



Universidad de Oviedo

INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA

**“IDENTIFICACIÓN DE FACTORES BIOLÓGICOS
ASOCIADOS CON LA AFECTACIÓN DEL
GANGLIO CENTINELA Y/O LOS GANGLIOS NO
CENTINELA EN EL CÁNCER DE MAMA”**

TESIS DOCTORAL

NANA BERIDZE VAKTANGOVA

JUNIO 2014



Universidad de Oviedo

INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA

**“IDENTIFICACIÓN DE FACTORES BIOLÓGICOS
ASOCIADOS CON LA AFECTACIÓN DEL
GANGLIO CENTINELA Y/O LOS GANGLIOS NO
CENTINELA EN EL CÁNCER DE MAMA”**

TESIS DOCTORAL

NANA BERIDZE VAKTANGOVA

JUNIO 2014



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: "Identificación de factores biológicos asociados con la afectación tumoral del ganglio centinela y/o los ganglios no centinela en el cáncer de mama".	Inglés: "Identification of biological factors associated with tumor involvement of the sentinel and/or non-sentinel nodes in breast cancer".
2.- Autor	
Nombre: Nana Beridze Vaktangova	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

La técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama no está exenta de falsos negativos, con un efecto adverso sobre el tratamiento óptimo de las pacientes. Además, su desarrollo nos plantea nuevos interrogantes, tales como la posibilidad de obviar la práctica de la técnica en aquellos casos de carcinomas de mama en estadio muy precoz o muy baja probabilidad de afectación ganglionar; o como identificar a ese importante porcentaje de mujeres (32-68 %) que presentan afectación de solo el ganglio centinela, en las que podría evitarse también la linfadenectomía axilar y sus efectos adversos. La invasión de los vasos linfáticos peritumorales por las células cancerosas, así como el fenotipo, tanto de las células cancerosas como de las células inflamatorias de los ganglios linfáticos, en cuanto a la expresión de proteínas relacionadas con la invasión y las metástasis, tales como son las MMPs y TIMPs, son factores que pueden contribuir a lograr una óptima precisión de la afectación tumoral ganglionar. Por otra parte, se ha descrito una gran heterogeneidad en las poblaciones de células inflamatorias que ocupan los ganglios linfáticos axilares en el cáncer de mama. Esas células pueden diferir no solo en el tipo sino también en su fenotipo en cuanto a su capacidad defensiva o pro-metastásica.

Los objetivos de este proyecto fueron identificar los factores biológicos asociados con la afectación tumoral del ganglio centinela y/o los ganglios no centinela en el cáncer de mama, mediante la integración de los aspectos morfológicos del sistema linfático regional con aspectos funcionales de las células que pueblan los ganglios linfáticos axilares, y de la agresividad biológica de las células cancerosas.

Para el estudio hemos seleccionado 59 casos de pacientes con carcinoma mamario que se han sometido a la fase de validación de la técnica de la BSGC (biopsia selectiva del ganglio centinela) por cáncer de mama, entre 1992 y 2009, en la Fundación Hospital de Jove de Gijón. Se han estudiado el tipo celular (célula inflamatoria/célula tumoral/fibroblasto) responsable de las distintas



expresiones proteicas en los tumores, tratando de definir los diferentes fenotipos del estroma tumoral. En total realizamos 590 determinaciones, lo que nos permitió encontrar algunos hallazgos nuevos de interés clínico sobre la metastatización axilar en el cáncer de mama.

Nuestros resultados mostraron una relación significativa de la invasión tumoral linfática en la frontera tumoral con una mayor probabilidad de afectación del GC, eso indica que es más importante la capacidad invasiva de las células cancerosas que el número de vasos linfáticos de cara a conseguir el avance tumoral hacia los ganglios centinela en el cáncer de mama. Además, se ha mostrado que la expresión del TIMP1, tanto en las células cancerosas, como por los fibroblastos o las CIMs de la periferia tumoral, se asocia negativamente y de forma significativa con la afectación tumoral del ganglio centinela, lo que sugiere que los TIMPs pueden contribuir en algún modo a proteger de la metastatización ganglionar mediante algún bloqueo enzimático de las MMPs. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la presencia elevada de células de CD68 positivas y CD138 positivas (macrófagos y células dendríticas, respectivamente), se relaciona con una mayor probabilidad de afectación tumoral del ganglio centinela. Asimismo la expresión de MMP1 por las CIMs peritumorales del ganglio centinela se asocia significativamente con la afectación tumoral de los ganglios no centinela.

Los hallazgos más importantes encontrados en este estudio, fueron las relaciones entre la combinación de diferentes factores en la frontera tumoral y la afectación del ganglio centinela y de los ganglios no centinela. Así, como las combinaciones CD68 +/TIMP1-(CT) y CD138+/TIMP1-(CT), analizadas en la frontera tumoral, mostraron ambas una especificidad y valor predictivo negativo del 100% para predecir la afectación del ganglio centinela. Por otra parte, para predecir la afectación de los ganglios no centinela, las combinaciones CD138-/TIMP1- (CT) y CD68-/TIMP1-(CT), analizadas en la frontera tumoral, mostraron ambas una especificidad y un valor predictivo negativo del 100%.

En definitiva, nuestros resultados contribuyen a conocer mejor algunos factores relacionados con la metastatización ganglionar en el cáncer de mama. Consideramos que en base a nuestros datos pueden plantearse futuros estudios de cara a mejorar la predicción de la afectación del ganglio centinela y no centinela en el cáncer de mama.



RESUMEN (en Inglés)

The technique of selective sentinel node biopsy in breast cancer is not free from false negatives, with an adverse effect on the optimal treatment of patients. In addition, its development has raised new questions, such as the possibility of avoiding this technique in those cases of either early stage breast carcinoma or with a very low probability of lymph node involvement, as well as identifying the important percentage of women (32-68 %) showing involvement of a single lymph node, who could be spared of an axillary lymphadenectomy and its potential unwanted effects. Invasion of peritumoral lymphatic vessels by cancer cells, phenotype, both cancer cells and the inflammatory lymph node cells, regarding the expression of related proteins invasion and metastasis, such as MMPs and TIMPs are, are factors that may contribute to optimum accuracy of nodal tumor involvement. Moreover, we have described a large heterogeneity in inflammatory cell populations that occupy the axillary lymph nodes in breast cancer. These cells may differ not only in type but also in their phenotype in their defensive or pro-metastatic capacity.

The objective of the present work is to identify the biological factor associated with the tumor involvement of the sentinel and/or non-sentinel nodes in breast cancer, by integrating the morphological aspects of the regional lymphatic system with the functional aspects of the cells present in the axillary lymph nodes and the biological aggressiveness of tumor cells.

For the study we selected 59 cases of patients with breast carcinoma who have undergone the validation phase of the technique of selective sentinel node biopsy for breast cancer between 1992 and 2009 in the Hospital Foundation Jove of Gijón. We have studied the cell type responsible for the different protein expression in tumors (inflammatory cell / tumor / fibroblast cell), trying to define the different phenotypes of tumor stroma. In total we made 590 determinations, which allowed us to find some new findings of clinical interest on axillary metastasis in breast cancer.

Our results showed a significant relationship of lymphatic tumor invasion in tumor border with a higher probability of sentinel node involvement, indicates that more importantly invasiveness of cancer cells than the number of lymphatic vessels accordingly to achieve tumor progression towards sentinel nodes in breast cancer. Furthermore, it has been shown that expression of TIMP1 in both cancer cells, such as fibroblasts or the MICs of the tumor periphery, negatively and significantly associated with tumor involvement of the sentinel node, suggesting that TIMPs may contribute in some way to protect the nodal metastasis by some MMPs enzymatic block. Moreover, our results showed that the high presence of CD68 positive cells and CD138 positive (macrophages and dendritic cells, respectively), is associated with a higher probability of sentinel node tumor involvement. Also MMP1 expression by peritumoral MICs sentinel node is significantly associated with tumor involvement of non-sentinel lymph.

The most important findings in this study were the relationship between the combination of different factors on the tumor border and the involvement of the sentinel lymph node and non-



sentinel. So, as combinations CD68 + / TIMP1-(CT) and CD138 + / TIMP1-(CT), analyzed in tumor border showed a down both specificity and predictive value of 100% for predicting sentinel node involvement. Moreover, to predict the involvement of non-sentinel lymph, combinations CD138-/TIMP1- (CT) and CD68-/TIMP1- (CT), analyzed in tumor border showed both a specificity and a negative predictive value of 100%.

In short, our results contribute to better understand some related to nodal metastasis in breast cancer factors. We believe that based on our data future studies may arise in order to improve the prediction of sentinel node involvement and no sentinel in breast cancer.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE _____ /
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN _____

A la memoria del Dr. Antonio Martínez Merino, excelente amigo y bellísima persona, que descanse en paz...

AGRADECIMIENTOS

- ✓ Al Dr. Francisco Vizoso Piñeiro, Jefe de la Unidad de Investigación del Hospital de Jove, director de esta tesis, no sólo por ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, sino también por su gran paciencia y animo que me trasmitía en cada una de las fases de la investigación.

- ✓ A la Doctora N. Eiró, por su colaboración, buena disposición y ayuda en la realización de análisis estadísticos de esta tesis doctoral.

- ✓ Al Dr. L. Ovidio González, médico anatomopatologo y miembro de la Unidad de Investigación de Hospital de Jove, por su colaboración en la valoración de preparaciones histológicas realizadas para este estudio.

- ✓ A todos los demás miembros de la unidad de Investigación y servicio de Anatomía patológica de Hospital de Jove, por su colaboración.

- ✓ A mis queridos padres, por su gran apoyo moral para poder llevar al cabo el presente trabajo.

ABREVIATURAS

AT.....	Ataxia –telangiectasia
Cat.....	Catepsina
CM.....	Cáncer de mama
CMI.....	Célula Mononuclear Inflamatoria
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
EGF.....	Factor de crecimiento epidérmico
EGF-R.....	Receptor del EGF
FB.....	Fibroblasto
FGF.....	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF-R.....	Receptor del FGF
FT.....	Frontera tumoral
GC.....	Ganglio centinela
GNC.....	Ganglio no centinela
HGF.....	Factor de crecimiento hepatocítico
IGF-1.....	Factor de crecimiento insulínico
IGF-1-R.....	Receptor del IGF-1
IHQ.....	Inmunohistoquímica
MACs.....	Moléculas de adhesión celular
MMPs.....	Metaloproteasas de matriz extracelular
PAIs.....	Inhibidores de los activadores del plasminógeno
PDGF.....	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGF-R.....	Receptor del PDGF
Pep C.....	Pepsinógeno C
PSA.....	Antígeno prostático específico
RE.....	Receptores de estrógenos
RP.....	Receptores de progesterona
ST.....	Estromalisina

TGF- βFactor de crecimiento transformante
TGF- β -R.....Receptor del TGF- β
THS.....Terapia hormonal sustitutiva
TIMPs.....Inhibidores de las metaloproteasas de matriz extracelular
tPA.....Activador tisular del plasminógeno
uPA.....Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa
VEGF.....Factor de crecimiento vascular epitelial

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Epidemiología del cáncer de mama.....	13
1.2. Etiología de cáncer de mama	17
1.2.1. Factor genético.....	17
1.2.2. Factores hormonales.....	20
1.2.3. Factores relacionados con el estilo de vida.....	22
1.3. Oncogénesis y progresión tumoral.....	26
1.3.1. ONCOGENESIS.....	27
1.3.1.1. C-erbB-2 (Her2/neu).....	27
1.3.1.2. c-myc.....	28
1.3.1.3. Int2.....	28
1.3.1.4. bcl-1.....	28
1.3.1.5. H-ras.....	29
1.3.1.6. bcl-2.....	29
1.3.2. GENES SUPRESORES TUMORALES.....	29
1.3.2.1. p53.....	30
1.3.2.1. Gen de retinoblastoma, Rb.....	30
1.3.2.3. nm23.....	31
1.3.3. FACTORES DE CRECIMIENTO.....	31
1.3.3.1. Receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	32
1.3.3.2. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF).....	32
1.3.3.3. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).....	32
1.3.3.4. El Receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-1).....	32
1.3.3.5. Factor de crecimiento transformante beta.....	33
1.3.3.6. Factor de crecimiento hepatocítico (HGF).....	33
1.3.3.7. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).....	34
1.3.4. MOLECULAS DE ADHESIÓN CELULAR (MAC).....	34
1.3.4.1. Cadherinas.....	35

1.3.4.2. Integrinas.....	35
1.3.4.3. Selectinas.....	36
1.3.4.4. Tenascina.....	36
1.3.4.5. CD44.....	36
1.3.4.6. Sialyl Lewis X.....	36
1.3.4.7. Otras.....	37
1.3.5. ENZIMAS PROTEOLITICOS Y SUS INHIBIDORES.....	37
1.3.5.1. Aspartil-proteasas.....	37
1.3.5.2. Serín-proteasas.....	38
1.3.5.3. Cisteín-proteasas.....	40
1.3.5.4. Metaloproteasas de la matriz extracelular.....	41
1.3.5.4.1. MMP-1.....	43
1.3.5.4.2. MMP-2.....	44
1.3.5.4.3. MMP-7.....	44
1.3.5.4.4. MMP-8.....	44
1.3.5.4.5. MMP-9.....	44
1.3.5.4.6. MMP-11.....	45
1.3.5.4.7. MMP-13.....	45
1.3.5.4.8. MMP-14.....	46
1.3.5.5. Inhibidores de los enzimas proteolíticos.....	46
1.3.5.6. Relevancia clínica de metaloproteasas de matriz y sus inhibidores en Cáncer de mama.....	48
1.4. FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS.....	57
1.4.1. Tamaño tumoral.....	58
1.4.2. Tipo y grado histológico.....	59
1.4.3. Receptores hormonales.....	60
1.4.4. Afectación ganglionar inicial.....	61
1.4.5. Localización de las metástasis.....	62
1.4.6. Localización del tumor.....	63
1.4.7. Edad.....	64
1.4.8. Invasión vascular linfática.....	64

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....66

III. MATERIAL Y METODOS.....69

- 3.1. Aspectos éticos.....70
- 3.2. Pacientes.....70
- 3.3. Elaboración de mallas de tejido y tinción IHQ.....72
- 3.4. Análisis de las tinciones.....74
- 3.5. Método estadístico.....75

IV. RESULTADOS.....76

- 4.1. Tinciones IHQ para los diferentes factores en la periferia tumoral
y en los ganglios axilares.....77
- 4.2. Evaluación de las tinciones IHQ para los diferentes factores.....82
- 4.3. Relación entre la expresión de los diferentes factores en la FT y la
afectación neoplásica del GC.....85
- 4.4. Relación entre la expresión de los diferentes factores en la FT y la
afectación de los GNC en el.....87
- 4.5. Relación entre la expresión de los diferentes factores en el GC con
afectación neoplásica y la afectación de los GNC.....89
- 4.6 Análisis de la concordancia entre la expresión de los distintos
factores en la FT y en el GC.....91
- 4.7. Análisis de concordancia de la expresión de los distintos factores
en el GC y los GNC.....98
- 4.8. Análisis de las combinaciones de diferentes factores en la FT
que pueden predecir la afectación tumoral de los GC.....103
- 4.9. Análisis de las combinaciones de expresión de los distintos
factores en la FT que pueden predecir la afectación tumoral de GNC.....114
- 4.10. Análisis de combinaciones de distintos factores en el GC con
afectación neoplásica que pueden predecir la afectación de los GNC.....123
- 4.11. Análisis de combinaciones de distintos factores en la FT y en el GC
neoplásico que pueden predecir la afectación de los GNC.....125

V. DISCUSIÓN.....127

VI. CONCLUSIONES.....	137
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	140

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE MAMA

El cáncer de mama es la causa más común de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo, representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519. 000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo².

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos¹. La bajas tasas de supervivencia observadas en los países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, que hace que un alto porcentaje de mujeres acudan al médico con la enfermedad ya muy avanzada, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento.

La incidencia más elevada, con tasas normalizadas por edad de hasta 99,4 por 100. 000 está en América del Norte. América del Sur, Europa oriental, África austral y Asia occidental, presentan incidencias moderadas, pero en aumento. La incidencia más baja se da en la mayoría de los países africanos, pero también en ellos se observa un incremento de la incidencia de cáncer de mama.

Según la Organización Mundial de Salud (OMS) es el cáncer más frecuente en las mujeres, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. La incidencia de cáncer de mama está aumentando en el mundo en desarrollo debido a la mayor esperanza de vida, el aumento de la urbanización y la adopción de modos de vida occidentales. En la figura 1.1.1 se presenta el incremento de la mortalidad por el de cáncer de mama, en la población femenina, para el año 2012, y otros 3 tipos de canceres más relevantes, comparando con los datos del año 2006²¹⁹.

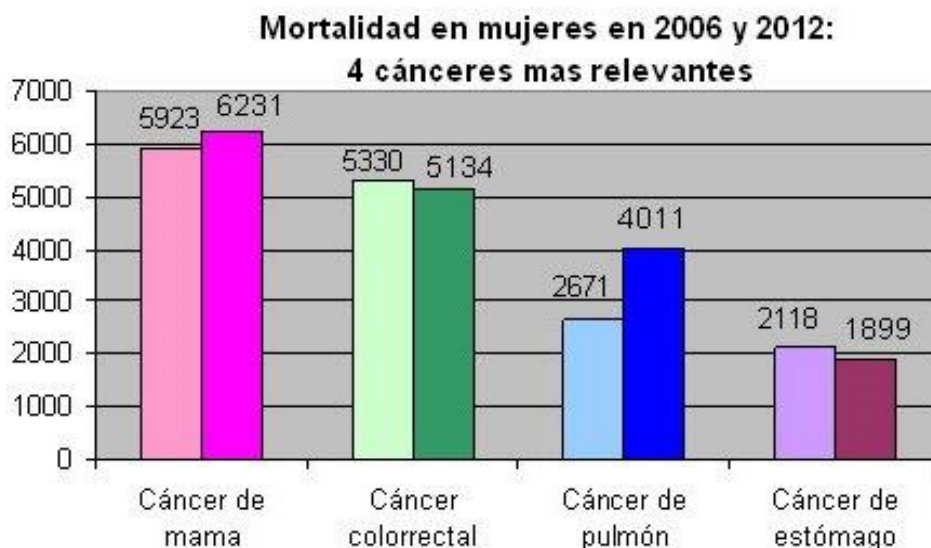


Figura 1.1.1. Estimación de la mortalidad de los 4 cánceres más relevantes en mujeres para los años 2006 y 2012²¹⁹.

El Internacional Agency for Research on Cáncer, ha creado un proyecto de estimación de la incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer, GLOBACAN.

El proyecto GLOBOCAN tiene como objetivo proporcionar estimaciones contemporáneas de la incidencia, prevalencia y años de vida ajustados a discapacidad de los principales cánceres, a nivel nacional, de 184 países del mundo.

Según los datos de Globocan, la estimación de la incidencia de cáncer de mama para la población femenina en España, para el año 2012 (tasa por 100.000 habitantes), fue 25. 215 y de la mortalidad 6075 (Figura 1.1.2).

Comparando con otros tipos de canceres, la incidencia de cáncer de mama en España para la población femenina, está en el puesto número uno, seguido por cáncer colorrectal, útero y pulmón en la incidencia; y en la mortalidad también ocupa el primer lugar seguido por el cáncer colorrectal, pulmón, páncreas y estómago, respectivamente.

