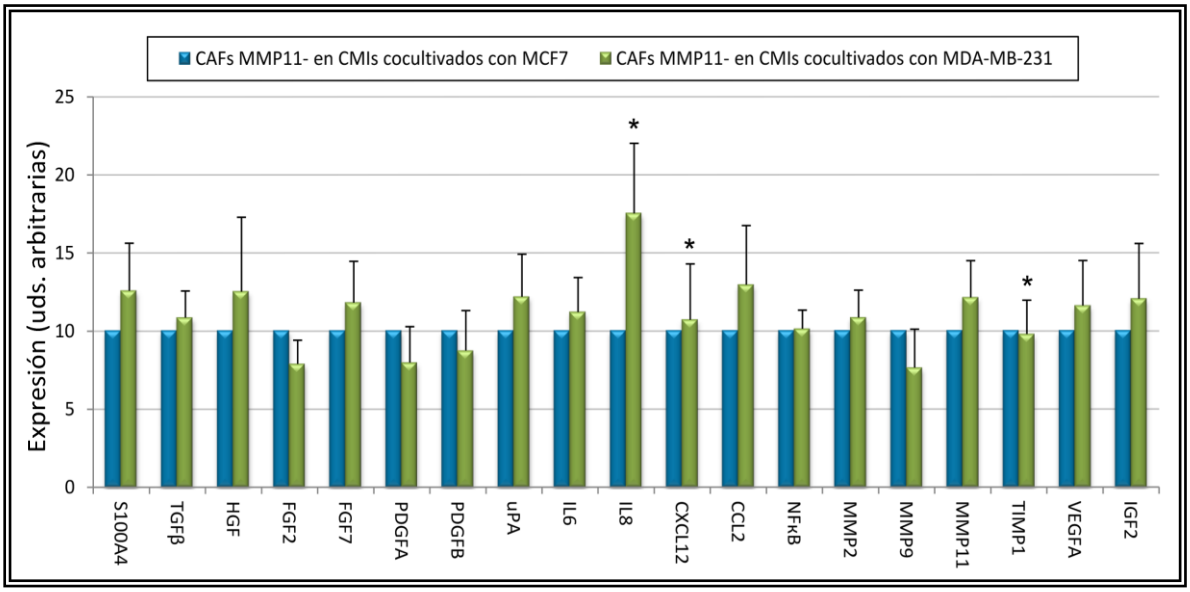

Figura 41. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio de los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs co-cultivados con la línea tumoral MCF7, o con la línea tumoral MDA-MB-231. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs co-cultivados con MCF7. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

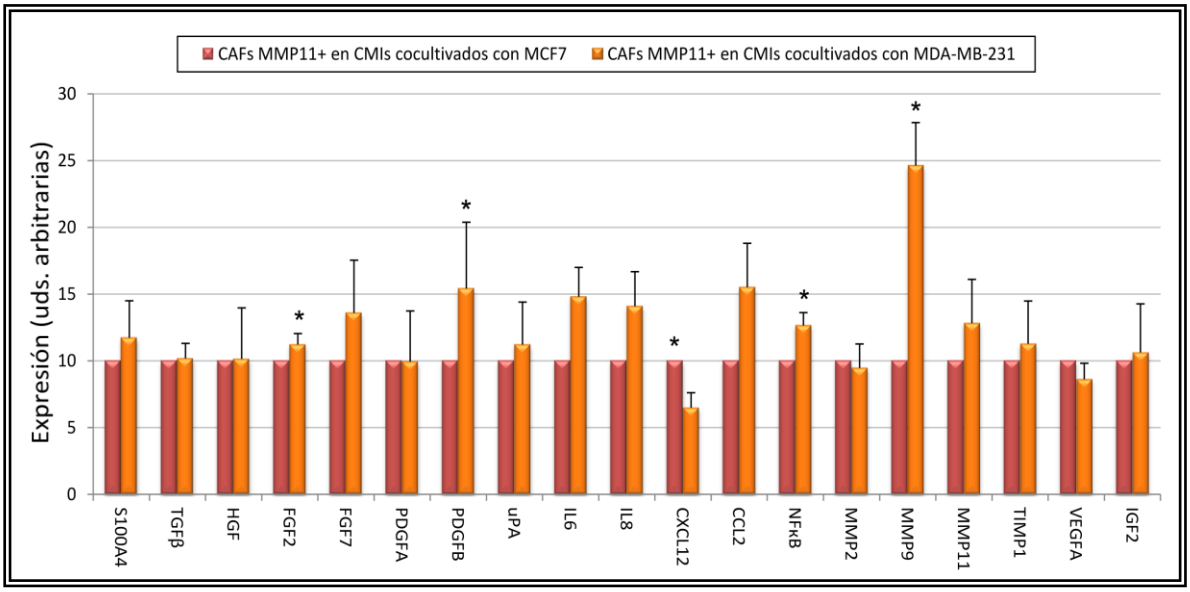

Figura 42. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión basal de los factores a estudio de los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs co-cultivados con la línea tumoral MCF7, o con la línea tumoral MDA-MB-231. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en los CAFs procedentes de tumores MMP11(+)

para las CMIs co-cultivados con MCF7. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

IV.5 Diferencias en el perfil molecular de las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7) co-cultivadas con los CAFs.

Las líneas celulares tumorales de cáncer de mama con diferente potencial metastásico MCF7 y MDA-MB-231, fueron co-cultivadas con los CAFs, y los resultados de PCR en tiempo real fueron analizados según la expresión de MMP11 en las CMIs en los tumores de los que provenían los CAFs. El análisis mostró que en la línea celular MCF7 (Figura 43) había un aumento significativo de S100A4, TGFβ, FGF2, FGF7, PDGFB, uPA, IL6, IL8, CCL2, NFkB, MMP2, MMP11, TIMP1, VEGFA e IGF2, tras ser co-cultivada con cualquiera de los dos tipos de CAFs (tanto los MMP11(+) como los MMP11(-) para las CMIs). En cambio, esta línea celular MCF7 mostró una disminución en la expresión de PDGFA y CXCL12 tras realizarse los co-cultivos con ambos tipos de CAFs.

Por otro lado, la figura 44 muestra el análisis por PCR a tiempo real de las diferencias significativas de expresión de la línea MCF7 co-cultivada con los CAFs provenientes de tumores MMP11(-) en las CMIs, respecto de la línea MCF7 co-cultivada con los CAFs provenientes de tumores MMP11(+) en las CMIs. Como se puede observar, la línea MCF7 mostró una mayor expresión de S100A4, FGF7, uPA, CXCL12, CCL2 Y NFkB, cuando fue co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores con MMP11(-) para las CMIs, respecto a la línea co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs. Por el contrario, se detectó un aumento de la expresión de TGFβ, PDGFA, PDGFB, IL6, IL8 y TIMP1, si la línea era co-cultivada con estos últimos CAFs.

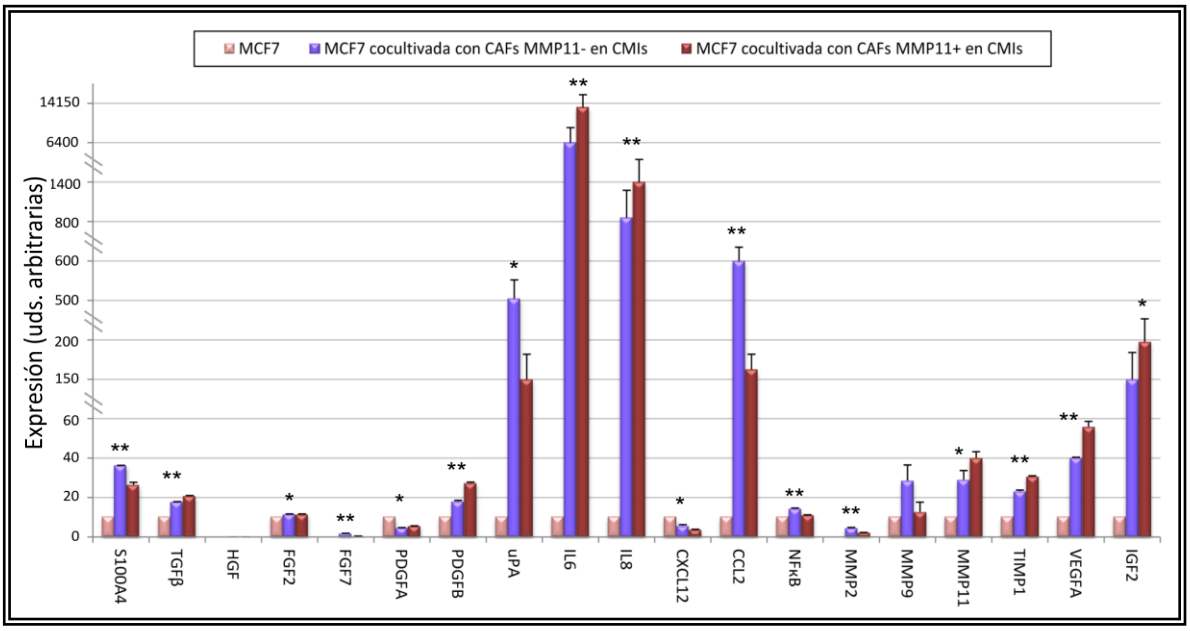

Figura 43. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio en la línea tumoral MCF7, tras ser co-cultivada con los CAFs procedentes tanto de tumores MMP11(-) para las CMIs, como con los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs, comparado con los niveles basales de expresión de esta línea. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en la línea MCF7 sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

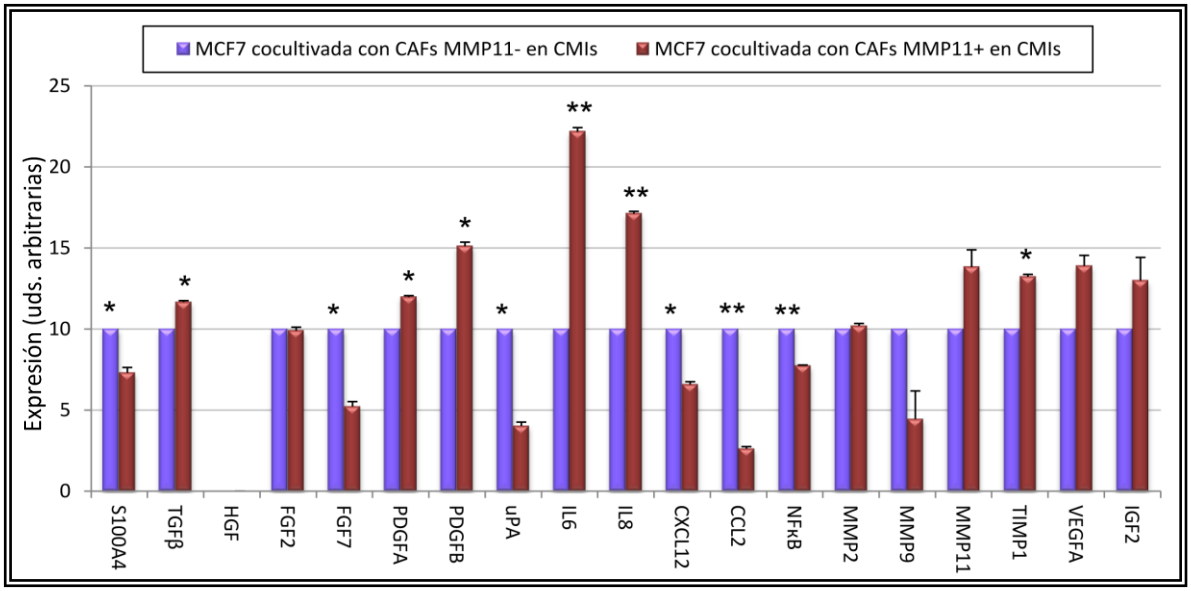

Figura 44. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio en la línea tumoral MCF7 co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, respecto a los niveles de expresión de esta línea co-cultivada con los

CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en la línea MCF7 co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

Estos mismos análisis se realizaron en la línea celular MDA-MB-231 con alto potencial metastásico, y los resultados indicaron (Figura 45) que tras ser co-cultivada con los dos tipos de CAFs, existía un aumento significativo de los factores S100A4, TGFβ, FGF7, PDGFA, PDGFB, uPA, IL6, IL8, MMP2, MMP9, MMP11, TIMP1 y VEGFA respecto a los niveles basales de la línea MDA-MB-231. En cambio, existía una disminución en la expresión de FGF2 tras realizarse los co-cultivos.

La figura 46 muestra el análisis por PCR a tiempo real de las diferencias de expresión de la línea MDA-MB-231 co-cultivada con los CAFs provenientes de tumores MMP11(-) en las CMIs, respecto de la línea MDA-MB-231 co-cultivada con los CAFs provenientes de tumores MMP11(+) en las CMIs. Los análisis indicaron que existe una mayor expresión de TGFβ, FGF7, PDGFB, MMP2 y MMP11 en la línea MDA-MB-231 co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, respecto a la línea co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs. Por el contrario, se observó un aumento de la expresión de FGF2, uPA, IL8 y TIMP1, si la línea era co-cultivada con estos últimos tipos de CAFs.

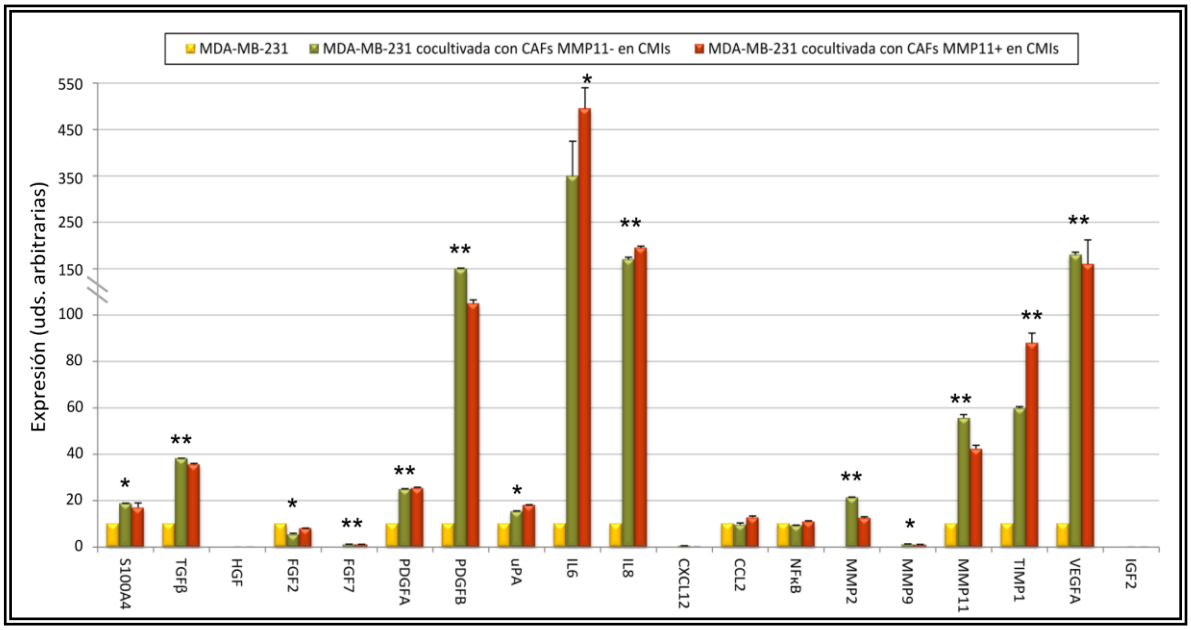

Figura 45. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio en la línea tumoral MDA-MB-231, tras ser co-cultivada con los CAFs procedentes tanto de tumores MMP11(-) para las CMIs, como con los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs, comparado con los niveles basales de expresión de esta línea. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en la línea MDA-MB-231 sin co-cultivar. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

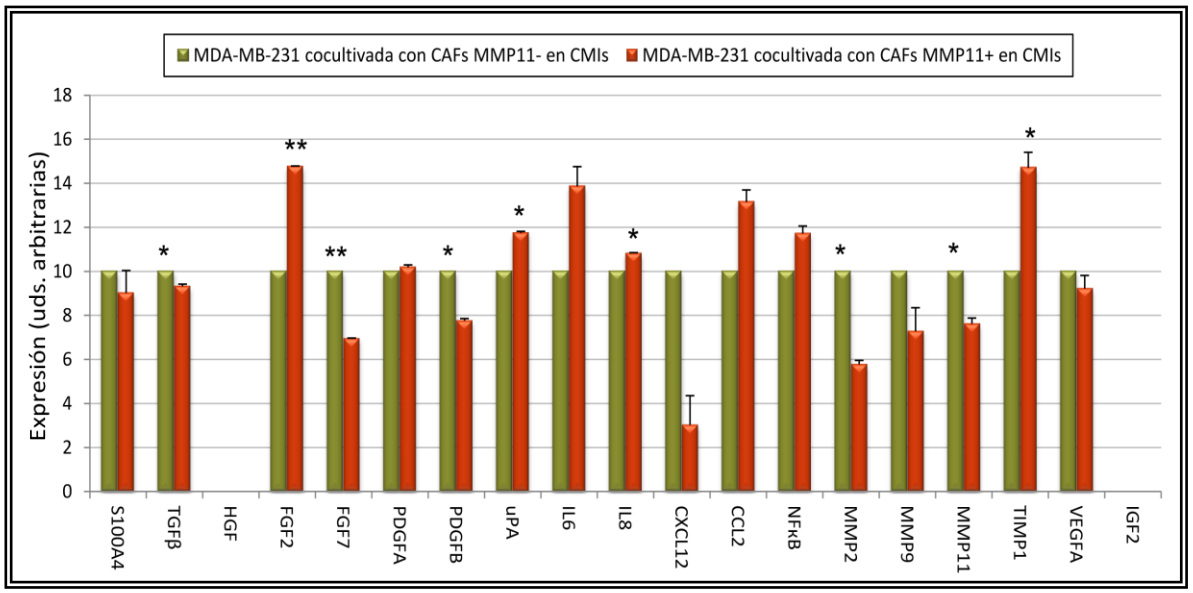

Figura 46. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real de los niveles de expresión de los factores a estudio en la línea tumoral MDA-MB-231, tras ser co-cultivada con los CAFs

procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs, respecto a los niveles de expresión de esta línea co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) para las CMIs. Los valores se normalizaron según el valor de cada factor en la línea MDA-MB-231 co-cultivada con los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) para las CMIs. Las barras de error muestran el error estándar para cada factor (*p<0.05 y **p≤0.001).

V. Análisis de la expresión proteica de los factores más diferencialmente expresados entre las poblaciones de tumores

Para confirmar las diferencias encontradas en los análisis de PCR en tiempo real, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para detectar la expresión proteica de estos factores en las muestras de carcinoma mamario. De los factores a estudio analizados, se seleccionaron aquellos cuya expresión diferencial entre ambas poblaciones de tumores mediante PCR a tiempo real fuese significativa y al menos 1,5 veces más elevada en los tumores MMP11(+) para las CMIs comparado con los tumores MMP11(-) para las CMIs.

En el caso de los CAFs (Figura 47), se seleccionaron los factores que tuvieron niveles de expresión significativamente más elevados en los CAFs asociados a tumores MMP11(+) para las CMIs, comparados con los CAFs asociados a tumores MMP11(-) para las CMIs , y que fueron S100A4, HGF, CXCL12 y TIMP1. En la Figura 48 se muestran ejemplos de tinción positiva para estos factores en los fibroblastos de las muestras de cáncer de mama.

Para los NAFs, se seleccionaron los factores que tuvieron niveles de expresión significativamente más elevados en los NAFs asociados a tumores MMP11(+) para las CMIs, comparados con los NAFs asociados a tumores MMP11(-) para las CMIs (Figura 49). Los factores seleccionados fueron FGF2 e IL8. En la figura 50 se muestran ejemplos de tinción positiva para estos factores en los fibroblastos de las muestras de las pacientes con cáncer de mama.

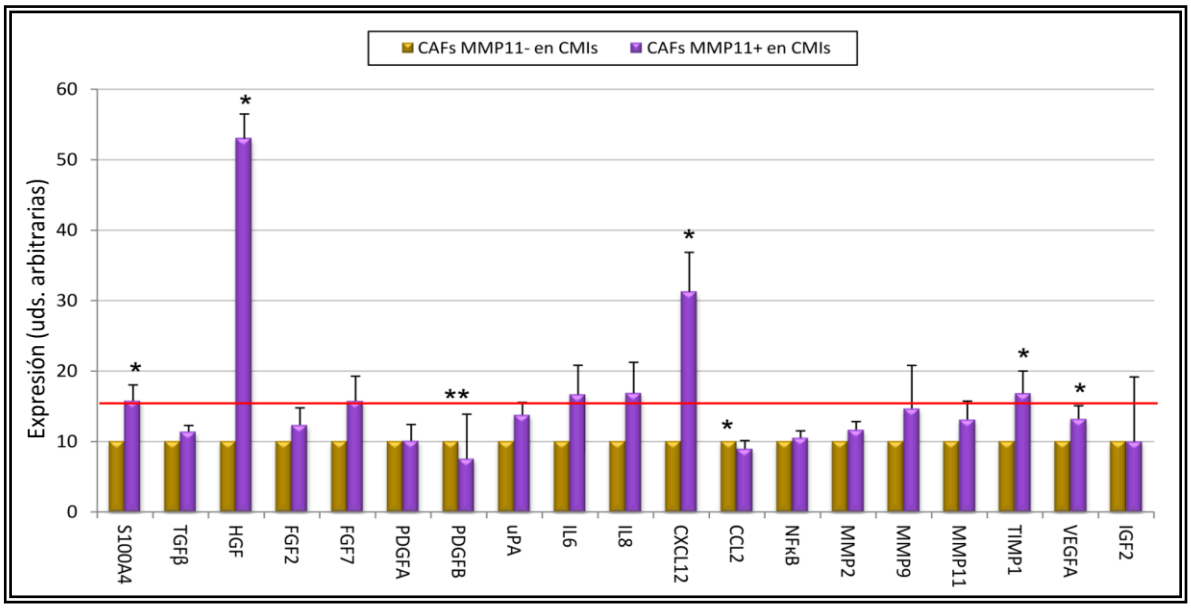

Figura 47. Selección de los factores significativos para el análisis inmunohistoquímico. La línea roja indica el punto de corte por encima del cual se seleccionaron los factores válidos para el análisis de la expresión proteica.

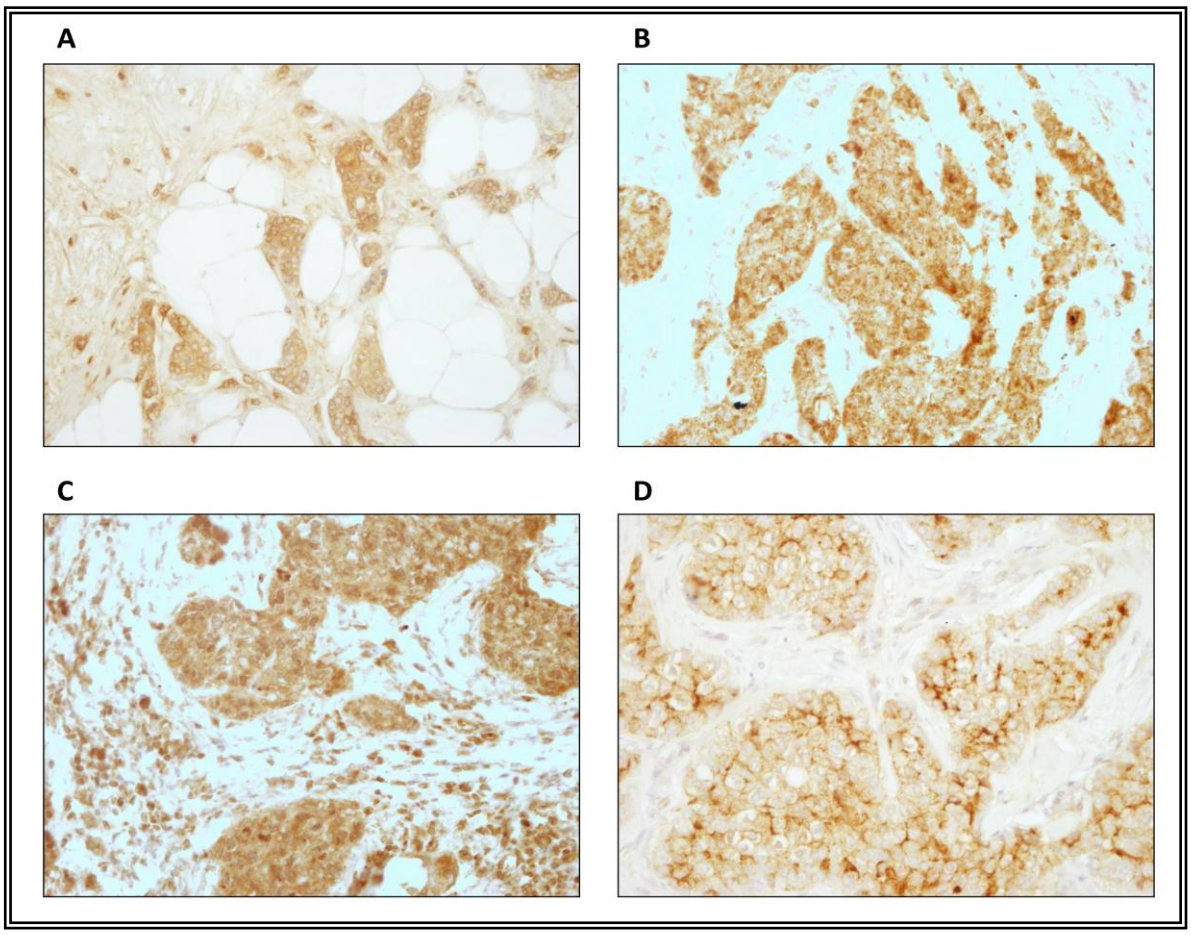

Figura 48. Ejemplos de tinción inmunohistoquímica para los factores diferencialmente expresados en la población de CAFs, analizados en las muestras de carcinoma mamario (200X). (A) Tinción positiva para S100A4; (B) Tinción positiva para HGF; (C) Tinción positiva para CXCL12; (D) Tinción positiva para TIMP1.

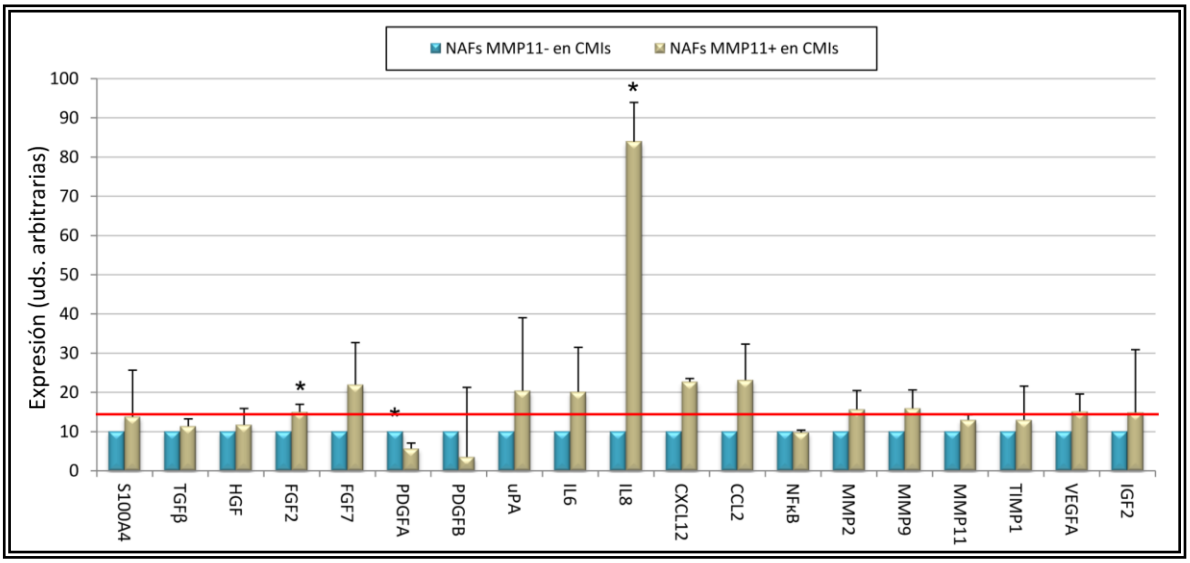

Figura 49. Gráfica de los factores para los NAFs

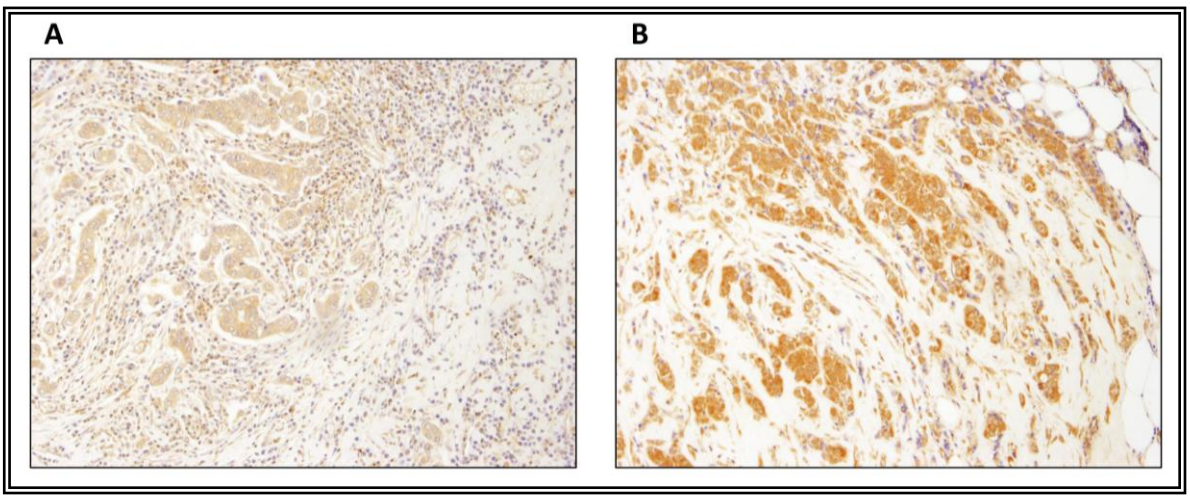

Figura 50. Ejemplos de tinción inmunohistoquímica para los factores diferencialmente expresados en la población de NAFs, analizados en las muestras de carcinoma mamario (200X). (A) Tinción positiva para FGF2; (B) Tinción positiva para IL8.

VI. Análisis de la influencia de los cultivos de CAFs en la capacidad invasiva de las líneas celulares de cáncer de mama

Para estudiar el papel de los CAFs, y su diferente comportamiento según si pertenecen a un grupo y otro de tumores, se examinó la capacidad invasiva de las líneas tumorales MCF7 y MDA-MB-231 mediante ensayos de invasión en Matrigel *in vitro*. Se utilizó como quimioatrayente el sobrenadante proveniente de cultivos de los CAFs asociados a tumores MMP11(+) en las CMIs, o proveniente de CAFs asociados a tumores MMP11(-) en las CMIs.

En el caso de la línea tumoral MCF7 la capacidad invasiva fue inexistente, aún cuando fue cultivada utilizando como quimioatrayente el sobrenadante de los CAFs (no se muestran los resultados), lo que es consistente con otros estudios, ya que esta línea se suele utilizar como control negativo en los ensayos de invasión debido a su bajo potencial metastásico (Booden, et al., 2004). En el caso de la línea tumoral MDA-MB-231 (Figura 51), se observó un aumento en el número de células capaces de invadir la matriz en aquellos casos en los que la línea tenía como quimioatrayente el sobrenadante de los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) en las CMIs, pero esta capacidad invasiva era aún mayor si el quimioatrayente pertenecía a los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) en las CMIs.

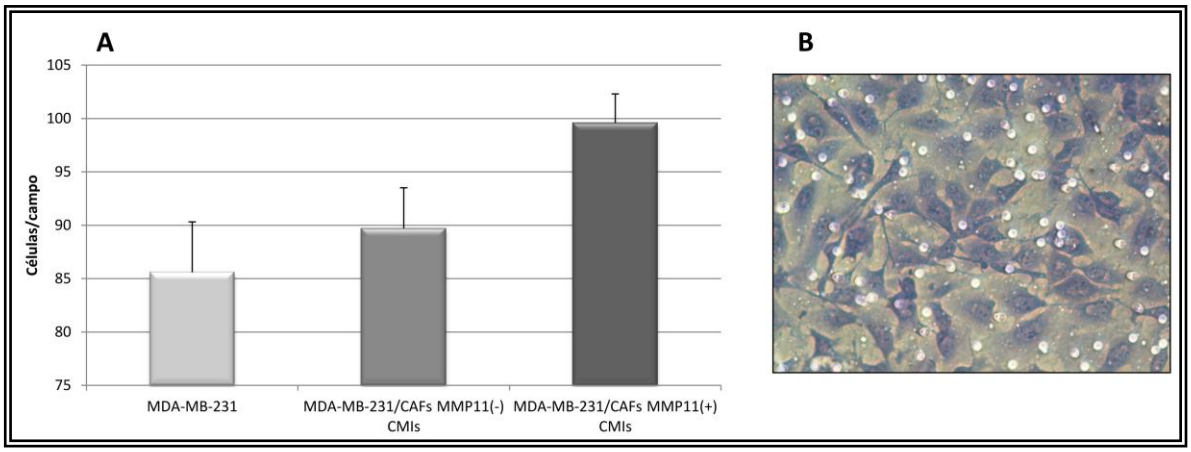

Figura 51. Análisis de la capacidad invasiva de las células tumorales MDA-MB-231. A) Contaje del número de células que atraviesan el Matrigel tras 48 horas, tanto para la línea MDA-MB-

231 sin quimioatrayentes, o utilizando como quimioatrayente el sobrenadante de los cultivos de los CAFs procedentes de tumores MMP11(-) en las CMIs o el sobrenadante de los CAFs procedentes de tumores MMP11(+) en las CMIs. Se contaron diez campos aleatorios (20x aumento) por membrana, y en la gráfica se muestra el valor de la media ± el error estándar. Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso. B) Imagen (20x) que muestran las células que han invadido la matriz tras 48 horas.

El posterior análisis estadístico de la capacidad invasiva de la línea tumoral MDA-MB-231 en los tres casos estudiados, indicó que existen diferencias significativas en la capacidad invasiva si esta línea tumoral tiene como quimioatrayente el sobrenadante de los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs ($p<0,001$). Se detectó además, que existen diferencias significativas en la capacidad invasiva de esta línea según se utilice como quimioatrayente el sobrenandante los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) o MMP11(-) para las CMIs ($p:0.002$).

Discusión

En este trabajo se muestra la existencia de un fenotipo diferente de fibroblastos dependiendo de su localización en la mama en mujeres que han sufrido un carcinoma de mama invasivo. Los NAFs, localizados al menos a dos centímetros del tumor, difieren de los CAFs. Estas diferencias se traducen en una expresión genómica diferencial de varios factores con un reconocido efecto en la progresión tumoral. Así mismo, hemos encontrado cambios significativos en la expresión de algunos de estos factores cuando los fibroblastos son cocultivados con líneas celulares de cáncer de mama de diferente grado de potencial metastásico (MCF7 y MDA-MB-231).

I. Importancia de los factores analizados

Para este estudio se ha evaluado la expresión de 19 factores, incluyendo S100A4, factores de crecimiento (TGFβ, HGF, FGF2, FGF7, PDGFA, PDGFB, VEGFA y IGF2), citoquinas inflamatorias (IL6 y IL8), quimiocinas (CCL2 y CXCL12), proteasas (uPA, MMP2, MMP9 y MMP11), el factor de transcripción NFκB y TIMP1. Todos estos factores están implicados en la promoción del crecimiento tumoral por varias vías, tales como la proliferación de la célula tumoral, la angiogénesis, la remodelación de la matriz extracelular, la inflamación, la invasión y la metástasis.

II. Comparación de los factores entre NAFs y CAFs

En los pacientes incluidos en este estudio, se han encontrado diferencias significativas entre los perfiles de expresión molecular de los NAFs y los CAFs. Los NAFs muestran una mayor expresión de S100A4, TGFβ, PDGFB, FGF2 y TIMP1, comparado con los CAFs. Sin embargo, los CAFs muestran una expresión más elevada de FGF7, IL6, CCL2, MMP2, MMP9 y MMP11, comparado con los NAFs (Figura 52).

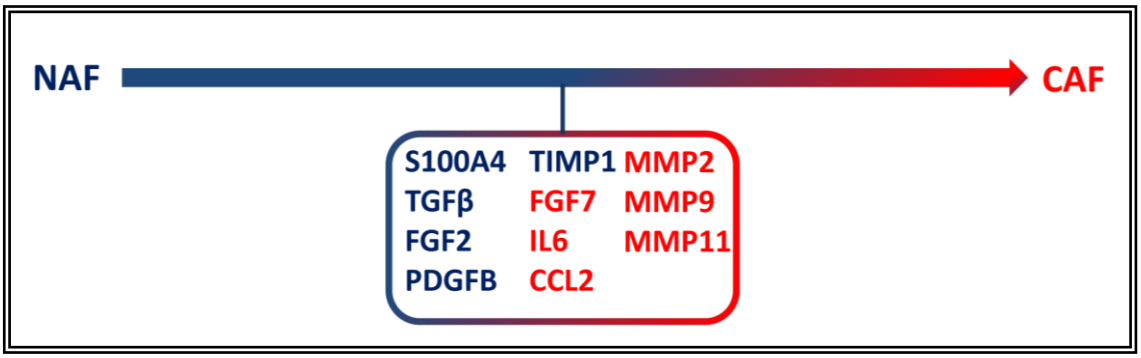

Figura 52. Factores cuya diferencia de expresión es significativa al comparar los NAFs con los CAFs. Los factores en azul representan los factores con mayor expresión en los NAFs y los factores en rojo representan los factores con mayor expresión por los CAFs.

Si consideramos que el posible origen de los CAFs son los NAFs residentes en el tejido mamario, los cambios observados entre ambos en el perfil molecular, pueden ser consecuencia de interacciones entre las células tumorales y los fibroblastos del microambiente estromal. Se sabe que los tumores sólidos son tejidos aberrantes donde las células estromales influyen y se desarrollan con la célula tumoral (Egeblad, et al., 2010). Estas acciones se desarrollan por el efecto de un gran número de proteínas secretadas por los fibroblastos, las cuales promueven la tumorigenicidad. Así mismo, varios factores secretados por las células tumorales han sido, a su vez, propuestos por inducir la secreción de estas proteínas por los fibroblastos. No está claro si existen vías dominantes únicas subyacentes a estas interacciones o si implican múltiples vías que actúan en paralelo. Aún así, hemos identificado que estas proteínas secretadas por los fibroblastos parecen actuar de forma conjunta a través de mecanismos autocrinos y de una señalización cruzada. Por lo tanto, los datos obtenidos están en concordancia con otros estudios, sugiriendo que los fibroblastos y las células tumorales actúan de forma paralela a través de múltiples vías (Rajaram, et al., 2013).

Nuestros resultados muestran que los CAFs comparados con los NAFs, han adquirido distintas propiedades, principalmente dirigidas a favorecer la promoción tumoral, proliferación celular e invasión. Estos datos son apoyados por varios estudios previos, habiendo descrito que las diferencias en la actividad de los NAFs *versus* CAFs en tumores de mama pueden ser debidas a

alteraciones en los mecanismos moleculares y/o celulares responsables de la producción y liberación de varios factores solubles por los CAFs. Estos factores derivados de fibroblastos, tales como IL6, CCL2, MMP2, MMP9, MMP11 y FGF7, pueden tener varias funciones en la promoción del crecimiento tumoral.

Respecto a la IL6, se ha descrito que la mayoría de los genes diana de esta citoquina están involucrados en la progresión del ciclo celular y la supresión de la apoptosis, lo cual subraya la importancia de la IL6 en la formación del tumor. Además, la IL6 incrementa la migración de las células endoteliales, un paso clave en la angiogénesis y diseminación de los tumores sólidos(Lin W. W., et al., 2007; Yao J. S., et al., 2006). Múltiples estudios han señalado a la IL6 como un potente factor de crecimiento para varios tumores, entre ellos el cáncer de mama (Berger, 2004; Garcia-Tunon, et al., 2005; Lin W. W., et al., 2007; Salgado, et al., 2003; Sansone, et al., 2007; Sasser, et al., 2007), y se ha visto que el incremento de la expresión de ésta y otras citoquinas está asociado a mal pronóstico (Olsen, et al., 2010). Ha sido, además, descrita una fuerte asociación entre los niveles en suero de la IL6 y un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, incluyendo tumores HER2 positivo (Bachelot, et al., 2003; Salgado, et al., 2003).

La IL6 vincula la inflamación a la transformación maligna a través de la activación de la vía NFκB la cual, a su vez, impulsa la producción constitutiva de IL6 generando un circuito de retroalimentación positivo (Iliopoulos, et al., 2009). Además, la IL6 ha sido previamente descrita por su capacidad de expandir poblaciones de células madre tumorales (CSCs), un subconjunto de células tumorales que poseen propiedades de células madre, así como de inducir la transición epitelio mesenquimal (EMT); estando ambos procesos implicados en la formación de metástasis y resistencia a terapias antitumorales. En el cáncer de mama, existen bastantes evidencias de que las CSCs son intrínsecamente resistentes a la quimioterapia, radioterapia y terapias endocrinas convencionales. Por evadir los efectos de estos

tratamientos, las CSCs se consideran responsables de la recurrencia de la enfermedad. (Iliopoulos, et al., 2011; Sansone, et al., 2007; Sullivan, et al., 2009).

Es interesante la observación de que el desarrollo de resistencias al trastuzumab (un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor HER2/neu) en líneas celulares de cáncer de mama con alta expresión de HER2, está mediado por la activación de un circuito de retroalimentación inflamatorio de la IL6, el cual conduce a la expansión de las CSCs. Así, tratamientos a largo plazo con trastuzumab generan CSCs altamente enriquecidas, las cuales exhiben un fenotipo EMT y secretan valores superiores a 100 veces más IL6 que las células parentales. La interrupción de ese circuito de retroalimentación inflamatorio, mediante el uso de anticuerpos frente al receptor de IL6 en xenoinjertos de ratón, conlleva una reducción en la población de CSCs, produciendo así una disminución en el crecimiento tumoral y metástasis (Korkaya, et al., 2012). Estos resultados demuestran que la resistencia al trastuzumab puede ser mediada por un circuito de retroalimentación inflamatorio de la IL6, y sugiere que el bloqueo de este circuito puede proporcionar una estrategia alternativa para superar la resistencia al trastuzumab.

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1 o CCL2) es una quimiocina que ejerce potentes efectos quimiotácticos, estimulantes y mitogénicos en las células mononucleares (Xia, et al., 2007). La secreción de CCL2 por las células inmunes infiltrantes del tumor, las células tumorales, y otras células del estroma, sugiere que CCL2 apoya la progresión tumoral (Steiner, et al., 2012).

En tumores primarios de cáncer de mama, la expresión de CCL2 está relacionada con la acumulación de macrófagos asociados al tumor, que es un indicador significativo de recidiva tumoral precoz (Saji, et al., 2001; Ueno, et al., 2000). Así mismo, altas concentraciones circulantes de esta quimiocina han sido asociadas a mal pronóstico en pacientes con carcinoma mamario (Lebrecht, et al., 2004). Además de tener un valor pronóstico significativo para la supervivencia libre de enfermedad (Dwyer, et al., 2007), la elevada expresión de CCL2

en células de cáncer de mama promueve la formación de metástasis en pulmón y hueso a través del aumento de la infiltración de macrófagos y la diferenciación de osteoclastos, respectivamente (Lu, et al., 2009). Se ha mostrado también una asociación entre CCL2 y la afectación ganglionar (Lebrecht, et al., 2004), expresión de factores angiogénicos (Saji, et al., 2001; Ueno, et al., 2000; Wilson, et al., 2002) y activación de MMPs en pacientes con cáncer de mama (Saji, et al., 2001).

Por otra parte, ha sido descrita una fuerte inducción del fenotipo de las CSCs en células de cáncer de mama cocultivadas con CAFs, dicha inducción ha sido atribuida a un aumento en la secreción de CCL2 por los CAFs cuando estos son comparados con los NAFs (Tsuyada, et al., 2012).

Por consiguiente, el hecho de que los CAFs muestren una alta expresión de la IL6 y CCL2, siendo ambos inductores de las CSCs, es un hallazgo relevante, ya que como hemos señalado más arriba, estudios recientes muestran que estas células iniciadoras del cáncer o CSCs juegan un papel crucial en la iniciación tumoral, progresión y en la refractariedad terapéutica (Visvader, et al., 2008).

El FGF7, forma parte de la familia de FGFs, que incluye más de 22 miembros, incluyendo FGF1 (ácido), FGF2 (basico), FGF3 (int2), FGF4 (hst), FGF5, FGF6, FGF8 (AIGF) y FGF9 (GAF) (Basilico, et al., 1992; Miyamoto, et al., 1993; Tanaka, et al., 1992). Entre los FGFs conocidos, FGF7 y FGF10 son inusuales, ya que tienen un origen estromal y parecen actuar específicamente sobre las células epiteliales siendo, por tanto, factores de crecimiento paracrinos (Rubin, et al., 1995).

Estudios previos han documentado la importancia del FGF7 en el control del crecimiento de epitelio mamario (Pekonen, et al., 1993), demostrando también la importancia del receptor de FGF7 (FGFR2-IIIb) en el desarrollo y morfogénesis de los lóbulos de la glándula mamaria en ratones transgénicos (Jackson D., et al., 1997).

Además, se ha observado que FGF7 induce la proliferación de células de cáncer de mama (Bansal, et al., 1997). Así, altos niveles de expresión transgénica de FGF7 en ratones durante el embarazo y la lactancia, implican una alta frecuencia de desarrollo de hiperproliferación en las yemas terminales de la glándula mamaria y adenocarcinomas (Kitsberg, et al., 1996). Por otro lado, *Jacquemier y col.* (1998) han demostrado que la proteína FGF7 está asociada con los tumores de mama más diferenciados y menos agresivos (Jacquemier, et al., 1998).

Recientemente, se ha mostrado que FGF7 estimula la proliferación de las células epiteliales pero no de los fibroblastos estromales. Así mismo, se observó que el medio condicionado derivado de células estromales incrementa la proliferación de células epiteliales de mama normales y neoplásicas. Este efecto puede ser anulado mediante un anticuerpo neutralizante frente a FGF7. Todos estos datos sugieren que FGF7 es un factor de crecimiento paracrino en la mama, ya que es producido por los fibroblastos estromales de mama y posee importantes papeles en la proliferación y morfogénesis, tanto en células epiteliales como en mioepiteliales (Palmieri, et al., 2003). Interesantemente, *Palmieri C y col.* (2003) no encontraron evidencias de la existencia de un receptor para FGF7 en las células estromales, indicando que los receptores celulares de este factor en la mama son células epiteliales y no fibroblastos.

En cuanto a la mayor expresión de las metaloproteasas 2, 9 y 11 por los CAFs, es importante mencionar la relación de estas proteasas con la progresión tumoral.

La degradación del tejido conectivo estromal y de los componentes de la membrana basal son elementos clave en la invasión tumoral y metástasis. Algunos componentes, en particular los colágenos intersticiales, son muy resistentes a los ataques proteolíticos, siendo sólo degradados por las MMPs (Nelson, et al., 2000). Las MMPs pueden también tener un impacto en el comportamiento tumoral *in vivo* como una consecuencia de su capacidad para escindir factores de crecimiento, receptores celulares de membrana, moléculas de adhesión celular, o quimiocinas/citoquinas. Por tanto, esos datos desafían claramente el clásico dogma que indica que las MMPs promueven las metástasis únicamente por la modulación de la remodelación de

la ECM (Egeblad, et al., 2002; Manes, et al., 1999; Noe, et al., 2001; Turk, et al., 2004). Así mismo, mediante la escisión de factores pro-apoptóticos, las MMPs pueden inducir un fenotipo más agresivo a través de la generación de células resistentes a la apoptosis (Fingleton, et al., 2001). Las MMPs también pueden regular la angiogénesis tumoral, tanto positivamente a través de su capacidad para movilizar o activar los factores pro-angiogénicos (Stetler-Stevenson, 1999), como negativamente a través de la generación de inhibidores de la angiogénesis, tales como angiostatina, endostatina y tumstatin, escindidos de largas proteínas precursoras (Cornelius, et al., 1998).

Las MMPs, especialmente las gelatinasas MMP2 (Baker, et al., 2002; Duffy, et al., 2000; Grieu, et al., 2004; Jones, et al., 1999; Li H. C., et al., 2004a; Sivula, et al., 2005; Talvensaari-Mattila, et al., 2001) y MMP9 (Chantrain, et al., 2004; Li H. C., et al., 2004a; Pellikainen, et al., 2004; Vizoso, et al., 2007) han sido estudiadas como factores pronósticos en el cáncer de mama, siendo asociadas con un peor pronóstico en varios subgrupos de pacientes. Esto puede ser debido tanto a la relación de las MMPs con la invasión tumoral y la metástasis, características que se deben a su especial capacidad para degradar el colágeno de tipo IV que se encuentra en la membrana basal (Jones, et al., 1997); como por su capacidad de inducción de la angiogénesis (Egeblad, et al., 2002).

La MMP11 es otra MMP que pueden ser altamente expresada y/o relacionada con la evolución clínica en el cáncer de mama (Duffy, et al., 2000; Vizoso, et al., 2007). Hay varios aspectos relacionados con el gran interés de la MMP11 en cáncer de mama. Estudios previos han demostrado que la MMP11 (Estromalisina 3) se expresa preferentemente en las células del estroma peritumoral (Basset, et al., 1997; Basset, et al., 1990), y que altos niveles de esta proteína están asociados con la progresión tumoral y con un mal pronóstico de los pacientes (Ahmad, et al., 1998; Anderson, et al., 1995; Basset, et al., 1997; Chenard, et al., 1996; Lochter, et al., 1999; Nakopoulou, et al., 2002b; Tetu, et al., 1998). De hecho, la MMP más diferencialmente sobreexpresada en los CMIs fue la MMP11, cuya expresión se encontró en el

85,7% de los casos con alto perfil de expresión de MMPs/TIMPs en las CMIs y sólo en el 4,6% de los casos con bajo perfil de expresión, siendo su expresión considerada como un marcador biológico útil para identificar estas poblaciones de CMIs (Gonzalez L. O., et al., 2007). Sobre la base de este hallazgo, y después de que el análisis llevado a cabo por PCR en tiempo real de 65 factores asociados con la progresión tumoral y la inflamación, *Eiró y col*. (2012) (Eiro, et al., 2012a) recientemente observaron que de los 65 factores a estudio, 22 factores estaban relacionados con la expresión de MMP11 por los CMIs. De ellos, los factores más diferencialmente expresados entre los dos grupos de tumores fueron la IL1, 5, 6, 17, IFNß y NFκB. En conjunto, estos resultados indican que los tumores de peor pronóstico identificados por la expresión de MMP11 por los CMIs intratumorales, muestran una mayor expresión de los genes relacionados con la inflamación. Estas asociaciones son relevantes debido a que estos genes que están altamente expresados, han sido asociados con varios mecanismos biológicos relacionados con la progresión del tumor (Aggarwal, et al., 2006; Bachelot, et al., 2003; Gemma, et al., 2001; Heng, et al., 2009; Kato, et al., 2001; Numasaki, et al., 2003; Saijo, et al., 2002). Es también relevante el nuevo hallazgo que muestra una asociación entre la expresión de MMP11 o TIMP2 por los CMIs en el centro tumoral y un alto ratio de CD68 / (CD3 + CD20) (macrófagos (CD68 +), células T (CD3 +) y células B (CD20 +)) (Eiro, et al., 2012b), ya que ambas proteínas son los dos factores principales que definen el fenotipo pro-metastásico de los CMIs en nuestros estudios anteriores (Del Casar, et al., 2009; Gonzalez L. O., et al., 2010b; Gonzalez L. O., et al., 2007; Vizoso, et al., 2007). Así mismo, si hay una alta proporción de CD68 / (CD3 + CD20) en el frente invasivo tumoral, la mayoría de las CMIs con un fenotipo positivo para la MMP11 o TIMP2 en el centro tumoral son macrófagos. Todos estos resultados sugieren que una alta proporción CD68 / (CD3 + CD20) en el frente invasivo contribuye a polarizar los macrófagos para lograr un alto fenotipo metastático en el centro tumoral.