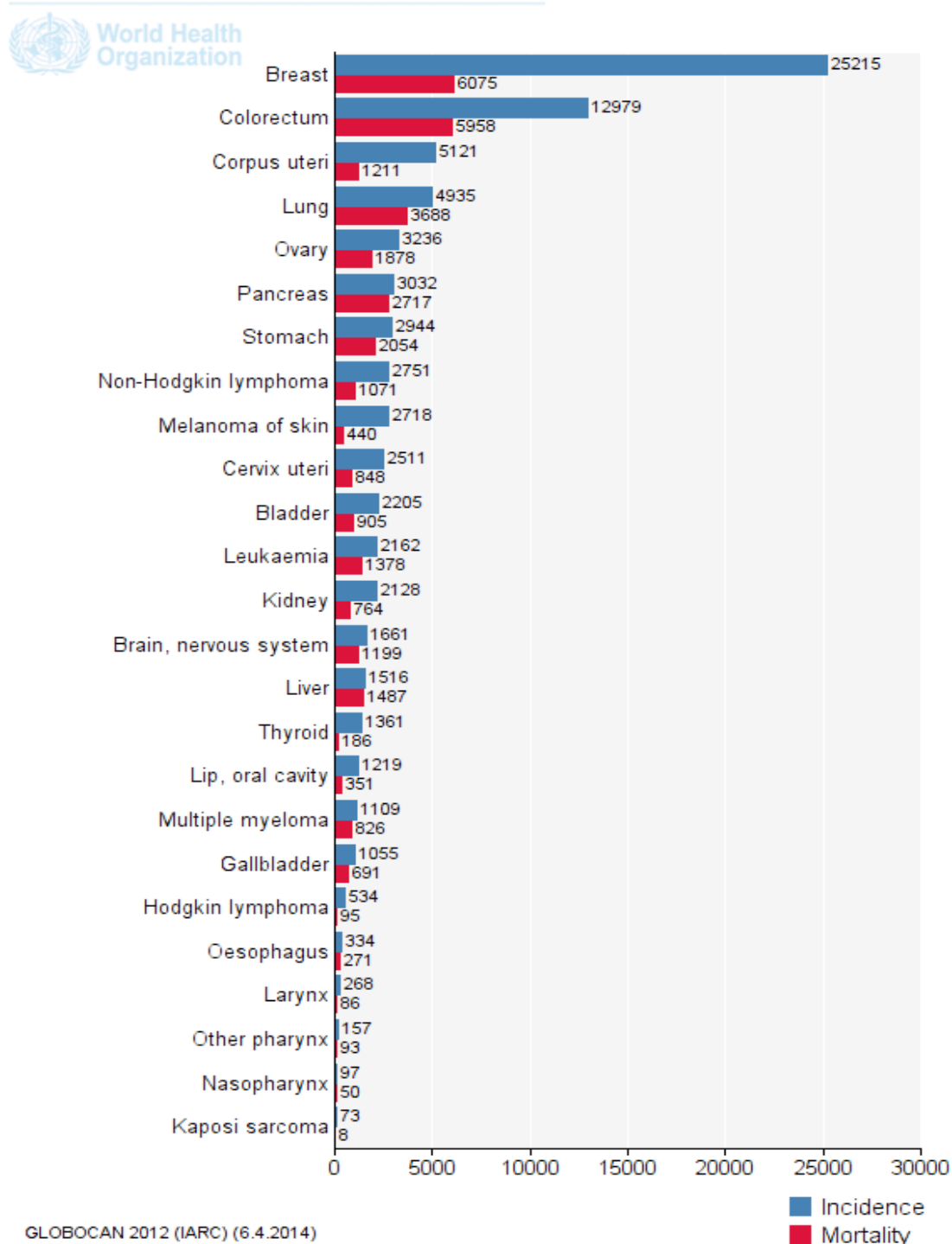
International Agency for Research on Cancer **Spain: Female, all ages**

Figura 1.1.2. Estimación de la incidencia para la población femenina en España, por el tipo de cáncer, para el año 2012 (tasa por 100.000 habitantes) (GLOBOCAN 2012, IARC).

En el año 2015, se estima que la incidencia de cáncer de mama será 26 282. Es decir, aproximadamente 1067 casos nuevos. El incremento va a ser con un predominio para la población ≥ 65 años (Figura 1.1.3).

GLOBOCAN 2012

Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide



Spain Breast Year	Estimated number of new cancers (all ages)	Male	Female	Both sexes
2012		-	25215	-
	ages < 65	-	15625	-
	ages >= 65	-	9590	-
2015		-	26282	-
	ages < 65	-	16092	-
	ages >= 65	-	10190	-
	Demographic change	-	1067	-
	ages < 65	-	467	-
	ages >= 65	-	600	-

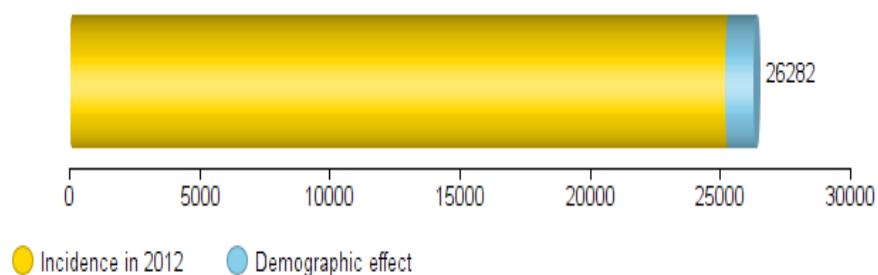
International Agency for Research on Cancer

Spain



Breast

Number of new cancers in 2015 (all ages)



GLOBOCAN 2012 (IARC) (6.4.2014)

Figura 1.1.3. Estimación de la incidencia de cáncer de mama en España para el año 2015 (GLOBOCAN 2012, IARC).

1.2. ETIOLOGIA DE CANCER DE MAMA

El riesgo de padecer esta enfermedad no es homogéneo entre la población en general, mientras algunas mujeres nunca desarrollarán el cáncer de mama otras parecen tener un mayor riesgo de padecerlo. Se conocen bien varios factores de riesgo del cáncer de mama. Sin embargo, en la mayoría de las mujeres afectadas no es posible identificar factores de riesgo específicos³.

1.2.1. FACTOR GENETICO

El cáncer de mama hereditario representa aproximadamente un 10% del total de los carcinomas de mama. Éste engloba el síndrome de cáncer de mama y ovario, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Cowden y la ataxia telangiectasia (AT)⁴.

Los genes más comúnmente asociados a este tipo de síndromes son las alteraciones de BRCA1 y BRCA2, las mutaciones germinales de p53, las del gen ATM y PTEN, además de múltiples polimorfismos.

Aproximadamente entre el 20 y el 30% de las mujeres con diagnóstico de cáncer de mama tiene al menos un familiar con la enfermedad, sin embargo sólo un 5 a 10% puede ser atribuible a mutación de los genes BRCA1 y BRCA 2^{437, 438}.

En 1990, mediante estudios de vínculos de ADN en familias, se identificaron los primeros genes asociados con el cáncer de mama⁴³⁹. Los científicos denominaron a estos genes “Breast Cáncer 1” o BRCA1, localizado en el cromosoma 17 y “Breast Cáncer 2” o BRCA2, localizado en el cromosoma 13. Las mutaciones en ambos genes se transmiten en familias con un patrón autosómico dominante.

En estado nativo BRCA1 es una proteína nuclear cuya expresión es frecuente en tejidos con respuesta hormonal como es el caso de ovario, timo, testículo y mama. La proteína BRCA1 inhibe la progresión del ciclo celular inhibiendo la quinasa dependiente de ciclinas p21waf1 e interaccionando con BRCA2, c-Myc, g-tubulina y la RNA helicasa A.

Se han descrito más de 500 mutaciones diferentes del gen BRCA1 que en un

80% de los casos suponen la aparición de un codón de parada, lo que da lugar a una proteína de menor tamaño, no funcional⁴⁴¹.

En el caso de BRCA2 también se han encontrado multitud de mutaciones y el 90% de éstas dan lugar a una proteína de menor peso molecular, al igual que ocurría con BRCA1. Las mutaciones de BRCA2 se encuentran con frecuencia asociadas con mutaciones somáticas de p53, mientras que no suelen coexistir con la sobreexpresión de la proteína HER-2.

Respecto a las mutaciones, existen variaciones raciales en los genes BRCA1 y BRCA2. Un ejemplo de esto son las familias de ascendencia Judía Asquenazí del centro o este de Europa⁴⁴⁰. Se ha visto que en este grupo la frecuencia de mutaciones se da en una relación de 1:40 de la población, comparado con 1:800 para la población occidental general⁵. Por otro lado, un estudio británico evaluó a mujeres con diagnóstico de cáncer de mama menores de 45 años sin antecedentes familiares, encontrando que un 5% de eran portadoras de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2⁶, este porcentaje es del 20% para descendientes de Judías Asquenazís.⁷ Lo que indica que hay un grupo de pacientes genéticamente susceptibles de padecer cáncer de mama.

Una vez identificadas, las portadoras de mutaciones genéticas BRCA deben someterse a una vigilancia de cáncer de mama más intensiva. Los familiares en primer grado de portadoras a las que aún no se les hayan realizado pruebas, también deben someterse a una mayor vigilancia hasta que todos sus exámenes se completen. En esta población de mujeres se recomienda, además de mamografía anual, un examen clínico de mama dos veces al año, una Resonancia Magnética y autoexamen de mama mensual, comenzando a la edad de 25 años. Además, basándose en la estimación de riesgo con modelos que utilizan familiares en primero y segundo grados de las ramas paterna y materna, las mujeres con un riesgo de cáncer de mama de 20% o más, requieren una vigilancia de cáncer de mama más intensiva⁸.

Aproximadamente el 50% de las mutaciones germinales de p53 se asocian con el síndrome de Li-Fraumeni. Se trata de un extraño tipo de alteración de carácter autosómico dominante caracterizada por el desarrollo de multitud de masas tumorales a muy temprana edad. Éstas suelen ubicarse en hueso, mama y cerebro, además de dar lugar a leucemias y carcinomas adrenocorticales. Sin

embargo, menos del 1% de los tumores de mama presentan mutaciones germinales de p53⁴⁴².

En el gen ATM, localizado en 11q22-23, se han encontrado más de 300 mutaciones distribuidas a lo largo de sus 150 kb y 66 exones. Aproximadamente el 85% de éstas dan lugar a una proteína truncada y defectiva. La proteína ATM es un miembro de la familia de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K). Su función es detectar los daños existentes en el DNA y activar los mecanismos de control del ciclo celular⁴⁴³.

La ataxia telangiectasia es el síndrome hereditario, asociado a la mutación de ATM. Es de carácter autosómico recesivo en el que los heterocigotos para ATM manifiestan neurodegeneración, inmunodeficiencias, sensibilidad a la radiación ionizante, alteraciones de la regulación del ciclo celular y predisposición a determinados tipos de cáncer. Esta predisposición da lugar al desarrollo de linfomas primarios, leucemias y en menor medida a la aparición de tumores sólidos. Se relaciona con un incremento de riesgo de desarrollar Cáncer de mama del 8%⁴⁴⁴.

PTEN/MMMAC1/TEP1 es un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 10(10q23.3). Este gen codifica para una proteína con actividad fosfatasa que actúa tanto sobre el propio fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3) como sobre sus sustratos proteicos. Las mutaciones identificadas en este gen pueden ser homocigóticas o heterocigóticas, siendo éstas últimas frecuentes en pacientes con cáncer de mama bilateral.

Las alteraciones germinales del gen dan lugar al síndrome de Cowden, de carácter autosómico dominante, al que se asocian multitud de cánceres como los de mama, tiroides y cerebro, además de otras lesiones benignas. Este síndrome también lleva implícito una alteración del desarrollo denominado síndrome Bannayan-Zonana.

Entre un 30-50% de las mujeres que poseen la mutación en la línea germinal desarrollan cáncer de mama. Estas alteraciones no se correlacionan con el cáncer de mama esporádico ni tampoco se presentan en tumores de mama de tipo familiar generados por otras mutaciones germinales como son las de BRCA1, BRCA2, p53 o ATM⁴⁴⁵.

1.2.2. FACTORES HORMONALES.

Diversos estudios han demostrado que la estimulación de crecimiento celular, por parte de los estrógenos, lo cual favorece la aparición de errores genéticos, ha sido asociada con un aumento del riesgo de cáncer de mama. Ello puede ocurrir asociado con diversas situaciones tales como la aparición temprana de la menstruación, el comienzo tardío de la menopausia, el primer embarazo a una edad mayor, nuliparidad o la administración de hormonas exógenas.

El embarazo y la lactancia reducen ambos el número de ciclos menstruales en la vida de la mujer y, por lo mismo, reducen su exposición a las hormonas endógenas⁹ que pudiera haberse acumulado. Asimismo, el embarazo y la lactancia tienen un efecto directo en las células epiteliales mamarias, lo que causa que se diferencien o maduren para poder producir leche. Algunos investigadores ofrecen la hipótesis de que dichas células diferenciadas son más resistentes a convertirse en células cancerosas que las células que no presentan diferenciación^{10, 11}.

Algunos factores relacionados con el embarazo han sido asociados con un riesgo menor de padecer cáncer de mama más tarde en la vida:

- ✓ Primer embarazo completo a temprana edad: Las mujeres que tuvieron su primer embarazo completo a temprana edad corren menos riesgo de presentar cáncer de mama más tarde en sus vidas. Por ejemplo, las mujeres que tuvieron su primer embarazo completo antes de los 20 años de edad presentan cerca de la mitad del riesgo que las mujeres cuyo primer embarazo completo ocurrió después de los 30 años de edad¹².
- ✓ Número mayor de hijos: El riesgo de cáncer de mama disminuye con el número de hijos nacidos. Las mujeres que han tenido cinco o más embarazos a término presentan la mitad del riesgo que las mujeres que nunca los tuvieron¹⁵.
- ✓ Antecedentes de preeclampsia: Es posible que las mujeres que han padecido pre eclampsia tienen un riesgo menor de cáncer de mama^{16, 17, 18}. La preeclampsia es una complicación en el embarazo en la cual la mujer presenta presión arterial alta y cantidades

excesivas de proteína en la orina. Los científicos están estudiando si ciertas hormonas o proteínas asociadas con la preeclampsia pueden afectar el riesgo de cáncer de mama^{16, 19,20}.

- ✓ Lactancia de duración prolongada: La lactancia por un período prolongado (al menos por un año) está asociada con una reducción del riesgo del cáncer de mama con y sin receptor hormonal^{14, 21}.

Los factores relacionados con el embarazo que pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama son los siguientes:

- ✓ Haber tenido un embarazo a término por primera vez a mayor edad: Cuanta más edad presenta la mujer al tener su primer embarazo completo, mayor será su riesgo de cáncer de mama. Las mujeres que han tenido embarazo a término por primera vez después de los 30 años de edad presentan un riesgo mayor que las mujeres que nunca lo tuvieron²².
- ✓ Haber tomado Dietilestilbestrol (DES) durante el embarazo: Las mujeres que tomaron DES durante el embarazo corren un riesgo ligeramente más alto de cáncer de seno que las mujeres que no tomaron dicho fármaco²⁴. Asimismo, es posible que las hijas de las mujeres que tomaron DES durante el embarazo presenten un ligero aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama después de los 40 años de edad en comparación con quienes nunca estuvieron expuestas al DES en el útero de la madre²⁵. El DES es una forma sintética de estrógeno que se usó desde principios de los años cuarenta hasta 1971 para prevenir el aborto espontáneo y otros problemas de embarazo.

Un análisis de 1996 de datos epidemiológicos de más de 50 estudios en el mundo llevado a cabo por el “Grupo Colaborativo sobre Factores Hormonales en el Cáncer de mama” encontró que las mujeres que usaban o habían usado recientemente anticonceptivos orales para el control de la natalidad tuvieron un riesgo ligeramente más alto de padecer cáncer de mama que las mujeres que nunca habían usado los anticonceptivos orales²⁶. El riesgo fue más alto entre las mujeres

que empezaron a usar anticonceptivos orales cuando eran adolescentes. Sin embargo, 10 años o más después de haber dejado de tomar la píldora, su riesgo de padecer cáncer de mama regresó al mismo grado, como si jamás hubiesen usado los anticonceptivos orales.

Se ha sugerido que la terapia hormonal sustitutiva (THS), puede aumentar ciertos tipos de cáncer, especialmente el de mama, aunque también tienen efecto protector frente a la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares. Un metaanálisis ha analizado los datos de la terapia hormonal sustitutiva en siete condiciones distintas de cuatro estudios randomizados: uno con tratamiento sólo con estrógenos y los otros de terapia combinada con estrógenos y progestágenos. Los cuatro estudios incluían un total de 20.000 mujeres controladas durante más de cinco años.

El resultado del análisis mostró que las mujeres bajo THS presentaban un riesgo relativo mayor de cáncer de mama, embolismo pulmonar e ictus, comparadas con las mujeres del grupo placebo. En mujeres sanas mayores de cincuenta años podría ser causa de una de estas enfermedades en 6/1000 mujeres, y en mujeres mayores de 60 años se elevaría hasta 6,5/1000. Pese a esto, también se vio que la THS tiene un efecto protector frente al cáncer de colon y la fractura de cadera, reduciendo la incidencia en 1,7/1000. No existían diferencias significativas en el riesgo de cáncer endometrial o enfermedad coronaria, y no se disponen de datos suficientes para valorar la relación entre la THS y la aparición de enfermedades poco comunes, como el cáncer de ovario²⁷.

1.2.3. FACTORES RELACIONADOS CON ESTILO DE VIDA

Más de 100 estudios epidemiológicos han considerado la asociación entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de mama en las mujeres. Estos estudios han encontrado invariablemente un riesgo mayor de cáncer de mama asociado con un consumo mayor de alcohol. Un metaanálisis de 53 de estos estudios (que incluyeron a un total de 58.000 mujeres con cáncer de mama) indicó que las mujeres que bebieron más de 45 gramos de alcohol diarios tuvieron 1,5 veces el

riesgo de padecer cáncer de mama que quienes no lo hicieron²⁸. El riesgo de cáncer de mama fue mayor en todos los niveles de consumo de alcohol: por cada 10 gramos de alcohol consumido al día, los investigadores observaron un pequeño (7%) aumento en el riesgo del cáncer de mama.

Un estudio en el Reino Unido (el cual incluyó a más de 28.000 mujeres con cáncer de mama) proporcionó un cálculo más reciente, y ligeramente más alto, del riesgo de cáncer de mama en niveles bajos y moderados de consumo de alcohol: cada 10 gramos de alcohol consumidos en un día estuvieron asociados a un aumento de 12% en el riesgo de cáncer de mama²⁹.

Las aminas heterocíclicas (AHC) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son sustancias químicas que se forman al cocinar carne de músculo, ya sea carne de res, de cerdo, de pescado o de aves, y al usar métodos de cocción a altas temperaturas, como freír en sartén o asar a la parrilla a fuego directo³⁰. En experimentos de laboratorio, se ha descubierto que las AHC y los HAP son mutagénicos, es decir, causan cambios en el ADN que pueden aumentar el riesgo de cáncer. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se pueden formar también durante otros procesos de preparación de alimentos, como al ahumar la carne³⁰. Las AHC no se encuentran en cantidades considerables en otros alimentos que no sean las carnes cocinadas a altas temperaturas.

Múltiples estudios demostraron que las mujeres obesas poseen un riesgo mayor de padecer cáncer de mama después de la menopausia, en comparación con aquellas mujeres no obesas. Esto parece tener su explicación en los altos niveles de estrógenos circulantes en las mujeres obesas. En las mujeres obesas posmenopáusicas los niveles de estrógenos son un 50-100% más elevados que entre las mujeres con normopeso³⁹. No hay que olvidar que antes de la menopausia, los ovarios son la fuente principal de estrógenos, aunque también lo es el tejido adiposo. Después de la menopausia, los ovarios dejan de producir estrógenos, por lo que el tejido adiposo se convierte en la principal fuente de esa hormona. Así pues, aquellos tejidos que, como el parénquima mamario, son muy sensibles a los estrógenos, quedan expuestos a un mayor estímulo entre las mujeres obesas⁴⁰. Esta circunstancia conlleva un riesgo mayor de desarrollar una

neoplasia y, en su caso, a un crecimiento más rápido de los tumores hormono-dependientes, fundamentalmente de los estrógenos⁴¹.

Hay múltiples estudios que relacionan la exposición al tabaco con el cáncer de mama. Uno de los estudios, prospectivo de cohortes, evaluó la relación entre el grado de la exposición y el riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres entre 50 y 79 años de edad, con un seguimiento de más de 10 años⁴².

Las ex fumadoras presentaron un riesgo de cáncer de mama 9% superior al de las no fumadoras, mientras que en las fumadoras este aumento fue del 16%. La magnitud del efecto es pequeña, pero dada la elevada prevalencia de tabaquismo entre las mujeres jóvenes el riesgo atribuible es muy importante. Aquellas fumadoras de mayor número de cigarrillos y más tiempo de evolución del tabaquismo, así como las que se iniciaron en la adolescencia, presentaron un riesgo de cáncer de mama significativamente superior.

Entre las no fumadoras, aquellas con mayor exposición al tabaquismo pasivo (al menos 10 años de exposición en la infancia, al menos 20 años en la edad adulta en casa y al menos 10 años en la edad adulta al trabajo) presentaban un riesgo 32% mayor respecto a las que nunca habían sido fumadoras pasivas. En otros grupos de no fumadores no se observó una asociación significativa.

Muchos estudios coinciden en relacionar la mayor incidencia de cáncer de mama con el consumo de grasa, azúcar refinada, dietas ricas en proteínas que promueven un desarrollo sexual precoz, observado en la dieta de los países occidentales que condicionan a un aumento de la producción de estrógenos y prolactina hipofisiaria⁴³.

Existe una evidencia consistente, a partir de los estudios observacionales, de que la actividad física se relaciona con la reducción de la mortalidad por cáncer de mama y de colon⁴⁴. El grado de evidencia científica sobre el efecto protector de la actividad física es diferente dependiendo del tipo de cáncer. Los cánceres que más susceptibilidad presentan a la actividad física, y por tanto, más se pueden prevenir siguiendo un estilo de vida más activo son los de colon, próstata, mama y endometrio.

Los mecanismos biológicos que explicarían el efecto protector del ejercicio físico en relación al cáncer de mama, han sido organizados en varios grupos o categorías, pudiendo ser resumidos en cuatro: Disminución del nivel de hormonas sexuales, disminución de la adiposidad, incrementos en la función inmune y cambios en los marcadores de resistencia a la insulina^{44, 45-49}.

En 2007, la “International Agency for Research on Cancer” (IARC), consideró el trabajo nocturno como probable cancerígeno. Esta conclusión se basó en suficiente evidencia de estudios en animales de experimentación y en evidencia limitada en humanos. Cabe como posible hipótesis el hecho de que la exposición a la luz artificial nocturna produzca una disrupción del ritmo circadiano y como consecuencia una disminución en la síntesis de la hormona melatonina que juega un papel importante en la carcinogénesis⁵².

Muchas funciones fisiológicas, tales como la temperatura, la secreción hormonal, la alternancia sueño-vigilia y el estado de alerta se incrementan y decrecen en ciclos de aproximadamente 24 horas (ritmo circadiano). Los factores ambientales, llamados sincronizadores o Zeitgbers ayudan a regular los ritmos circadianos en ciclos de 24 horas (día-noche). De estos factores (temperatura externa, presión atmosférica, etc.) la luz es el más poderoso sincronizador ⁵³.

La melatonina (N-Acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona principalmente secretada durante la noche por la glándula pineal. El nivel pico máximo de secreción de melatonina ocurre durante el sueño a mitad de la noche (entre las 00:00 h y las 03.00 h). Los factores que modulan su secreción son de 2 tipos: ambientales (fotoperiodo, temperatura, estación del año) y endógenos (la edad, a partir de los 30 años se produce una disminución de su síntesis en los humanos; y el estrés). Se ha demostrado que la melatonina está involucrada en la regulación de los ritmos circadianos, del sueño, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, afecciones psiquiátricas como el Desorden Afectivo Estacional (SAD). Se le atribuye una acción antineoplásica a través de los siguientes mecanismos: antioxidante, antimitótico y antiangiogénico. Puede actuar como un agente modulador del sistema inmunológico y alterar el metabolismo lipídico. Interviene en la regulación del crecimiento tumoral actuando a través de genes

supresores de tumor y a nivel del cáncer mamario actúa bloqueando los receptores estrogénicos ER alfa e inhibiendo la aromatasa disminuyendo el estímulo estrogénico^{53,54}.

Recientemente en Dinamarca, primer país que considera el cáncer de mama como enfermedad profesional, han recibido indemnizaciones mujeres que habían desarrollado cáncer de mama y habían trabajado en turnos nocturnos durante al menos 20 años y tenían, por lo demás, bajo riesgo de cáncer⁵⁵.

1.3. ONCOGENESIS Y PROGRESION TUMORAL

Para que una célula normal se transforme en una célula cancerosa, se deben alterar los genes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular⁵⁰. Estos cambios genéticos pueden ocurrir en múltiples niveles, desde la pérdida o ganancia de cromosomas completos, a una mutación puntual que afecta un único nucleótido en el ADN.

Los tumores malignos poseen siguientes propiedades biológicas⁵¹:

- ✓ Adquisición de autosuficiencia en cuanto a señales de crecimiento, conduciendo a un crecimiento descontrolado.
- ✓ Pérdida de sensibilidad a factores reguladores de crecimiento, conduciendo también a un crecimiento descontrolado.
- ✓ Pérdida de la capacidad de entrar en apoptosis, pudiendo de esta forma crecer a pesar de daños en el material genético y de señales anti crecimiento externas.
- ✓ Pérdida de la capacidad de senescencia (envejecimiento), conduciendo esto a un potencial replicativo sin límites (literalmente a la inmortalidad).

- ✓ Adquisición de una capacidad sostenida de angiogénesis, permitiéndole al tumor crecer más allá de las limitaciones impuestas por la difusión pasiva de nutrientes.
- ✓ Adquisición de la capacidad de invadir los tejidos vecinos.
- ✓ Adquisición de la capacidad de producir metástasis en sitios distantes, una propiedad clásica de los tumores malignos.
- ✓ Pérdida en la capacidad de reparación de errores genéticos, conduciendo esto a una tasa de mutaciones aumentada (lo que se conoce como inestabilidad genómica), consiguiendo de este modo acelerar la aparición de los restantes cambios⁵¹.

En este proceso están implicados todos aquellos genes cuya activación/desactivación conlleve a un aumento en la proliferación celular, altere el control de ciclo celular, interfiera en la diferenciación celular, o están involucrados en la muerte celular programada o apoptosis. A esto habría que añadir las alteraciones oncogénicas heredadas por línea germinal y aquellos genes implicados en el mecanismo de reparación celular⁴⁴⁶.

1.3.1. ONCOGENES

Un oncogén es gen anormal o activado que procede de la mutación de un alelo de un gen normal llamado protooncogén⁵⁶. Los oncogenes son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer. En el hombre se han identificado y secuenciado más de 60 oncogenes en los diferentes cromosomas del genoma, formando un conjunto muy heterogéneo de genes.

1.3.1.1. C-erbB-2 (Her 2/neu): Uno de los marcadores moleculares tanto predictivo como pronóstico lo constituye la amplificación del proto-oncogén c-erbB-2 (Her 2 /neu) ⁵⁷, (“Human epidermal growth factor receptor-2”). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 17 región q21 y codifica una proteína de 185 Kd, la cual tiene actividad de tirosina quinasa.

La asociación entre amplificación del gen c-erbB-2 y cáncer de mama se relacionó por primera vez en 1987, por Slamon y col⁵⁸, cuyos resultados mostraron que la amplificación de este gen se relacionaba con el tiempo de recaída y sobrevida libre de enfermedad.

En células normales, se expresan dos copias del gen Her2/neu, mientras que en las células tumorales se produce una amplificación del gen, con aumento del número de copias, aumento en la transcripción del RNA mensajero y aumento en la codificación de proteínas.

El oncogen Her2/neu está amplificado y/o sobreexpresado en aproximadamente un 30% de los casos. El conocimiento de la positividad del mismo tiene un importante valor pronóstico asociándose a una mayor agresividad de la enfermedad. Así mismo, dicho gen puede ser un marcador predictivo de respuesta a determinados tratamientos como el trastuzumab (Herceptin®) ⁶³⁻⁶⁸. La sobreexpresión del Her2/neu se asocia con cánceres de mama de crecimiento más rápido y con mayor probabilidad de recaídas postratamiento⁵⁹⁻⁶².

1.3.1.2. c-myc: El oncogén c-Myc se encuentra expresado en altos niveles en diversas neoplasias como las de mama, próstata, pulmón, colon y linfomas, y en la mayoría se asocia con mal pronóstico de la enfermedad^{69, 70, 71}.

En numerosos estudios con estas técnicas han hallado niveles altos de amplificación de c-Myc en tumores primarios de mama. Se considera que la amplificación de este gen se relaciona con tumores más agresivos y de mal pronóstico⁷².

1.3.1.3. Int2: El gen int-2 aparece amplificado hasta en un 19% de los carcinomas de mama y esta amplificación se correlaciona con la existencia de recidivas locales, en las pacientes de edad superior a 50 años y la presencia de metástasis ganglionares axilares⁷³.

1.3.1.4. bcl-1: Es un miembro de genes de familia de ciclina. La amplificación de la región del cromosoma que contiene bcl -1 se produce con frecuencia en el cáncer de mama, cáncer de células escamosas, y otros tipos de tumores. La

amplificación en la expresión alterada del gen bcl -1 contribuye a la carcinogénesis⁷⁴.

1.3.1.5. H-ras: Subfamilia de proteínas Ras, que incluyen H-Ras, N-Ras y K-Ras, son moléculas de señalización centrales que activan las redes de señalización corriente abajo críticos para los procesos celulares que incluyen la supervivencia celular, la proliferación, la motilidad y la organización del citoesqueleto⁷⁵. El aumento de expresión y / o la activación de H-Ras se asocian a menudo con la agresividad del tumor en el cáncer de mama. La H-Ras y N-Ras inducen la proliferación celular y la transformación fenotípica⁷⁶.

1.3.1.6. bcl-2: El gen Bcl-2 forma parte de una amplia familia en la que se incluyen otros genes cuyo denominador común es el control de la apoptosis. Un campo de investigación abierto es el valor de la expresión de bcl-2 como factor predictivo de respuesta hormonal y quimioterápica, así como su relación e interacciones con estos agentes terapéuticos que frenan el estímulo hormonal y/o inducen apoptosis, como el Tamoxifeno⁴⁴⁸; esto permitiría una mejor aproximación terapéutica y monitorización de estas pacientes.

La inducción de Bcl-2 tras la terapia con Tamoxifeno, puede ser un indicador de la sensibilidad a las hormonas del tumor y un indicador de buena respuesta al tratamiento⁴⁴⁷. Al contrario de lo que se podría esperar, niveles altos de expresión de Bcl-2 identifican a un fenotipo relativamente indolente de carcinomas de mama positivos para receptores estrogénicos que muestran una mejor supervivencia y puede ser considerada como predictiva de respuesta a esta terapia hormonal⁴⁴⁹.

1.3.2. GENES SUPRESORES TUMORALES

Un gen supresor tumoral es un gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena⁷⁷. Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales y generalmente inhiben la proliferación celular excesiva.

1.3.2.1. *p53*: El gen *p53* o *tp53*, también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica un factor de transcripción nuclear de 43.7 KDa. Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. El gen *p53* es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular. Un *p53* defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer (alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en *p53*)⁷⁸.

La capacidad de *p53* de activar la apoptosis en presencia de daño del ADN tiene importantes implicaciones terapéuticas. Las dos principales modalidades actuales de tratamiento terapéutico del cáncer (irradiación y quimioterapia) se basan en generar daños en el ADN que activen la entrada en apoptosis de las células tumorales. Los tumores que retienen *p53* responderían a este tipo de tratamientos, mientras que tumores que presenten alelos mutados de *p53* serán relativamente resistentes, dado que tendrán problemas para activar la entrada en apoptosis⁷⁸. Ya que *p53* está implicada en la inducción de la apoptosis en células que han sufrido una lesión irreparable del ADN, la pérdida de la función de esta proteína permite la supervivencia de las células con ADN alterado, lo que da lugar a una posible propagación de mutaciones oncogénicas. El 25% de los casos de cáncer de mama presenta mutaciones en *tp53*. Su mutación se relaciona con mayor tamaño tumoral, afectación ganglionar, índice mitótico elevado⁴⁵⁰, así como a una mayor recurrencia local⁴⁵¹ y una menor supervivencia en este grupo de pacientes.

1.3.2.2. Gen del retinoblastoma, *Rb*: *Rb* (también denominada *pRb*) es la proteína del retinoblastoma, una proteína supresora de tumores que se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, el melanoma, el cáncer de próstata o el cáncer de mama, entre otros⁷⁹. Originalmente se detectó esta alteración en cáncer de retina, de donde deriva su nombre. Una de las funciones principales de *pRb* es la inhibición de la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que está preparada para ello y se dan las condiciones adecuadas: *pRb* impide, por tanto, la proliferación celular. Por ello, la inactivación de *pRb* puede suponer la

aparición de un cáncer, ya que con ello se elimina un importante freno a la proliferación celular. La pRb realiza el control de la diferenciación celular durante la embriogénesis y en tejidos adultos, la regulación de la muerte celular por apoptosis, mantenimiento de las células en un estado permanente de parada en el ciclo y preservación de la estabilidad cromosómica⁸⁰. En la actualidad, pRb se considera como un co-regulador de la transcripción, que puede unirse a muchos factores de transcripción y potenciar o antagonizar la acción de éstos.

1.3.2.3. nm23: El gen nm23 fue identificado por primera vez por selección diferencial de las líneas celulares de melanoma derivadas de ratón de potencial metastásico de alta y baja.

Se han aislado dos homólogos humanos del gen nm23: nm23-H1 y nm23-H2. nm23-H1 y nm23-H2 son los genes supresores de metástasis-implicados en el control del proceso metastásico de las células malignas⁸¹.

En el cáncer de mama, se ha demostrado una asociación significativa entre la expresión reducida nm23, en los niveles de ARN o de proteína, y el comportamiento agresivo del tumor. Células tumorales nm23 negativos se han observado en el carcinoma ductal comedo en lesiones "in situ", lo que indica que la disminución en la expresión de nm23 comienza antes de la invasión de identificación histológicamente real⁸².

Según algunos estudios, no se encontraron asociaciones significativas entre la expresión nm23 y el tamaño del tumor, la afectación ganglionar y el grado histológico. Tampoco se demostró que la supervivencia global en pacientes nm23 positivos fuese mayor que en los pacientes nm23 negativos⁸¹.

1.3.3. FACTORES DE CRECIMIENTO

Diferentes modelos experimentales han demostrado que las células de cáncer de mama requieren la activación de factores de crecimiento para proliferar, invadir y diseminarse⁸³.

1.3.3.1. Receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR): El factor de crecimiento epidérmico, es una glicoproteína transmembrana con un dominio extracelular y un dominio tirosín-cinasa intracelular. Su sobreexpresión en cáncer de mama se ha relacionado con un peor pronóstico y mayor agresividad del tumor⁸⁴⁻⁸⁵.

1.3.3.2. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF): El factor de crecimiento fibroblástico, es un factor de crecimiento que aumenta el índice de actividad mitótica y síntesis de ADN facilitando la proliferación de varias células precursoras, como el condroblasto, colagenoblasto, osteoblasto, que forman el tejido fibroso, de unión y soporte del organismo. Este factor ha sido relacionado con la angiogénesis tumoral en procesos oncogénicos⁸⁶. Su papel pronóstico en cáncer de mama es controvertido⁸⁷.

1.3.3.3. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF): El PDGF forma parte de una familia de factores de crecimiento constituida por cinco miembros codificados por cuatro genes diferentes⁸⁸. Estas isoformas se denominan PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD y actúan sobre las células sensibles a ellas por medio de dos receptores tirosin-quinasa⁸⁹. Las formas A y B se activan intracelularmente en el proceso de exocitosis, mientras que las C y D se liberan como factores latentes que requieren la intervención de proteasas⁹⁰. El PDGF y sus receptores desempeñan papeles clave en la proliferación y diferenciación del mesénquima, así como el desarrollo del riñón, sistema cardiovascular, cerebro, pulmón y tejido conectivo. En los tejidos adultos, sin embargo, se asocian con los procesos de regeneración tisular, inflamación y angiogénesis, así como con la génesis de algunos tumores⁹¹.

El PDGF se ha visto expresado en tumores de mama⁴⁵³. Su presencia se relaciona con un estadio avanzado de la enfermedad ⁴⁵².

1.3.3.4. El Receptor del factor de crecimiento insulínico: El IGF-1 es sintetizado principalmente en el hígado, pero también en la glándula mamaria, pudiendo ejercer efectos autocrinos y paracrinos sobre su receptor (IGF-R)

presente en la superficie celular⁹². El IGF-1 se encuentra en la circulación general mayoritariamente unido a la proteína fijadora de IGF (IGFBP), la cual puede inhibir o aumentar la acción de IGF-1 dependiendo del grado de su unión con éste. Además, esta proteína fijadora puede estimular directamente los IGF-R presentes en diferentes células⁹³.

La hormona de crecimiento (GH) es el estímulo primario para producir IGF-1 a nivel hepático, y la insulina puede estimular la producción de IGF-1 por sobreestimulación de los receptores de GH en el hígado⁹⁴. La hiperinsulinemia puede también aumentar la biodisponibilidad de IGF-1 al disminuir la secreción hepática de la proteína fijadora de IGF-1 (IGFBP), aumentando así los niveles de IGF-1 libre en plasma y que puede unirse a sus receptores, tanto en las células cancerosas como en las células normales^{92,95}.

Se ha demostrado que los efectos proliferativos y antiapoptóticos de IGF-1 son importantes en la génesis del tumor⁹⁶, y además el IGF-1 tiene efectos angiogénicos, dado que es capaz de estimular la producción del factor de crecimiento endotelial vascular en las células cancerosas a nivel mamario, aumentando así el riesgo de invasión y metástasis por el tumor⁹⁷.

1.3.3.5. Factor de crecimiento transformante beta: El factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- β) es miembro de una superfamilia de factores polipeptídicos que inhiben el crecimiento e inducen apoptosis en un gran número de tipos celulares, particularmente células epiteliales⁹⁸.

Se ha demostrado que el TGF- β tiene efectos bifásicos durante la tumorigénesis, actuando tempranamente como un supresor tumoral y contribuyendo más tarde a la progresión del tumor, a través de sus acciones paracrinas o autocrinas sobre las células tumorales y su entorno^{98,99}.

1.3.3.6. Factor de crecimiento hepatocítico (HGF): Se ha demostrado que los niveles circulantes de HGF pueden ser un indicador útil para la progresión de las lesiones metastásicas y el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama metastásico¹⁰⁰.

1.3.3.7. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF): VEGF es una proteína implicada en la vasculogénesis (formación “de novo” del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes)¹⁰¹.

El hallazgo de que la sola pérdida de un alelo de VEGF produzca una vascularización embrionaria defectuosa que induce la muerte del embrión señala el papel fundamental que juega este factor en el desarrollo del aparato circulatorio¹⁰². Asimismo, VEGF ha resultado ser un mediador clave de la neovascularización asociada a determinados tumores¹⁰³. Muchos estudios han demostrado que la expresión del VEGF es elevada en tejidos tumorales o en la circulación en muchos tipos de tumores sólidos humanos, entre ellos en cáncer de mama¹⁰⁴. Se considera que hay una reducción en la supervivencia en los tumores de mama que sobreexpresan VEGF.