Por otro lado, hay que destacar que varios estudios han observado que el TGFβ actúa como supresor tumoral en estadíos tempranos de la tumorigénesis, en cambio cuando el tumor está

más desarrollado, los cambios genéticos y/o bioquímicos inducen a TGFβ a estimular la progresión tumoral por su actividad pleiotrópica tanto en las células tumorales como en las células estromales no malignas (Akhurst, et al., 2001; Gregoire, et al., 1995; Kalluri, et al., 2006). Estos datos están en concordancia con nuestra hipótesis sobre el posible origen de los CAFs en los NAFs residentes en el tejido mamario, adquiriendo un fenotipo más agresivo como consecuencia de las interacciones con las células tumorales.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que los CAFs mostraron mayores niveles de IL6, CCL2, FGF7, MMP2, MMP9 y MMP11, en comparación con los NAFs asociados, y que la expresión elevada de estos factores puede contribuir a la progresión tumoral en el cáncer de mama.

III. Evaluación del perfil molecular de los CAFs cocultivados con líneas celulares de cáncer de mama con diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231) la población total a estudio.

El papel principal de las interacciones epitelio-estroma en el desarrollo de la glándula mamaria es bien conocido. Pero la acumulación de evidencias en el cáncer de mama han demostrado que las interacciones alteradas producidas entre las células malignas epiteliales y los fibroblastos asociados también desempeñan un papel importante en el desarrollo, crecimiento y progresión tumoral (Elenbaas, et al., 2001; Polyak, et al., 2010; Shekhar, et al., 2001; Wiseman, et al., 2002). No obstante, a pesar del creciente número de estudios enfocados en las interacciones epitelio-estroma en tumores sólidos, el papel desempeñado por los fibroblastos en el desarrollo y progresión del cáncer de mama aún no se entiende completamente. Por esta razón, el uso de modelos de cocultivos utilizando fibroblastos derivados de estroma maligno puede proporcionar una herramienta práctica para el análisis de las influencias recíprocas entre el estroma y las células epiteliales tumorales.

En el presente trabajo se evalúa el perfil molecular de los CAFs de todos los pacientes incluídos en el estudio tras el cocultivo con líneas celulares de cáncer de mama que presentan diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231). Los CAFs cocultivados con la línea tumoral MCF7, la cual posee un bajo potencial metastático, mostraron un aumento en la expresión de TGFβ, HGF, IL8, MMP2 y VEGFA; mientras que los niveles de CCL2, NFκB y MMP11, se redujeron en comparación a los CAFs basales. Con respecto a los CAFs cocultivados con la línea tumoral de alta poder metastático MDA-MB-231, se observó una mayor expresión de S100A4, TGFβ, HGF, IL6, IL8, MMP2 y VEGFA; mientras que la expresión de PDGFA, CCL2 y NFκB, fue menor en comparación con los CAFs basales. Por consiguiente, TGFβ, HGF, IL8, MMP2 y VEGFA, tienen una mayor expresión por los CAFs cuando estos son cocultivados con cualquiera de las dos líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en este estudio; mientras que CCL2 y NFκB se redujeron en ambos casos (Figura 53). Esta observación lleva a considerar la existencia de un comportamiento común en la expresión de varios factores secretados por los CAFs cuando estos son cocultivados con células tumorales, independientemente de la agresividad biológica de estos últimos tipos celulares.

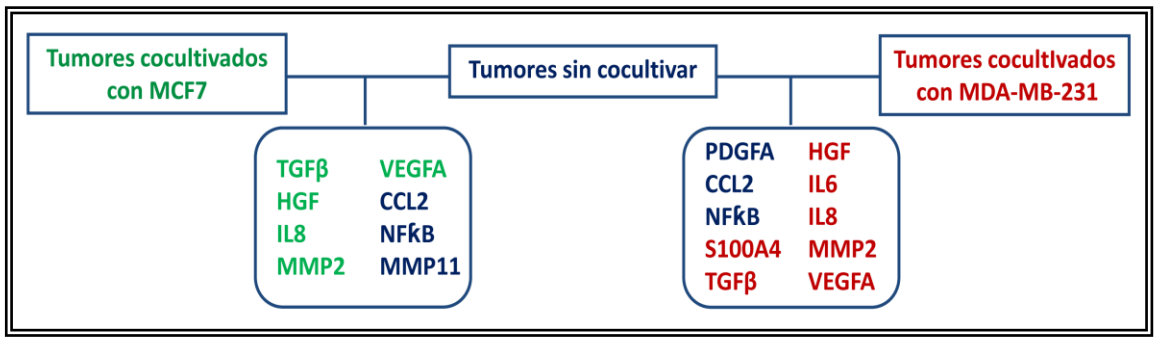

Figura 53. Factores cuya diferencia de expresión es significativa al comparar la expresión basal de los CAFs con la expresión de éstos tras ser cocultivados con ambas líneas tumorales. Los factores en azul representan los factores con mayor expresión en los CAFs sin cocultivar, los factores en rojo representan los factores con mayor expresión por los CAFs cocultivados con MDA-MB-231 y, los factores en verde representan los factores con mayor expresión por los CAFs cocultivados con MCF7.

El TGFβ es una citoquina fuertemente implicada en la regulación de varios procesos celulares y tisulares, que van desde el control del ciclo celular a la inmunovigilancia a la regeneración de tejidos. La desregulación de la expresión de TGFβ se asocia con muchos tipos de tumores y, a menudo, se relaciona también con un mal pronóstico (Lampropoulos, et al., 2012). Existe una relación del TGFβ1 con el desarrollo de metástasis óseas en cáncer de mama. TGFβ1 es liberado de la matriz ósea durante la reabsorción, aumentando la invasión tumoral en el tejido óseo por la promoción de la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) producida por las células tumorales, la cual es fuertemente asociada con la reabsorción ósea en modelos humanos y animales (Farina, et al., 1998). Se ha observado, además, que el bloqueo de TGFβ1 en las células de mama resulta en una disminución de la osteólisis, menor migración tumoral al hueso y una mayor supervivencia en ratones (Yin, et al., 1999). TGFβ1 juega también un papel importante en las interacciones estroma-epitelio, creando un ambiente favorable para la invasión y metástasis de la célula epitelial. De hecho, estudios recientes han mostrado que la expresión del receptor de TGFβ1 es mayor en el estroma de mujeres con cáncer de mama de alto estadio tumoral (Korkaya, et al., 2011). También se ha descrito que altos niveles de ARNm de TGFβ1 en tumores de mama se asocian con un incremento de la densidad microvascular (Akhurst, et al., 2001; Elenbaas, et al., 2001; Farina, et al., 1998).

HGF es también una importante proteína secretada por los fibroblastos que media en el desarrollo y la progresión de tumores (Wang J., et al., 2001). En estadíos tempranos de cáncer de mama, la expresión de esta proteína es típicamente detectada, aunque a bajos niveles, en el estroma de hiperplasias y carcinomas *in situ*. Sin embargo, en estadíos más avanzados (carcinomas invasivos), la expresión de HGF está a menudo incrementada en las células epiteliales, facilitando así la estimulación de la proliferación de forma paracrina y autocrina(Elenbaas, et al., 2001; Parr, et al., 2004; Taniguchi, et al., 1995).

Se ha demostrado que HGF transduce sus actividades biológicas a través del receptor tirosin quinasa MET, activando varias vías intracelulares las cuales, a su vez, transmiten la señal de HGF al citosol y al núcleo de las células (Comoglio, et al., 2001; Eckerich, et al., 2007; Ma P. C., et al., 2007). La pareja de HGF/MET controla la expresión de un panel de genes que son importantes para estos procesos, incluyendo HIF-1α, miembros del sistema de activación del plasminógeno y el receptor CXCR4 (Maroni, et al., 2007; Matteucci, et al., 2009). Los receptores tirosin-quinasa Met y CXCR4 están asociados con la morfogénesis y la diferenciación funcional del epitelio de la glándula mamaria normal y desempeñan, además, un papel importante en la transformación maligna (Nagy, et al., 1996).

Nuestros resultados están en concordancia con estudios previos que muestran la expresión de TGFβ Y HGF por los CAFs, contribuyendo así a la proliferación de las células tumorales (Castells, et al., 2012) y promoviendo el crecimiento hiperplásico o tumurogénico del epitelio normal de la mama (Stuelten, et al., 2005). La inducción de tumores de mama también ha sido demostrada en ratones ortotópicamente injertados con fibroblastos transfectados con HGF y/o TGFβ y co-inyectados con células epiteliales de mama de apariencia normal, poniendo de relieve el papel fundamental de las interacciones heterotípicas en el desarrollo de la mama en humanos (Kuperwasser, et al., 2004). Estas interacciones cruzadas tumor-estroma parecen tener también una importante influencia en el microambiente de los ganglios linfáticos involucrados, como se demuestra por la capacidad de los fibroblastos ganglionares para afectar a la viabilidad, proliferación y migración de las células de cáncer de mama (LeBedis, et al., 2002; Montel, et al., 2006; Santos, et al., 2011). La raíz de estas alteraciones parece ser la inducción de cambios recíprocos en los perfiles genómicos de las células tumorales y estromales que implican, en particular, genes críticos para el control del crecimiento, adhesión celular e invasividad (Buess, et al., 2007; Montel, et al., 2006; Rozenchan, et al., 2009; Santos, et al., 2011).

También es de notable importancia el hecho de que HGF aumenta la expresión de CXCR4 vía NFκB, contribuyendo a la invasión celular. Así, el bloqueo de la expresión de NFκB produce una inhibición de la inducción de la expresión de CXCR4 en respuesta a HGF (Esencay, et al., 2010). Ha sido demostrado que la familia de la proteína quinasa C (PKC) está involucrada en la expresión y función de CXCR4, estando también vinculada a la transducción de la señal intracelular inducida por HGF en las células tumorales (Chianale, et al., 2010; Tyan, et al., 2011). Se ha observado, además, que la fosforilación de CXCR4 es inducida por el tratamiento con HGF en las líneas celulares MDA-MB-436 y MCF7, siendo ésta atenuada por la inhibición de PKC (Huang S., et al., 2012).

Por otro lado, el HGF es capaz de promover la producción de MMP14 en la línea celular MDA-MB-231, la cual a su vez activa a la MMP2, aumentando así la capacidad de invasión de las células tumorales de mama (Jiang W. G., et al., 2006). En este sentido, es remarcable el hecho de que la MMP2 es uno de los factores más secretados por los CAFs cocultivados con las líneas celulares de cáncer de mama en nuestra población de estudio.

En este trabajo, se ha mostrado que la IL8 es uno de los factores de mayor expresión por los CAFs cocultivados con las líneas tumorales MCF7 y MDA-MB-231. Este dato es relevante, ya que la IL8 juega un papel importante en la inflamación y en los procesos de cicatrización (Dobreva, et al., 2006), y tiene la capacidad para reclutar tanto células T como células inflamatorias no específicas en los sitios de inflamación mediante la activación de los neutrófilos (Schroder, 1992). Además, la IL8 también estimula la producción de la α-actina del músculo liso en los fibroblastos humanos (Feugate, et al., 2002).

Además, ha sido descrito que la IL8 tiene la capacidad de promover el crecimiento tumoral, la angiogénesis, y las metástasis en modelos murinos de varios tipos tumorales (Li A., et al., 2005a). Así mismo, recientemente se ha observado que la IL8 promueve el potencial invasor y metastático en las células de cáncer de mama. Los estudios clínicos también han demostrado que los niveles de IL8 son más altos en el tejido tumoral que en el tejido normal de mama, y

que un aumento en la concentración sérica de la IL8 está asociado con estadíos avanzados en carcinomas mamarios (Benoy, et al., 2004). Es importante también la participación de la IL8 en el proceso de angiogenesis (Hu, et al., 1993; Koch, et al., 1992), ya que es una citoquina proangiogénica que colabora en la propagación de las metástasis a distancia a través de la neovascularización, promoviendo la supervivencia de la masa tumoral mediante el mantenimiento de una red rica de capilares, facilitando así que se cubran las necesidades de nutrientes de las células tumorales. De hecho, se ha demostrado que el bloqueo de la IL8 y de su receptor CXCR2, inhibe significativamente el proceso de angiogénesis (Trevino, et al., 2006; Wente, et al., 2006). Además, la IL8 es un quimiotáctico para los fibroblastos, acelerando su migración, y estimulando la deposición de la tenascina, fibronectina y colágeno I, durante la cicatrización de heridas *in vivo* (Feugate, et al., 2002).

También es destacable el hecho de que algunos miembros de la familia de las MMPs, incluyendo la MMP2 y la MMP9, están regulados por la expresión de la IL8 (Li A., et al., 2003; Luca, et al., 1997). En concordancia con estos estudios, nuestros resultados muestran que la expresión de la MMP2 por los CAFs se incrementó de manera significativa después de cocultivar estos fibroblastos con las líneas tumorales de cáncer de mama utilizadas en este estudio. Además, la acumulación de evidencias demuestra que la IL8, a través de sus receptores CXCR1/2, es un importante regulador de la actividad de CSCs de mama. La inhibición de la señalización de CXCR1/2 ha demostrado ser eficaz en modelos preclínicos de cáncer de mama, proporcionando un buen fundamento para la utilización de estos receptores como diana terapeútica (Singh, et al., 2013).

Los extensos efectos del aumento de la actividad de la IL8 en la patogénesis del tumor hacen que sea un objetivo terapéutico único en la terapia del cáncer. De hecho, el bloqueo de la actividad de la IL8 con un anticuerpo monoclonal disminuye el crecimiento del tumor en dos modelos murinos de cáncer (Mian, et al., 2003). Así mismo, el bloqueo de la expresión de la IL8 en algunas líneas celulares de melanoma humano mediante el uso de ARN antisentido, ha

mostrado que la IL8 funciona como un modulador del crecimiento autocrino para estas células (Schadendorf, et al., 1993). Además, recientes estudios muestran un efecto terapeútico potencial frente a las células de cancer de mama mediante la inhibición de la IL8 (Li J., et al., 2012a; Park S. H., et al., 2013).

Tanto la IL8 como el VEGF son componentes importantes en la respuesta celular a la hipoxia, un evento común en el cáncer, incluyendo el melanoma humano, cáncer de colon y de páncreas, entre otros (Karashima, et al., 2003).

Las células tumorales requieren nutrientes, oxígeno y la capacidad para evacuar los productos de desecho. Estos requisitos se cumplen por medio de la angiogénesis, la formación de nuevas redes vasculares a partir de los vasos sanguíneos pre-existentes. Este proceso es uno de los factores cruciales que contribuye al crecimiento y metástasis en el cáncer de mama (Bergers, et al., 2003). VEGFA es un miembro de la familia de VEGF, y es la isoforma más común y más estudiada, por lo que normalmente se describe como VEGF (Halper, 2010). Este factor es considerado un potente regulador de la angiogénesis, y de este modo está implicado en el desarrollo y progresión de tumores sólidos, ya que posee la capacidad de promover el crecimiento de las células endoteliales derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos. Se ha observado que este factor induce una potente respuesta angiogénica en una gran variedad de modelos *in vivo* (Leung, et al., 1989; Plouet, et al., 1989), existiendo una relación positiva entre VEGFA y la densidad microvascular (Obermair, et al., 1997).

Existen varias evidencias que muestran la importancia de VEGF en el cáncer de mama (Gasparini, 2000). Así, pacientes con cáncer ductal locorregional tienen altas concentraciones séricas de VEGF en comparación con mujeres con tumores benignos de mama. Las mayores concentraciones de VEGF en suero fueron encontradas en pacientes con cáncer de mama metastático, en particular entre aquellos que no habían recibido tratamiento (Salven, et al., 1999). Existen, además, numerosos estudios que relacionan niveles elevados de expresión de

VEGF en el tejido tumoral con baja supervivencia en pacientes con cáncer de mama (Bando, et al., 2005; Ghosh, et al., 2008; Manders, et al., 2002; Toi, et al., 2002).

Como puede observarse, nuestros resultados indican que los CAFs cocultivados con cualquiera de las dos líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en el presente estudio, responden con un aumento de la expresión de varios factores estromales que poseen acciones biológicas relacionadas con la promoción de la progresión tumoral. Por consiguiente, nuestros datos apoyan el papel clave de los CAFs en el carcinoma de mama.

IV. Evaluación del perfil molecular de las líneas celulares de cáncer de mama con diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231) cocultivadas con CAFs en la población total a estudio

Nuestros resultados también mostraron que varios de los factores estromales estudiados (S100A4, TGFβ, FGF7, PDGA, PDGB, uPA, IL6, IL8, MMP2, MMP11, TIMP1 y VEGFA) se incrementaron en las dos líneas celulares de cáncer mama después de ser cocultivadas con los CAFs (Figura 54).

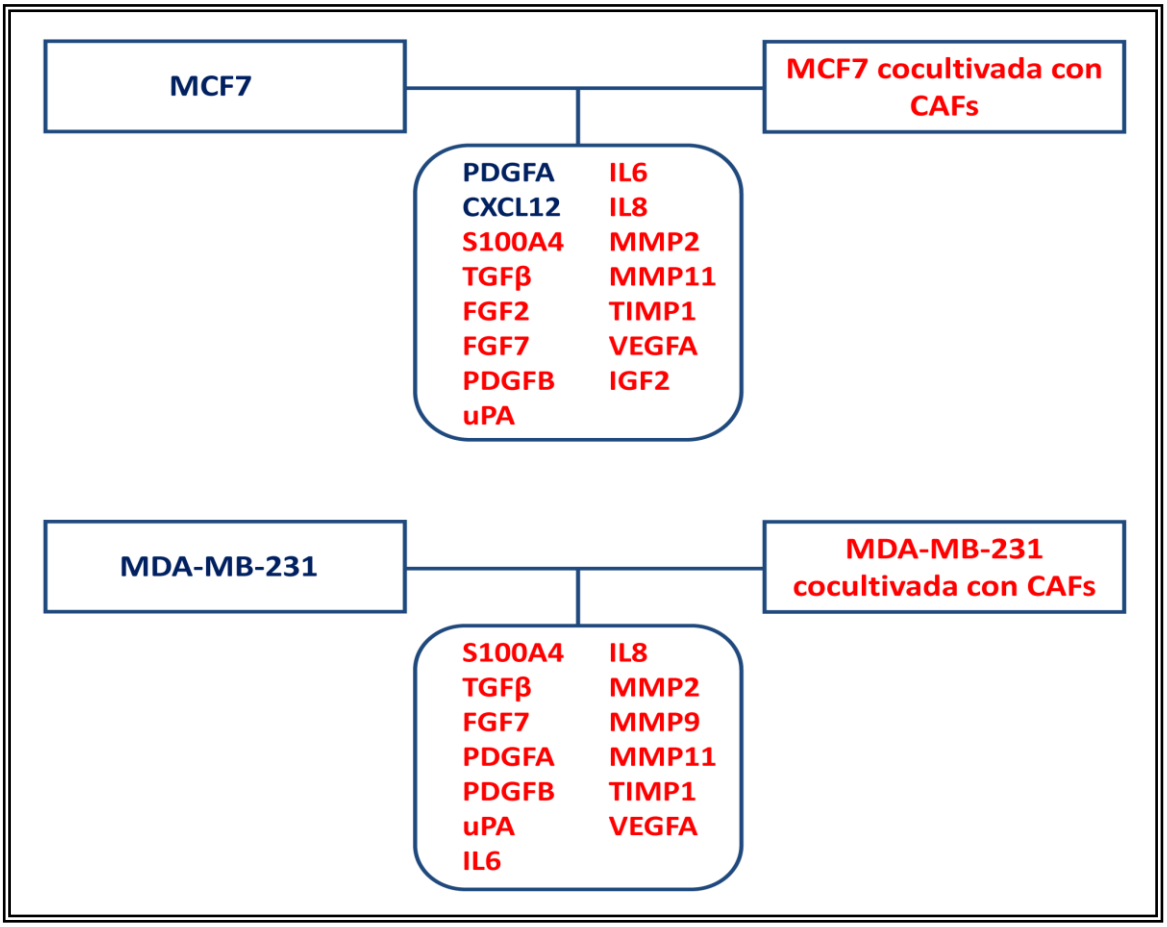

Figura 54. Factores cuya diferencia de expresión es significativa al comparar la expresión basal de las líneas tumorales con la expresión de éstas tras ser cocultivadas con ambas los CAFs. Los factores en azul representan los factores con mayor expresión en las líneas sin cocultivar, los factores en rojo representan los factores con mayor expresión por las líneas cocultivadas con los CAFs.

Estos datos parecen reflejar la existencia de una influencia recíproca entre las células tumorales y los CAFs, lo que está en concordancia con otros estudios previos. Así, por ejemplo, ha sido descrito que una alta expresión ectópica de TGFβ activo por las células tumorales, produce un mayor contenido de CAFs y ECM, lo que demuestra la importancia de TGFβ como inductor de estroma reactivo en el cáncer (Orimo, et al., 2005). Además, nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios que demuestran que las células tumorales pueden producir estos importantes factores estromales. Por ejemplo, se detectaron altos niveles de

IL8 en células de cáncer de mama (De Larco, et al., 2001; Green, et al., 1997; Sheridan, et al., 2006; Youngs, et al., 1997), así como en las células epiteliales de una amplia variedad de tumores humanos incluyendo cáncer de colon (Brew R., et al., 1997), melanoma (Schadendorf, et al., 1993), cáncer de prostata (Greene, et al., 1997), o de ovario (Xu, et al., 2000).

Anteriormente, hemos mencionado varios aspectos que apoyan la importancia de factores como TGFβ, FGF7, IL6, IL8, MMP2, MMP11 y VEGFA en la progresión tumoral. Otros factores como S100A4, PDGFA, PDGFB, uPA y TIMP1 también fueron altamente expresados tanto por la línea celular MCF7 como por la línea MDA-MB-231.

En cuanto a la expresión de FGF7 por las líneas celulares de cáncer de mama, es importante tener en cuenta que aunque se han obtenido datos en cáncer de pulmón y de mama que sugieren que FGF7 puede ser expresado de una forma autocrina en algunos tipos de células tumorales (Tamaru, et al., 2004; Yamayoshi, et al., 2004), éste es un factor paracrino que actúa tanto en células epiteliales como en mioepiteliales. Por ello, su localización en las líneas tumorales puede ser debido a que su receptor FGFR2-IIIb, el cual se expresa sólo en las células epiteliales, puede unirse a FGF7 e inmovilizarlo en este tipo celular, donde es detectado. Esta es también la conclusión alcanzada por *Jacquemier y col.* (1998), en su estudio sobre la expresión de FGF7 en carcinomas de mama humanos, en el que mediante inmunohistoquímica observaron la localización de FGF7 tanto en células tumorales como en los compartimentos del estroma (Jacquemier, et al., 1998).

La S100A4 es un miembro de la superfamilia de proteínas de unión a calcio S100 (Sugimoto, et al., 2006). S100A4 se expresa en muchos tipos celulares además de en las células tumorales, tales como fibroblastos, células del sistema inmune y adipocitos (Gross, et al., 2013), posee además una amplia gama de funciones biológicas, como la regulación de la angiogénesis, la supervivencia celular, la motilidad y la invasión. Así, niveles elevados de esta proteína se asocian con una baja supervivencia en pacientes con cáncer de mama, y se ha observado

también que es capaz de inducir metástasis en modelos murinos (Ismail, et al., 2008; Jenkinson, et al., 2004).

Las proteínas diana de S100A4 se localizan tanto intracelular como extracelularmente, teniendo por tanto un papel en ambos compartimentos. Respecto a su papel intracelular, la S100A4 es un conocido factor modulador de la ECM y de la integridad del citoesqueleto, promoviendo la metástasis mediante el aumento de la motilidad y de la capacidad invasiva de las células tumorales, lo que consigue a través de la interacción con componentes del citoesqueleto como la cadena pesada de la miosina no muscular, la alteración de la adhesión celular y rompiendo las uniones con las cadherinas (Sherbet, 2009).

Se ha observado además que la expresión extracelular de S100A4 promueve la metástasis mediante la inducción de la secreción de MMPs (Saleem, et al., 2006; Schmidt-Hansen, et al., 2004b; Zhang G., et al., 2011), y promoviendo la angiogénesis a través de la estimulación de la motilidad de las células endoteliales y la invasión tumoral. En este sentido se ha descrito que la S100A4 promueve la invasión y la angiogénesis en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 a través del aumento de expresión de la MMP13 (Wang L., et al., 2012a). También se ha observado una relación entre la expresión de S100A4 y mal pronóstico en varios tipos de tumores de mama (Cabezon, et al., 2007; Garrett, et al., 2006).

Por consiguiente, diferentes estudios han demostrado el papel central de S100A4 en el proceso de la metástasis del cáncer, lo que califica a S100A4 como una diana potencialmente prometedora para la intervención terapéutica contra la metástasis (Boye, et al., 2010; Hernandez, et al., 2013; Zhang G., et al., 2011).

Los miembros de la familia PDGFs y sus receptores (PDGFRs) influyen en el crecimiento y en la invasividad tumoral a través de sus efectos sobre las células tumorales y el microambiente que

las rodea (Cao, 2013), siendo PDGF un potente mitógeno y factor quimiotáctico para muchas células del tejido conectivo (Heldin, et al., 1999).

En condiciones fisiológicas PDGFs y PDGFRs llevan a cabo sus acciones biológicas de una manera paracrina (Heldin, et al., 1999). Hay varios miembros de la familia PDGF (A, B, C y D). Entre ellos, el PDGFB exhibe la actividad más fuerte (Yoshida, et al., 2012). PDGFB, también denominado protooncogén c-sis, es un candidato ideal para el estudio, ya que su aportación para el desarrollo y mantenimiento de las células tumorales es apoyada por varios trabajos (Liang, et al., 1996; Zhang Y., et al., 2013). Altos niveles de expresión de PDGFB han sido encontrados en tejidos tumorales de mama comparado con tejido normal (Coltrera, et al., 1995); además tiene la capacidad de activar la vía de NFκB, la cual es conocida por su papel regulador en la producción de citoquinas (van Steensel, et al., 2010).

En general, los efectos de los PDGFs en la promoción tumoral son principalmente autocrinos, estromales y angiogénicos (Hermanson, et al., 1992). Se ha observado un incremento de la expresión de PDGFB en varias líneas tumorales de mama, así como en otras líneas celulares malignas no hematopoyéticas como melanoma, cáncer de ovario y cáncer de próstata (Ariad, et al., 1991; Bronzert, et al., 1987; Elenbaas, et al., 2001). La señalización autocrina de PDGF ha demostrado ser esencial para la formación de tumores y metástasis en tumores mamarios mediados por Ras, así como en ratones transgénicos MMTV-Neu/TGFβ (Jechlinger, et al., 2006).

También existe una señalización paracrina de los PDGFs, como demostró el análisis inmunohistoquímico en tejidos de cáncer de mama humano, ya que gracias a él observaron la expresión/activación del receptor de PDGF en la membrana de poblaciones de células del estroma periepitelial, lo que sugiere una estimulación paracrina del tejido estromal adyacente por las células tumorales de mama (Coltrera, et al., 1995).

Existen varios mecanismos por los que los PDGFs están implicados en la progresión tumoral, tales como la angiogénesis, la EMT, el reclutamiento de fibroblastos y el control de la respuesta inmune del tumor.

La participación de PDGFs en la angiogénesis implica una interacción cruzada con otros factores angiogénicos, como el VEGF y las angiopoyetinas. Se ha observado, además, que la expresión de ARNm de VEGF y PDGFs por RT-PCR es mayor en tejido tumoral que en tejido normal en cáncer de mama, y que estas expresiones están significativamente relacionadas con el grado de angiogénesis o metástasis en los ganglios linfáticos (Chua, et al., 1985). Los PDGFs pueden promover también la neovascularización mediante el reclutamiento de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea (Li X., et al., 2005b; Saik, et al., 2011; Song, et al., 2009).

Los PDGFA, PDGFB y PDGFD son capaces de inducir la EMT en diferentes modelos experimentales, considerándose la EMT como un rasgo característico de la invasión tumoral y de la metástasis (Kong, et al., 2008; Patel, et al., 2010). Se ha observado, además, que el PDGFB tiende a inducir la translocación nuclear de la β-catenina y la proliferación celular en la línea tumoral MDA-MB-231, mientras que no se observó ninguno de estos procesos en la línea tumoral MCF7. Los resultados de estos estudios sugieren que el PDGFB regula la expresión de la proteína de β-catenina y está asociada con el comportamiento de células tumorales (Yokoyama, et al., 2011). Se ha sugerido, además, que el circuito autocrino de PDGF es crucial para el mantenimiento de la EMT (van Zijl, et al., 2009). Durante la EMT, el TGFβ y el oncogen Ras actúan sinérgicamente aumentando la expresión del receptor de PDGF para llevar a cabo la estimulación a través de un bucle autocrino (Kalluri, et al., 2006).

En modelos experimentales de cáncer de mama, PDGF inicia una respuesta desmoplásica a través de una señalización paracrina (Shao, et al., 2000; Walker, 2001). PDGFB puede promover la proliferación de fibroblastos y reforzar la matriz extracelular (Jeoung, et al., 2002), regula la síntesis de pericitos y las funciones de los fibroblastos en la matriz tumoral (Roskoski,

2007). Además, el PDGFB está implicado de manera significativa en el reclutamiento, proliferación y diferenciación de fibroblastos estromales, dando lugar a una tasa de crecimiento acelerado y a un fenotipo invasivo (Mueller, et al., 2004; Shao, et al., 2000). Parece que las vías de señalización de PDGF, PDGFR y TGFβ, muestran funciones coordinadas y complementarias en el control del comportamiento de los CAFs. PDGF induce principalmente la proliferación de fibroblastos, mientras que el TGFβ activa a los fibroblastos, produciendo un fenotipo modificado que secreta un amplio rango de proteínas de la matriz y de factores de crecimiento (Bruna, et al., 2007).

También ha sido estudiada la capacidad de PDGF para modular la respuesta inmune en modelos de tumores preclínicos. Además, PDGF estimula la migración de monocitos y la expresión de MMP2 y MMP9 (Wagsater, et al., 2009). PDGF también inhibe potentemente la citotoxicidad de las células *natural killer* (Gersuk, et al., 1991). Además, se ha demostrado que PDGF puede modular la vía de señalización de NFκB, la cual está directamente implicada en la regulación de la función inmune (Wang Z., et al., 2007). Por otro lado, en el microambiente interactivo del tumor-estroma, PDGF puede modular las funciones inmunosupresoras inducidas por TGFβ, tales como el la inhibición de la migración de macrófagos y el IFNγ (Bissell, et al., 2001).

De acuerdo con todas estas observaciones, varios estudios han mostrado que anticuerpos neutralizantes anti-PDGF inhiben la transformación celular mediada por oncogenes (Johnsson, et al., 1985). Existen reactivos específicos anti-PDGF, tales como anticuerpos neutralizantes contra ligandos de PDGF o contra sus dominios extracelulares que están en desarrollo. Sin embargo, varios inhibidores de la tirosin-quinasa están actualmente disponibles en la clínica, incluyendo imatinib, sunitinib, pazopanib y sorafenib, los cuales puede inhibir la señalización de PDGF (Davids, et al., 2009; Escudier, et al., 2007; Motzer, et al., 2007).

Recientemente, se ha mostrado que el imatinib (Glivec®), un inhibidor de la tirosin-quinasa específico para los receptores de PDGF, ejerce un significativo efecto inhibidor sobre la

proliferación, la invasión y la migración de las células tumorales en el cáncer de mama, así como una disminución de la expresión en la superficie celular de heparin sulfato proteoglicanos (HSPG), incluso después de la exposición de PDGF. Estos efectos dependen de la agresividad de las células de cáncer de mama y el tipo de HSPG. Por ello, se considera que el imatinib posee una potencial utilidad terapéutica en los pacientes con cáncer de mama (Malavaki, et al., 2013).

Tras realizar los cocultivos de los CAFs con ambas líneas tumorales, hemos observado que las células tumorales tienen también una alta expresión de uPA. Esta observación está en concordancia con el hecho de que los tumores malignos tienen la capacidad de degradar la ECM mediante una proteólisis controlada. El sistema activador del plasminógeno tipo uroquinasa está involucrado en estos procesos y se compone de uPA, el receptor de uPA (uPAR) e inhibidores (PAI-1 y PAI-2) (Blasi, 1999). El receptor de uPA juega un papel crucial tanto en la proteólisis pericelular como en la invasión y en la progresión tumoral (Gong, et al., 2000).

La unión de uPA a su receptor, implica la activación de una proteolisis en la superficie celular y la acción de uPA puede intensificarse resultando en la degradación de la matriz y, en consecuencia, el crecimiento, la invasión y la metástasis tumoral (Andreasen, et al., 1997; Hjertner, et al., 2000).

El aumento de las concentraciones tisulares de uPAR han sido observadas tanto durante la invasión tumoral inicial como durante la metástasis a otros órganos (Abendstein, et al., 2000; Fisher, et al., 2000). Varios estudios recientes también han mostrado que la uPA, el uPAR y el PAI-1 están relacionados con la supervivencia global de los pacientes con cáncer de mama, lo que sugiere que estos biomarcadores son útiles para predecir la evolución clínica en este tipo de tumores (Andres, et al., 2012). De hecho, uPA es considerado un indicador pronóstico independiente de metástasis y recurrencia, particularmente en el caso del cáncer de mama (Chen J., et al., 2001; Duffy, et al., 1998; Duffy, et al., 1988; Duffy, et al., 1990; Knoop, et al.,

1998; McMahon, et al., 2008; Thomssen, et al., 2009), ya que aumenta la migración de las células tumorales gracias a la degradación de la ECM, lo que permite a las células tumorales tener acceso a la circulación sistémica y colonizar varios órganos (Moreau, et al., 2011). Además, la expresión del uPA y de la MMP13 se relaciona con la transición de CDIS a CDI (Radisky, et al., 2007).

El TIMP1 es uno de los cuatro inhibidores naturales de las MMPs. El TIMP1 es una proteína multifuncional, ya que además de su función inhibidora de las MMPs, es también conocido por promover el crecimiento celular, inhibir la apoptosis, y está probablemente involucrado en la regulación de la angiogénesis (Wurtz, et al., 2008b; Wurtz, et al., 2005). Niveles elevados de mRNA y proteína de TIMP1 han sido detectados en muchos tipos de tumores, incluyendo el cáncer de mama. Varios estudios han observado la asociación existente entre altos niveles de TIMP1 y un mal pronóstico, tanto a nivel de ARNm y como a nivel proteico en el cáncer de mama (Kuvaja, et al., 2007; McCarthy, et al., 1999; Schrohl, et al., 2003; Schrohl, et al., 2004; Talvensaari-Mattila, et al., 2005; Wu Z. S., et al., 2008; Wurtz, et al., 2008a). Además, algunos estudios han descrito a TIMP1 como un marcador predictivo para la quimioterapia y la terapia hormonal, en la que la falta de respuesta se ha relacionado con altos niveles de TIMP1 (Lipton, et al., 2008; Schrohl, et al., 2006; Zhu, et al., 2012). De hecho, se ha demostrado que una alta expresión de TIMP1 podría disminuir significativamente la sensibilidad de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435 a la epirubicina y al paclitaxel, dos tratamientos antineoplásicos. El TIMP1 puede, además, activar potentemente las vías de señalización del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) / Akt y del NFκB. Así, la atenuación de TIMP1 inducida por el efecto de la epirubicina y paclitaxel fue revertida mediante la utilización de inhibidores químicos frente a PI3K/Akt y a NFκB, lo que demuestra que las vías de señalización de PI3K/Akt y NFκB están involucradas en el efecto inducido por TIMP1 en la quimio-resistencia. En resumen, todos estos datos indican que el TIMP1 disminuye la quimiosensibilidad a través

de la vía de transducción de señal de PI3K/Akt/NFκB en células de cáncer de mama MDA-MB-435 (Fu, et al., 2011).

Nuestros resultados demuestran que los CAFs estimulan la expresión de todos los factores a los que se ha hecho referencia en líneas celulares de cáncer de mama de alta y baja agresividad. Sin embargo, también es importante la existencia de algunas diferencias en la expresión de varios factores después de que los CAFs fuesen cocultivados con las líneas MCF7 o con MDA-MB-231. Así, mientras que MDA-MB-231 mostró un aumento de la expresión de MMP9, MCF7 mostró un aumento de la expresión de FGF2, CXCL2 e IGF2.

Como ya fue descrito anteriormente, la MMP9 juegan un importante papel en el crecimiento del tumor y en el desarrollo de metástasis, lo que contribuye a la agresividad de línea celular metastásica MDA-MB-231. También es notable el hallazgo de que los CAFs aumentaron la expresión por MCF7 de varios factores, tales como FGF2, CXCL2, MMP11 e IGF2, los cuales que están asociados a un comportamiento más agresivo en el cáncer.

El FGF2 juega un papel esencial tanto en los procesos fisiológicos como en los patológicos mediante la interacción con receptores específicos en la superficie celular (Beenken, et al., 2009; Korc, et al., 2009). Cada vez existen más evidencias de que el FGF2 promueve la proliferación de las células tumorales a través de la activación de la vía Ras/Raf/MEK/ERK (Lazar-Molnar, et al., 2000; Lefevre, et al., 2009; Nesbit, et al., 1999; Smalley, 2003). Además, se ha encontrado una concentración significativamente mayor de FGF2 en suero de pacientes con cáncer de mama respecto a sus controles normales normales (Granato, et al., 2006; Hewala, et al., 2010). Recientemente, se ha descrito que el crecimiento expansivo de dos líneas celulares de glioblastoma está mediado por FGF2 (Podergajs, et al., 2013). De acuerdo con estos datos, existe un trabajo previo en el que se muestra que la concentración de FGF2 está relacionado con la proliferación y progresión tumoral de las CSCs CD44 (+)/CD24 (-), a

través de la transición de la fase de reposo a la de división en el ciclo celular en la línea celular MCF7 (Yang, et al., 2012).

Debido a que una alta expresión de FGF2 y/o sus receptores es comúnmente detectada en tumores, el desarrollo de antagonistas frente a FGF2 y a sus receptores ha sido considerado como una estrategia potencial para la terapia del cáncer (Cronauer, et al., 2003; Li Q., et al., 2012b; Rusnati, et al., 2007; Wu X., et al., 2013).

El CXCL12 es una quimiocina altamente pleiotrópica, que influye en una gran variedad de procesos biológicos mediante la interacción con su receptor CXCR4. Es particularmente importante en la respuesta inmune, actuando como un potente factor quimiotáctico para linfocitos T maduros y monocitos (Bleul, et al., 1996). Al menos en ratones inmunodeficientes, CXCL12 puede promover la supervivencia y la proliferación de las células tumorales de mama (Orimo, et al., 2005). Además, puede inducir la producción de MMPs (Fernandis, et al., 2004) y promover la invasión de células de cáncer de mama *in vitro* (Liang, et al., 2005). Se ha observado su expresión en varias líneas celulares (Kang H., et al., 2005b), así como en tumores de pacientes con cáncer de mama, siendo más abundante en tumores con ganglios linfáticos positivos, en tumores de pacientes con recidivas o en aquellos de pacientes con metástasis o que no sobreviven (Kang H., et al., 2005a; Kang H., et al., 2005b). En un estudio previo se demostró que la que la co-implantación de células tumorales con fibroblastos que expresan CXCL12 aumenta el crecimiento del tumor y promueve la vascularización de los tumores en desarrollo.

El receptor CXCR4 se encuentra a menudo altamente expresado en tumores mamarios y se ha relacionado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Muller, et al., 2001; Salvucci, et al., 2006). Se ha mostrado, además, que la señalización de CXCL12-CXCR4 desempeña un papel en el crecimiento tumoral, invasión, la angiogénesis y el reclutamiento de células de la médula ósea (Fernandis, et al., 2004; Kishimoto, et al., 2005; Kryczek, et al., 2007;

Lee B. C., et al., 2004; Orimo, et al., 2005; Petit, et al., 2007); contribuyendo a la metástasis y al peor pronóstico clínico en pacientes con cáncer de mama. Así mismo, la expresión de CXCR4 en células tumorales de mama promueve las metástasis por atracción de las células tumorales a los sitios con elevada expresión de CXCL12, tales como los ganglios linfáticos (Muller, et al., 2001).

Recientes estudios sobre de la señalización autocrina de CXCL12 han indicado que este factor puede inducir la diferenciación de monocitos en una población distinta de macrófagos proangiogénicos e inmunosupresores en el microambiente tumoral (Sanchez-Martin, et al., 2011). Los resultados de estos estudios indican que elevadas expresiones de CXCL12 en el microambiente tumoral pueden alterar la capacidad invasiva, así como a las células inmunes asociadas a tumores que son reclutados hacia estos. Altas expresiones de CXCL12 han sido relacionadas, además, con un incremento de metástasis y un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Kang H., et al., 2005b). Así, la expresión de CXCL12 por las células tumorales mamarias puede mejorar la invasión *in vivo* en el microambiente tumoral a través del reclutamiento de macrófagos. Esta mejora de la invasión depende de la señalización de CXCR4 y, muy probablemente, se produce a través de la activación de CXCR4 en los macrófagos, lo que produce un aumento de las interacciones paracrinas con las células tumorales en el microambiente tumoral. El aumento de la secreción de CXCL12 también da lugar a una mayor densidad microvascular, lo que puede estar mediado por los macrófagos asociados a tumores, y contribuye a la arquitectura tumoral alterada. Estos resultados ponen de manifiesto cómo la regulación de las células tumorales del microambiente local puede aumentar la invasión y la motilidad, contribuyendo así a una mayor malignidad del tumor (Boimel, et al., 2012).

Varios agentes han sido utilizados para bloquear la interacción entre CXCL12 y CXCR4 como un medio para inhibir las metástasis. Estos incluyen anticuerpos neutralizantes anti-CXCR4 (Liang, et al., 2004; Muller, et al., 2001), inhibidores farmacológicos como AMD3100 (Smith, et al., 2004) y T140 (Tamamura, et al., 2003), y pequeños ARNs de

interferencia dirigidos a CXCR4 (Liang, et al., 2005; Smith, et al., 2004). También ha sido estudiado el bloqueo de la vía de señalización CXCL12-CXCR4 como tratamiento en el cáncer de mama (Duda, et al., 2011; Epstein, 2004).

Los IGFs juegan un importante papel en el desarrollo de la glándula mamaria normal, así como en la biología del cáncer de mama (Chitnis, et al., 2008; Rowzee, et al., 2008; Surmacz, 2000; Werner, et al., 2000). El IGF1 y el IGF2 son los péptidos similares a la insulina más estudiados. Estos factores están conservados evolutivamente y son conocidos por ser reguladores clave en el metabolismo energético y en el crecimiento celular (Djiogue, et al., 2013). La participación de los IGFs en la carcinogénesis se atribuye a su papel en la vinculación al metabolismo que requiere un alto consumo de energía, al aumento de la proliferación celular y, a la supresión de la apoptosis. Por lo que los IGFs han sido propuestos como mecanismo clave de unión entre la resistencia a la insulina y el cáncer (Djiogue, et al., 2013). También ha sido demostrada la inducción de la angiogénesis por el IGF2 a través de la estimulación de la migración y la diferenciación morfológica de las células endoteliales (Lee O. H., et al., 2000). De hecho, se ha observado una mayor expresión de este factor en el estroma de carcinomas mamarios invasivos respecto al tejido normal (Shekhar, et al., 2001; Singer, et al., 1995), y se asocia con la progresión tumoral en este tumor (Cullen, et al., 1992).

La señalización de IGF2 se produce a través de tres receptores, entre los que se encuentra la isoforma A del receptor de la insulina (IR-A) y el receptor de IGF1 (IGFIR). La mayoría de las acciones biológicas de IGF2 están mediadas por el receptor IGFIR, el cual contiene una tirosin-quinasa, y posee potentes actividades relacionadas con la supervivencia celular y con la inhibición de la apoptosis (Belfiore, et al., 2008; Pollak, 2008; Samani, et al., 2007; Werner, et al., 2009). La presencia del IGFIR es un requisito previo fundamental para la adquisición de un fenotipo neoplásico, por lo que las células con alteraciones en el gen de IGFIR, con algunas

excepciones, no se someten a la transformación maligna cuando se exponen a agentes oncogénicos (Sell, et al., 1993).

En cuanto a su unión con IR-A, hay varios estudios demostrando que una elevada expresión de IGF2 puede mediar con varios efectos cancerígenos a través de este receptor (Wang Y., et al., 2012b). Además, los receptores con dominio discoidina, los cuales están implicados en la migración celular y la metástasis tumoral, y el receptor de efrina B4, que está implicado en la migración celular, se activan predominantemente por IGF2 (Djiogue, et al., 2013).

V. Influencia de varias reclasificaciones de tumores.

Considerando la totalidad de los casos de cáncer de mama incluidos en el presente estudio, nuestros resultados demuestran que los CAFs difieren de los NAFs con respecto a su perfil molecular. Además, ambos muestran comportamientos específicos con respecto a la secreción de varios factores estromales tras ser cocultivados con las líneas tumorales MDA-MB-231 o MCF7. Pero también es importante analizar si existe variabilidad de los resultados cuando los tumores son reclasificados según las características intrínsecas del tumor o las características del estroma. Por lo tanto, se realizó el análisis de los datos teniendo en cuenta el grado histológico clásico o expresión de HER2 y la expresión de MMP11 por los CMIs; ya que los tumores con expresión positiva de MMP11 en las CMIs están asociados con una alta ocurrencia de metástasis a distancia (Gonzalez L. O., et al., 2007) y con un alto perfil inflamatorio (Eiro, et al., 2012a) en comparación con los tumores que muestran una expresión negativa de MMP11 en las CMIs.

V.1 Influencia de la reclasificación de los tumores en el perfil molecular de los CAFs y los NAFs.

Hemos observado que los CAFs de tumores que poseen un grado de diferenciación histológico SBR I-II tienen niveles más altos de IL6, MMP11 e IGF2, en comparación con los tumores con grado SBR III. En el caso de los NAFs, se observó una mayor expresión significativa de PDGFB, uPA, MMP9 e IGF2, en los NAFs de tumores que poseen un grado de diferenciación histológico SBR I-II, respecto a los NAFs con SBRIII. Por otro lado, los CAFs procedentes de tumores con el ganglio centinela negativo poseen expresiones más elevadas de MMP9 e IGF2, comparados con los CAFs asociados a tumores con el ganglio centinela positivo, mientras que la expresión de PDGFB, MMP2 y TIMP1, fue significativamente mayor en este último grupo de CAFs. En el caso de los NAFs, se observó una expresión más elevada de IL8, en los NAFs procedentes de tumores con el ganglio centinela negativo respecto a los procedentes de tumores con el ganglio centinela positivo.

Estos resultados parecen indicar que la agresividad morfológica de los tumores se relaciona más bien poco con el perfil molecular de los CAFs.

Sin embargo, nuestros resultados muestran varias diferencias significativas al reclasificar los casos en relación con la expresión de la MMP11 por las CMIs. Por consiguiente, hemos encontrado que los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs tienen una expresión más elevada de CXCL12, S100A4, HGF, VEGFA y TIMP1 en comparación con los CAFs procedentes de tumores con la MMP-11(-) para las CMIs (Figura 55). Estos resultados parecen estar de acuerdo con nuestros datos anteriores que indican que estos tumores presentan un comportamiento más agresivo, ya que como se ha descrito anteriormente estos factores están relacionados con la progresión tumoral. Así mismo, los NAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs tienen niveles más altos de IL8 y de FGF2, comparados con los NAFs asociados a tumores con MMP11(-) para las CMIs (Figura 55). Por lo tanto, teniendo en cuenta la importancia biológica de la IL8 y el FGF2 en la progresión del tumor, estos resultados

parecen indicar que los NAFs de tumores MMP11(+) para las CMIs apoyan el nicho tumoral facilitando su crecimiento.

V.2 Influencia de la reclasificación de los tumores en el cambio del perfil molecular de los NAFs o los CAFs.

Por otro lado, si se considera que el origen de los CAFs son los NAFs residentes, también son notables nuestros hallazgos de las diferencias en el perfil molecular de ambos dependiendo del tipo de tumor (Figura 55).