1.3.4. MOLECULAS DE ADHESIÓN CELULAR (MAC):

Las moléculas de adhesión celular son glicoproteínas ubicadas en la superficie celular que constituyen receptores celulares, aunque también se encuentran en la matriz tisular, y mediante las cuales se efectúan las interacciones específicas célula-célula y célula-matriz, desencadenando diferentes eventos funcionales celulares como la expresión génica, cambios fenotípicos de inducción y/o sobreexpresión de determinadas moléculas en la membrana celular; y, por lo tanto, cambios en el estado de activación de la célula¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Estas moléculas, para poder ejercer sus funciones, no solo necesitan de la expresión de sus ligandos o contrarreceptores al nivel del sitio con el cual interactúan, sino que también requieren de la preactivación de la propia célula, lo que induce un incremento de la afinidad del receptor por sus ligandos, colaborando a su vez en la activación celular enviando señales coestimuladoras o coactivadoras al interior de la célula¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Hay varios tipos de MACs implicados en cáncer de mama.

1.3.4.1. **Cadherinas:** Las cadherinas constituyen una familia de glucoproteínas de la superficie celular involucradas principalmente en la adhesión célula-célula mediante un sistema dependiente de calcio⁴⁵⁴. Atendiendo al tipo celular en el que con mayor abundancia se expresan, las cadherinas han sido clasificadas en cuatro subfamilias: cadherina E (epitelial), cadherina N (neuronas), cadherina P (placenta) y cadherina V (tejido vascular) ⁴⁵⁵. La homología entre las cadherinas de diversos tejidos es elevada, siendo la región citoplasmática la zona mejor conservada, fenómeno sin duda ligado al importante papel que este dominio representa en el mantenimiento de la morfología celular.

Las cadherinas intervienen de manera fundamental en el reconocimiento celular durante la embriogénesis, regulando la compleja cascada de sucesos que tienen como resultado la cohesión celular, de tal manera que una anomalía en su expresión puede conducir al desarrollo de tumores y a la formación de metástasis.

La determinación de E-cadherina es utilizada para diferenciar entre lesiones ductales y lobulares⁴⁵⁶.

1.3.4.2. **Integrinas:** Reciben este nombre porque integran el medio ambiente extracelular e intracelular. Esta familia está constituida por heterodímeros cuyas cadenas a y b transmembránicas se encuentran asociadas no covalentemente. Una característica distintiva de las moléculas integrinas es la capacidad de modular rápida y reversiblemente su adhesividad. Esta función es mediada por 2 mecanismos principales que pueden ser influenciados por diferentes estímulos: los cambios en la conformación de los heterodímeros ab, lo cual provoca un incremento en la afinidad por los ligandos (a través de pasos secuenciales, las integrinas pasan de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad donde está la integrina totalmente activada), y los cambios de la localización celular de las integrinas, permitiendo la modulación de su fuerza de interacción y de su afinidad¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. La expresión de la $\alpha 3\beta 1$ se asocia con un mayor poder invasivo y metástasis, a través de aumentar la producción de la proteasa gelatinasa B (MMP9)⁴⁵⁷.

1.3.4.3. **Selectinas:** Las Selectinas son las moléculas que intervienen en la adhesión de los linfocitos al endotelio vascular. Han sido descritos tres tipos de selectinas designadas por la inicial del tipo celular en el que fueron descubiertas⁴⁵⁸.

La selectina P, inicialmente localizada en plaquetas⁴⁵⁹ presenta una función, mal definida hasta el momento, relacionada con la trombosis y la hemostasis. La selectina L es una proteína relacionada con el reconocimiento de los linfocitos por los ganglios linfáticos periféricos y que interviene en la adhesión de los monocitos y los neutrófilos a las células endoteliales. La selectina E interviene esencialmente en la adhesión y la migración de los neutrófilos a las células endoteliales y su expresión en este último tipo celular es mediada por citoquinas; está siendo utilizada como marcador de metástasis a distancia⁴⁶⁰.

1.3.4.4. **Tenascina:** Las tenascinas son una familia de proteínas de gran tamaño que aparecen en tejidos embrionarios, en heridas y en tumores. Son capaces de unirse a las integrinas, a los proteoglicanos y a los receptores del tipo de las inmunoglobulinas. Su expresión en el borde invasivo de tumor se relaciona con un aumento de la expresión de marcadores de proliferación celular, siendo un factor pronóstico adverso de recidiva local y metástasis⁴⁶¹.

1.3.4.5. **CD44:** El antígeno CD44 es una célula de la superficie de la glucoproteína implicada en las interacciones célula-célula, la adhesión celular y la migración. En los seres humanos, el antígeno CD44 está codificado por el gen CD44 en el cromosoma 11¹⁰⁸. Esta proteína participa en una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo activación de los linfocitos, la hematopoyesis y metástasis tumorales. Su expresión se relaciona con metástasis en nódulos linfáticos regionales y factores pronósticos adversos⁴⁶².

1.3.4.6. **Sialyl Lewis X:** es un tetrasacárido de hidratos de carbono que normalmente está adherido a O-glicanos en la superficie de las células. Se sabe que juega un papel vital en los procesos de reconocimiento de célula a célula. Es un antígeno expresado por células tumorales, facilitando la adhesión al endotelio vascular, invasión y metástasis⁴⁶³.

1.3.4.7. Otras: Existen glicoproteínas de membrana expresadas en las células mamarias que son el producto de la expresión de gen MUC1: CA15.3, MCA, CA459, CA27.29, CASA, TRUCANT BR, que interfieren en el proceso de adhesión celular y escapan al reconocimiento del sistema inmune. La determinación de estas proteínas se ha relacionado con una mayor diseminación tumoral⁴⁶⁴.

1.3.5. ENZIMAS PROTEOLITICOS Y SUS INHIBIDORES:

Los enzimas proteolíticos han adquirido un gran interés en fisiopatología tumoral debido a su papel potencial en la degradación de los componentes principales de la matriz extracelular y membrana basal facilitando, de esa forma, la invasión tumoral y las metástasis.

Los enzimas proteolíticos que son expresadas por los carcinomas humanos se agrupan en cuatro grandes familias: metaloproteinasas, spartil-proteinasas, cisteín-proteinasas y serín-proteinasas. La expresión tumoral de la mayoría de estas enzimas ha sido asociada con un comportamiento más agresivo de los carcinomas humanos y un pronóstico desfavorable de los pacientes¹⁰⁹.

1.3.5.1. Aspartil-proteinasas: En este grupo de enzimas proteolíticos se encuentra la catepsina D (cat-D), que es una proteasa ácida lisosomal presente en todas las células a bajas concentraciones, y el pepsinógeno C (pep-C), que es una enzima proteolítico normalmente involucrada en la digestión de proteínas en el estómago y en la proteólisis del líquido seminal en la vagina.

La cat-D se ha propuesto como un marcador de dependencia estrogénica de los tumores, como un factor de crecimiento y como una proteasa importante en la invasión tumoral. Esta propuesta se basa en estudios "in vitro" que demostraron que distintas líneas celulares de tumores humanos secretan activamente una forma precursora de la cat-D (pro-cat-D) que, tras autoactivación a pH ácido, puede promover la proliferación celular actuando como mitógeno autocrino, favorecer la capacidad invasiva y metastatizante de los tumores, y degradar distintos componentes de la matriz extracelular, incluyendo proteínas de

adhesión¹¹⁰⁻¹¹². También se ha demostrado que la cat-D puede activar formas precursoras latentes de otros enzimas proteolíticos implicados en la cascada metastásica, como la cat-B y L.

El pep-C es un enzima proteolítico principalmente involucrado en la digestión de proteínas en el estómago, y de expresión muy restringida en los tejidos humanos. Sin embargo, se ha demostrado que también el epitelio de los quistes mamarios y un porcentaje significativo de carcinomas mamarios muestran la capacidad de producir pep-C¹¹³. Además, en este mismo tipo de neoplasia con posterioridad se ha demostrado también una asociación significativamente positiva entre la expresión tumoral del enzima y la buena diferenciación tumoral y el estado positivo de los receptores hormonales¹¹⁴, así como también con un pronóstico favorable de las pacientes independientemente del estado ganglionar¹¹⁵

1.3.5.2. Serín-proteinasas: Dentro de este grupo de enzimas proteolíticos se encuentran los activadores del plasminógeno, que convierten el plasminógeno en plasmina y desempeñan un papel importante en el proceso de coagulación. Pero el sistema de la activación del plasminógeno es, además, un complejo sistema de cascada proteolítica que, junto a otros sistemas enzimáticos, participa en la degradación de la matriz extracelular durante los procesos de remodelación tisular en condiciones normales y patológicas, incluyendo la invasión cancerosa^{116, 117}. Hasta el momento, se han descrito dos tipos genética e inmunológicamente diferentes de estos enzimas: el tipo uroquinasa (uPA) y el tipo tisular (tPA).

El uPA es una enzima que cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina activa¹¹⁸. La plasmina, una proteinasa neutra de amplia especificidad, tiene la capacidad de unirse a diferentes receptores de la superficie de las células tumorales¹¹⁹ y desarrolla una amplia actividad fibrinolítica que cataliza la degradación de diferentes componentes de la matriz extracelular. Además, se ha demostrado que la plasmina puede activar otros enzimas proteolíticos, conduciendo a una amplificación de la reacción. Así pues, como resultado de la activación del uPA se produce la rotura de una amplia variedad de proteínas de la

matriz extracelular. El uPA se sintetiza y secreta por una amplia variedad de células tumorales y estromales en forma de una proenzima inactiva (pro-uPA) que se une a receptores específicos de la superficie de las células tumorales¹¹⁶. Tras esa unión, la proenzima puede ser activada por la plasmina y otras enzimas como la calicreína¹²⁰, o las catepsinas B y L^{121, 122}. Así pues, los receptores del uPA también son un componente esencial de la migración de la célula tumoral, ya que permiten la regulación continua de la actividad proteolítica en los contactos celulares mediante las diferentes localizaciones de uPA y sus inhibidores¹²³. Diversos estudios sugieren que el uPA puede desempeñar un papel relevante en la progresión de diversos carcinomas humanos. Además, los valores intratumorales elevados de uPA han sido asociados con una menor supervivencia de pacientes afectadas de cáncer de mama¹²⁴⁻¹²⁷.

El tipo tisular del activador del plasminógeno (tPA) está primordialmente involucrado en la disolución de los coágulos intravasculares¹¹⁶. Sin embargo, también se ha detectado la expresión del tPA en carcinomas de mama y colorrectales. Pero, al contrario del uPA, los valores intratumorales elevados de tPA se han asociado a un pronóstico favorable de los carcinomas mamarios¹²⁷⁻¹²⁹. Así pues, a pesar de estar emparentadas bioquímicamente, estos dos enzimas muestran un comportamiento diferente en el cáncer de mama, incluso sus valores tisulares muestran una relación inversa en este tipo de neoplasia¹²⁹. Esa correlación observada de los valores elevados de tPA en el cáncer de mama con el pronóstico favorable puede estar relacionada con el hecho de que esta serín-proteinasa es una enzima inducible por estrógenos en el cáncer de mama¹³⁰. De hecho, en este tipo de neoplasia se ha observado una relación significativamente positiva entre los valores de tPA y los receptores estrogénicos¹³¹. Por ello, la expresión tumoral de tPA puede ser indicativa de carcinomas mamarios que tienen un sistema de receptores estrogénicos biológicamente activos, que es una condición asociada con pronóstico favorable en esos tumores.

El antígeno prostático específico (PSA) presenta actividad proteolítica similar a la tripsina y quimotripsina¹³², y su producción está regulada por los andrógenos¹³³. Hasta hace poco tiempo se consideraba que esta enzima era producida exclusivamente por las células epiteliales de la glándula prostática¹³⁴, pero

estudios recientes demuestran que otros tejidos, como las glándulas periuretrales¹³⁵, anales¹³⁶, salivales¹³⁷ y mamaria¹³⁸, pueden producir PSA. Así pues, todos esos datos sugieren que el término "prostático específico" inicialmente asignado a este antígeno no se ajusta ni mucho menos a la realidad. En el ámbito de la patología tumoral, el PSA ha demostrado ser un marcador sérico útil para la detección, pronóstico y seguimiento de pacientes con cáncer de próstata¹³⁴. Sin embargo, la expresión tumoral de esta glucoproteína también se ha detectado en carcinomas mamarios, pulmonares, parotídeos, adrenales renales, ováricos, colorrectales y melanomas. De especial importancia son los estudios realizados en el cáncer de mama, donde el 30% de esos tumores tienen una expresión positiva para el PSA¹³⁹, que se asocia con la positividad de los receptores de estrógenos y progesterona¹⁴⁰, así como a un pronóstico favorable de las pacientes¹⁴¹. También se ha demostrado que el PSA puede ser producido por los tumores mamarios y por el tejido mamario normal tras estimulación esteroide¹⁴², y que sus concentraciones séricas en pacientes con cáncer de mama metastásico pueden predecir la respuesta al tratamiento hormonal con acetato de megestrol¹⁴³. Además, muy recientemente se ha descrito que la expresión tumoral del antígeno se correlaciona positivamente con una peor respuesta a la terapia con Tamoxifeno en pacientes con recurrencias de cáncer mamario¹⁴⁴.

1.3.5.3. Cisteín-proteinasas: Las cisteín-proteinasas son un grupo de enzimas proteolíticas lisosomales que desempeñan un papel importante en muchos procesos celulares normales, especialmente en relación con el recambio tisular¹⁴⁵. Además, estas enzimas parecen estar involucradas en determinados procesos patológicos benignos¹⁴⁶, así como en el proceso de invasión cancerosa y las metástasis¹⁴⁷. Hasta el momento, se han aislado y caracterizado 10 cisteín-proteinasas lisosomales humanas: catepsinas B, L, H, S, O, K, C, W, L2 y Z. Todas ellas contienen un residuo de cisteína en el centro activo de la molécula y, en prácticamente todos los casos, se sintetizan como proenzimas que deben ser activadas para su actuación, pero que difieren en algunas características enzimáticas, incluyendo su especificidad de sustrato y su estabilidad en función del pH.

Se ha demostrado que las catepsinas B, L y O pueden ser secretadas por una variedad de tumores humanos o animales¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Además, existen estudios que demuestran que las cat-B y L están involucradas en la degradación de constituyentes de la membrana basal, como la laminina, fibronectina y el colágeno tipo IV^{149, 151}, y que la cat-B puede favorecer la angiogénesis¹⁵². De acuerdo con esas observaciones experimentales, existen también estudios que indican una asociación significativa entre los valores de expresión tumoral de las cat-B¹⁵³ o L¹⁵⁴ con ciertos parámetros de agresividad tumoral en carcinomas de colon y próstata. Además, la expresión tumoral de la cat-B ha sido asociada con un peor pronóstico de los pacientes afectados de carcinoma de colon¹⁵⁵ o mama^{156, 157}. Sin embargo, también existen datos en la bibliografía que contradicen estas últimas observaciones en relación con el cáncer de mama¹⁵⁸.

1.3.5.4. Metaloproteinasas de la matriz extracelular: Las Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) pertenecen a una familia de al menos 19 miembros que son el producto de genes relacionados entre sí¹⁵⁹. Estas enzimas pueden ser clasificadas, de acuerdo con criterios estructurales y funcionales, en cuatro grandes familias de diferente especificidad de sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromalisinas y metaloproteinasas de membrana. Además, hay algunos miembros de la familia de MMP, como la macrófago metaloelastasa¹⁶⁰, la estromalisina-3¹⁶¹, la MMP-19¹⁶² y la enamelisina¹⁶³, que poseen características especiales que impiden su clasificación en alguno de los citados grupos.

Todas la MMPs tienen unas características comunes, incluyendo la presencia de dos átomos de cinc en el sitio activo de la molécula y un residuo característico de cisteína, esencial para el mantenimiento de su latencia enzimática¹⁶⁴. Además, todas las MMPs son secretadas como proenzimas que requieren un pH neutro para poder actuar y son inhibidas por una familia específica de proteínas, que se denominan inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) ¹⁶⁵. Las MMPs están ampliamente distribuidas en el organismo humano, donde desempeñan una serie de funciones fisiológicas como la cicatrización¹⁶⁶, la reabsorción ósea¹⁶⁷, la

involución mamaria¹⁶⁸ y otras funciones fisiológicas asociadas al embarazo y al parto¹⁶⁹. Además, más recientemente se ha demostrado que estas enzimas están implicadas en multitud de variados procesos patológicos como la artritis reumatoide¹⁷⁰, enfermedad periodontal¹⁷¹, la esclerosis múltiple¹⁷², las enfermedades cardiovasculares¹⁷³ o ciertas alteraciones hematológicas¹⁷⁴. El mecanismo fisiopatológico por el que las MMPs y los TIMPs están implicadas en estos procesos es a través de una alteración del recambio de la matriz extracelular. Todos esos hallazgos han motivado un cambio sustancial en la concepción fisiopatológica de muchos de esos procesos benignos. Pero, sin duda, el aspecto que ha generado mayor interés en investigación clínica es el papel de las MMP en la fisiopatología tumoral. Esto se debe a que la expresión tumoral de estas enzimas ha sido relacionada con el potencial metastásico de las células cancerosas, ya que el proceso de invasión tumoral conlleva la degradación de determinados elementos de la membrana basal y de la estroma intersticial, como colágenos, laminina, fibronectina, tenascina, gelatinas y proteoglicanos, que son todos ellos sustrato de las MMPs¹⁷⁵.

Un aspecto relevante de la dinámica de las MMPs en la fisiopatología tumoral es que su expresión puede tener lugar no sólo en las propias células cancerosas, sino también en las células estromales peritumorales. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el ARN y la proteína estromalisina-3 se detectan específicamente en los fibroblastos circundantes a las células neoplásicas mamarias, pero no en los fibroblastos de la glándula mamaria normal^{161, 176}. Además, diversos estudios demostraron la expresión de gelatinasa A (MMP-2), mediante estudios de inmunohistoquímica o bien de hibridación "in situ", por las células tumorales en una amplia variedad de carcinomas humanos. Estas investigaciones parecen indicar que las células tumorales mismas son las principales productoras de gelatinasa A en los tumores malignos "in vivo". Sin embargo, los estudios de hibridación "in situ" han señalado que el ARNm de la gelatinasa A se expresa en las células estromales adyacentes a tumores humanos de piel¹⁷⁷, colon¹⁷⁸ y cérvix uterino¹⁷⁹, y no por las propias células tumorales. Se ha sugerido que esa aparente discrepancia entre los estudios de inmunotinción y de hibridación "in situ" puede deberse a la unión y/o interiorización en las células cancerosas de las MMPs

producida por los fibroblastos peritumorales¹⁸⁰. Además, a esto podemos añadir que existen datos que indican que la producción de MMPs por las células estromales peritumorales está motivada por determinadas señales bioquímicas originadas en las propias células cancerosas. En este sentido, estudios realizados en el cáncer de mama demostraron que la colagenasa-3 (MMP-13) es expresada por los fibroblastos peritumorales mediante activación por factores difusibles liberados por las células cancerosas, como la interleucina-1 alfa y el factor transformante del crecimiento β (TGF- β)^{181,182}.

Independientemente del origen celular de la producción de las MMPs en el marco tumoral, estudios recientes demostraron una asociación significativa entre una expresión tumoral aumentada de diferentes MMPs y un peor pronóstico de los pacientes afectados de diferentes tumores, en términos de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia total. Así, se ha descrito que la expresión tumoral de estromalisina-3 está asociada a un peor pronóstico en el cáncer de mama^{183, 184} y de colon¹⁸⁵; la colagenasa intersticial en el cáncer colorrectal¹⁸⁶, esofágico¹⁸⁷ y en condrosarcomas¹⁸⁸; la gelatinasa B en el cáncer colorrectal¹⁸⁹; la gelatinasa A en el cáncer gástrico¹⁹⁰, de ovario¹⁹¹, de mama¹⁹² y de vejiga urinaria¹⁹³, y la colagenasa-3 en el cáncer de mama¹⁹⁴.