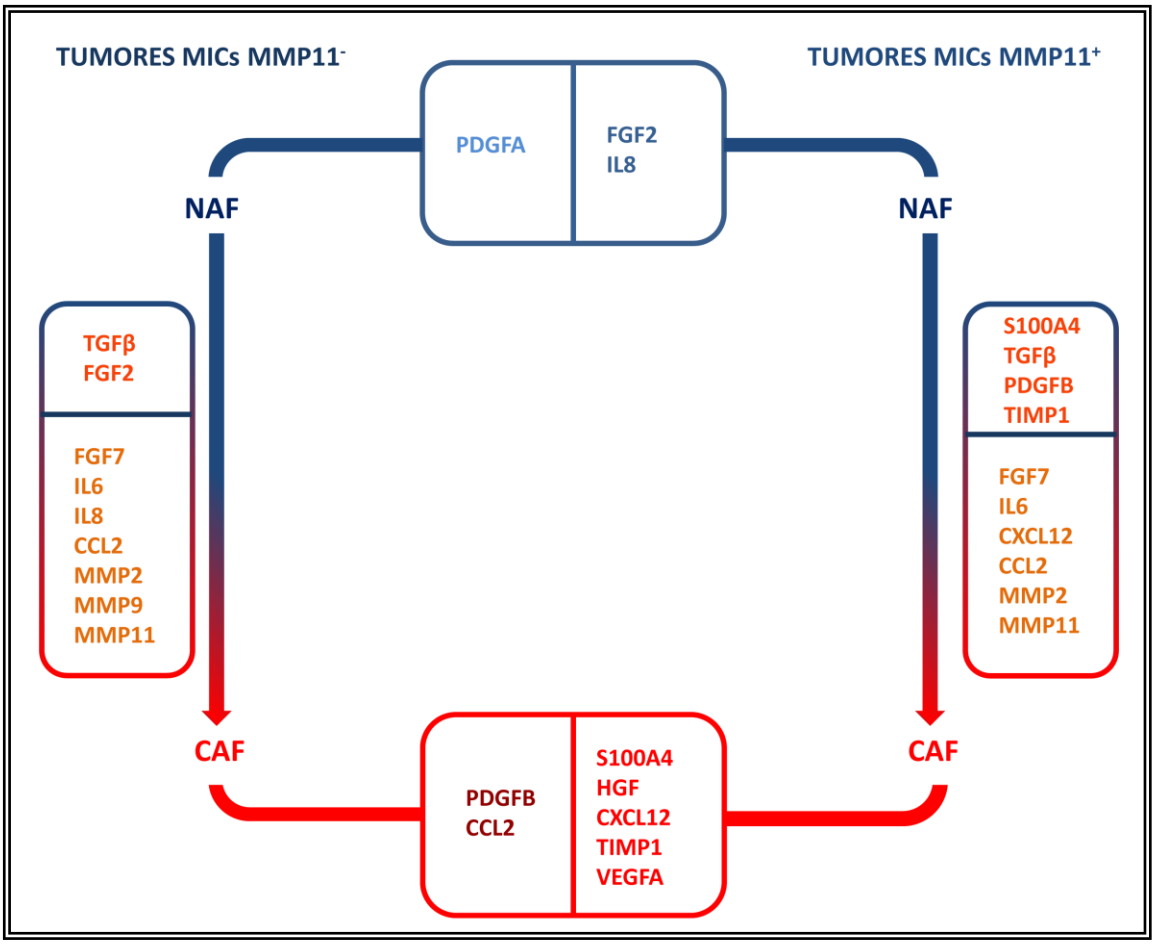

Figura 55. Factores cuya diferencia de expresión es significativa al reclasificar los NAFs y los CAFs según la expresión de MMP11 por las CMIs. Azul: factores significativos al comparar los NAFs de ambos grupos; rojo: factores significativos al comparar los CAFs de ambos grupos; naranja: factores significativos al comparar los CAFs con los NAFs.

Estos resultados parecen indicar una evolución diferente del fenotipo de los CAFs dependiendo de si los tumores son positivos o negativos para la MMP11 en las CMIs. Así, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs tienen niveles de expresión más elevados de FGF7, IL6 e IL8, CCL2, MMP2, MMP9 y MMP11, pero menores niveles de expresión de TGFβ y FGF2 en comparación con los NAFs asociados. Sin embargo, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs poseen mayores niveles de expresión de FGF7, IL6, CCL2, CXCL12, MMP2 y MMP11, pero menores niveles de expresión de S100A4, TGFβ, PDGFB y TIMP1, en comparación con los NAFs asociados. Por consiguiente, un total de 8 factores mostraron un patrón diferencial dependiente de la clasificación tumoral según la expresión de MMP11 por las CMIs. Así mismo, nuestros resultados muestran diferencias significativas en el perfil molecular de los CAFs dependiendo del tipo de tumor; los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs mostraron expresiones más elevadas de S100A4, HGF, CXCL12, VEGFA y TIMP1, pero menores niveles de expresión de PDGFB y CCL2, comparados con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs. Como se puede ver, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs muestran altos niveles de estos factores estromales protumorales en comparación con los CAF procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs. Todo esto sugiere que los CAFs pueden contribuir a la agresividad biológica y al comportamiento clínico de los tumores a través de la creación de un microambiente favorable para las células tumorales en los carcinomas mamarios.

Respecto al hecho de que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs mostraron niveles CCL2 más altos, es digno de mención que esta citoquina también puede actuar atrayendo a las células inmunes antitumorales (Lanca, et al., 2013; Molon, et al., 2011; Rollins, et al., 1991) y es requerida para la inmunovigilancia eficiente, lo que implica que la inhibición de la CCL2 puede promover la neocarcinogénesis, así como el desarrollo de metástasis. La CCL2 es un importante factor quimiotáctico para los monocitos, por lo que la inhibición de CCL2/CCR2 puede disminuir el reclutamiento tanto de macrófagos asociados al

tumor como de células supresoras derivadas de la línea mieloide al tumor y, por consiguiente, la reducción de crecimiento del tumor primario (Siveen, et al., 2009).

V.3 Influencia de la reclasificación de los tumores sobre el perfil molecular de los CAFs tras el cocultivo de estos con líneas tumorales de cáncer de mama que presentan diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231).

En el presente estudio también se investigó la posible influencia de la reclasificación de los tumores, según la expresión de la MMP11 por las CMIs, sobre el perfil molecular de los CAFs mediante el cocultivo de estos con líneas tumorales de cáncer de mama que presentan diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231) (Figura 56).

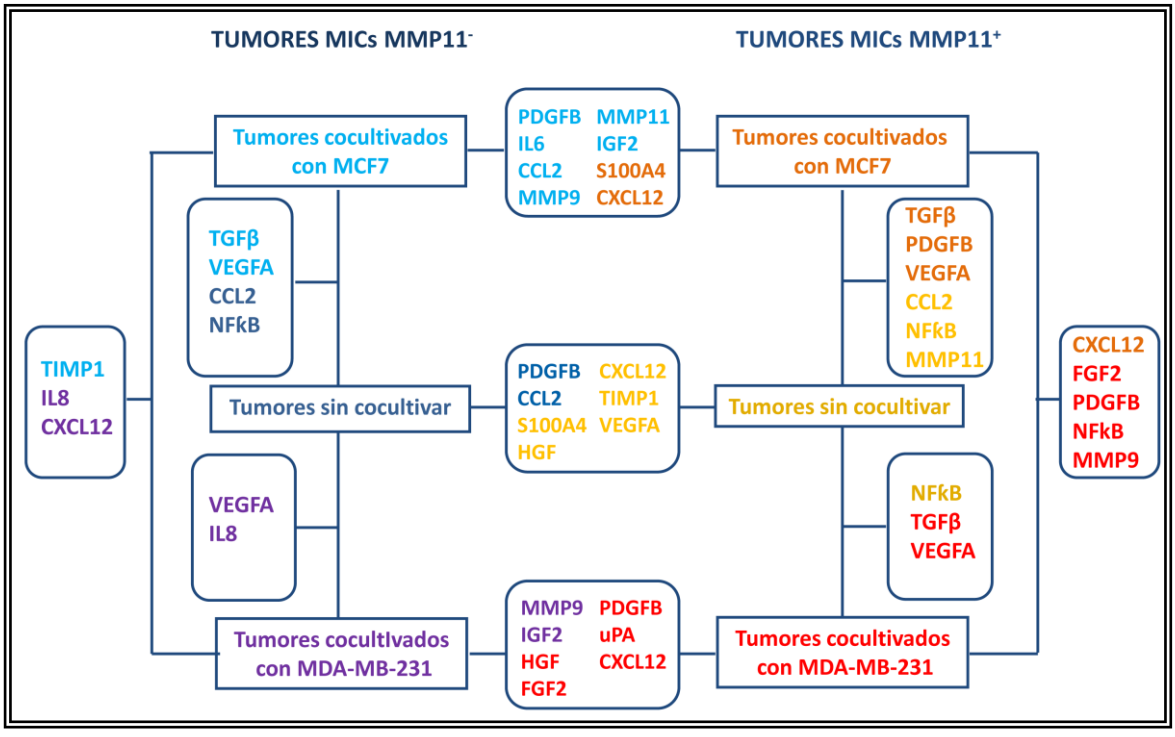

Figura 56. Factores cuya diferencia de expresión es significativa al comparar la expresión basal de los CAFs, divididos según nuestra reclasificación, con la expresión de éstos tras ser cocultivados con ambas líneas tumorales, así como las diferencias de expresión al comparar ambas poblaciones de CAFs. Se muestran las diferentes comparaciones realizadas y, en cada

una de ellas, el color de los factores representa una mayor expresión por los CAFs representados con el mismo color.

Los resultados obtenidos tras comparar los niveles basales de expresión de los factores analizados por los CAFs sin cocultivar con los CAFs después de ser cocultivados con la línea tumoral MCF7, mostraron que tanto los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs como los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, poseen expresiones más elevadas para TGFβ y VEGFA, pero mostraron menores niveles de expresión de CCL2 y NFkB. Sin embargo, existen algunas diferencias de expresión entre ambos tipos de CAFs. Así, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs mostraron además altos niveles de expresión de PDGFB y menores de MMP11 después de ser cocultivados con la línea tumoral MCF7.

Con respecto a la comparación de los niveles basales de expresión de los factores analizados por los CAFs sin cocultivar con los CAFs después de ser cocultivados con la línea tumoral MDA-MB-231, nuestros resultados mostraron que tanto los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs como los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, tienen mayor expresión de VEGFA. Sin embargo, aquí también encontramos algunas diferencias de expresión entre ambos tipos de CAFs. Así, mientras que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs mostraron niveles de expresión más elevados de la IL8, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs mostraron mayores niveles de expresión de TGFβ, pero menores niveles de NFkB después ser cocultivados con la línea tumoral MDA-MB-231.

Es remarcable el hallazgo de que al comparar directamente los niveles de expresión de los factores entre los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs y los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, después de ser cocultivados con la línea tumoral MCF7, se encontraron que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs expresan niveles más altos de PDGFB, CCL2, MMP9, MMP11, IGF2 e IL6, pero

tienen niveles más bajos de expresión de S100A4 y CXCL12, en comparación con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs. Sin embargo, después de ser cocultivados con la línea tumoral MDA-MB-231, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs mostraron niveles más bajos de HGF, FGF2, PDGFB, CXCL12, y de uPA, pero tuvieron niveles de expresión más altos de IGF2 y MMP9, en comparación con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs. Por consiguiente, podemos concluir que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs tienen una expresión más elevada de estos factores en comparación con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs cuando ambos son cocultivados con la línea tumoral MCF7. Sin embargo, los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs tienen mayor expresión de un mayor número de factores en comparación con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs cuando ambos son cocultivados con la línea tumoral MDA-MB-231.

Estos resultados nos llevaron a considerar que CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs pueden estimular a las células tumorales, especialmente a aquellas con un mayor potencial metastásico.

También es importante nuestra conclusión de que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs expresan niveles más altos de CXCL12 que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs, cuando ambos fueron cocultivados tanto con la línea MCF7 como con la línea MDA-MB-231. Tal como se indicó previamente, este factor está especialmente asociado con acciones biológicas clave que confieren agresividad al tumor.

Respecto a las diferencias en la expresión de los factores a estudio en ambas poblaciones de CAFs según éstos fuesen cocultivados con una u otra línea tumoral, se observó que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs, experimentaban un aumento en la expresión del TIMP1 tras ser cocultivados con la línea tumoral de menor agresividad MCF7 respecto al cocultivo de éstos con la línea de mayor agresividad MDA-MB-231, en cambio;

cuando éstos eran cocultivados con la línea MDA-MB-231, se producía un aumento en la expresión de la IL8 y CXL12 respecto a los cocultivados con la línea MCF7. En cuanto a los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, éstos experimentaron un aumento en la expresión de CXCL12 tras ser cocultivados con la línea tumoral MCF7 respecto a los cocultivados con la línea MDA-MB-231, pero esta población de CAFs experimentaba una mayor expresión de FGF2, PDGFB, NFkB y MMP9 cuando era cocultivada con la línea tumoral de mayor agresividad. Estos datos nos llevan a considerar el efecto recíproco existente entre las células tumorales y el estroma tumoral, ya que en los cocultivos realizados, el caso donde se observa una mayor expresión de factores asociados con la progresión tumoral es al cocultivar los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs con la línea tumoral de mayor agresividad MDA-MB-231.

V.4 Influencia de la reclasificación de los tumores sobre el perfil molecular de líneas tumorales de cáncer de mama que exhiben diferentes grados de potencial metastático (MCF7 y MDA-MB-231) cocultivadas con los CAFs.

Finalmente, se analizó si los diferentes tipos de CAFs, de acuerdo a nuestra reclasificación, difieren en su capacidad para estimular la producción de varios factores por las dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231) (Figura 57).

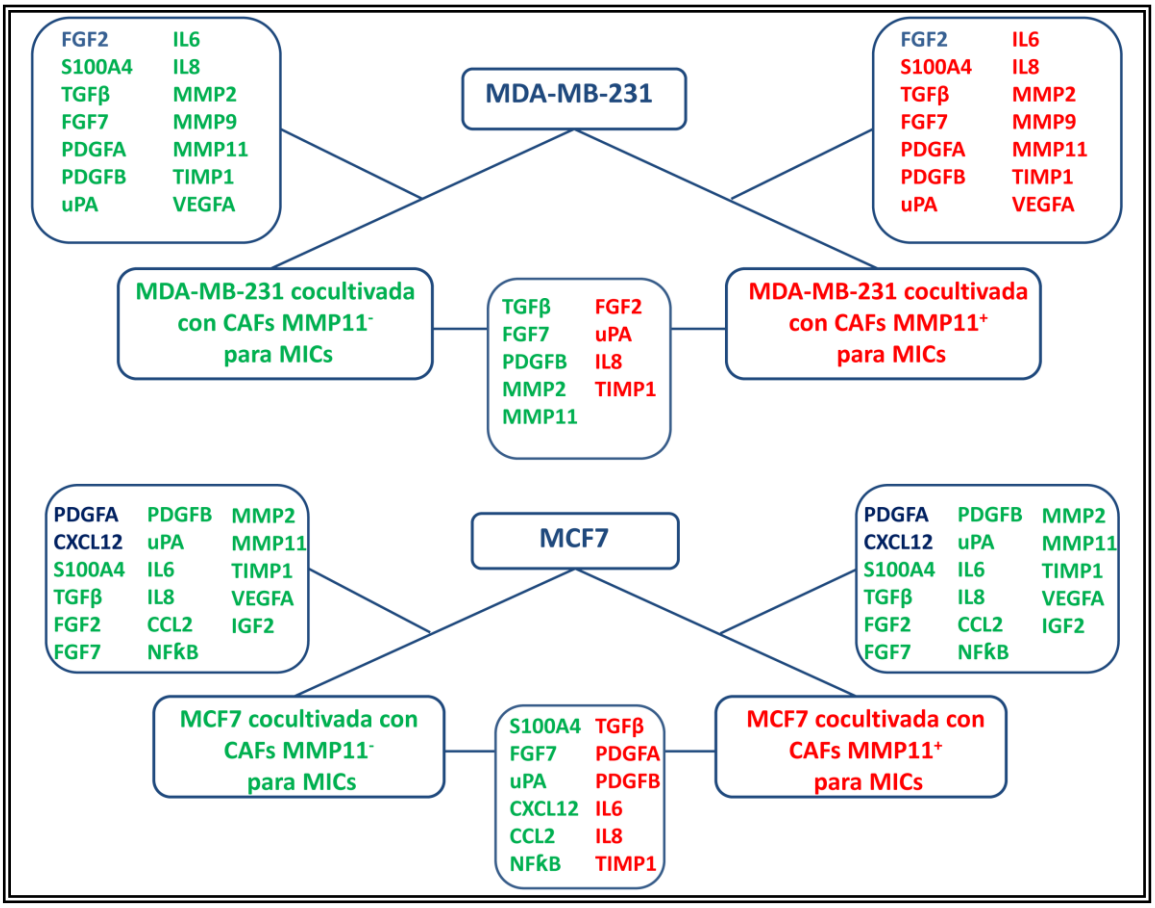

Figura 57. Factores cuya diferencia de expresión es significativa al comparar la expresión basal de las líneas tumorales con la expresión de éstas tras ser cocultivadas con ambas poblaciones de CAFs. Los factores en azul representan los factores con mayor expresión en las líneas tumorales sin cocultivar, los factores en rojo representan los factores con mayor expresión por las líneas tras ser cocultivadas con CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs y, los factores en verde representan los factores con mayor expresión las líneas tumorales tras ser cocultivadas con CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs.

En ambas líneas tumorales, se encontró que tras ser cocultivadas tanto con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs como con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, se producía un aumento significativo en la expresión de varios factores, tales como S100A4, TGFβ, FGF2, FGF7, PDGFA, PDGFB, VEGFA, IL6, IL8, uPA, MMP2, MMP11 y TIMP1. Además, ambas líneas tumorales muestran comportamientos

específicos con respecto a la secreción de varios factores estromales tras ser cocultivados con los CAFs. Así, la línea tumoral MDA-MB-231 muestra un aumento significativo en la expresión de la MMP9 tras ser cocultivada con ambas poblaciones de CAFs respecto a su expresión basal. En cambio, la línea tumoral MCF7 experimentó un aumento significativo en la expresión de CXCL12, CCL2, NFkB e IGF2 tras realizarse los cocultivos. Por consiguiente, estos resultados nos llevaron a considerar que los CAFs, independientemente de nuestra reclasificación, parecen contribuir a un aumento en la capacidad para producir factores estromales contribuyendo así a la progresión tumoral.

En cuanto a la expresión diferencial de los factores a estudio según las líneas tumorales fuesen cocultivadas con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs o cocultivadas con los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs; se observó que en ambas líneas tumorales existen diferencias en los factores incrementados en función de la población de CAFs con que han sido cocultivadas. Así, en la línea tumoral MCF7 se observó una mayor expresión de S100A4, FGF7, uPA, CXCL12, CCL2 Y NFkB, si ésta era cocultivada con los CAFs procedentes de tumores con MMP11(-) para las CMIs, respecto a la línea cocultivada con los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs. Por el contrario, existió un aumento de expresión de TGFβ, PDGFA, PDGFB, IL6, IL8 y TIMP1, si la línea era cocultivada con estos últimos CAFs. Respecto a la línea tumoral MDA-MB-231, muestra también diferencias de expresión significativas de varios factores según haya sido cocultivada con una u otra población de CAFs. Así existió una mayor expresión de TGFβ, FGF7, PDGFB, MMP2 y MMP11, por la línea MDA-MB-231 si ésta era cocultivada con los CAFs procedentes de tumores con MMP11(-) para las CMIs, respecto a la línea cocultivada con los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs. Por el contrario, existió un aumento de expresión de FGF2, uPA, IL8 y TIMP1, si la línea era cocultivada con estos últimos CAFs.

Así pues, nuestros resultados parecen indicar que ambas poblaciones de CAFs inducen un incremento en la producción de factores relacionados con la progresión tumoral en ambas líneas celulares de cáncer de mama. Aunque al comparar el efecto de cada una de las poblaciones de CAFs sobre ambas líneas tumorales observamos que existen diferentes patrones en la inducción de los factores a estudio, es difícil establecer que esto se traduzca en una diferente agresividad tumoral, si ésta agresividad dependiese exclusivamente en el efecto sobre las líneas tumorales de cáncer de mama.

Por ello, nuestros datos nos llevaron a considerar que nuestra reclasificación influye, de forma diferenciada, más en la expresión de factores relacionados con la progresión tumoral por los fibroblastos del estroma que en la expresión de estos factores por la propia célula tumoral, poniendo así de manifiesto la importancia del estroma en la progresión tumoral.

Por otro lado, es importante el hecho de que el medio condicionado de ambas poblaciones de CAFs aumentó la capacidad invasiva de la línea tumoral MDA-MB-231 en los ensayos de invasión en Matrigel, pero este efecto fue mayor cuando la línea tumoral tuvo como quimioatrayente el medio condicionado de los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs. En cambio, no se observó ningún cambio en la capacidad invasiva de la línea tumoral MCF7, lo que es consistente con otros estudios, ya que esta línea se suele utilizar como control negativo en los ensayos de invasión debido a su bajo potencial metastásico (Booden, et al., 2004). Esto podría indicar que los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs contribuyen especialmente una mayor invasividad tumoral en las células cancerosas más agresivas.

En resumen, nuestros resultados en la población general del estudio demuestran un papel dinámico de los CAFs en la progresión tumoral del carcinoma mamario. Si se considera que el origen de los CAFs son los NAFs residentes, el paso de los NAFs a los CAFs está asociado a cambios moleculares, los cuales implican una mayor expresión de algunos factores de importancia biológica en la progresión tumoral. Además, nuestros resultados muestran que los

CAFs modificaron su perfil molecular tras ser cocultivados con líneas tumorales de diferente agresividad biológica, mostrando una expresión más elevada de estos factores. Así mismo, tanto la línea tumoral de cáncer de mama MDA-MB-231 como la línea MCF7, aumentan la expresión de muchos de estos factores cuando son cocultivadas con los CAFs. Todos estos datos sugieren una interacción cruzada entre los CAFs y las células tumorales que resulta en un aumento de varios factores que promueven el crecimiento tumoral. Sin embargo, nuestros resultados también muestran la importancia de la caracterización de los fenotipos moleculares del estroma, así tanto los NAFs como los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs mostraron una mayor expresión de varios de los factores a estudio en comparación con los NAFs y CAFs procedentes de tumores con la MMP11(-) para las CMIs.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron diferencias funcionales entre ambas poblaciones de CAFs cuando estos fueron cocultivados con las líneas tumorales MCF7 y MDA-MB-231. Además, después de realizar los cocultivos, se observó que ambas líneas tumorales tenían una mayor expresión de los factores a estudio, siendo este aumento diferente en función de la población de los CAFs utilizados para los cocultivos, según nuestra reclasificación. Todos estos resultados nos llevan a considerar que nuestra clasificación según la expresión de MMP11 por las CMIs identifica una población de CAFs dotada de una mayor capacidad de secreción de los factores a estudio, apoyando el papel de la heterogeneidad del estroma en la progresión tumoral. Así mismo, los ensayos de invasión mostraron que los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) para las CMIs contribuyen a una mayor invasividad tumoral en las células cancerosas más agresivas.

Todos estos resultados nos han llevado a considerar que los CAFs procedentes de tumores con la MMP11(+) para las CMIs, contribuyen a la progresión del tumor. Por consiguiente, nuestros hallazgos pueden contribuir a una mejor caracterización del estroma tumoral con el fin de mejorar la evaluación del pronóstico en pacientes con cáncer de mama, así como para definir las poblaciones de los CAFs como posibles dianas terapéuticas en el cáncer de mama.

Conclusiones

.

1.- Considerando que el origen de los CAFs son los NAFs residentes, el paso de NAFs a CAFs está asociado a cambios moleculares, como una menor expresión de S100A4, TGFβ, PDGFB, FGF2 y TIMP1, y una expresión más elevada de FGF7, IL6, CCL2, MMP2, MMP9 y MMP11 por este último tipo de fibroblastos.

2.- Clasificando los tumores en base al grado de diferenciación histológico SBR, existe una mayor expresión de PDGFB, uPA, MMP9 e IGF2 en los NAFs, y de IL6, MMP11 e IGF2 en los CAFs, ambos tipos de fibroblastos procedentes de tumores con SBR I-II respecto a los NAFs y CAFs procedentes de tumores con SBR III. En cuanto a la clasificación según la afectación ganglionar; existe una mayor expresión de PDGFB, MMP2 y TIMP1 por los CAFs de tumores con el ganglio centinela positivo, respecto a los CAFs de tumores con el ganglio centinela negativo, y una expresión más elevada de MMP9 e IGF2 por este último tipo de CAFs. Los NAFs procedentes de tumores con el ganglio centinela positivo presentan una mayor expresión de IL8, respecto a los NAFs de tumores con el ganglio centinela negativo.

3.- La clasificación de los NAFs y los CAFs en base a la expresión de MMP11 en las CMIs muestra dos poblaciones con una marcada diferencia en el perfil molecular de los factores a estudio, así los NAFs muestran una mayor expresión de FGF2 e IL8 por los NAFs procedentes de tumores con MMP11(+), comparado con los procedentes de tumores con MMP11(-). En el caso de los CAFs de tumores asociados a peor pronóstico, muestran una mayor expresión de S100A4, HGF, CXCL12, VEGFA y TIMP1, respecto a los CAFs de tumores de buen pronóstico. Considerando que el origen de los CAFs con los NAFs residentes, el paso de los NAFs a los CAFs, clasificados en base a la expresión de la MMP11, implica un aumento en la expresión de varias citoquinas, metaloproteasas, así como de FGF7.

4.- Existe una influencia de las líneas tumorales MCF7 y MDA-MB-231 sobre el perfil molecular de los CAFs, observándose un aumento de factores como proteasas, citoquinas y factores de crecimiento, independientemente de la expresión de MMP11 por las CMIs.

5.- Los CAFs influyen en el perfil molecular de las líneas tumorales MCF7 y MDA-MB-231, independientemente de su agresividad biológica, produciendo un aumento en la expresión de varios factores de crecimiento, proteasas y citoquinas inflamatorias, lo que contribuye a la progresión tumoral. Por otro lado, en cuanto a la influencia de los CAFs, divididos según la expresión de MMP11 en las CMIs, sobre la células tumorales se observan diferentes patrones en la inducción de los factores a estudio, siendo difícil establecer que esto se traduzca en una diferente agresividad tumoral. Estos datos nos llevan a considerar que la reclasificación según la expresión de MMP11 influye más en los fibroblastos del estroma que en la propia célula tumoral, poniendo así de manifiesto la importancia del estroma en la progresión tumoral.

6.- Los CAFs promueven la capacidad invasiva de la línea tumoral de mayor agresividad MDA-MB-231, observándose además un efecto mayor con los CAFs procedentes de tumores con MMP11(+) por CMIs.

Bibliografía

Abendstein B, Daxenbichler G, Windbichler G, Zeimet AG, Geurts A, Sweep F, et al. (2000). "Predictive value of uPA, PAI-1, HER-2 and VEGF in the serum of ovarian cancer patients". Anticancer Res 20: 569-572.