1.3.5.4.1. MMP-1: La MMP-1 (colagenasa intersticial) es una colagenasa que degrada el colágeno tipo I y III, así como la gelatina. Su función principal corresponde al recambio normal del colágeno, pero su actividad se incrementa para lograr la remodelación de la matriz extracelular durante la cicatrización de heridas. En relación al cáncer de mama, se asocia su presencia con un mayor tamaño tumoral²²⁰, así mismo su expresión por parte de los fibroblastos correlaciona con la aparición de metástasis^{221, 222}. Recientemente, se ha observado que juega un papel crítico en las metástasis óseas del cáncer de mama y la invasión de tejidos blandos a través de mecanismos de degradación de la matriz, angiogénesis y activación de osteoclastos²²³

1.3.5.4.2. MMP-2: La MMP-2 es una gelatinasa (gelatinasa A) que degrada el colágeno IV, componente fundamental de la membrana basal, los colágenos V, VII, IX y X, la gelatina y la elastina. Diversos estudios muestran que esta proteasa es sintetizada tanto en las células tumorales como en el estroma peritumoral²²⁴, lo que resultaría indicativo del importante papel que parece desempeñar en la fisiopatología tumoral en la interacción tumor-estroma²²⁵. Otro dato a tener en cuenta en cuanto a la relación de la MMP-2 y el cáncer de mama es su correlación con el estado menopáusico, de tal manera que hasta tres cuartas partes de los tumores mamarios de mujeres premenopáusicas muestran elevados niveles de MMP-2, mientras que en las mujeres postmenopáusicas solamente se encuentran elevados en una cuarta parte de los casos²²⁶.

1.3.5.4.3. MMP-7: La MMP-7 (matrilisina) es una estromalisina que degrada el colágeno tipo IV, la fibronectina y la laminina. Tanto los fibroblastos como las células inflamatorias mononucleares son capaces de expresarla, demostrándose que la eliminación de MMP-7 disminuye la invasividad y enlentece el crecimiento tumoral²²⁷. Se ha puesto de manifiesto que los niveles elevados de MMP-7 se asocian con mayor agresividad y mayor aparición de metástasis a distancia²²².

1.3.5.4.4. MMP-8: La MMP-8 es una colagenasa (colagenasa-2 o neutrofílica), producida en su mayoría por neutrófilos y asociada con muchos procesos inflamatorios. Estudios realizados en cáncer de mama han puesto de manifiesto que su expresión se correlaciona con una baja afectación ganglionar y confiere buen pronóstico a aquellas pacientes en las que se expresa, siendo por tanto la MMP-8 un factor de protección, reduciendo el potencial metastásico de las células tumorales²²⁸.

1.3.5.4.5. MMP-9: La MMP-9 es una gelatinasa (gelatinasa B) que, al igual que la MMP-2, degrada el colágeno IV, V, VII, IX y X, la gelatina y la elastina. La elevación de MMP-9 tiene lugar al principio del proceso de malignización, habiéndose detectado su expresión en los carcinomas "in situ" de mama²²⁹. La MMP-9 tiene un papel pronóstico importante, siendo útil en el seguimiento de

pacientes intervenidas de cáncer de mama, ya que se observado un fuerte descenso de sus valores séricos tras la cirugía²³⁰.

1.3.5.4.6. MMP-11: La MMP-11 es una estromalisina (estromalisina -3; ST-3) que es expresada por células del estroma peritumoral²³¹ y que degrada proteoglicanos, laminina, fibronectina y regiones no helicoidales del colágeno IV²²⁰. Su elevación se asocia a mayor invasividad y peor pronóstico²³⁸. Se ha sugerido que la determinación de ST-3 podría servir para identificar tumores de comportamiento más agresivo, de tal manera que existen estudios que describen un peor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama que mostraban niveles elevados de ST-3 en relación con las pacientes cuyos tumores expresaban niveles bajos²³².

1.3.5.4.7. MMP-13: La MMP-13 es una colagenasa (colagenasa -3), un enzima proteolítico que degrada preferentemente el colágeno tipo II²³³. Esto hace que tenga un papel importante en la destrucción del cartílago articular, el cual es rico en colágeno tipo II, demostrándose aumentado sus niveles en el cartílago de pacientes afectados de enfermedades degenerativas como la osteoartritis o la artritis reumatoide²³⁴. A parte del colágeno II también degrada otros componentes de la matriz extracelular como las gelatinas, proteoglicanos, colágeno tipo IV, fibronectina y tenascina. La MMP-13 es expresada tanto por las células tumorales como por los fibroblastos, siendo para unos autores predominantes en las células tumorales²³⁵ y para otros en los fibroblastos, habiéndose observado además igual grado de expresión por parte de células tumorales y de fibroblastos²³⁶.

Su expresión se considera un factor de mal pronóstico, ya que juega un papel importante en la progresión de carcinoma "in situ" hacia la forma invasiva²²². Además, niveles elevados de MMP-13 se correlacionan con mayor afectación de los ganglios linfáticos, lo cual confiere a la MMP-13 un papel importante como marcador de invasividad y metástasis ganglionares²³⁶.

1.3.5.4.8. MMP-14: La MMP-14, también llamada metaloproteasa de membrana tipo 1 (MT1-MMP), es un enzima considerada llave ya que su mecanismo de acción es activar la pro-MMP-13 y la MMP-2 en la superficie celular. Se ha relacionado su expresión con la presencia de metástasis ganglionares, lo cual le confiere entidad como factor pronóstico²³⁷. Además, es de remarcar la fuerte asociación encontrada entre la expresión de la MMP-14 por las células estromales y peor pronóstico, encontradas en un estudio realizado por Vizoso y cols. en el 2007²³⁸.

1.3.5.5. Inhibidores de los enzimas proteolíticos:

La actividad de los enzimas proteolíticos en patología tumoral depende en gran medida del balance con sus inhibidores naturales, que pueden ser producidos por las células tumorales mismas, o bien por las células estromales adyacentes al tejido lesionado. Para cada familia de enzimas proteolíticas se han descrito inhibidores específicos. De esos inhibidores naturales, los que más han sido estudiados en patología tumoral son los inhibidores tisulares metaloproteinasas (TIMPs) y los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs).

Hasta el momento, se han identificado cuatro TIMPs. Se trata de glucoproteínas que se unen estrechamente a las formas activas de las MMPs, ocasionando una inhibición de su actividad¹⁹⁵. La importancia de los TIMPs en fisiopatología tumoral viene avalada por diferentes estudios experimentales, que demostraron que la administración exógena de TIMPs puede bloquear o inhibir la invasión o progresión tumoral en diversos modelos experimentales¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Además, independientemente de la acción inhibitoria de las MMPs, se han señalado otras acciones de los TIMPs que, como la inducción de la apoptosis o su capacidad de bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos¹⁹⁹⁻²⁰¹, condicionan también una disminución del crecimiento tumoral. Sin embargo, a pesar de esos datos que indican una regulación negativa de los TIMPs en el proceso de invasión tumoral y metástasis, la significación biológica de la expresión tumoral de estos inhibidores parece, al menos, controvertida. Así, también se ha demostrado que la elevada

expresión tumoral de ARNm de TIMPs se relaciona con un incremento del potencial invasivo y metastásico de los carcinomas de origen gástrico, colorectal, pancreático, cabeza y cuello²⁰²⁻²⁰⁴. Además, recientemente se ha demostrado que la expresión tumoral de TIMP-1 en el carcinoma gástrico²⁰⁵ y mamario²⁰⁶ está asociada de forma independiente con un peor pronóstico de los pacientes. Estas discrepancias en la función de los TIMPs entre los estudios “in vivo” e “in vitro” y la significación clínica de su expresión tumoral pueden deberse a diversos motivos. Así, existen datos que sugieren que el TIMP-1 tiene dos actividades distintas: una inhibidora de las MMPs, y otra como factor de crecimiento^{207, 208}. Esos datos, sin duda, resultan indicativos del complejo papel que parecen desempeñar los inhibidores de los enzimas proteolíticos en el proceso tumoral.

Los estudios clínicos demuestran la significación pronóstica de los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs). Así, en relación con el inhibidor del uPA (PAI-1) se ha descrito que, sorprendentemente, los valores elevados del mismo están asociados con un pronóstico adverso en el cáncer de mama^{125, 129, 209} y de cérvix uterino²¹⁰. Por el contrario, se ha señalado que los valores elevados del inhibidor del tPA (PAI-2) están asociados a un pronóstico favorable en el cáncer de mama²¹¹. Aunque estos datos pueden resultar desconcertantes, debemos considerar, como ya señalamos anteriormente, que cada vez resultan ser más los efectos asignados a los inhibidores de los enzimas proteolíticos en patología tumoral. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el PAI-1 también desempeña un papel importante en la promoción de la angiogénesis²¹², proceso que está ampliamente considerado como un factor de pronóstico adverso de los tumores. Además, se considera que la excesiva liberación del PAI-1 podría ser importante de cara a la reimplantación de las células tumorales circulantes, teniendo en cuenta que la formación del nuevo estroma en el lugar de las metástasis requiere el bloqueo temporal de la degradación de la matriz extracelular ocasionado por el uPA¹²⁵. En definitiva, de acuerdo con estas observaciones, que apuntan la importancia de la dinámica de los parámetros del sistema activador del plasminógeno en la fisiopatología tumoral, diversas investigaciones recientes indican que la evaluación combinada de todos esos parámetros aporta una mejor

precisión pronóstica en los carcinomas de mama^{129, 213, 209,127}, gástricos²¹⁴, de pulmón²¹⁵ y colorrectales^{216, 217}.

1.3.5.6. Relevancia clínica de metaloproteasas de matriz y sus inhibidores en Cáncer de mama

A pesar del aumento de la incidencia de cáncer de mama, la mortalidad ha sido bastante estable durante varios años, siendo hoy en día la primera causa de muerte por cáncer²³⁹. Esto es debido al hecho de que, aunque menos de 10 % de las mujeres con cáncer de mama primario tienen signos clínico-patológicos de la enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico inicial, la recaída en forma de metástasis ocurre en muchas mujeres con tumores localizados, tras los 5 años de la cirugía. Sin embargo, es difícil predecir la aparición de metástasis a distancia ya que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que abarca una variedad de entidades patológicas y una amplia gama de comportamientos clínicos, incluso en los grupos de pacientes que parecen ser clínicamente similares. Por lo tanto, a pesar de tener varias variables pronósticas clásicas disponibles, tales como el estado ganglionar, tamaño tumoral, grado de malignidad, la edad y estado de receptores hormonales, es necesario identificar nuevos factores pronósticos a fin de mejorar la actual clasificación de riesgo y, por lo tanto, desarrollar una gestión más racional de los pacientes con cáncer de mama.

La invasión tumoral y el desarrollo de metástasis son los principales determinantes de la evolución del paciente y, en consecuencia, las moléculas que participan en estos procesos son candidatos obvios para ser identificados como nuevos marcadores de pronóstico en el cáncer de mama. Los diferentes tipos de enzimas proteolíticas (metalo - , aspártico, cisteína, serina y treonina -proteinasas) realizan la degradación de los componentes del estroma de tejido y la membrana basal conectivo, elementos clave en la invasión tumoral y la metástasis²⁴⁰. Sin embargo, algunos componentes, en particular de los colágenos intersticiales, son muy resistentes a los ataques proteolíticos y pueden ser degradados por las enzimas colagenolíticas específicos como la catepsina K, la elastasa de neutrófilos y metaloproteinasas de la matriz (MMPs) ²⁴¹. La familia de las MMPs humanas se compone actualmente de 26 miembros de endopeptidasas zinc dependientes que

se pueden dividir en 6 clases estructurales o, en función de su especificidad de sustrato y la estructura primaria²⁴²⁻²⁴⁴.

La expresión de las MMPs es inducida por una variedad de estímulos externos tales como citocinas y factores de crecimiento, incluyendo interferones, interleucinas, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral - alfa (TNF - α) o beta (TNF - β), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el inductor de metaloproteinasa de la matriz extracelular (EMMPRIN)²⁴⁵. Los MMPs se sintetizan como zimógenos inactivos, los cuales a continuación se activan principalmente por cualquiera de otras MMPs o por Serín-proteasas.

La expresión anormal de MMPs contribuyen en patológicas no neoplásicas, que implica la inflamación aguda, así como crónica y / o la degradación del tejido, y también en cáncer²⁴⁶⁻²⁵⁰. Hay evidencia que apoya la hipótesis de que la inflamación participa en condiciones que conducen al cáncer^{251,252}, y hay asociaciones bien conocidas entre los procesos inflamatorios y cáncer, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorectal^{253,254}, la hepatitis viral B y C o cirrosis hepática alcohólica y el hepatocarcinoma²⁵⁵, la esofagitis de reflujo crónica resultante en el esófago y carcinoma esofágico de Barrett²⁵⁴, infección cervical por virus del papiloma humano y el cáncer de cuello de útero, la prostatitis y cáncer de próstata, la pancreatitis y cáncer de páncreas, o infección gástrica desde *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico^{256,257}.

Las MMPs desempeñan un papel esencial en la degradación de los componentes del estroma de tejido conectivo y de la membrana basal, que son elementos clave en la invasión tumoral y la metástasis. Por lo tanto, está bien establecido la implicación de las MMPs en el desarrollo del cáncer²⁵⁸, tales como el cáncer de mama²³⁸, cáncer colorectal^{259, 260}, cáncer de próstata²⁶¹ y carcinoma hepatocelular²⁶² entre otros.

La sobreexpresión de MMPs aumenta significativamente el potencial invasor y metastásico de líneas celulares tumorales tanto en "in vitro" como en estudios "in vivo"^{263,264}. Modelos genéticos de ratón han mostrado MMPs / TIMPs como modificadores de tumores en diferentes niveles²⁶⁵. Durante la invasión tumoral, MMPs parecen tener diversas funciones, probablemente debido a su preferencia por el sustrato. Se puede suponer que las gelatinasas son principalmente

responsables de la destrucción de colágeno IV en la membrana basal, mientras que las estromelinas degradan las proteínas no colágenas, tales como lamininas. Después de que las células tumorales han destruido la membrana basal, se requiere que las colagenasas alteren la red de colágeno intersticial nativa, que se compone principalmente por colágeno tipo I, III y V y el colágeno microfibrillar IV. Además, existen datos que desafían claramente el dogma clásico que indica que las MMPs promueven la metástasis únicamente por la modulación de la remodelación de la matriz extracelular, y en relación con esto, se ha descrito que las MMPs influyen en el comportamiento de las células tumorales “in vivo”, como consecuencia de su capacidad para escindir receptores de la superficie celular, moléculas de adhesión celular, o citocinas²⁶⁶⁻²⁶⁹. Además, 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 apoptosis²⁷⁰. Las MMPs también pueden regular la angiogénesis tumoral, tanto positiva a través de su capacidad para movilizar o activar los factores pro-angiogénicos²⁷¹, o negativamente a través de la generación de inhibidores de la angiogénesis, tales como angiostatina, endostatina²⁷².

Sin embargo, además de su papel potencial para la inhibición de la angiogénesis, hay varios estudios que muestran que las MMPs pueden limitar la progresión del tumor. Por ejemplo, en el cáncer de mama, expresión de MMP - 3 en la glándula mamaria disminuye desarrollo de tumores mamarios en ratones transgénicos²⁷³; también, un aumento de la expresión de MMP - 8 disminuye la metástasis de las células MDA- MB - 435 de carcinoma tanto “in vitro” como “in vivo”²⁷⁴.

Las funciones MMPs parecen depender de su localización celular. Las MMPs unidas a las membranas celulares pueden regular su actividad, lo que lleva a la promoción de la migración celular y la invasión y pueden activar cascadas de señalización intracelulares²⁷⁵. Además, las MMPs sobre la superficie celular pueden ser internalizadas y, o bien dirigidas a los lisosomas para la destrucción o ser una fuente de actividad intracelular. Varias MMPs (incluyendo la MMP - 2, -3, -13 y MT1-MMP/MMP-14) se han encontrado en los núcleos de diversos tipos de células²⁷⁶⁻²⁷⁹. El papel de las MMPs intracelulares aún es poco conocido, y se

sugirieron mecanismos o funciones sobre el papel de las MMPs nucleares en los procesos de cáncer de mama^{280, 281}.

Varias MMPs, especialmente gelatinasas MMP- 2²⁸²⁻²⁸⁶ y MMP – 9^{238, 285, 287}, han sido estudiadas como factores pronósticos en el cáncer de mama, siendo asociados con un peor pronóstico en diversos subgrupos de pacientes. Estos hallazgos pueden ser debidos a que las MMPs están relacionados con la invasión tumoral y la metástasis por su especial capacidad para degradar el colágeno de tipo IV que se encuentra en la BM²⁸⁸, y para inducir la angiogénesis²⁶⁷. Del mismo modo, otras MMPs o TIMPs pueden ser sobreexpresados y/o relacionados con el pronóstico del cáncer de mama, tales como la MMP – 7²³⁸, la MMP – 11^{220, 238}, MT1-MMP (MMP - 14)^{238, 282, 289}, la MMP – 13²⁹⁰, TIMP – 1^{238, 291-295} o TIMP – 2^{238, 295-297}. Además los polimorfismos genéticos de estas proteínas pueden tener una asociación con el riesgo de cáncer de mama, progresión y la supervivencia²⁹⁸. También se han publicado datos discordantes sobre el valor pronóstico de las MMPs antes mencionadas, y de esta manera se han relacionado con sólo unos pocos factores pronósticos^{299, 300} o demostrado no tener ninguna asociación con los parámetros clínico-patológicos en el cáncer de mama^{282, 301,302}.

Es notable, que a excepción de la MMP - 2, hay diferencias significativas en la expresión de MMPs y TIMPs entre los subtipos histológicos de carcinomas de mama³⁰³. Estos tipos histológicos se pueden dividir en tres grupos de acuerdo con el valor pronóstico: excelente, malo y muy mal pronóstico. Los pacientes con un pronóstico excelente, como carcinoma tubular invasivo o carcinoma mucinoso, mostraron una tasa de supervivencia más alta (más del 80 %) a los 10 años³⁰⁴. Los pacientes con cáncer papilar invasivo o medulares tienen un peor pronóstico (supervivencia del 60-80%). Las pacientes con carcinoma ductal infiltrante y el carcinoma lobular mostraron una supervivencia a los 10 años por debajo del 50 %³⁰⁵. Sin embargo, sólo unos pocos estudios han evaluado las diferencias en las características clínicas, patológicas y biológicas en función del tipo histológico. Con la creciente incidencia de carcinoma de mama, el número de pacientes con un tumor poco frecuente puede aumentar, por lo que un conocimiento más profundo de la biología molecular de estos tumores podría ayudar a mejorar el enfoque de tratamiento. Según ha informado del Casar et al.³⁰³, los carcinomas de mama ductal mostraron mayor expresión global de MMPs y TIMPs que los otros tipos

histológicos; en contraste, los carcinomas mucinosos tenían expresiones más bajas de MMPs y TIMPs que otros carcinomas. Con respecto a la expresión de MMPs y TIMPs en los fibroblastos, se encontró que estas células del estroma fueron más frecuentemente positivas para MMP - 1, 7 y 13, y TIMP - 1 y 3, en los carcinomas ductales que en otros tipos histológicos de carcinomas de mama. Por lo tanto, las variaciones en la expresión de MMPs/ TIMPs entre los subtipos histológicos de carcinomas de mama parece contribuir a las diferencias en la apariencia morfológica de los carcinomas de mama, y también podrían estar relacionados con variaciones en la fisiopatología del tumor de estos subtipos de cáncer de mama²¹⁸.

El cáncer de mama, como un tumor sólido, se compone de una mezcla variable de células neoplásicas y las células del estroma del tumor no neoplásicas, que comprenden células endoteliales, fibroblastos y una representación de la variable de células inflamatorias. En los últimos años, varias evidencias han demostrado que tanto los cambios en el comportamiento del estroma y la interacción entre las células tumorales y las células del estroma, están íntimamente ligados a la tumorigénesis, la invasión tumoral y la metástasis^{306, 307}. De hecho, se sabe actualmente que, además de su producción por las células tumorales epiteliales, la producción de MMPs y / o TIMPs expresión ser inducida en fibroblastos estromales y / o en las células vasculares e inflamatorias^{290, 293, 297, 303}. Por lo tanto, una fuente importante de MMPs en el carcinoma de mama son las células del estroma³⁰⁹⁻³¹².

Hoy en día, es ampliamente aceptado que el tipo celular (células de las células tumorales / estroma) que expresan MMPs/TIMPs podría tener un interés biológico en el cáncer de mama. Se ha demostrado que la expresión de MMP - 9 o TIMP - 2 por las células tumorales , la MMP - 1 , 7 , 9 , 11 , 13 , o TIMP - 3 por los fibroblastos , y MMP - 7 , 9 , 11 , 13 , 14 o TIMP -1 y 2 por las células inflamatorias, se asocia significativamente con una mayor tasa de metástasis a distancia²³⁸.

Las células miofibrilares inflamatorias (CMIs) pueden representar hasta un 50 % de la masa total del tumor en carcinomas de mama invasivo .Las CMIs que infiltran los carcinomas mama, incluyen una representación de la variable de macrófagos, células plasmáticas, mastocitos y los linfocitos B y T^{313, 314}. Históricamente, los leucocitos infiltrantes de tumores han sido considerados como manifestaciones de un mecanismo de defensa contra los tumores en desarrollo

intrínseco^{314, 315}. Sin embargo, los estudios indican que el aumento de la infiltración de leucocitos puede promover fenotipos tumorales, tales como la angiogénesis, el crecimiento y la invasión^{313, 316}. Esto puede ser debido a células inflamatorias, que secretan citoquinas, factores de crecimiento, quimiocinas y proteasas, estimulan la proliferación de células de cáncer y la invasión³¹⁷. Los leucocitos infiltrantes de tumores de la sangre periférica se someten a una modificación fenotípica para infiltrarse desde el frente invasivo en el centro del tumor. Esto parece ser un proceso dinámico en el que las células inflamatorias y los mediadores inmunomoduladores presentes en el microambiente tumoral polarizan la respuesta inmune del huésped hacia fenotipos específicos que influyen en la progresión del tumor. Se ha descrito que los pacientes con altos patrones de expresión de MMPs / TIMPs en las correspondientes poblaciones CMIs en el centro del tumor, así como en la frontera invasiva, tienen la más alta probabilidad de desarrollar metástasis a distancia. Ello indica la importancia de la evaluación de la expresión de estos factores implicados en el crecimiento del tumor en diferentes zonas tumorales, que proporcionan información complementaria sobre el comportamiento del tumor y el pronóstico en el cáncer de mama.

Es interesante describir algunas de las características biológicas de las MMPs, expresadas por esa población de CMIs-prometastáticas, específicamente la MMP - 7, 9, 11, 13 y 14, y TIMP - 1 y 2³¹⁸. MMP - 7 (matrilisina 1) es una estromeliasina, que degrada el colágeno de tipo I, fibronectina y laminina, que se expresa de forma aberrante en tumores de mama humanos, y cuya eliminación está asociada con una menor capacidad de invasión y de crecimiento tumoral³¹⁹. MMP - 9 (gelatinasa B) se relaciona con la invasión tumoral y la metástasis por su especial capacidad para degradar el colágeno de tipo IV que se encuentra en la BM²⁸⁸, y también es capaz de inducir la angiogénesis²⁶⁷. De hecho, una alta expresión de MMP - 9 se correlaciona significativamente con la agresividad del tumor y de mal pronóstico^{285, 287}. Se ha descrito que la MMP- 11 (Stromalinas - 3) se expresa preferentemente por las células del estroma peritumoral^{320, 321}, y que sus altos niveles intratumorales se asocian con la progresión tumoral y mal pronóstico^{238, 293}. MMP - 13 (colagenasa - 3) tiene una excepcionalmente amplia especificidad de sustrato cuando se compara con otras MMPs^{322, 323}, desempeña un papel central en

la cascada de activación de MMPs, tanto de activación y como ser activada por otras MMPs (MMP - 14 , o 2 3) , y puede desempeñar un papel esencial durante la transición de las lesiones DCIS a IDC de la mama²⁹⁰. MMP - 14 (tipo de membrana 1 de MMP o MT1-MMP) es una MMP clave implicada en la degradación de ECM , la activación de la pro-MMP - 13³²⁴ y la pro-MMP - 2³²⁵ en la superficie de la célula , tiene un papel crucial en la carcinogénesis molecular , el crecimiento de las células tumorales, la invasión y la angiogénesis.

La relación positiva entre la expresión de TIMPs por las CMIs y el peor pronóstico del cáncer de mama puede parecer paradójico, porque tanto TIMP - 1 y 2 son inhibidores conocidos de la actividad de MMPs. Como TIMPs inhiben MMP "in vivo", es de esperar que los altos niveles de inhibidores podrían prevenir la progresión del tumor y, por lo tanto, deberían estar relacionados con pronóstico favorable en pacientes con cáncer. Sin embargo, los TIMPs también pueden promover la proliferación celular y tienen efectos antiapoptóticos que pueden favorecer la expansión del tumor durante la aparición y el crecimiento temprano de los tumores primarios^{326, 327}.

El fibroblasto es uno de los principales componentes celulares del estroma de los carcinomas de mama. La agrupación de análisis mostró dos grupos distintos, con perfiles moleculares bajos o altos de MMPs / TIMPs en ambas poblaciones de fibroblastos, ya sea en el centro del tumor o en el frente invasivo, pero cada uno de ellos con diferentes patrones de expresión de MMPs / TIMPs. Los fibroblastos del estroma intratumoral mostraron una expresión positiva de MMP - 2, 7 y 14 , y TIMP - 3, con más frecuencia que los fibroblastos de la frontera invasiva , que mostraron una expresión mayor de la MMP - 9. Este patrón de expresión variada de MMPs y TIMPs puede corresponder a diferencias en la densidad celular, que es mayor en el centro del tumor, y / o a los mecanismos biológicos de la interacción entre las células tumorales y la población de fibroblastos de esas dos zonas tumorales diferentes³²⁸.

Como se ha descrito más arriba, los pacientes con patrón de alta expresión de MMPs / TIMPs en las poblaciones CMIs en el centro del tumor, así como en la frontera invasiva, tienen la más alta probabilidad de desarrollar metástasis a distancia³²⁹. La expresión de MMP - 11 es la que define esas poblaciones prometastásicas de CMIs²⁹³. 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 et al.^{330, 331} descubrieron recientemente de que 22 factores estaban relacionados con la expresión de MMP- 11 por las CMIs. De ellos, los factores más expresados diferencialmente entre los dos grupos de tumores eran de IL- 1, 5, 6, 17, IFN β y NF κ B. En conjunto, estos resultados indican que los tumores de peor pronóstico identificados por la expresión de MMP - 11 por las CMIs intratumorales, mostraron una sobre regulación de los genes relacionados con la inflamación. Estas asociaciones son relevantes debido a que estos genes altamente expresados se han asociado con varios mecanismos biológicos relacionados con la progresión del tumor³³²⁻³³⁷. También es relevante el nuevo hallazgo de la asociación entre la expresión de MMP -11 o TIMP - 2 por las células inflamatorias en el centro del tumor y un alto ratio de CD68 / (CD3 + CD20) (macrófagos (CD68 +) , células T (CD3 +) y células B (CD20 +))³³⁸, ya que ambas proteínas son los dos factores principales que definen el fenotipo pro - metastásico de las CMIs en los estudios anteriores^{238, 318, 328, 329}. Además, si hay una alta relación de CD68 / (CD3 + CD20) en la frontera invasiva, la mayoría de las CMIs con un fenotipo positivo para MMP - 11 o TIMP - 2 en el centro del tumor son macrófagos. Todos estos resultados sugieren que una alta CD68 / (CD3 + CD20) relación en la frontera tumoral contribuye a polarizar los macrófagos para lograr un fenotipo metastásico en el centro del tumor.

Clásicamente, los factores biológicos y / o pronósticos en el cáncer de mama se han investigado en el tumor primario. Sin embargo, los ganglios linfáticos, especialmente centinela, son de gran interés debido a que están expuestos a todos los factores solubles procedentes de tumor y también pueden ser colonizados por clones agresivos que se derivan de las células tumorales primarias. Se ha informado de que cuando se comparan valores de MMPs / TIMPs entre diferentes localizaciones tumorales (en el centro del tumor, frente invasivo o ganglios linfáticos axilares metastásicos (GLAMs)), las correlaciones de expresiones de MMPs/TIMPs más altas se encontraron entre GLAMs³³⁹, lo que sugiere que los clones de células de tumor primario que colonizan los ganglios linfáticos regionales muestran una tendencia a tener un fenotipo similar de MMPs / TIMPs.

Se ha demostrado recientemente que la expresión de MMPs / TIMPs por GLAMs (tales como la MMP - 1, 7, 13 o TIMP - 1 por CMIs) se asoció positivamente

con el número de nódulos invadidos. Asimismo, es especialmente relevante que la expresión de MMP- 1 (colagenasa intersticial, también llamada colagenasa - 1) por las CMIs de ganglios linfáticos centinela (GLC) se asoció significativamente con la diseminación metastásica a los ganglios no centinela. Esto parece indicar que las células cancerosas metastásicas tienen la capacidad de inducir la producción de estas proteínas en las células “huésped” inflamatorias dentro de los ganglios linfáticos. Ello hace hincapié en la importancia de las interacciones estroma-epitelial en la progresión del tumor entre GLAMs. Además, se informó de que en todos los casos con expresión MMP- 1 negativa por las CMIs del GLC, el resto de los ganglios no centinela (SLNs) no se vieron afectados, lo que apunta a una sensibilidad del 100 %, un valor predictivo negativo del 100 % y una especificidad del 61,5% para predecir la condición GLC no afectado por tumor³⁴². Por lo tanto, la expresión de MMP - 1 por las CMIs del GLC puede ser un marcador biológico útil para predecir la progresión a metástasis en todo el sistema linfático axilar en el cáncer de mama, lo que podría ayudar a evitar la disección ganglios linfáticos axilares innecesarias en un porcentaje significativo de casos (50-68 %) ^{340, 341}, cuando, aparte de GLC, se sospecha de metástasis a otros ganglios axilares.

MMP - 1 degrada varios componentes de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno tipo I (el principal componente del tejido conectivo), II, III, VII, VIII, y IX, así como inhibidores de serinproteasa, y macroglobulina α_2 ²⁴². Los datos reportados por Eiró et al.³⁴² parecen indicar que la capacidad de degradación de MMP -1 puede ser responsable de la extensión del tumor a través de los ganglios linfáticos. Esta observación puede aparecer en contradicción con los datos reportados previamente en relación con la falta de asociación entre la alta expresión de MMP- 1 por los tumores primarios y metástasis a distancia en los carcinomas de mama³¹⁸. Sin embargo, la progresión metastásica en todo el sistema linfático axilar es un proceso completamente diferente de la extensión del tumor hematógena, que es el responsable de metástasis a distancia^{343, 344}.

MMPs y TIMPs juegan un papel clave en varios procesos básicos de la progresión del tumor. Diferentes perfiles de expresión están asociados con las principales etapas de la progresión del cáncer de mama, tales como la creación de un potencial fenotípico invasivo en DCIS, favoreciendo el desarrollo de metástasis hematógenas, y haciendo posible la progresión metastásica en todo el sistema

linfático axilar. Estas asociaciones tienen interés clínico, ya que pueden contribuir a una mejor caracterización de los carcinomas de mama precoz que difieren en su comportamiento biológico y clínico para evaluar microinvasión en muestras de resección de tumores de mama, para proporcionar un pronóstico más preciso, y para predecir el estado del tumor de los ganglios no- GC en el cáncer de mama. También son especialmente notables las evidencias que indican que la expresión de MMPs y TIMPs en poblaciones de células del estroma tumoral, tales como CMIs y fibroblastos, claramente impactos en la evolución clínica del cáncer de mama, lo que sugiere que estroma tumoral pasivo puede participar activamente en el proceso de invasión del cáncer.

1.4. FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS.

Los factores pronósticos en el cáncer de mama son muchos y su número aumenta continuamente. Sin embargo, para que un factor pronóstico pueda ser considerado como tal tiene que cumplir los siguientes criterios, según el American Joint Committee on Cancer (AJCC): significación estadística, independencia y relevancia clínica, mientras que el factor predictivo es cualquier valor asociado al grado de respuesta al tratamiento específico³⁴⁵.

En los últimos años, gracias a los grandes avances que se han producido en el campo de la biomedicina, se han desarrollado nuevas técnicas de investigación y se ha descubierto un gran número de biomarcadores muy importantes en la regulación de los procesos implicados en la carcinogénesis. Muchos investigadores han aplicado estos avances a la identificación de factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama. Los marcadores biológicos utilizados con fines pronósticos o predictivos, en el cáncer de mama han sido de gran importancia y utilidad³⁴⁶.

El grado histológico, el tamaño tumoral, el estado de los ganglios linfáticos axilares y el estudio de los receptores hormonales en el tumor, receptores de estrógenos y de progesterona, son marcadores pronósticos utilizados universalmente, que condicionan el tratamiento empleado. La historia natural de la enfermedad definirá el lapso de vida en cada caso, siendo los ganglios linfáticos

axilares con metástasis el factor pronóstico más relevante para la evolución de la enfermedad y para la supervivencia global, mientras que el número de ganglios metastásicos se relaciona directamente con la recidiva local y disminución de la supervivencia³⁴⁷.

El estadiaje universalmente aceptado es el de la AJCC³⁴⁵. Dicho sistema de estadiaje es tanto clínico como patológico y está basado en la clasificación TNM, donde el T se refiere al tumor, el N a los ganglios y el M a las metástasis.

1.4.1 Tamaño tumoral (T de la clasificación TNM³⁵⁴).

El tamaño del tumor es uno de los factores pronósticos principales del sistema de estadificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC)³⁴⁸, se considera al diámetro máximo, expresado en milímetros, según el informe histopatológico.

Se ha descrito una fuerte correlación entre el tamaño tumoral y el riesgo de recidiva e incluso de supervivencia, de tal forma que cuanto mayor sea el tamaño del tumor peor será el pronóstico³⁴⁹. En el 1969, Ficher y Cols³⁵⁰ señalan que esta relación se debe a que cuanto mayor es el tumor más posibilidad hay de que los ganglios axilares estén afectados, aumentando el número de recidivas y disminuyendo la supervivencia.

Sin embargo, los resultados obtenidos por la SEER³⁵¹ concluyen que, el tamaño del tumor es un factor pronóstico independiente, siendo la influencia mayor en las pacientes con adenopatías positivas que negativas, pero significativa en los dos grupos. Según, este mismo estudio, cuando el tamaño, con ganglios negativos, es menor de 0,5 cm la mortalidad es del 0,8%, entre 0,5 y 0,9 cm sería del 1,7%, si el tamaño está entre 1 y 1,9 cm aumentaría hasta el 4,2%, entre 3 y 3,9 cm el 13,8%, entre 4 y 4,9 cm del 15% y si es mayor de 5 cm el riesgo sería del 17,8%.

A la hora de analizar el tumor hay que hacerlo de la forma más exacta posible, para ello hay que seguir las siguientes pautas³⁵²:

Medir el tumor en dos dimensiones y el diámetro mayor es el que se toma como referencia para la estadificación. El tamaño macroscópico y microscópico debe estar correlacionado. En tumores con componente "in situ", sólo se tomará como tamaño el del componente invasor, el cual se medirá durante el examen

microscópico. Si en el examen se encuentran dos o más tumores, estos se analizarán por separado.

La clasificación TNM³⁵³, para el tamaño tumoral en el cáncer de mama es la siguiente:

Tx: el tamaño del tumor primario no puede ser determinado.

T0: No evidencia de tumor primario.

Tis: Carcinoma “in situ” (carcinoma intraductal, lobulillar enfermedad de Paget del pezón).

T1: Tumor menor de 2 cm en su diámetro máximo.

T2: Tumor mayor de 2 cm pero menor de 5 cm en su diámetro máximo.

T3: Tumor mayor de 5 cm en su diámetro máximo

T4: Tumor de cualquier tamaño pero que infiltra la pared costal o la piel.

1.4.2. Tipo y grado histológico.

Ambas variables anatomopatológicas han sido definidas clásicamente como factores pronósticos en la enfermedad limitada^{355, 356}, el documento consenso del colegio de patólogos americanos los reconoció como factores pronósticos de categoría I³⁵⁷. Sin embargo, su poder predictivo de la supervivencia en la enfermedad metastásica es más controvertido, hay trabajos que demuestran una correlación entre los patrones de diseminación metastásica y el grado histológico en pacientes con recaídas del tumor primario³⁵⁸, pero es escaso el número de trabajos que incluyen cualquiera de estas dos variables en sus modelos multivariantes^{359, 361, 362}, resultando frecuentemente negativos los resultados al respecto^{360, 363, 364, 365, 366}.

“La American Joint Commission on Cancer” recomienda las siguientes directivas para asignar un grado a los tumores ³⁶⁷:

GX: No es posible asignar un grado (Grado indeterminado)

G1: Bien diferenciado (Grado bajo)

G2: Moderadamente diferenciado (Grado intermedio)

G3: Mal diferenciado (Grado alto)

G4: Indiferenciado (Grado alto)

Actualmente, existen varias clasificaciones histopatológicas del cáncer de mama. Las más utilizadas son las de la “Armed Forces Institute of Pathology”

(AFIP) ³⁶⁸ y la de la “World Health Organización” ³⁶⁹. Los carcinomas de mama se clasifican en ductales o lobulares, en función de si se originan en el ducto o en el lóbulo de la mama normal.

El carcinoma ductal infiltrante y el lobulillar infiltrante son los tipos histológicos más frecuentes en el cáncer de mama. Generalmente el carcinoma ductal infiltrante tiene mayor incidencia de afectación axilar y peor pronóstico que otros tipos histológicos ³⁷⁰, mientras que el carcinoma lobulillar infiltrante es de interés por su frecuente bilateralidad y multicentricidad en la misma mama ³⁷¹.

La AJCC ³⁷², ha desarrollado un sistema de clasificación histológica para los tumores de mama.

El carcinoma ductal in situ, representa entre el 10-15% de todas las neoplasias. Suponiendo un 20-30% de las lesiones detectadas en la mamografía. El carcinoma ductal infiltrante, supone el 70-80% de los tumores infiltrantes de la mama. El carcinoma lobulillar infiltrante, es poco frecuente, representa el 5-10% de los tumores infiltrantes de la mama.

1.4.3. Receptores hormonales.

La determinación de receptores hormonales de estrógeno y progesterona se ha convertido en una práctica estándar en la evaluación de pacientes con cáncer primario de mama³⁷³. La determinación de los RE y RP, se ha establecido, a partir de mediados de los 70, como factor pronóstico importante ³⁷⁴.

Hay una buena correlación entre RP positivos, tumores bien diferenciados con bajos índices proliferativos y buena respuesta a la terapia hormonal. Más del 50% de los tumores con RE positivos responden a esta terapia, frente al 10% de tumores con RE negativos. En cambio, los tumores RE negativos están, en general, peor diferenciados, con altos índices proliferativos, tienen mayor probabilidad de recurrencia visceral y, generalmente, no responden a la terapia hormonal³⁷⁵. Numerosos estudios han confirmado que el periodo libre de enfermedad y la media de supervivencia son mayores en pacientes con tumores RE y RP positivos³⁷⁶.