Abranches MV, Mendes MC, Pena G, Maia YC, Ribeiro SM, Franceschini Sdo C, et al. (2011). "Antioxidant vitamins and cytokines are altered in breast cancer". Eur J Cancer Prev 20: 403-410.

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. (2006). "Inflammation and cancer: how hot is the link?". Biochem Pharmacol 72: 1605-1621.

Ahmad A, Hanby A, Dublin E, Poulsom R, Smith P, Barnes D, et al. (1998). "Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression". Am J Pathol 152: 721-728.

Ahmed KM, Cao N, Li JJ. (2006). "HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer". Anticancer Res 26: 4235-4243.

Akhurst RJ, Derynck R. (2001). "TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword". Trends Cell Biol 11: S44-51.

Alexander CM, Howard EW, Bissell MJ, Werb Z. (1996). "Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene". J Cell Biol 135: 1669-1677.

Altadill A, Rodriguez M, Gonzalez LO, Junquera S, Corte MD, Gonzalez-Dieguez ML, et al. (2009). "Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma". Dig Liver Dis 41: 740-748.

Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. (2004). "Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer". Cancer Cell 6: 17-32.

Anderson IC, Mari SE, Broderick RJ, Mari BP, Shipp MA. (2000). "The angiogenic factor interleukin 8 is induced in non-small cell lung cancer/pulmonary fibroblast cocultures". Cancer Res 60: 269-272.

Anderson IC, Sugarbaker DJ, Ganju RK, Tsarwhas DG, Richards WG, Sunday M, et al. (1995). "Stromelysin-3 is overexpressed by stromal elements in primary non-small cell lung cancers and regulated by retinoic acid in pulmonary fibroblasts". Cancer Res 55: 4120-4126.

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review". Int J Cancer 72: 1-22.

Andres SA, Edwards AB, Wittliff JL. (2012). "Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitor (PAI-1) in human breast carcinomas and their clinical relevance". J Clin Lab Anal 26: 93-103.

Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. (2005). "HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer". Virchows Arch 446: 489-496.

Ariad S, Seymour L, Bezwoda WR. (1991). "Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate of progression". Breast Cancer Res Treat 20: 11-17.

Arnold JT, Isaacs JT. (2002). "Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault". Endocr Relat Cancer 9: 61-73.

Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. (2003). "Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy". Lancet 362: 697-703.

Aust G, Steinert M, Kiessling S, Kamprad M, Simchen C. (2001). "Reduced expression of stromal-derived factor 1 in autonomous thyroid adenomas and its regulation in thyroid-derived cells". J Clin Endocrinol Metab 86: 3368-3376.

Bacac M, Provero P, Mayran N, Stehle JC, Fusco C, Stamenkovic I. (2006). "A mouse stromal response to tumor invasion predicts prostate and breast cancer patient survival". PLoS One 1: e32.

Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. (2002). "Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4". Cancer Res 62: 7203-7206.

Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay JY. (2003). "Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients". Br J Cancer 88: 1721-1726.

Badache A, Hynes NE. (2001). "Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells". Cancer Res 61: 383-391.

Baeuerle PA, Henkel T. (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system". Annu Rev Immunol 12: 141-179.

Baker EA, Leaper DJ. (2002). "Measuring gelatinase activity in colorectal cancer". Eur J Surg Oncol 28: 24-29.

Bando H, Weich HA, Brokelmann M, Horiguchi S, Funata N, Ogawa T, et al. (2005). "Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer". Br J Cancer 92: 553-561.

Bansal GS, Cox HC, Marsh S, Gomm JJ, Yiangou C, Luqmani Y, et al. (1997). "Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer". Br J Cancer 75: 1567-1574.

Barcellos-Hoff MH, Ravani SA. (2000). "Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells". Cancer Res 60: 1254-1260.
Basilico C, Moscatelli D. (1992). "The FGF family of growth factors and oncogenes". Adv Cancer Res 59: 115-165.

Basset P, Bellocq JP, Lefebvre O, Noel A, Chenard MP, Wolf C, et al. (1997). "Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression". Crit Rev Oncol Hematol 26: 43-53.
Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, et al. (1990). "A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas". Nature 348: 699-704.

Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF. (1985). "Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor". Proc Natl Acad Sci U S A 82: 4132-4136.

Beck AH, Espinosa I, Gilks CB, van de Rijn M, West RB. (2008). "The fibromatosis signature defines a robust stromal response in breast carcinoma". Lab Invest 88: 591-601.

Beenken A, Mohammadi M. (2009). "The FGF family: biology, pathophysiology and therapy". Nat Rev Drug Discov 8: 235-253.

Beg AA, Baltimore D. (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death". Science 274: 782-784.

Belfiore A, Frasca F. (2008). "IGF and insulin receptor signaling in breast cancer". J Mammary Gland Biol Neoplasia 13: 381-406.

Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpe S, et al. (2004). "Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival". Clin Cancer Res 10: 7157-7162.

Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, et al. (2008). "Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome". J Pathol 214: 357-367.

Berger FG. (2004). "The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality". Breast Cancer Res Treat 88: 281-285.
Bergers G, Benjamin LE. (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch". Nat Rev Cancer 3: 401-410.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis". Nat Cell Biol 2: 737-744.

Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Goulet R, Jr., Nakshatri H. (1998). "NF-kappaB activation and interleukin 6 production in fibroblasts by estrogen receptor-negative breast cancer cell-derived interleukin 1alpha". Proc Natl Acad Sci U S A 95: 6971-6976.

Bhowmick NA, Moses HL. (2005). "Tumor-stroma interactions". Curr Opin Genet Dev 15: 97-101.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression". Nature 432: 332-337.

Bierie B, Moses HL. (2006). "TGF-beta and cancer". Cytokine Growth Factor Rev 17: 29-40.

Bigelow RL, Williams BJ, Carroll JL, Daves LK, Cardelli JA. (2009). "TIMP-1 overexpression promotes tumorigenesis of MDA-MB-231 breast cancer cells and alters expression of a subset of cancer promoting genes in vivo distinct from those observed in vitro". Breast Cancer Res Treat 117: 31-44.

Bissell MJ, Radisky D. (2001). "Putting tumours in context". Nat Rev Cancer 1: 46-54.
Blasi F. (1999). "Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system". Thromb Haemost 82: 298-304.

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. (1996). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)". J Exp Med 184: 1101-1109.

Bloom HJ, Richardson WW. (1957). "Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years". Br J Cancer 11: 359-377.
Bocker W. (2002). "[WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]". Verh Dtsch Ges Pathol 86: 116-119.

Boffetta P, Autier P. (2011). "Is breast cancer associated with tobacco smoking?". BMJ 342: d1093.

Boimel PJ, Smirnova T, Zhou ZN, Wyckoff J, Park H, Coniglio SJ, et al. (2012). "Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells". Breast Cancer Res 14: R23.

Bond M, Baker AH, Newby AC. (1999). "Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts". Biochem Biophys Res Commun 264: 561-567.

Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. (1998). "Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B". FEBS Lett 435: 29-34.

Bonnier P, Romain S, Charpin C, Lejeune C, Tubiana N, Martin PM, et al. (1995). "Age as a prognostic factor in breast cancer: relationship to pathologic and biologic features". Int J Cancer 62: 138-144.

Booden MA, Eckert LB, Der CJ, Trejo J. (2004). "Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion". Mol Cell Biol 24: 1990-1999.

Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. (2005). "Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer". Histopathology 46: 31-36.

Boulay A, Masson R, Chenard MP, El Fahime M, Cassard L, Bellocq JP, et al. (2001). "High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase". Cancer Res 61: 2189-2193.

Boye K, Maelandsmo GM. (2010). "S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles". Am J Pathol 176: 528-535.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function". Biochim Biophys Acta 1477: 267-283.

Brew R, Erikson JS, West DC, Flanagan BF, Christmas SE. (1997). "Interleukin-8 as a growth factor for human colorectal carcinoma cells in vitro". Biochem Soc Trans 25: 264S.

Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. (2000). "Interstitial collagenases as markers of tumor progression". Clin Cancer Res 6: 4823-4830.

Bronzert DA, Pantazis P, Antoniades HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB, et al. (1987). "Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines". Proc Natl Acad Sci U S A 84: 5763-5767.

Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. (1996). "Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer". Clin Cancer Res 2: 585-592.

Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocana A, Penuelas S, Arias A, et al. (2007). "High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene". Cancer Cell 11: 147-160.

Buess M, Nuyten DS, Hastie T, Nielsen T, Pesich R, Brown PO. (2007). "Characterization of heterotypic interaction effects in vitro to deconvolute global gene expression profiles in cancer". Genome Biol 8: R191.

Burger JA, Kipps TJ. (2006). "CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment". Blood 107: 1761-1767.

Bussard KM, Venzon DJ, Mastro AM. (2010). "Osteoblasts are a major source of inflammatory cytokines in the tumor microenvironment of bone metastatic breast cancer". J Cell Biochem 111: 1138-1148.

Cabezon T, Celis JE, Skibshoj I, Klingelhofer J, Grigorian M, Gromov P, et al. (2007). "Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer". Int J Cancer 121: 1433-1444.

Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. (2008). "Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer". BMC Cancer 8: 153.

Camp JT, Elloumi F, Roman-Perez E, Rein J, Stewart DA, Harrell JC, et al. (2011). "Interactions with fibroblasts are distinct in Basal-like and luminal breast cancers". Mol Cancer Res 9: 3-13.

Camporeale A, Poli V. (2012). "IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity?". Front Biosci (Landmark Ed) 17: 2306-2326.

Cao Y. (2013). "Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis". Trends Mol Med 19: 460-473.

Carriero MV, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Maglio O, Lista L, Barbieri A, et al. (2009). "Structure-based design of an urokinase-type plasminogen activator receptor-derived peptide inhibiting cell migration and lung metastasis". Mol Cancer Ther 8: 2708-2717.

Carter CL, Allen C, Henson DE. (1989). "Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases". Cancer 63: 181-187.

Casey T, Bond J, Tighe S, Hunter T, Lintault L, Patel O, et al. (2009). "Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer". Breast Cancer Res Treat 114: 47-62.

Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. (2002). "Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers". J Hepatol 36: 200-209.

Castello R, Estelles A, Vazquez C, Falco C, Espana F, Almenar SM, et al. (2002). "Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer". Clin Chem 48: 1288-1295.

Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. (2012). "Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death". Int J Mol Sci 13: 9545-9571.

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1". Nat Med 10: 858-864.

Coltrera MD, Wang J, Porter PL, Gown AM. (1995). "Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma". Cancer Res 55: 2703-2708.

Comoglio PM, Boccaccio C. (2001). "Scatter factors and invasive growth". Semin Cancer Biol 11: 153-165.

Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, et al. (2001). "Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells". Cancer Res 61: 8851-8858.

Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization". J Immunol 161: 6845-6852.

Cotran Ry, ed. (2010). Patología estructural y funcional. 7º ed.: Stirling.

Cronauer MV, Schulz WA, Seifert HH, Ackermann R, Burchardt M. (2003). "Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications". Eur Urol 43: 309-319.

Cullen KJ, Lippman ME, Chow D, Hill S, Rosen N, Zwiebel JA. (1992). "Insulin-like growth factor-II overexpression in MCF-7 cells induces phenotypic changes associated with malignant progression". Mol Endocrinol 6: 91-100.

Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, et al. (2004). "Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment". Cancer Res 64: 1675-1686.

Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissiere F, Laune D, et al. (2007). "Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content". Breast Cancer Res 9: R15.

Chavey C, Muhlbauer M, Bossard C, Freund A, Durand S, Jorgensen C, et al. (2008). "Interleukin-8 expression is regulated by histone deacetylases through the nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer". Mol Pharmacol 74: 1359-1366.

Chen J, Baskerville C, Han Q, Pan ZK, Huang S. (2001). "Alpha(v) integrin, p38 mitogen-activated protein kinase, and urokinase plasminogen activator are functionally linked in invasive breast cancer cells". J Biol Chem 276: 47901-47905.

Chen S, Parmigiani G. (2007). "Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance". J Clin Oncol 25: 1329-1333.

Chenard MP, O'Siorain L, Shering S, Rouyer N, Lutz Y, Wolf C, et al. (1996). "High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma". Int J Cancer 69: 448-451.

Chianale F, Rainero E, Cianflone C, Bettio V, Pighini A, Porporato PE, et al. (2010). "Diacylglycerol kinase alpha mediates HGF-induced Rac activation and membrane ruffling by regulating atypical PKC and RhoGDI". Proc Natl Acad Sci U S A 107: 4182-4187.

Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. (2008). "The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway". Clin Cancer Res 14: 6364-6370.

Christopherson K, 2nd, Hromas R. (2001). "Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses". Stem Cells 19: 388-396.

Chu QD, Panu L, Holm NT, Li BD, Johnson LW, Zhang S. (2010). "High chemokine receptor CXCR4 level in triple negative breast cancer specimens predicts poor clinical outcome". J Surg Res 159: 689-695.

Chua CC, Geiman DE, Keller GH, Ladda RL. (1985). "Induction of collagenase secretion in human fibroblast cultures by growth promoting factors". J Biol Chem 260: 5213-5216.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. (2005). "Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors". Lancet 366: 1784-1793.

Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. (2004). "Evaluation of the clinical significance of HER2 amplification by chromogenic in situ hybridisation in patients with primary breast cancer". Anticancer Res 24: 2401-2406.

Dankbar B, Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma". Blood 95: 2630-2636.

Daughaday WH, Rotwein P. (1989). "Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations". Endocr Rev 10: 68-91.

Davids MS, Charlton A, Ng SS, Chong ML, Laubscher K, Dar M, et al. (2009). "Response to a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor pazopanib in metastatic Merkel cell carcinoma". J Clin Oncol 27: e97-100.

De Cremoux P, Grandin L, Dieras V, Savignoni A, Degeorges A, Salmon R, et al. (2009). "Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients". Anticancer Res 29: 1475-1482.

De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, et al. (2004). "SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells". Blood 104: 3472-3482.

de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP. (1998a). "Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis". J Pathol 184: 53-57.

—. (1998b). "Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops". J Pathol 184: 44-52.

De Larco JE, Wuertz BR, Rosner KA, Erickson SA, Gamache DE, Manivel JC, et al. (2001). "A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells". Am J Pathol 158: 639-646.

Del Casar JM, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez LO, Gonzalez JM, Junquera S, Bongera M, et al. (2010). "Expression of metalloproteases and their inhibitors in different histological types of breast cancer". J Cancer Res Clin Oncol 136: 811-819.

Del Casar JM, Gonzalez LO, Alvarez E, Junquera S, Marin L, Gonzalez L, et al. (2009). "Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas". Breast Cancer Res Treat 116: 39-52.

Demers M, Couillard J, Belanger S, St-Pierre Y. (2005). "New roles for matrix metalloproteinases in metastasis". Crit Rev Immunol 25: 493-523.

DeMichele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Klein-Cabral M, et al. (2003). "Interleukin-6 -174G-->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer". Cancer Res 63: 8051-8056.

Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, et al. (2006). "Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature". Br J Cancer 94: 1823-1832.

Desmouliere A. (1995). "Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis". Cell Biol Int 19: 471-476.

Díaz J, ed. (1990). Cáncer de mama, avances en diagnóstico y tratamiento León.

Djiogue S, Nwabo Kamdje AH, Vecchio L, Kipanyula MJ, Farahna M, Aldebasi Y, et al. (2013). "Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs". Endocr Relat Cancer 20: R1-R17.

Dobreva I, Waeber G, James RW, Widmann C. (2006). "Interleukin-8 secretion by fibroblasts induced by low density lipoproteins is p38 MAPK-dependent and leads to cell spreading and wound closure". J Biol Chem 281: 199-205.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. (2005). "NF-kB in development and progression of human cancer". Virchows Arch 446: 475-482.

Domenech A, Benitez A, Bajen MT, Ricart Y, Rodriguez-Gasen A, Palacin JA, et al. (2009). "What are the preoperative factors that can determine the presence of metastases in other axillary nodes in breast cancer when the sentinel node is positive?". Q J Nucl Med Mol Imaging 53: 422-427.

Duan Z, Foster R, Bell DA, Mahoney J, Wolak K, Vaidya A, et al. (2006). "Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer". Clin Cancer Res 12: 5055-5063.

Ducut Sigala JL, Bottero V, Young DB, Shevchenko A, Mercurio F, Verma IM. (2004). "Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit". Science 304: 1963-1967.

Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. (2011). "CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies?". Clin Cancer Res 17: 2074-2080.

Duffy MJ, Duggan C, Mulcahy HE, McDermott EW, O'Higgins NJ. (1998). "Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in breast cancer including patients with axillary node-negative disease". Clin Chem 44: 1177-1183.

Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. (2000). "Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis". Breast Cancer Res 2: 252-257.

Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ. (1988). "Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report". Cancer 62: 531-533.

Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P. (1990). "Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer". Cancer Res 50: 6827-6829.

Dunn SE, Torres JV, Nihei N, Barrett JC. (2000). "The insulin-like growth factor-1 elevates urokinase-type plasminogen activator-1 in human breast cancer cells: a new avenue for breast cancer therapy". Mol Carcinog 27: 10-17.

Dupont WD, Page DL. (1985). "Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease". N Engl J Med 312: 146-151.

Dushkin H, Cristofanilli M. (2011). "Inflammatory breast cancer". J Natl Compr Canc Netw 9: 233-240; quiz 241.

Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, Murphy JM, et al. (2007). "Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells". Clin Cancer Res 13: 5020-5027.

Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, et al. (1997). "Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13". Am J Hum Genet 61: 120-128.

Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K. (2007). "Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration". Int J Cancer 121: 276-283.

Edge SB B.D. CC, et al, ed. (2010). AJCC Cancer Staging Manual. 7ª ed.

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. (2010). "Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism". Dev Cell 18: 884-901.

Egeblad M, Werb Z. (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression". Nat Rev Cancer 2: 161-174.

Eichbaum MH, de Rossi TM, Kaul S, Bruckner T, Schneeweiss A, Sohn C. (2007). "Serum levels of hepatocyte growth factor/scatter factor in patients with liver metastases from breast cancer". Tumour Biol 28: 36-44.

Eiro N, Fernandez-Garcia B, Gonzalez LO, Vizoso FJ. (2013a). "Cytokines related to MMP-11 expression by inflammatory cells and breast cancer metastasis". Oncoimmunology 2: e24010.

Eiro N, Gonzalez L, Gonzalez LO, Fernandez-Garcia B, Lamelas ML, Marin L, et al. (2012a). "Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development". PLoS One 7: e49047.

Eiro N, Gonzalez LO, Atienza S, Gonzalez-Quintana JM, Beridze N, Fernandez-Garcia B, et al. (2013b). "Prediction of metastatic breast cancer in non-sentinel lymph nodes based on metalloprotease-1 expression by the sentinel lymph node". Eur J Cancer 49: 1009-1017.

Eiro N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, Junquera S, Lamelas ML, del Casar JM, et al. (2012b). "Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer". PLoS One 7: e52796.

Elenbaas B, Weinberg RA. (2001). "Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation". Exp Cell Res 264: 169-184.

Elston CW. (1984). "The assessment of histological differentiation in breast cancer". Aust N Z J Surg 54: 11-15.

Elston CW, Ellis IO. (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up". Histopathology 19: 403-410.

Epstein RJ. (2004). "The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies". Nat Rev Cancer 4: 901-909.

Erdem O, Dursun A, Coskun U, Gunel N. (2005). "The prognostic value of p53 and c-erbB-2 expression, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma". Tumori 91: 46-52.

Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, et al. (2011). "Comparative study of stromal metalloproteases expression in patients with benign hyperplasia and prostate cancer". J Cancer Res Clin Oncol 137: 551-555.

—. (2010). "Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer". Br J Cancer 102: 922-929.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. (2007). "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma". N Engl J Med 356: 125-134.

Esencay M, Newcomb EW, Zagzag D. (2010). "HGF upregulates CXCR4 expression in gliomas via NF-kappaB: implications for glioma cell migration". J Neurooncol 99: 33-40.

Esteller M. (2008). "Epigenetics in cancer". N Engl J Med 358: 1148-1159.

Farina AR, Coppa A, Tiberio A, Tacconelli A, Turco A, Colletta G, et al. (1998). "Transforming growth factor-beta1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity". Int J Cancer 75: 721-730.

Fein DA, Fowble BL, Hanlon AL, Hooks MA, Hoffman JP, Sigurdson ER, et al. (1997). "Identification of women with T1-T2 breast cancer at low risk of positive axillary nodes". J Surg Oncol 65: 34-39.

Feldman EL, Sullivan KA, Kim B, Russell JW. (1997). "Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival". Neurobiol Dis 4: 201-214.

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2". Cancer Res 59: 3915-3918.

Fernandez-Garcia B, Eiro N, Marin L, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez LO, Lamelas ML, et al. (2014). "Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis". Histopathology 64: 512-522.

Fernandez-Gomez J, Escaf S, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez J, 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: 171-176.

Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klosel R, Ganju RK. (2004). "Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells". Oncogene 23: 157-167.

Ferrara N, Davis-Smyth T. (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor". Endocr Rev 18: 4-25.

Feugate JE, Li Q, Wong L, Martins-Green M. (2002). "The cxc chemokine cCAF stimulates differentiation of fibroblasts into myofibroblasts and accelerates wound closure". J Cell Biol 156: 161-172.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. (2008). "Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer". Nat Med 14: 518-527.

Finch PW, Rubin JS. (2006). "Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors". J Natl Cancer Inst 98: 812-824.

Fingleton B, Vargo-Gogola T, Crawford HC, Matrisian LM. (2001). "Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis". Neoplasia 3: 459-468.

Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PF. (2000). "Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases--a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases". Breast Cancer Res Treat 61: 1-12.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. (2000). "Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999". Arch Pathol Lab Med 124: 966-978.

Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Janicke F, et al. (1992). "Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients". Cancer Res 52: 6101-6105.

Folkman J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications". N Engl J Med 285: 1182-1186.

Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. (1994). "Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium". Lancet 343: 692-695.

Fox SB, Gasparini G, Harris AL. (2001). "Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs". Lancet Oncol 2: 278-289.

Fu ZY, Lv JH, Ma CY, Yang DP, Wang T. (2011). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 decreased chemosensitivity of MDA-435 breast cancer cells to chemotherapeutic drugs through the PI3K/AKT/NF-small ka, CyrillicB pathway". Biomed Pharmacother 65: 163-167.

Fukino K, Shen L, Patocs A, Mutter GL, Eng C. (2007). "Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma". JAMA 297: 2103-2111.

Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. (2005). "IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma". Histopathology 47: 82-89.

Garcia MF, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez LO, Junquera S, Berdize N, Del Casar JM, et al. (2010). "Comparative study of the expression of metalloproteases and their inhibitors in different localizations within primary tumours and in metastatic lymph nodes of breast cancer". Int J Exp Pathol 91: 324-334.

Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. (2006). "S100A4, a mediator of metastasis". J Biol Chem 281: 677-680.

Gasparini G. (2000). "Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer". Oncologist 5 Suppl 1: 37-44.

Gehmert S, Prantl L, Vykoukal J, Alt E, Song YH. (2010). "Breast cancer cells attract the migration of adipose tissue-derived stem cells via the PDGF-BB/PDGFR-beta signaling pathway". Biochem Biophys Res Commun 398: 601-605.

Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, et al. (2001). "A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma". J Immunol 167: 4747-4757.

Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto F, et al. (2001). "Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line". Eur J Cancer 37: 1554-1561.

Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM. (2000). "Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun". J Immunol 165: 7199-7206.

Gersuk GM, Westermark B, Mohabeer AJ, Challita PM, Pattamakom S, Pattengale PK. (1991). "Inhibition of human natural killer cell activity by platelet-derived growth factor (PDGF). III. Membrane binding studies and differential biological effect of recombinant PDGF isoforms". Scand J Immunol 33: 521-532.

Gervais-Fagnou DD, Girouard C, Laperriere N, Pintillie M, Goss PE. (1999). "Breast cancer in women following supradiaphragmatic irradiation for Hodgkin's disease". Oncology 57: 224-231.

Ghosh S, Karin M. (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle". Cell 109 Suppl: S81-96.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses". Annu Rev Immunol 16: 225-260.

Ghosh S, Sullivan CA, Zerkowski MP, Molinaro AM, Rimm DL, Camp RL, et al. (2008). "High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer". Hum Pathol 39: 1835-1843.

Giani C, Campani D, Rasmussen A, Fierabracci P, Miccoli P, Bevilacqua G, et al. (2002). "Insulin-like growth factor II (IGF-II) immunohistochemistry in breast cancer: relationship with the most important morphological and biochemical prognostic parameters". Int J Biol Markers 17: 90-95.

Giani C, Cullen KJ, Campani D, Rasmussen A. (1996). "IGF-II mRNA and protein are expressed in the stroma of invasive breast cancers: an in situ hybridization and immunohistochemistry study". Breast Cancer Res Treat 41: 43-50.

Gill SE, Parks WC. (2008). "Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing". Int J Biochem Cell Biol 40: 1334-1347.

Giulianelli S, Cerliani JP, Lamb CA, Fabris VT, Bottino MC, Gorostiaga MA, et al. (2008). "Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis". Int J Cancer 123: 2518-2531.

Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HG. (1999). "Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1". Int J Cancer 82: 765-770.

Goldfarb M. (1996). "Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development". Cytokine Growth Factor Rev 7: 311-325.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. (2009). "Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009". Ann Oncol 20: 1319-1329.

Gong SJ, Rha SY, Chung HC, Yoo NC, Roh JK, Yang WI, et al. (2000). "Tissue urokinase-type plasminogen activator receptor levels in breast cancer". Int J Mol Med 6: 301-305.

Gonzalez L, Eiro N, Gonzalez LO, Andicoechea A, Barbon E, Garcia-Muniz JL, 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: 2063-2071.

Gonzalez LO, Gonzalez-Reyes S, Marin L, Gonzalez L, Gonzalez JM, Lamelas ML, et al. (2010a). "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: 862-876.

Gonzalez LO, Junquera S, del Casar JM, Gonzalez L, Marin L, Gonzalez-Reyes S, et al. (2010b). "Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pure and mixed invasive and in situ ductal carcinomas of the breast". Hum Pathol 41: 980-989.

Gonzalez LO, Pidal I, Junquera S, Corte MD, Vazquez J, Rodriguez JC, 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: 957-963.

Gouyer V, Conti M, Devos P, Zerimech F, Copin MC, Creme E, et al. (2005). "Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent". Cancer 103: 1676-1684.

Granato AM, Frassineti GL, Giovannini N, Ballardini M, Nanni O, Maltoni R, et al. (2006). "Do serum angiogenic growth factors provide additional information to that of conventional markers in monitoring the course of metastatic breast cancer?". Tumour Biol 27: 302-308.

Grant SL, Hammacher A, Douglas AM, Goss GA, Mansfield RK, Heath JK, et al. (2002). "An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells". Oncogene 21: 460-474.

Graves DT, Barnhill R, Galanopoulos T, Antoniades HN. (1992). "Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo". Am J Pathol 140: 9-14.

Green AR, Green VL, White MC, Speirs V. (1997). "Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours". Int J Cancer 72: 937-941.

Greene GF, Kitadai Y, Pettaway CA, von Eschenbach AC, Bucana CD, Fidler IJ. (1997). "Correlation of metastasis-related gene expression with metastatic potential in human prostate carcinoma cells implanted in nude mice using an in situ messenger RNA hybridization technique". Am J Pathol 150: 1571-1582.

Gregoire M, Lieubeau B. (1995). "The role of fibroblasts in tumor behavior". Cancer Metastasis Rev 14: 339-350.

Grieu F, Li WQ, Iacopetta B. (2004). "Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype". Breast Cancer Res Treat 88: 197-204.

Gross SR, Sin CG, Barraclough R, Rudland PS. (2013). "Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health". Cell Mol Life Sci

Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. (2012). "Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer". Cancer Treat Rev 38: 904-910.

Gur-Dedeoglu B, Konu O, Bozkurt B, Ergul G, Seckin S, Yulug IG. (2009). "Identification of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in normal matched breast tumor tissues". Oncol Res 17: 353-365.

Halaban R. (1996). "Growth factors and melanomas". Semin Oncol 23: 673-681.

Halper J. (2010). "Growth factors as active participants in carcinogenesis: a perspective". Vet Pathol 47: 77-97.

Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, Jr., et al. (2002). "Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease". Br J Cancer 87: 1234-1245.

Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis". Ann Surg Oncol 8: 72-79.

Han W, Kim SW, Park IA, Kang D, Youn YK, Oh SK, et al. (2004). "Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer". BMC Cancer 4: 82.

Hanahan D, Weinberg RA. (2000). "The hallmarks of cancer". Cell 100: 57-70.

—. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation". Cell 144: 646-674.

Hawsawi NM, Ghebeh H, Hendrayani SF, Tulbah A, Al-Eid M, Al-Tweigeri T, et al. (2008). "Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes". Cancer Res 68: 2717-2725.

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. (1992). "Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum". FEBS Lett 298: 29-32.

Hayden MS, Ghosh S. (2004). "Signaling to NF-kappaB". Genes Dev 18: 2195-2224.

Heldin CH, Eriksson U, Ostman A. (2002). "New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens". Arch Biochem Biophys 398: 284-290.

Heldin CH, Westermark B. (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor". Physiol Rev 79: 1283-1316.

Heng B, Glenn WK, Ye Y, Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, et al. (2009). "Human papilloma virus is associated with breast cancer". Br J Cancer 101: 1345-1350.

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops". Cancer Res 52: 3213-3219.

Hernandez JL, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, et al. (2013). "Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody". PLoS One 8: e72480.

Herszenyi L, Hritz I, Lakatos G, Varga MZ, Tulassay Z. (2012). "The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer". Int J Mol Sci 13: 13240-13263.

Hewala TI, Abd El-Moneim NA, Ebied SA, Sheta MI, Soliman K, Abu-Elenean A. (2010). "Diagnostic and prognostic value of serum nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, basic fibroblast growth factor and copper as angiogenic markers in premenopausal breast cancer patients: a case-control study". Br J Biomed Sci 67: 167-176.

Hjertner O, Qvigstad G, Hjorth-Hansen H, Seidel C, Woodliff J, Epstein J, et al. (2000). "Expression of urokinase plasminogen activator and the urokinase plasminogen activator receptor in myeloma cells". Br J Haematol 109: 815-822.

Holliday DL, Hughes S, Shaw JA, Walker RA, Jones JL. (2007). "Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5A/5A genotype enhances breast cancer cell invasion". Breast Cancer Res 9: R67.

Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. (1990). "Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study". Int J Cancer 46: 796-800.

Hu DE, Hori Y, Fan TP. (1993). "Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats". Inflammation 17: 135-143.

Huang HY, Jiang ZF, Li QX, Liu JY, Wang T, Zhang R, et al. (2010). "Inhibition of human breast cancer cell invasion by siRNA against urokinase-type plasminogen activator". Cancer Invest 28: 689-697.

Huang S, Ouyang N, Lin L, Chen L, Wu W, Su F, et al. (2012). "HGF-induced PKCzeta activation increases functional CXCR4 expression in human breast cancer cells". PLoS One 7: e29124.

Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. (2000). "Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8". Cancer Res 60: 5334-5339.

Hugo HJ, Lebret S, Tomaskovic-Crook E, Ahmed N, Blick T, Newgreen DF, et al. (2012). "Contribution of Fibroblast and Mast Cell (Afferent) and Tumor (Efferent) IL-6 Effects within the Tumor Microenvironment". Cancer Microenviron

Hung WK, Chan MC, Mak KL, Chong SF, Lau Y, Ho CM, et al. (2005). "Non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with metastatic sentinel nodes". ANZ J Surg 75: 27-31.

Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. (2009). "An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation". Cell 139: 693-706.

Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K. (2011). "Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion". Proc Natl Acad Sci U S A 108: 1397-1402.

Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. (2010). "STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer". Mol Cell 39: 493-506.

Ingerslev HC, Ossum CG, Lindenstrom T, Nielsen ME. (2010). "Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)". PLoS One 5: e9304.

Ismail NI, Kaur G, Hashim H, Hassan MS. (2008). "S100A4 overexpression proves to be independent marker for breast cancer progression". Cancer Cell Int 8: 12.

Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, Fujimoto N, Okada Y. (1996). "Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas". Jpn J Cancer Res 87: 602-611.

Jackson D, Bresnick J, Rosewell I, Crafton T, Poulsom R, Stamp G, et al. (1997). "Fibroblast growth factor receptor signalling has a role in lobuloalveolar development of the mammary gland". J Cell Sci 110 (Pt 11): 1261-1268.

Jackson L, Evers BM. (2006). "Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers". Cancer Treat Res 130: 39-65.

Jacquemier J, Sun ZZ, Penault-Llorca F, Geneix J, Devilard E, Adelaide J, et al. (1998). "FGF7 protein expression in human breast carcinomas". J Pathol 186: 269-274.

Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, et al. (2006). "Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis". J Clin Invest 116: 1561-1570.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011). "Global cancer statistics". CA Cancer J Clin 61: 69-90.

Jenkinson SR, Barraclough R, West CR, Rudland PS. (2004). "S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis". Br J Cancer 90: 253-262.

Jeoung DI, Bong Lee E, Lee S, Lim Y, Lee DY, Kim J, et al. (2002). "Autoantibody to DNA binding protein B as a novel serologic marker in systemic sclerosis". Biochem Biophys Res Commun 299: 549-554.

Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD, et al. (2006). "Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells". Int J Mol Med 17: 583-590.

Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. (2002). "Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer". Oncogene 21: 2245-2252.

Johnsson A, Betsholtz C, Heldin CH, Westermark B. (1985). "Antibodies against platelet-derived growth factor inhibit acute transformation by simian sarcoma virus". Nature 317: 438-440.

Jones JL, Glynn P, Walker RA. (1999). "Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas". J Pathol 189: 161-168.

Jones JL, Walker RA. (1997). "Control of matrix metalloproteinase activity in cancer". J Pathol 183: 377-379.

Kalluri R, Neilson EG. (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis". J Clin Invest 112: 1776-1784.

Kalluri R, Zeisberg M. (2006). "Fibroblasts in cancer". Nat Rev Cancer 6: 392-401.

Kang H, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. (2005a). "The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer". Breast 14: 360-367.

Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. (2005b). "Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer". Breast Cancer Res 7: R402-410.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, et al. (2003). "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone". Cancer Cell 3: 537-549.

Karashima T, Sweeney P, Kamat A, Huang S, Kim SJ, Bar-Eli M, et al. (2003). "Nuclear factor-kappaB mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8". Clin Cancer Res 9: 2786-2797.

Kato T, Furumoto H, Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, et al. (2001). "Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer". Biochem Biophys Res Commun 282: 735-738.

Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. (2005). "Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumourigenesis". Tumour Biol 26: 173-185.

Kim JM, Stewart R, Kim SY, Kang HJ, Jang JE, Kim SW, et al. (2013). "A one year longitudinal study of cytokine genes and depression in breast cancer". J Affect Disord 148: 57-65.

Kinder M, Chislock E, Bussard KM, Shuman L, Mastro AM. (2008). "Metastatic breast cancer induces an osteoblast inflammatory response". Exp Cell Res 314: 173-183.

Kishimoto H, Wang Z, Bhat-Nakshatri P, Chang D, Clarke R, Nakshatri H. (2005). "The p160 family coactivators regulate breast cancer cell proliferation and invasion through autocrine/paracrine activity of SDF-1alpha/CXCL12". Carcinogenesis 26: 1706-1715.

Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. (2009). "CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures". Cytotechnology 59: 31-44.

Kitsberg DI, Leder P. (1996). "Keratinocyte growth factor induces mammary and prostatic hyperplasia and mammary adenocarcinoma in transgenic mice". Oncogene 13: 2507-2515.

Klausner AP, Unger P, Fine EM. (2002). "Recurrent prostatic stromal proliferation of uncertain malignant potential: a therapeutic challenge". J Urol 168: 1493-1494.

Kleer CG, Bloushtain-Qimron N, Chen YH, Carrasco D, Hu M, Yao J, et al. (2008). "Epithelial and stromal cathepsin K and CXCL14 expression in breast tumor progression". Clin Cancer Res 14: 5357-5367.

Kleespies A, Bruns CJ, Jauch KW. (2005). "Clinical significance of VEGF-A, -C and -D expression in esophageal malignancies". Onkologie 28: 281-288.

Knoop A, Andreasen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV, Simonsen AC, et al. (1998). "Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer". Br J Cancer 77: 932-940.

Knupfer H, Preiss R. (2007). "Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review)". Breast Cancer Res Treat 102: 129-135.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. (1992). "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis". Science 258: 1798-1801.

Kong D, Wang Z, Sarkar SH, Li Y, Banerjee S, Saliganan A, et al. (2008). "Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells". Stem Cells 26: 1425-1435.

Kopans DB. (1994). "Caution on core". Radiology 193: 325-326; discussion 326-328.

Korc M, Friesel RE. (2009). "The role of fibroblast growth factors in tumor growth". Curr Cancer Drug Targets 9: 639-651.

Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, et al. (2012). "Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population". Mol Cell 47: 570-584.

Korkaya H, Liu S, Wicha MS. (2011). "Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment". J Clin Invest 121: 3804-3809.

Kozlowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. (2003). "Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients". Rocz Akad Med Bialymst 48: 82-84.

Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. (2007). "Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis". Am J Physiol Cell Physiol 292: C987-995.

Kunz-Schughart LA, Knuechel R. (2002). "Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue". Histol Histopathol 17: 623-637.

Kunz M, Hartmann A, Flory E, Toksoy A, Koczan D, Thiesen HJ, et al. (1999). "Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness". Am J Pathol 155: 753-763.

Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, et al. (2004). "Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice". Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4966-4971.

Kuratsu J, Yoshizato K, Yoshimura T, Leonard EJ, Takeshima H, Ushio Y. (1993). "Quantitative study of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in cerebrospinal fluid and cyst fluid from patients with malignant glioma". J Natl Cancer Inst 85: 1836-1839.

Kuvaja P, Talvensaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. (2008). "High preoperative plasma TIMP-1 is prognostic for early relapse in primary breast carcinoma". Int J Cancer 123: 846-851.

Kuvaja P, Wurtz SO, Talvensaari-Mattila A, Brunner N, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. (2007). "High serum TIMP-1 correlates with poor prognosis in breast carcinoma - a validation study". Cancer Biomark 3: 293-300.

Lamas E, Le Bail B, Housset C, Boucher O, Brechot C. (1991). "Localization of insulin-like growth factor-II and hepatitis B virus mRNAs and proteins in human hepatocellular carcinomas". Lab Invest 64: 98-104.

Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, Papavassiliou AG. (2012). "TGF-beta signalling in colon carcinogenesis". Cancer Lett 314: 1-7.

Lanca T, Costa MF, Goncalves-Sousa N, Rei M, Grosso AR, Penido C, et al. (2013). "Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds". J Immunol 190: 6673-6680.

Landa MC, Frago N, Tres A. (1994). "Diet and the risk of breast cancer in Spain". Eur J Cancer Prev 3: 313-320.

Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. (2000). "Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma". Cytokine 12: 547-554.

LeBedis C, Chen K, Fallavollita L, Boutros T, Brodt P. (2002). "Peripheral lymph node stromal cells can promote growth and tumorigenicity of breast carcinoma cells through the release of IGF-I and EGF". Int J Cancer 100: 2-8.

Lebrecht A, Grimm C, Lantzsch T, Ludwig E, Hefler L, Ulbrich E, et al. (2004). "Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients with breast cancer". Tumour Biol 25: 14-17.

Lebret SC, Newgreen DF, Thompson EW, Ackland ML. (2007). "Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors". Breast Cancer Res 9: R19.

Lee BC, Lee TH, Avraham S, Avraham HK. (2004). "Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells". Mol Cancer Res 2: 327-338.

Lee OH, Bae SK, Bae MH, Lee YM, Moon EJ, Cha HJ, et al. (2000). "Identification of angiogenic properties of insulin-like growth factor II in in vitro angiogenesis models". Br J Cancer 82: 385-391.

Lefevre G, Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, Faussat AM, Mrzyk S, et al. (2009). "Activation of the FGF2/FGFR1 autocrine loop for cell proliferation and survival in uveal melanoma cells". Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 1047-1057.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen". Science 246: 1306-1309.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. (2003). "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis". J Immunol 170: 3369-3376.

Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. (2005a). "Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis". Angiogenesis 8: 63-71.

Li G, Fridman R, Kim HR. (1999). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells". Cancer Res 59: 6267-6275.

Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, et al. (2004a). "Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma". Breast Cancer Res Treat 88: 75-85.

Li J, Li F, Wang H, Wang X, Jiang Y, Li D. (2012a). "Wortmannin reduces metastasis and angiogenesis of human breast cancer cells via nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 and interleukin-8 pathways". J Int Med Res 40: 867-876.

Li Q, Gao S, Yu Y, Wang W, Chen X, Wang R, et al. (2012b). "A novel bFGF antagonist peptide inhibits breast cancer cell growth". Mol Med Rep 6: 210-214.

Li SR, Ng CF, Banerjea A, Ahmed S, Hands R, Powar M, et al. (2004b). "Differential expression patterns of the insulin-like growth factor 2 gene in human colorectal cancer". Tumour Biol 25: 62-68.

Li X, Tjwa M, Moons L, Fons P, Noel A, Ny A, et al. (2005b). "Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors". J Clin Invest 115: 118-127.

Li Y, Ambrosone CB, McCullough MJ, Ahn J, Stevens VL, Thun MJ, et al. (2009). "Oxidative stress-related genotypes, fruit and vegetable consumption and breast cancer risk". Carcinogenesis 30: 777-784.

Li Z, Wang Z, Yang L, Li X, Sasaki Y, Wang S, et al. (2010). "Fibroblast growth factor 2 regulates bone sialoprotein gene transcription in human breast cancer cells". J Oral Sci 52: 125-132.

Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. (2006). "Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones". Endocr Relat Cancer 13: 905-919.

Liang Y, Robinson DF, Dennig J, Suske G, Fahl WE. (1996). "Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors". J Biol Chem 271: 11792-11797.

Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, et al. (2004). "Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4". Cancer Res 64: 4302-4308.

Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. (2005). "Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis". Cancer Res 65: 967-971.

Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot JM, Kucia M, et al. (2002). "CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion". Blood 100: 2597-2606.

Lin HJ, Zuo T, Lin CH, Kuo CT, Liyanarachchi S, Sun S, et al. (2008). "Breast cancer-associated fibroblasts confer AKT1-mediated epigenetic silencing of Cystatin M in epithelial cells". Cancer Res 68: 10257-10266.

Lin WW, Karin M. (2007). "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer". J Clin Invest 117: 1175-1183.

Liotta LA, Kohn EC. (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface". Nature 411: 375-379.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. (1980). "Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen". Nature 284: 67-68.

Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Evans DB, Hamer P, et al. (2007). "Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 level predicts decreased response and survival in metastatic breast cancer". Cancer 109: 1933-1939.

Lipton A, Leitzel K, Chaudri-Ross HA, Evans DB, Ali SM, Demers L, et al. (2008). "Serum TIMP-1 and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen in metastatic breast cancer". J Clin Oncol 26: 2653-2658.

Liu XW, Bernardo MM, Fridman R, Kim HR. (2003). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway". J Biol Chem 278: 40364-40372.

Lochter A, Bissell MJ. (1999). "An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases". APMIS 107: 128-136.

Lonning PE, Knappskog S, Staalesen V, Chrisanthar R, Lillehaug JR. (2007). "Breast cancer prognostication and prediction in the postgenomic era". Ann Oncol 18: 1293-1306.

Lu X, Kang Y. (2009). "Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone". J Biol Chem 284: 29087-29096.

Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. (1997). "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis". Am J Pathol 151: 1105-1113.

Luo J, Margolis KL, Wactawski-Wende J, Horn K, Messina C, Stefanick ML, et al. (2011). "Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study". BMJ 342: d1016.

Lynch CC, Matrisian LM. (2002). "Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication". Differentiation 70: 561-573.

Ma PC, Tretiakova MS, Nallasura V, Jagadeeswaran R, Husain AN, Salgia R. (2007). "Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion". Br J Cancer 97: 368-377.

Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. (2009). "Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression". Breast Cancer Res 11: R7.

Maass H, Engel B, Trams G. (1975). "Steroid hormone receptors in human breast cancer and the clinical significance". J Steroid Biochem 6: 743-749.

Malavaki CJ, Roussidis AE, Gialeli C, Kletsas D, Tsegenidis T, Theocharis AD, et al. (2013). "Imatinib as a key inhibitor of the platelet-derived growth factor receptor mediated expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and functional properties of breast cancer cells". FEBS J 280: 2477-2489.

Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, et al. (2002). "The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy". Br J Cancer 87: 772-778.

Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, et al. (1999). "The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells". J Biol Chem 274: 6935-6945.

Manicone AM, McGuire JK. (2008). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation". Semin Cell Dev Biol 19: 34-41.

Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM, et al. (2006). "Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial". J Natl Cancer Inst 98: 599-609.

Mansour EG, Gray R, Shatila AH, Osborne CK, Tormey DC, Gilchrist KW, et al. (1989). "Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer. An intergroup study". N Engl J Med 320: 485-490.

Maroni P, Bendinelli P, Matteucci E, Desiderio MA. (2007). "HGF induces CXCR4 and CXCL12-mediated tumor invasion through Ets1 and NF-kappaB". Carcinogenesis 28: 267-279.

Marumo T, Schini-Kerth VB, Busse R. (1999). "Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells". Diabetes 48: 1131-1137.

Matteucci E, Bendinelli P, Desiderio MA. (2009). "Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells". Carcinogenesis 30: 937-945.

McCarthy K, Maguire T, McGreal G, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. (1999). "High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer". Int J Cancer 84: 44-48.

McMahon B, Kwaan HC. (2008). "The plasminogen activator system and cancer". Pathophysiol Haemost Thromb 36: 184-194.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. (2000). "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics". BMJ 321: 624-628.

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, et al. (2002). "Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations". Nat Genet 31: 55-59.

Meyers CA, Albitar M, Estey E. (2005). "Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome". Cancer 104: 788-793.

Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C, Yang XD, et al. (2003). "Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB". Clin Cancer Res 9: 3167-3175.

Miyamoto M, Naruo K, Seko C, Matsumoto S, Kondo T, Kurokawa T. (1993). "Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property". Mol Cell Biol 13: 4251-4259.

Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. (2007). "Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis". Br J Cancer 96: 1092-1100.

Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. (2011). "Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells". J Exp Med 208: 1949-1962.

Montel V, Mose ES, Tarin D. (2006). "Tumor-stromal interactions reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis". Int J Cancer 119: 251-263.

Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. (1999). "Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis". Nat Med 5: 828-831.

Moreau M, Mourah S, Dosquet C. (2011). "beta-Catenin and NF-kappaB cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells". Int J Cancer 128: 1280-1292.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. (2007). "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma". N Engl J Med 356: 115-124.

Mueller MM, Fusenig NE. (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer". Nat Rev Cancer 4: 839-849.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis". Nature 410: 50-56.

Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux TL, McClellan JL, Steiner JL, Carmichael MD, et al. (2011). "Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice". Cytokine 55: 274-279.

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. (2002). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration". Pathol Int 52: 255-264.

Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor". Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2305-2309.

Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. (1998). "A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection". Semin Immunol 10: 179-185.

Nagy J, Curry GW, Hillan KJ, McKay IC, Mallon E, Purushotham AD, et al. (1996). "Hepatocyte growth factor/scatter factor expression and c-met in primary breast cancer". Surg Oncol 5: 15-21.

Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y. (1997). "Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions". Cancer Res 57: 3305-3313.

Nakopoulou L, Giannopoulou I, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Tsirmpa I, Alexandrou P, et al. (2002a). "Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis". J Pathol 197: 307-313.

Nakopoulou L, Panayotopoulou EG, Giannopoulou I, Alexandrou P, Katsarou S, Athanassiadou P, et al. (2002b). "Stromelysin-3 protein expression in invasive breast cancer: relation to proliferation, cell survival and patients' outcome". Mod Pathol 15: 1154-1161.

Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. (1997). "Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth". Mol Cell Biol 17: 3629-3639.

Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, et al. (1995). "The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer". J Clin Invest 95: 2391-2396.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. (2000). "Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications". J Clin Oncol 18: 1135-1149.

Nesbit M, Nesbit HK, Bennett J, Andl T, Hsu MY, Dejesus E, et al. (1999). "Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes". Oncogene 18: 6469-6476.

Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, et al. (2001). "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1". J Cell Sci 114: 111-118.

Nozaki S, Sledge GW, Jr., Nakshatri H. (2000). "Cancer cell-derived interleukin 1alpha contributes to autocrine and paracrine induction of pro-metastatic genes in breast cancer". Biochem Biophys Res Commun 275: 60-62.

Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. (2003). "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth". Blood 101: 2620-2627.

Obermair A, Kucera E, Mayerhofer K, Speiser P, Seifert M, Czerwenka K, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival". Int J Cancer 74: 455-458.

Olsen CJ, Moreira J, Lukanidin EM, Ambartsumian NS. (2010). "Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts". BMC Cancer 10: 444.

Olson JE, Vachon CM, Vierkant RA, Sweeney C, Limburg PJ, Cerhan JR, et al. (2005). "Prepregnancy exposure to cigarette smoking and subsequent risk of postmenopausal breast cancer". Mayo Clin Proc 80: 1423-1428.

Onisto M, Riccio MP, Scannapieco P, Caenazzo C, Griggio L, Spina M, et al. (1995). "Gelatinase A/TIMP-2 imbalance in lymph-node-positive breast carcinomas, as measured by RT-PCR". Int J Cancer 63: 621-626.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. (2001). "Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions". Trends Immunol 22: 571-579.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion". Cell 121: 335-348.

Ornitz DM, Itoh N. (2001). "Fibroblast growth factors". Genome Biol 2: REVIEWS3005.

Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. (2005). "Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer". Clin Cancer Res 11: 865s-870s.

Ottman R, Pike MC, King MC, Henderson BE. (1983). "Practical guide for estimating risk for familial breast cancer". Lancet 2: 556-558.

Overall CM, Lopez-Otin C. (2002). "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era". Nat Rev Cancer 2: 657-672.

Palmieri C, Roberts-Clark D, Assadi-Sabet A, Coope RC, O'Hare M, Sunters A, et al. (2003). "Fibroblast growth factor 7, secreted by breast fibroblasts, is an interleukin-1beta-induced paracrine growth factor for human breast cells". J Endocrinol 177: 65-81.

Park BW, Kim SI, Kim EK, Yang WI, Lee KS. (2002). "Impact of patient age on the outcome of primary breast carcinoma". J Surg Oncol 80: 12-18.

Park SH, Kim JH, Lee DH, Kang JW, Song HH, Oh SR, et al. (2013). "Luteolin 8-C-beta-fucopyranoside inhibits invasion and suppresses TPA-induced MMP-9 and IL-8 via ERK/AP-1 and ERK/NF-kappaB signaling in MCF-7 breast cancer cells". Biochimie 95: 2082-2090.

Parr C, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. (2004). "The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer". Clin Cancer Res 10: 202-211.

Pasche B. (2001). "Role of transforming growth factor beta in cancer". J Cell Physiol 186: 153-168.

Patel P, West-Mays J, Kolb M, Rodrigues JC, Hoff CM, Margetts PJ. (2010). "Platelet derived growth factor B and epithelial mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells". Matrix Biol 29: 97-106.

Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, et al. (2007). "Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases". N Engl J Med 357: 2543-2551.