Los RE son proteínas intracelulares que al unirse al núcleo favorecen la expresión de genes específicos. Los efectos de la combinación hormona-receptor se traducen en una estimulación de la división celular e inducción de la síntesis de otras proteínas ³⁷⁷.

Mientras que se acepta el valor predictivo de la respuesta al tratamiento con hormonoterapia de los receptores hormonales, su valor como factor pronóstico es más controvertido y no siempre ha demostrado ser independiente en términos de supervivencia global ^{378, 379}, y muchos argumentan en este sentido que puede tratarse más de un marcador de la velocidad de crecimiento, pues su expresión se asocia a un fenotipo en cierta medida de mejor pronóstico e, incluso, se correlaciona con determinadas localizaciones metastásicas como la ósea ³⁸⁰. Otros estudios, por el contrario, si encuentran potencial pronóstico en el estado de los receptores hormonales de tumor de manera independiente, a pesar de las correlaciones anteriormente reseñadas ^{381, 382, 383}.

Por otra parte, hay que puntualizar ciertas limitaciones al considerar esta variable: la heterogeneidad en cuanto a la determinación en distintos laboratorios de los receptores y la consideración conjunta o separada de los RE y RP en los diversos estudios que también complica las conclusiones al respecto ³⁸⁴, la determinación en el estadio diseminado de los receptores hormonales no siempre es completa lo cual limita su inclusión en los modelos multivariantes ³⁸⁶, y generalmente no se considera la posibilidad en los grandes estudios poblacionales de que la expresión de los receptores sea variable entre el tumor primario y las metástasis, como han demostrado algunas series ³⁸⁵.

1.4.4. Afectación ganglionar inicial (N de la clasificación TNM ³⁵⁴).

La afectación ganglionar axilar tiene un consolidado valor pronóstico en la enfermedad limitada como predictor de las recaídas, pero el valor pronóstico en cuanto a supervivencia global de la afectación ganglionar en la enfermedad inicialmente metastásica no está tan claro.

Si se consideran las pacientes con CM, solo en las que se intervinieron del tumor primario y se realizó linfadenectomía se tiene una información adecuada para esta variable. Tras revisar los datos de las distintas series, estas pacientes no representan un porcentaje amplio de las muestras y si en estos casos nos guiamos

por el estadio ganglionar clínico se añade una heterogeneidad a la variable que dificulta alcanzar conclusiones válidas. Los estudios que han demostrado el valor pronóstico independiente de la afectación ganglionar axilar en términos de supervivencia global (SG) tienen sus limitaciones ^{363, 366} y tenemos también series que, por el contrario, no coinciden en incluir el estado ganglionar axilar en sus modelos multiajustados ^{364, 365}.

1.4.5. Localización de las metástasis.

Hay estudios que consideran por separado cada uno de los órganos afectados por metástasis ^{366, 388} y otros que las agrupan en función de la localización predominante marcada por aquella que confiere peor pronóstico ^{364, 365}. Esta es una variable para la que está establecida la relevancia pronóstica en la enfermedad metastásica ^{366, 387}. Particularizando por las principales localizaciones:

✓ Metástasis viscerales: La afectación metastásica visceral es de gran relevancia por si misma frente a otras variables en determinadas series^{389, 390}. Varios estudios se han centrado en la afectación hepática o cerebral como localizaciones con entidad propia, si bien el CM ha demostrado metástasis en tejidos como las glándulas adrenales o el tracto gastrointestinal y, en definitiva, en múltiples nichos con frecuencias no desdeñables. La afectación hepática por CM se ha considerado clásicamente asociada a una supervivencia limitada, pero las series más recientes advierten la posibilidad de que dicho pronóstico este mejorando recientemente en un subgrupo que se beneficia de tratamientos multidisciplinarios ^{391, 392}. En cuanto a la afectación cerebral, de tradicional mal pronóstico, se advierten ciertas particularidades en su historia natural que merecen la atención de distintos grupos, no sólo en términos del comportamiento clínico de dichos tumores, sino también de los factores biológicos, como la sobreexpresión de HER2, que pudieran determinar este tipo de recaídas ³⁹³⁻³⁹⁶.

✓ Metástasis pulmonares: La afectación visceral en general tiene reconocido mal pronóstico pero hay trabajos que sugieren que no todas las localizaciones viscerales tienen invariablemente dicha connotación, como es

el caso de la localización pulmonar en forma de nodular ³⁹⁷, , una de las más frecuentes según las series dentro de la afectación visceral ³⁹⁸.

✓ Metástasis piel y partes blandas: Esta categoría incluye la afectación ganglionar más allá de los ganglios axilares o locorreionales, la piel y otros tejidos blandos. El pronóstico ha sido generalmente descrito como mejor que para la afectación visceral ³⁶⁴, no sin cuestionarlo como hacen Dunphy et al³⁸⁹ en su análisis de supervivencia libre tras tratamientos quimioterápicos a altas dosis.

✓ Metástasis óseas: Se trata de otra localización de buen pronóstico ³⁶⁴ y de las más frecuentes en CM ³⁹⁸. Los trabajos que se han centrado en analizar las características de la enfermedad con esta localización la asocian a una evolución más prolongada y con mayores índices de respuesta a hormonoterapia, dada la frecuente expresión de receptores hormonales en los tumores con metástasis óseas ³⁹⁹.

1.4.6. Localización del tumor.

La mayoría de los autores no le concede valor pronóstico y, por tanto, fue el menos estudiado.

En el estudio iniciado por Clemmesen con 17.219 pacientes y posteriormente recopilado por Haagensen ⁴⁰⁰, se observa una mayor incidencia de tumores en la mama izquierda. Veronesi ⁴⁰¹, refiere mayor proporción de recidivas cuando el tumor primario se sitúa en los cuadrantes internos de la mama, que cuando el tumor está localizado en los cuadrantes externos.

También se ha descrito que la localización del tumor en el cuadrante inferior interno está asociada con el empeoramiento de la supervivencia en las mujeres con cáncer de mama en estadios tempranos ⁴⁰².

Sarp y cols. ⁴⁰², encuentran una evidencia cada vez más creciente que los tumores de los cuadrantes internos metastatizan con más frecuencia a la cadena mamaria interna. Como esas metástasis no son investigadas, las pacientes con tumores en los cuadrantes inferiores internos tienen un mayor riesgo de muerte por cáncer de mama.

1.4.7. Edad.

La edad en el momento del diagnóstico es un punto de controversia respecto a las características del cáncer de mama. Mientras que algunos estudios sugieren que el cáncer de mama tiene peor pronóstico clínico en mujeres menores de 35 años que en mayores de 51 años ⁴⁰³, otros, sin embargo, no han encontrado la relación de que las mujeres jóvenes presentan formas más agresivas, en este tipo de tumor, con respecto a las de mayor edad ⁴⁰⁴.

1.4.8. Invasión vascular linfática.

Los vasos sanguíneos y los linfáticos que rodean a un carcinoma ductal infiltrante pueden estar invadidos por células tumorales. La invasión vascular linfática es un importante factor pronóstico para los pacientes con cáncer de mama operable. En los pacientes sin afectación ganglionar linfática, la invasión vascular linfática es un predictor de mal pronóstico, de recurrencia precoz y metástasis a distancia^{405, 406}. En aquellos con afectación adenopática, la invasión vascular linfática es un marcador de alto riesgo de muerte indicando mayor probabilidad de fracaso terapéutico⁴⁰⁷.

La invasión vascular linfática por células tumorales es evidente histológicamente en aproximadamente el 15% de los carcinomas ductales infiltrantes de mama y en casi el 10% de los tumores sin afectación ganglionar. Indica un pronóstico desfavorable en términos de recaída local y reducción de la supervivencia global, por eso se recomienda su evaluación en el estudio anatómopatológico de la pieza tumoral⁴⁰⁸.

Nuevos marcadores específicos del endotelio, como D2-40, hacen que sea posible distinguir entre la invasión vascular venosa y la invasión vascular linfática. La presencia de invasión vascular venosa perdió significación estadística en un estudio al compararse con la invasión vascular linfática. En el análisis multivariante, la invasión vascular linfática peritumoral fue el único factor pronóstico independiente de metástasis ganglionares⁴⁰⁹. En el caso de ausencia de afectación ganglionar constituye un indicador aún de mayor potencia⁴¹⁰. Otros

estudios también han intentado comparar invasión vascular venosa e invasión vascular linfática y determinar cuál de las dos representa un indicador de mal pronóstico. Para ello, se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas para comprobar la expresión de CD34 y CD31 para invasión vascular venosa y de podoplanina/D2-40 (marcadores de vasos linfáticos) para la invasión vascular linfática. Se ha confirmado la asociación, estadísticamente significativa en el análisis multivariante, de invasión vascular linfática con metástasis ganglionares axilares, mayor tamaño tumoral, desarrollo de metástasis a distancia, recurrencia loco-regional y peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global^{411, 412}.

En pacientes con cáncer de mama triple negativo no se observaron cambios en invasión vascular linfática y/o invasión vascular venosa con respecto a otros subtipos tumorales. Sin embargo, se observó una mayor frecuencia de metástasis viscerales en este subgrupo, lo que ratifica un diferente comportamiento biológico⁴¹³.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

La técnica BSGC no está exenta de falsos negativos, con un efecto adverso sobre el tratamiento óptimo de las pacientes. Además, su desarrollo nos plantea nuevos interrogantes, tales como la posibilidad de obviar la práctica de la técnica en aquellos casos, cada vez más frecuentes en nuestro ámbito clínico, de carcinomas de mama en estadio muy precoz y muy baja probabilidad de afectación ganglionar; o como identificar a ese importante porcentaje de mujeres que presentan afectación de solo el ganglio centinela, en las que podría evitarse también la linfadenectomía axilar y sus efectos adversos. La respuesta a esos interrogantes puede estar en la integración de los aspectos morfológicos del sistema linfático regional con aspectos funcionales de las células que pueblan los ganglios linfáticos axilares, y de la agresividad biológica de las propias células cancerosas. Si bien los vasos linfáticos intratumorales son casi inexistentes y no funcionantes en los carcinomas mamarios, esos tumores pueden promover una densidad aumentada de red linfática peritumoral que puede alterar la dinámica del sistema. Asimismo, parece razonable considerar que la invasión de los linfáticos peritumorales por las células cancerosas, así como el fenotipo, tanto de las células cancerosas como de las células inflamatorias de los ganglios linfáticos, en cuanto a la expresión de proteínas relacionadas con la invasión y las metástasis, tales como son las MMPs y TIMPs, son factores que pueden contribuir a lograr una óptima precisión de la afectación tumoral ganglionar. Por otra parte, se ha descrito una gran heterogeneidad en las poblaciones de células inflamatorias que ocupan los ganglios linfáticos axilares en el cáncer de mama. Esas células pueden diferir no solo en el tipo sino también en su fenotipo en cuanto a su capacidad defensiva o pro-metastásica.

Por ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos para esta Tesis Doctoral:

1. Evaluar el grado de predicción de afectación del ganglio centinela, así como de los ganglios no centinela, mediante el análisis de la densidad de vasos linfáticos peritumorales en el cáncer de mama.

2. Investigar la relación entre la invasión de los vasos linfáticos peritumorales por células cancerosas y la afectación del ganglio centinela y de los ganglios no centinela.
3. Investigar la relación entre el fenotipo de expresión de MMPs y TIMPs por las células cancerosas en la periferia tumoral, y la afectación del ganglio centinela y de los ganglios no centinela.
4. Investigar la relación entre el fenotipo de expresión de MMPs y TIMPs por las células cancerosas en el ganglio centinela, y la afectación de los ganglios no centinela.
5. Evaluar las variaciones de las poblaciones de células inflamatorias (CD3, CD20, CD68 y CD138), así como sus fenotipos de expresión de MMPs y TIMPs, en la periferia tumoral y su posible relación con la afectación del ganglio centinela.
6. Evaluar las variaciones de las poblaciones de células inflamatorias (CD3, CD20, CD68 y CD138), así como los fenotipos de expresión de MMPs y TIMPs, en el ganglio centinela y su posible relación con la afectación de los ganglios no centinela.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Todos los datos se han tratado manteniéndose la confidencialidad de acuerdo con la legislación vigente sobre datos de carácter personal. Las pacientes se identificaron únicamente por el número de historia clínica y el número de biopsia. El estudio fue aprobado por el comité ético regional.

3.2. Pacientes

Las 59 pacientes incluidas en este estudio corresponden a pacientes que se sometieron a la fase de validación de la técnica de la BSGC por cáncer de mama, entre 1992 y 2009, en el Fundación Hospital de Jove de Gijón. Se han obtenido datos referentes a las características de las pacientes y de los tumores, a los diferentes aspectos relacionados con la técnica del ganglio centinela.

Se registraron datos de las pacientes, como la edad y estado menopáusico.

Los datos de los tumores que se incluyeron: tamaño tumoral, estado de afectación ganglionar (afectación del GC y GNC), grado histológico, contenido de RE y de RP, c-erbB-2, invasión linfovascular. La Tabla 3.1. se detallan las características de los casos de las 59 pacientes con carcinoma mamario con el número (porcentaje) correspondiente.

Tabal 3.1. Características de los 59 casos de carcinomas mamarios incluidos en el estudio.

Características	Nº casos
Número total de casos	59(100)
Edad	
≤59	32(54)
>59	28(46)
Menopausia	
Premenopausia	21(35,6)
Postmenopausia	38(64,4)
Tamaño tumoral	
T1	27(45,8)
T2	28(47,5)
T3	4(6,8)
Afectación del GC	
No	20(33,9)
Si	39(66,1)
Afectación del GNC	
No	40(67,8)
Si	19(32,2)
Grado histológico	
Bien dif.	18(30,5)
Moderadamente dif.	22(37,3)
Pobrememente dif.	19(32,2)
RE	
Negativo	11(18,6)
Positivo	48(81,4)
RP	
Negativo	18(30,5)
Positivo	41(69,5)
c-erbB-2	
Negativo	50(84,7)
Positivo	9(15,3)
Invasión linfovascular	
No	39(66,1)
Si	20(33,9)

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela; RE, receptores estrógenos;

RP, receptores de progesterona.

3.3. Elaboración de mallas de tejido y tinción inmunohistoquímica

Con el fin de determinar la expresión de diferentes factores en las muestras de tejidos de los pacientes a estudio, hemos elaborado mallas de tejido o “array” de tejido que nos ha permitido procesar hasta 32 muestras de pacientes a la vez. Las muestras de los tejidos se fijaron en formol tamponado al 4% durante un mínimo de 24h. Tras esto, se realizó un estudio macroscópico, incluyendo en parafina las secciones representativas para el diagnóstico anatomopatológico. Para su inclusión se llevó a cabo el siguiente proceso: Formol 15'- Alcohol 70°C 30'- 70°C 30'- 96°C 30'- 96°C 30'- 100°C 30'-100°C 30'- 100°C 45'- Xilol 60'- Xilol 60'-Xilol 60'.

Tras la obtención de bloques de tejido y con la ayuda de un microtomo (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), se cortaron muestras a un grosor de 3 μm , siendo posteriormente tenidos con hematoxilina-eosina para seleccionar las zonas más representativas. Usando estos como mapa en los bloques de parafina correspondientes, elaboramos el array mediante “manual tissue microarray” (Modelo MTA-1, Beecker instruments, Sun Praerie, Wisconsin, USA). Se extrajo un cilindro del bloque receptor, que es rellenado por otro cilindro con el tejido extraído del bloque donante. Al mismo tiempo de la realización del array se rellenó una plantilla con la situación de cada cilindro y su número de biopsia correspondiente. Cada uno de los casos es introducido en el array por duplicado. Una vez incluidos todos los casos, el bloque fue introducido en una estufa a 60°C para la correcta unión de los cilindros al resto del bloque de parafina, realizando posterior enfriamiento de este, y se obtuvieron secciones de 3 μm de espesor. Los cortes son recogidos en portaobjetos pretratados específicos para su uso en el inmunoteñidor (Figura 3.1-A).

Sobre estas secciones, se realizó el estudio inmunohistoquímico utilizando para ello anticuerpos específicos frente a MMP-1, MMP-7, MMP-13, TIMP-1, CD3, CD20, CD68, CD138, D2-40. Previo a la inmunotinción se realizó el desparafinado y desmascaramiento antigénico, para lo que pueden existir dos opciones, ausencia de tratamiento o pre tratamiento con calor (Figura 3.1-B).



A B
 Figura 3.1. A. Elaboración de array mediante “manual tissue array”; B. Tinción Inmunohistoquímica realizada sobre un array.

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

Los cortes se introdujeron en los contenedores especiales del tenidor automático, donde se realizó la técnica inmunohistoquímica siguiendo estos pasos: a) lavado en tampon; b) de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% durante 5 min c) incubación con anticuerpos primarios (tiempo dependiente del anticuerpo usado) (Tabla 3.2); d) el exceso de anticuerpo se elimina realizando un lavado en tampon (Wash Buffer, Dako); e) lavado en tampon; f) incubación de los cortes con el sistema de polímeros de dextrano durante 30 min (En Vision™ Detection Kit, Dako). El sistema de polímeros de dextrano se basa en la utilización

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

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

Tabla 3.2: Anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Recuperación antigénica	Dilución	Tiempo de incubación	Referencia
MMP1	pH6	1:200	30'	Thermo Scientific
MMP7	No tto.	1:50	30'	Thermo Scientific
MMP13	pH9	1:400	60'	Calbiochem
TIMP1	pH6	1:100	30'	Thermo Scientific
CD3	pH6	1:100	30'	Ready-to-Use
CD20	pH9	1:400	30'	Ready-to-Use
CD68	pH6	1:100	10'	Ready-to-Use
CD138	pH9	1:50	15'	Ready-to-Use
D2-40	pH6	1:100	15'	Ready-to-Use

3.4. Análisis de las tinciones

Para todas las tinciones se estableció un nivel mínimo de 10% de células teñidas para considerar la tinción como positiva.

Se ha estudiado el tipo celular (célula inflamatoria/célula tumoral/fibroblastos) responsable de las distintas expresiones proteicas en los tumores, tratando de definir los diferentes fenotipos del estroma tumoral. Distinguimos las células cancerosas de las células estromales a causa de que las tumorales son de mayor tamaño, con los núcleos hipercromáticos, algunas

multinucleadas, con presencia de nucléolos, aumento del radio núcleo/citoplasma. Las células mononucleares inflamatorias son de forma redondeada u ovalada, de contornos bien definidos, poseen un solo núcleo. Los fibroblastos son fusiformes, con el núcleo ovalado de contorno bien delimitado. Por otra parte las células tumorales suelen formar nidos, cordones o acinos, estructuras cribiformes o sólidas, mientras que las células de estroma están dispersas.

3.4. Método estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las inmunotinciones, se ha utilizado el programa SPSS 17.0. Las diferencias en porcentajes fueron calculadas con la prueba del Chi-cuadrado.

Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de p , era igual o inferior a 0,05.

IV. RESULTADOS

4.1. Tinciones inmunohistoquímicas para los diferentes factores en la periferia tumoral y en los ganglios axilares.

Las figuras 4.1.1-4.1.4 muestran tinciones inmunohistoquímicas representativas de los diferentes factores analizados en la periferia tumoral y en los ganglios linfáticos axilares con o sin afectación tumoral.

Como se puede apreciar en la figura 4.1.1, la tinción positiva para los vasos linfáticos con Anti D2- 40 en la frontera tumoral se caracterizó por tinción intensa de la membrana citoplasmática de endotelio de los vasos linfáticos. (Figura 4.1.1).

La tinción inmunohistoquímica positiva para los CD 3y CD20 se localizó en la membrana citoplasmática y las tinciones positivas para los CD68Y CD138 se localizaron en el citoplasma celular de porcentajes variables de CIMs. (Figura 4.1.2).