Pekonen F, Nyman T, Rutanen EM. (1993). "Differential expression of keratinocyte growth factor and its receptor in the human uterus". Mol Cell Endocrinol 95: 43-49.

Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. (2004). "Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis". Clin Cancer Res 10: 7621-7628.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours". Nature 406: 747-752.

Petit I, Jin D, Rafii S. (2007). "The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis". Trends Immunol 28: 299-307.

Phan SH. (2002). "The myofibroblast in pulmonary fibrosis". Chest 122: 286S-289S.

Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. (2002). "Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention". Nat Genet 31: 33-36.

Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. (2003). "The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases". Am J Respir Crit Care Med 167: 1676-1686.

Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, Bready J, Chang D, Kenney WC, et al. (1995). "Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds". J Clin Invest 96: 1336-1350.

Pike MC, Pearce CL, Wu AH. (2004). "Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary". Oncogene 23: 6379-6391.

Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rouke S, Blamey RW, Elston CW. (1994). "Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up". Histopathology 24: 41-47.

Plante M, Rubin SC, Wong GY, Federici MG, Finstad CL, Gastl GA. (1994). "Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer". Cancer 73: 1882-1888.

Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. (1989). "Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells". EMBO J 8: 3801-3806.

Podergajs N, Brekka N, Radlwimmer B, Herold-Mende C, Talasila KM, Tiemann K, et al. (2013). "Expansive growth of two glioblastoma stem-like cell lines is mediated by bFGF and not by EGF". Radiol Oncol 47: 330-337.

Polyak K, Kalluri R. (2010). "The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer". Cold Spring Harb Perspect Biol 2: a003244.

Pollak M. (2008). "Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia". Nat Rev Cancer 8: 915-928.

Potter SM, Dwyer RM, Hartmann MC, Khan S, Boyle MP, Curran CE, et al. (2012). "Influence of stromal-epithelial interactions on breast cancer in vitro and in vivo". Breast Cancer Res Treat 131: 401-411.

Radisky ES, Radisky DC. (2007). "Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion". Rev Endocr Metab Disord 8: 279-287.

Rajaram M, Li J, Egeblad M, Powers RS. (2013). "System-wide analysis reveals a complex network of tumor-fibroblast interactions involved in tumorigenicity". PLoS Genet 9: e1003789.

Rastelli F, Crispino S. (2008). "Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer". Tumori 94: 370-383.

Ree AH, Florenes VA, Berg JP, Maelandsmo GM, Nesland JM, Fodstad O. (1997). "High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases". Clin Cancer Res 3: 1623-1628.

Ritter E, Perry A, Yu J, Wang T, Tang L, Bieberich E. (2008). "Breast cancer cell-derived fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor are chemoattractants for bone marrow stromal stem cells". Ann Surg 247: 310-314.

Rofstad EK, Halsor EF. (2002). "Hypoxia-associated spontaneous pulmonary metastasis in human melanoma xenografts: involvement of microvascular hot spots induced in hypoxic foci by interleukin 8". Br J Cancer 86: 301-308.

Rollins BJ, Sunday ME. (1991). "Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells". Mol Cell Biol 11: 3125-3131.

Rosen PP, Groshen S. (1990). "Factors influencing survival and prognosis in early breast carcinoma (T1N0M0-T1N1M0). Assessment of 644 patients with median follow-up of 18 years". Surg Clin North Am 70: 937-962.

Roskoski R, Jr. (2007). "Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor". Biochem Biophys Res Commun 356: 323-328.

Rossner P, Jr., Gammon MD, Zhang YJ, Terry MB, Hibshoosh H, Memeo L, et al. (2009). "Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival". J Cell Mol Med 13: 3847-3857.

Rouyer N, Wolf C, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Bellocq JP, et al. (1994). "Stromelysin-3 gene expression in human cancer: an overview". Invasion Metastasis 14: 269-275.

Rowzee AM, Lazzarino DA, Rota L, Sun Z, Wood TL. (2008). "IGF ligand and receptor regulation of mammary development". J Mammary Gland Biol Neoplasia 13: 361-370.

Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, e Ferreira EN, et al. (2009). "Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts". Int J Cancer 125: 2767-2777.

Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cheon G, et al. (1995). "Keratinocyte growth factor". Cell Biol Int 19: 399-411.

Rusnati M, Presta M. (2007). "Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies". Curr Pharm Des 13: 2025-2044.

Saalbach A, Aneregg U, Bruns M, Schnabel E, Herrmann K, Haustein UF. (1996). "Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities". J Invest Dermatol 106: 1314-1319.

Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, et al. (2002). "Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction". J Immunol 169: 469-475.

Saik JE, Gould DJ, Watkins EM, Dickinson ME, West JL. (2011). "Covalently immobilized platelet-derived growth factor-BB promotes angiogenesis in biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogels". Acta Biomater 7: 133-143.

Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, et al. (2001). "Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma". Cancer 92: 1085-1091.

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, et al. (2000). "Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression". Blood 96: 34-40.

Saleem M, Kweon MH, Johnson JJ, Adhami VM, Elcheva I, Khan N, et al. (2006). "S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9". Proc Natl Acad Sci U S A 103: 14825-14830.

Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, et al. (2003). "Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer". Int J Cancer 103: 642-646.

Salven P, Perhoniemi V, Tykka H, Maenpaa H, Joensuu H. (1999). "Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer". Breast Cancer Res Treat 53: 161-166.

Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, Deschenes J, Sauter G, Simon R, et al. (2006). "The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study". Breast Cancer Res Treat 97: 275-283.

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. (2007). "The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights". Endocr Rev 28: 20-47.

Sanchez-Martin L, Estecha A, Samaniego R, Sanchez-Ramon S, Vega MA, Sanchez-Mateos P. (2011). "The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression". Blood 117: 88-97.

Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, et al. (2007). "IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland". J Clin Invest 117: 3988-4002.

Santos RP, Benvenuti TT, Honda ST, Del Valle PR, Katayama ML, Brentani HP, et al. (2011). "Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression". Tumour Biol 32: 145-157.

Sara VR, Hall K. (1990). "Insulin-like growth factors and their binding proteins". Physiol Rev 70: 591-614.

Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE, Hall BM. (2007). "Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer". FASEB J 21: 3763-3770.

Sayer RA, Lancaster JM, Pittman J, Gray J, Whitaker R, Marks JR, et al. (2005). "High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer". Gynecol Oncol 96: 355-361.

Scarff RWaTH, ed. (1968). Histological typing of breast tumors: World Health Organization, Geneva.

Sciacca FL, Sturzl M, Bussolino F, Sironi M, Brandstetter H, Zietz C, et al. (1994). "Expression of adhesion molecules, platelet-activating factor, and chemokines by Kaposi's sarcoma cells". J Immunol 153: 4816-4825.

Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. (1993). "IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor". J Immunol 151: 2667-2675.

Schmidt-Hansen B, Klingelhofer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen S, Kruse C, et al. (2004a). "Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay". J Biol Chem 279: 24498-24504.

Schmidt-Hansen B, Ornas D, Grigorian M, Klingelhofer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, et al. (2004b). "Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity". Oncogene 23: 5487-5495.

Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C. (2003). "Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice". Circulation 108: 2491-2497.

Schroder JM. (1992). "The neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel neutrophil chemotactic cytokine". Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 40: 23-31.

Schrohl AS, Christensen IJ, Pedersen AN, Jensen V, Mouridsen H, Murphy G, et al. (2003). "Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer". Mol Cell Proteomics 2: 164-172.

Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, et al. (2004). "Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer". Clin Cancer Res 10: 2289-2298.

Schrohl AS, Meijer-van Gelder ME, Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Look MP, Mouridsen HT, et al. (2006). "Primary tumor levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are predictive of resistance to chemotherapy in patients with metastatic breast cancer". Clin Cancer Res 12: 7054-7058.

Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R. (1993). "Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor". Proc Natl Acad Sci U S A 90: 11217-11221.

Sellers TA, Kushi LH, Cerhan JR, Vierkant RA, Gapstur SM, Vachon CM, et al. (2001). "Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women". Epidemiology 12: 420-428.

Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, et al. (2005). "Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation". J Biol Chem 280: 20833-20841.

Seymour L, Dajee D, Bezwoda WR. (1993). "Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer". Breast Cancer Res Treat 26: 247-252.

Sgier D, Zuberbuehler K, Pfaffen S, Neri D. (2010). "Isolation and characterization of an inhibitory human monoclonal antibody specific to the urokinase-type plasminogen activator, uPA". Protein Eng Des Sel 23: 261-269.

Shao ZM, Nguyen M, Barsky SH. (2000). "Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated". Oncogene 19: 4337-4345.

Sheen-Chen SM, Liu YW, Eng HL, Chou FF. (2005). "Serum levels of hepatocyte growth factor in patients with breast cancer". Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14: 715-717.

Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. (2001). "Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression". Cancer Res 61: 1320-1326.

Sherbet GV. (2009). "Metastasis promoter S100A4 is a potentially valuable molecular target for cancer therapy". Cancer Lett 280: 15-30.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. (2006). "CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis". Breast Cancer Res 8: R59.

Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene". Genomics 28: 495-500.

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, 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: 926-935.

Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG. (2012). "Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis". Am J Pathol 181: 1895-1899.

Siddiqi I, Funatomi H, Kobrin MS, Friess H, Buchler MW, Korc M. (1995). "Increased expression of keratinocyte growth factor in human pancreatic cancer". Biochem Biophys Res Commun 215: 309-315.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994). "Structure, regulation and function of NF-kappa B". Annu Rev Cell Biol 10: 405-455.

Sieuwerts AM, Klijn JG, Henzen-Logmans SC, Foekens JA. (1999). "Cytokine-regulated urokinase-type-plasminogen-activator (uPA) production by human breast fibroblasts in vitro". Breast Cancer Res Treat 55: 9-20.

Simpson JF, Page DL. (1994). "Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data". Am J Clin Pathol 102: S3-8.

Singer C, Rasmussen A, Smith HS, Lippman ME, Lynch HT, Cullen KJ. (1995). "Malignant breast epithelium selects for insulin-like growth factor II expression in breast stroma: evidence for paracrine function". Cancer Res 55: 2448-2454.

Singh JK, Simoes BM, Clarke RB, Bundred NJ. (2013). "Targeting IL-8 signalling to inhibit breast cancer stem cell activity". Expert Opin Ther Targets 17: 1235-1241.

Siveen KS, Kuttan G. (2009). "Role of macrophages in tumour progression". Immunol Lett 123: 97-102.

Sivula A, Talvensaari-Mattila A, Lundin J, Joensuu H, Haglund C, Ristimaki A, et al. (2005). "Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer". Breast Cancer Res Treat 89: 215-220.

SJ. S. (1997). "Morphologic risk factors for local recurrence in

patients with invasive breast cancer treated with conservative

surgery and radiation therapy.". Breast J 3: 261-266.

Sloane BF, Yan S, Podgorski I, Linebaugh BE, Cher ML, Mai J, et al. (2005). "Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment". Semin Cancer Biol 15: 149-157.

Smalley KS. (2003). "A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma?". Int J Cancer 104: 527-532.

Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. (2004). "CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer". Cancer Res 64: 8604-8612.

Song N, Huang Y, Shi H, Yuan S, Ding Y, Song X, et al. (2009). "Overexpression of platelet-derived growth factor-BB increases tumor pericyte content via stromal-derived factor-1alpha/CXCR4 axis". Cancer Res 69: 6057-6064.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications". Proc Natl Acad Sci U S A 98: 10869-10874.

Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. (1997). "Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer". J Clin Invest 100: 2952-2960.

Sozzani S, Locati M, Allavena P, Van Damme J, Mantovani A. (1996). "Chemokines: a superfamily of chemotactic cytokines". Int J Clin Lab Res 26: 69-82.

Sporn MB, Roberts AB. (1992). "Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges". J Cell Biol 119: 1017-1021.

Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, Sadikot RT, Yull FE, Blackwell TS, et al. (2008). "Host nuclear factor-kappaB activation potentiates lung cancer metastasis". Mol Cancer Res 6: 364-371.

Steiner JL, Murphy EA. (2012). "Importance of chemokine (CC-motif) ligand 2 in breast cancer". Int J Biol Markers 27: e179-185.

Sternlicht MD, Werb Z. (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior". Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463-516.

Stetler-Stevenson WG. (1999). "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention". J Clin Invest 103: 1237-1241.

Strieter RM, Kunkel SL, Elner VM, Martonyi CL, Koch AE, Polverini PJ, et al. (1992). "Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization". Am J Pathol 141: 1279-1284.

Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. (1997). "The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews". N Engl J Med 336: 1401-1408.

Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL, Sansone P, Sasser AK, Tavolari S, et al. (2008). "Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner". Cancer Res 68: 9087-9095.

Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. (2005). "Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta". J Cell Sci 118: 2143-2153.

Subramaniam DS, Isaacs C. (2005). "Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer". Curr Treat Options Oncol 6: 147-159.

Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. (2006). "Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment". Cancer Biol Ther 5: 1640-1646.

Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, et al. (2009). "Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells". Oncogene 28: 2940-2947.

Sun R, Jaruga B, Kulkarni S, Sun H, Gao B. (2005). "IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: regulation by SOCS3". Biochem Biophys Res Commun 338: 1943-1949.

Surmacz E. (2000). "Function of the IGF-I receptor in breast cancer". J Mammary Gland Biol Neoplasia 5: 95-105.

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract". Nature 393: 591-594.

Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. (2001). "Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy". Breast Cancer Res Treat 65: 55-61.

Talvensaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. (2005). "High preoperative serum TIMP-1 is a prognostic indicator for survival in breast carcinoma". Breast Cancer Res Treat 89: 29-34.

Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, et al. (2003). "T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer". FEBS Lett 550: 79-83.

Tamaru N, Hishikawa Y, Ejima K, Nagasue N, Inoue S, Muramatsu M, et al. (2004). "Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis in human breast cancer". Lab Invest 84: 1460-1471.

Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, et al. (1992). "Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells". Proc Natl Acad Sci U S A 89: 8928-8932.

Taniguchi T, Toi M, Inada K, Imazawa T, Yamamoto Y, Tominaga T. (1995). "Serum concentrations of hepatocyte growth factor in breast cancer patients". Clin Cancer Res 1: 1031-1034.

Tarkkonen KM, Nilsson EM, Kahkonen TE, Dey JH, Heikkila JE, Tuomela JM, et al. (2012). "Differential roles of fibroblast growth factor receptors (FGFR) 1, 2 and 3 in the regulation of S115 breast cancer cell growth". PLoS One 7: e49970.

Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Bernard P. (1998). "Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A, and urokinase expression in breast cancer". Hum Pathol 29: 979-985.

Thomssen C, Harbeck N, Dittmer J, Abraha-Spaeth SR, Papendick N, Paradiso A, et al. (2009). "Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens". J Natl Cancer Inst 101: 1028-1029.

Tlsty TD, Coussens LM. (2006). "Tumor stroma and regulation of cancer development". Annu Rev Pathol 1: 119-150.

Tlsty TD, Hein PW. (2001). "Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals". Curr Opin Genet Dev 11: 54-59.

Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. (2002). "Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer". Int J Cancer 98: 14-18.

Trevino JG, Gray MJ, Nawrocki ST, Summy JM, Lesslie DP, Evans DB, et al. (2006). "Src activation of Stat3 is an independent requirement from NF-kappaB activation for constitutive IL-8 expression in human pancreatic adenocarcinoma cells". Angiogenesis 9: 101-110.

Trimis G, Chatzistamou I, Politi K, Kiaris H, Papavassiliou AG. (2008). "Expression of p21waf1/Cip1 in stromal fibroblasts of primary breast tumors". Hum Mol Genet 17: 3596-3600.

Tsimberidou AM, Estey E, Wen S, Pierce S, Kantarjian H, Albitar M, et al. (2008). "The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes". Cancer 113: 1605-1613.

Tsuyada A, Chow A, Wu J, Somlo G, Chu P, Loera S, et al. (2012). "CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells". Cancer Res 72: 2768-2779.

Turk V, Kos J, Turk B. (2004). "Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer?". Cancer Cell 5: 409-410.

Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, Pan CC, Shew JY, Chang KJ, et al. (2011). "Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis". PLoS One 6: e15313.

Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, et al. (2000). "Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer". Clin Cancer Res 6: 3282-3289.

Ulich TR, Yi ES, Cardiff R, Yin S, Bikhazi N, Biltz R, et al. (1994). "Keratinocyte growth factor is a growth factor for mammary epithelium in vivo. The mammary epithelium of lactating rats is resistant to the proliferative action of keratinocyte growth factor". Am J Pathol 144: 862-868.

Valkovic T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babic R, Jonjic N. (1998). "Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer". Pathol Res Pract 194: 335-340.

Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. (2004). "Chemokine-protease interactions in cancer". Semin Cancer Biol 14: 201-208.

Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, et al. (2006). "Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study". Br J Cancer 94: 1643-1649.

van Steensel L, Paridaens D, Dingjan GM, van Daele PL, van Hagen PM, Kuijpers RW, et al. (2010). "Platelet-derived growth factor-BB: a stimulus for cytokine production by orbital fibroblasts in Graves' ophthalmopathy". Invest Ophthalmol Vis Sci 51: 1002-1007.

van Zijl F, Mair M, Csiszar A, Schneller D, Zulehner G, Huber H, et al. (2009). "Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge". Oncogene 28: 4022-4033.

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. (1995). "Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation". Genes Dev 9: 2723-2735.

Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, 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: 5569-5575.

Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. (2007). "Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials". BMC Cancer 7: 153.

Visvader JE, Lindeman GJ. (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions". Nat Rev Cancer 8: 755-768.

Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, et al. (2007). "Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer". Br J Cancer 96: 903-911.

Vona-Davis L, Rose DP. (2007). "Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression". Endocr Relat Cancer 14: 189-206.

Wadowska-Jaszczynska K, Jach R, Stangel-Wocikiewicz K, Kabzinska-Turek M, Przybylska P, Basta A, et al. (2011). "Results in treatment of early breast cancers and the level of selected metalloproteinases". Neuro Endocrinol Lett 32: 821-830.

Wagsater D, Zhu C, Bjorck HM, Eriksson P. (2009). "Effects of PDGF-C and PDGF-D on monocyte migration and MMP-2 and MMP-9 expression". Atherosclerosis 202: 415-423.

Walker RA. (2001). "The complexities of breast cancer desmoplasia". Breast Cancer Res 3: 143-145.

Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. (1987). "Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes". Biochem Biophys Res Commun 149: 755-761.

Wang J, Guan E, Roderiquez G, Calvert V, Alvarez R, Norcross MA. (2001). "Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages". J Biol Chem 276: 49236-49243.

Wang L, Wang X, Liang Y, Diao X, Chen Q. (2012a). "S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by upregulating matrix metalloproteinase-13". Acta Biochim Pol 59: 593-598.

Wang Y, Hua S, Tian W, Zhang L, Zhao J, Zhang H, et al. (2012b). "Mitogenic and anti-apoptotic effects of insulin in endometrial cancer are phosphatidylinositol 3-kinase/Akt dependent". Gynecol Oncol 125: 734-741.

Wang YD, De Vos J, Jourdan M, Couderc G, Lu ZY, Rossi JF, et al. (2002). "Cooperation between heparin-binding EGF-like growth factor and interleukin-6 in promoting the growth of human myeloma cells". Oncogene 21: 2584-2592.

Wang Z, Kong D, Banerjee S, Li Y, Adsay NV, Abbruzzese J, et al. (2007). "Down-regulation of platelet-derived growth factor-D inhibits cell growth and angiogenesis through inactivation of Notch-1 and nuclear factor-kappaB signaling". Cancer Res 67: 11377-11385.

Watanabe M, Ishiwata T, Nishigai K, Moriyama Y, Asano G. (2000). "Overexpression of keratinocyte growth factor in cancer cells and enterochromaffin cells in human colorectal cancer". Pathol Int 50: 363-372.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models". Nat Rev Cancer 5: 591-602.

Weisburger JH. (2002). "Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms". Eur J Cancer Prev 11 Suppl 2: S1-7.

Wente MN, Keane MP, Burdick MD, Friess H, Buchler MW, Ceyhan GO, et al. (2006). "Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis". Cancer Lett 241: 221-227.

Werner H, Bruchim I. (2009). "The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene". Arch Physiol Biochem 115: 58-71.

Werner H, Le Roith D. (2000). "New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia". Cell Mol Life Sci 57: 932-942.

West RB, Nuyten DS, Subramanian S, Nielsen TO, Corless CL, Rubin BP, et al. (2005). "Determination of stromal signatures in breast carcinoma". PLoS Biol 3: e187.

Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A. (1997). "I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity". EMBO J 16: 1413-1426.

Wilson J, Balkwill F. (2002). "The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment". Semin Cancer Biol 12: 113-120.

Wiseman BS, Werb Z. (2002). "Stromal effects on mammary gland development and breast cancer". Science 296: 1046-1049.

Wittliff JL. (1984). "Steroid-hormone receptors in breast cancer". Cancer 53: 630-643.

Wolff C, Malinowsky K, Berg D, Schragner K, Schuster T, Walch A, et al. (2011). "Signalling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis". J Pathol 223: 54-63.

Wu X, Huang H, Wang C, Lin S, Huang Y, Wang Y, et al. (2013). "Identification of a novel peptide that blocks basic fibroblast growth factor-mediated cell proliferation". Oncotarget 4: 1819-1828.

Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, et al. (2008). "Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer". Int J Cancer 122: 2050-2056.

Wurtz SO, Moller S, Mouridsen H, Hertel PB, Friis E, Brunner N. (2008a). "Plasma and serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are associated with prognosis in node-negative breast cancer: a prospective study". Mol Cell Proteomics 7: 424-430.

Wurtz SO, Schrohl AS, Mouridsen H, Brunner N. (2008b). "TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer--an update". Acta Oncol 47: 580-590.

Wurtz SO, Schrohl AS, Sorensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H, et al. (2005). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer". Endocr Relat Cancer 12: 215-227.

Xia Y, Frangogiannis NG. (2007). "MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy". Inflamm Allergy Drug Targets 6: 101-107.

Xu L, Fidler IJ. (2000). "Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer". Oncol Res 12: 97-106.

Xue F, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Michels KB. (2011). "Cigarette smoking and the incidence of breast cancer". Arch Intern Med 171: 125-133.

Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, et al. (2003). "Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor". Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 1996-2001.

Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization". Circulation 107: 1322-1328.

Yamayoshi T, Nagayasu T, Matsumoto K, Abo T, Hishikawa Y, Koji T. (2004). "Expression of keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7 and its receptor in human lung cancer: correlation with tumour proliferative activity and patient prognosis". J Pathol 204: 110-118.

Yang ZL, Cheng K, Han ZD. (2012). "Effect of bFGF on the MCF-7 Cell Cycle with CD44(+)/CD24(-): Promoting the G0/G1-->G2/S Transition". J Breast Cancer 15: 388-392.

Yao C, Lin Y, Chua MS, Ye CS, Bi J, Li W, et al. (2007). "Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells". Int J Cancer 121: 1949-1957.

Yao JS, Zhai W, Young WL, Yang GY. (2006). "Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: the role for KDR and MMP-9". Biochem Biophys Res Commun 342: 1396-1404.

Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, et al. (1999). "TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development". J Clin Invest 103: 197-206.

Yokoe T, Iino Y, Morishita Y. (2000). "Trends of IL-6 and IL-8 levels in patients with recurrent breast cancer: preliminary report". Breast Cancer 7: 187-190.

Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, Maemura M, et al. (1997). "Changes of cytokines and thyroid function in patients with recurrent breast cancer". Anticancer Res 17: 695-699.

Yokoyama Y, Mori S, Hamada Y, Hieda M, Kawaguchi N, Shaker M, et al. (2011). "Platelet-derived growth factor regulates breast cancer progression via beta-catenin expression". Pathobiology 78: 253-260.

Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, et al. (2012). "PDGFBB promotes PDGFRalpha-positive cell migration into artificial bone in vivo". Biochem Biophys Res Commun 421: 785-789.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. (1987). "Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines". Proc Natl Acad Sci U S A 84: 9233-9237.

Youngs SJ, Ali SA, Taub DD, Rees RC. (1997). "Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines". Int J Cancer 71: 257-266.

Yun HJ, Jo DY. (2003). "Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells". J Korean Med Sci 18: 679-685.

Zang XP, Pento JT. (2000). "Keratinocyte growth factor-induced motility of breast cancer cells". Clin Exp Metastasis 18: 573-580.

Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. (1998). "Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT". EMBO J 17: 5085-5094.

Zhang F, Lee J, Lu S, Pettaway CA, Dong Z. (2005). "Blockade of transforming growth factor-beta signaling suppresses progression of androgen-independent human prostate cancer in nude mice". Clin Cancer Res 11: 4512-4520.

Zhang G, Li M, Jin J, Bai Y, Yang C. (2011). "Knockdown of S100A4 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma cells by repression of matrix metalloproteinase-9". Asian Pac J Cancer Prev 12: 2075-2080.

Zhang GJ, Adachi I. (1999). "Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma". Anticancer Res 19: 1427-1432.

Zhang Y, Zhao Y, Li L, Shen Y, Cai X, Zhang X, et al. (2013). "The oncoprotein HBXIP upregulates PDGFB via activating transcription factor Sp1 to promote the proliferation of breast cancer cells". Biochem Biophys Res Commun 434: 305-310.

Zhu D, Zha X, Hu M, Tao A, Zhou H, Zhou X, et al. (2012). "High expression of TIMP-1 in human breast cancer tissues is a predictive of resistance to paclitaxel-based chemotherapy". Med Oncol 29: 3207-3215.

Zlotnik A. (2006a). "Chemokines and cancer". Int J Cancer 119: 2026-2029.

—. (2006b). "Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis". Contrib Microbiol 13: 191-199.

Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. (2006). "The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution". Genome Biol 7: 243.

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development". Nature 393: 595-599.