Las tinciones inmunohistoquímicas positivas para los MMP1, MMP7, MMP13 y TIMP1 se localizaron en el citoplasma, tanto de las células cancerosas como en los CIMs o fibroblastos de la frontera tumoral (Figura 4.1.4) y de los ganglios linfáticos (Figura 4.1.3).

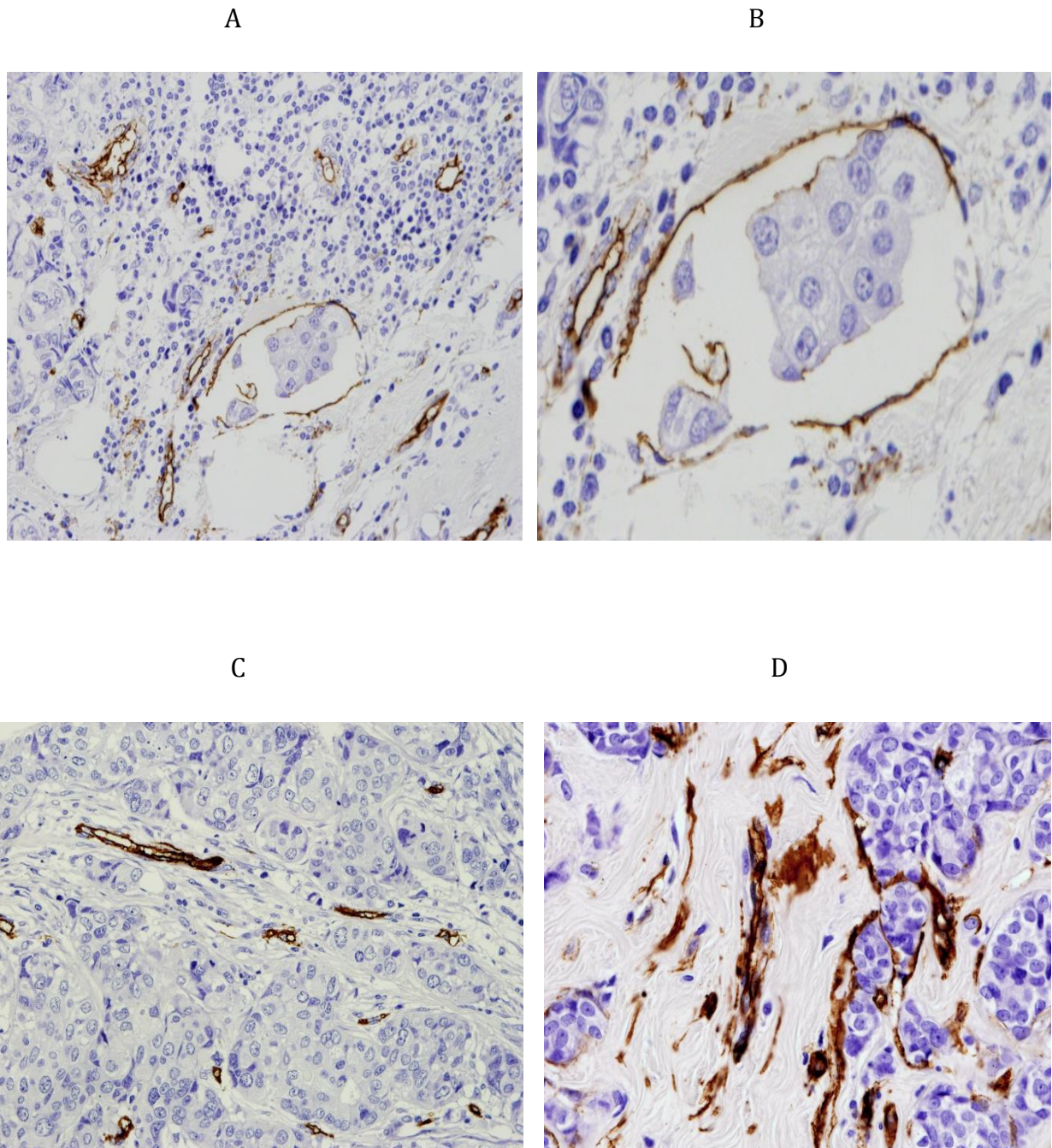


Figura 4.1.1. Ejemplos de secciones tenidas con la Anti D2-40.

A. Invasión linfovascular tumoral (x200). B. Invasión linfática tumoral (x400), se aprecia el corte del vaso linfático con el embolo tumoral en su interior. C. Densidad de vasos linfáticos en la frontera tumoral (x200). D. Aumento de la densidad de los vasos linfáticos en la periferia tumoral (x400).

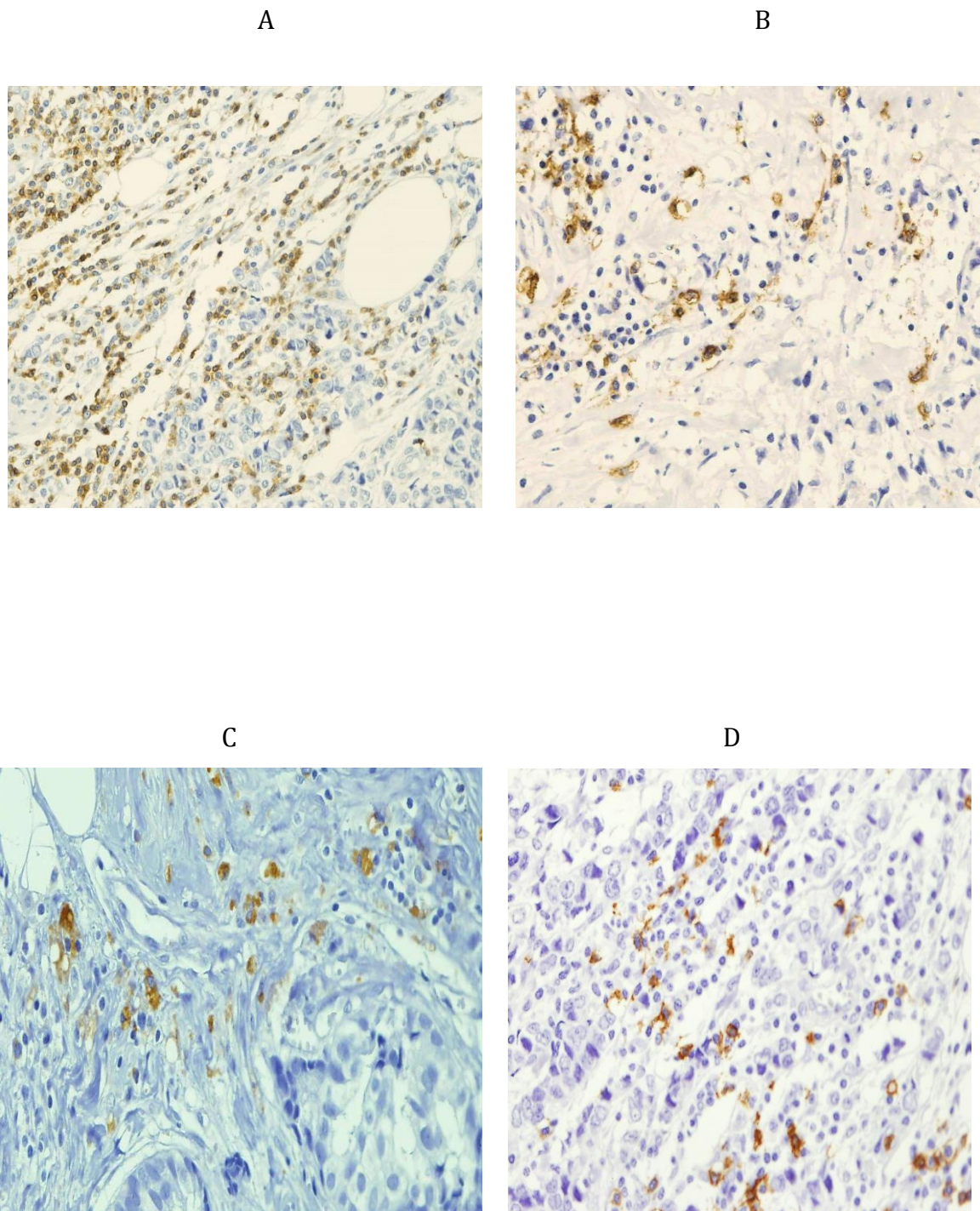


Figura 4.1.2. Ejemplos de secciones tenidas positivas en la frontera tumoral (x200).

A. Positividad de CD3, expresión por las CMIs. B. Positividad de CD20, expresión por las CMIs. C. Positividad de CD68 en las CMIs. D. Positividad de CD138 en las CMIs.

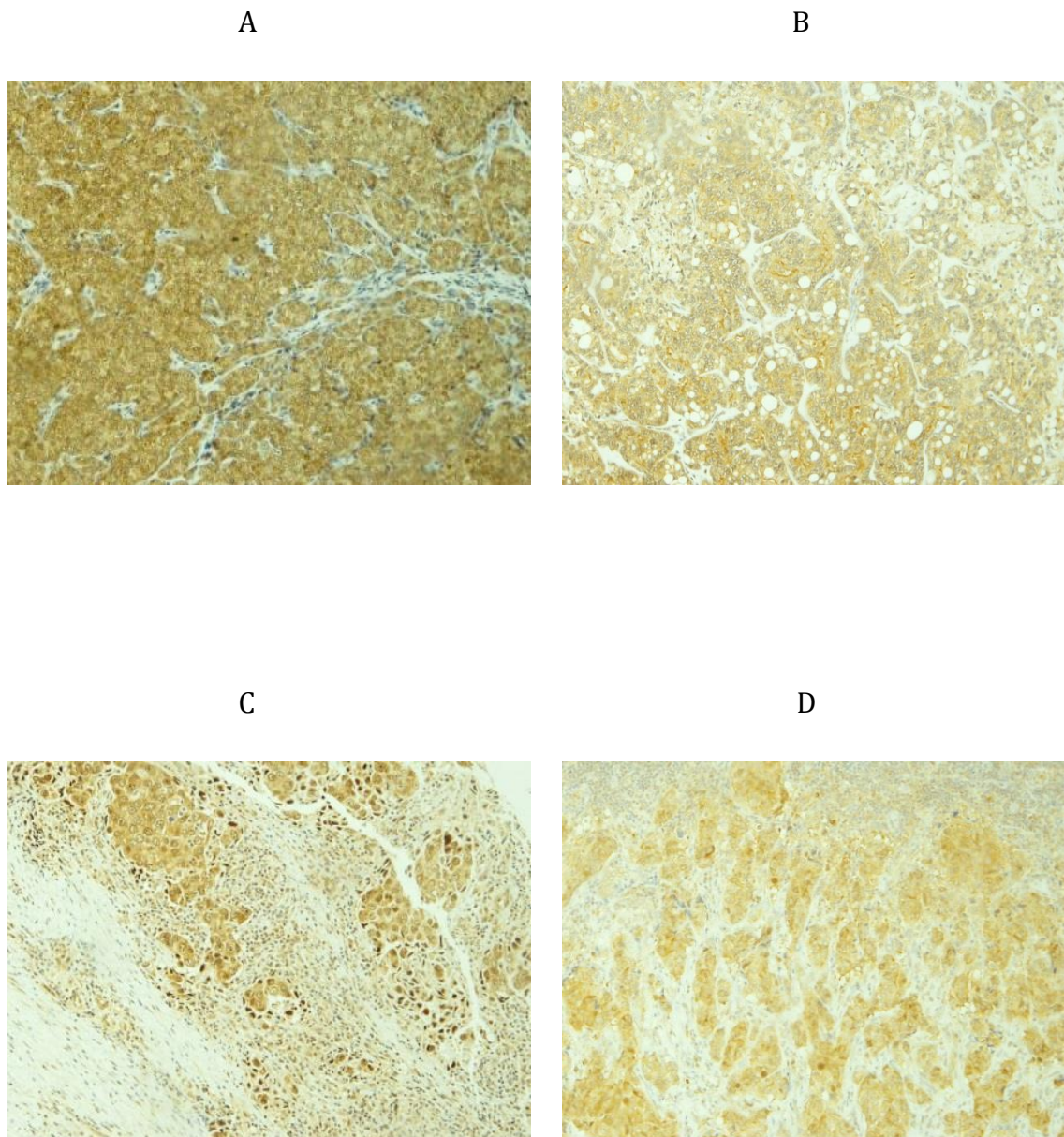


Figura 4.1.3. Ejemplos de secciones tenidas con las MMPs y TIMPs en los ganglios con afectación tumoral (x200).

- A. MMP1 tinción intensamente positiva para las CT. B. MMP7 tinción positiva para las CT y CMs.
C. MMP13 tinción positiva para las CT y CMs. D. TIMP1 tinción positiva para las CT y CMs.

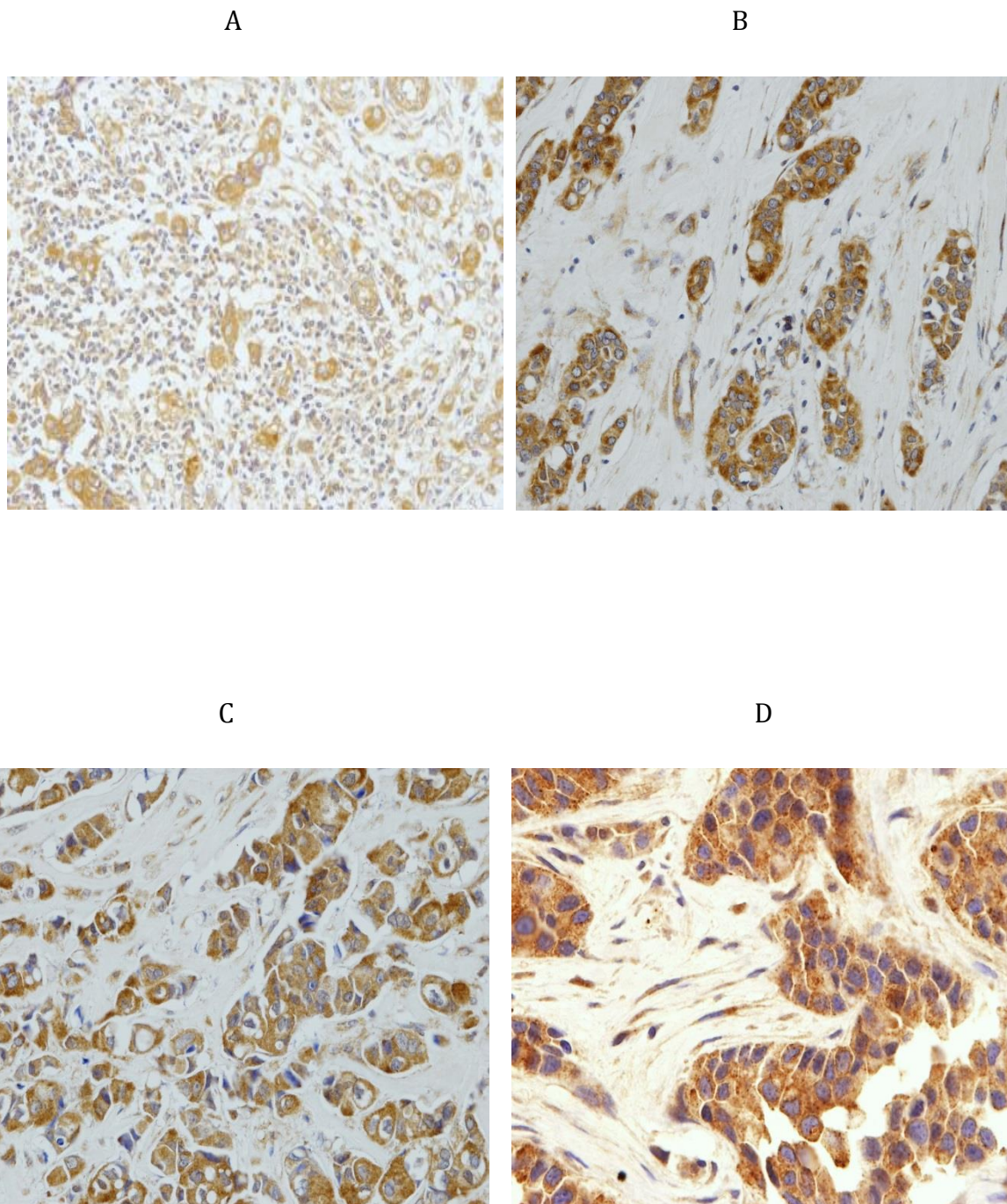


Figura 4.1.4. Ejemplos de secciones tenidas con las MMPs y TIMPs en la FT.

A. MMP1 tinción positiva para las CT, CMIs y FB (x200). B. MMP7 tinción positiva para las CT, CMIs y FB (x200). C. MMP13 tinción positiva para las CT, CMIs y FB (x200). D. TIMP1 tinción intensamente positiva para los tres tipos celulares CT, CMIs, FB (x400).

4.2. Evaluación de las tinciones inmunohistoquímicas para los deferentes factores.

Analizando las tinciones inmunohistoquímicas para los diferentes factores, existieron porcentajes variables de CMIs que mostraron tinciones inmunohistoquímicas positivas para el CD3, CD20, CD68 y CD138, tanto en el estroma de la frontera tumoral, como en los ganglios linfáticos axilares.

La expresión de CD68 tuvo lugar en un elevado porcentaje de casos tanto en los ganglios centinela como en los ganglios no centinela (83%) (Tabla 4.2.1).

En la frontera tumoral, la evaluación de expresión de los factores CD3 y CD20, se realizó en números (porcentajes). Sin embargo, en los ganglios axilares, (dado que los ganglio linfáticos están compuestos mayormente de los linfocitos B y T, y los factores CD20 y CD3 son marcadores específicos para éstas células, respectivamente), la evaluación consistió en calcular la relación entre ambos. La expresión de CD3 por CMIs en la frontera tumoral fue en un porcentaje alto de casos (76,7) y la de CD20 en un porcentaje más bajo (31,6) (Tabla 4.2.2). El ratio CD3/CD20 y CD20/CD3 arrojaron resultados muy parecidos, tanto en GC como en GNC (Tabla 4.2.3).

En el presente estudio también consideramos el valor de la mediana de los porcentajes de cara a evaluar los resultados. La mediana (intervalo) en el GC para CD3/CD20 fue 1,03 (0-9,85); para CD20/CD3, 0,78 (0-2,04). En el GNC para CD3/CD20 fue 1,1 (0-3,14), y para CD20/CD3, 0,84 (0-5,16).

La expresión de MMPs y TIMPs en la frontera tumoral y en los ganglios linfáticos fue considerada por tipo celular (célula tumoral, fibroblastos y MICs del estroma tumoral). La tabla 4.2.4 muestra el número (porcentaje) de casos positivos para cada factor, tanto en la frontera tumoral como en los ganglios centinela y no centinela. La expresión de MMP1, MMP7 y MMP13 por las células tumorales tuvo lugar en un elevado porcentaje de casos en la frontera tumoral (95%, 86,7% y 85%, respectivamente).

Tabla 4.2.1. Expresión de CD68 y CD138 por CMIs en la FT, GC y GNC en 59 carcinomas mamarios.

Factores	FT	GC	GNC
CD68	32 (55,2)	44 (83)	44 (83)
CD138	25 (43,9)	27 (50,9)	19 (35,8)

Los valores están representados como el número (porcentaje) de casos positivos.

Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; FT, Frontera tumoral; GC, Ganglio centinela; GNC, Ganglio no centinela.

Tabla 4.2.2. Expresión de CD3 y CD20 por CMIs en la FT en 59 carcinomas mamarios.

Factores	FT
CD3	46 (76,7)
CD20	19 (31,6)

Los valores están representados como el número (porcentaje) de casos positivos.

Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.2.3. Expresión CD3 y CD20 por CMIs en los ganglios axilares en 59 carcinomas mamarios.

Tipo de relación	GC	GNC
CD3/CD20	26 (46,3)	25 (41,7)
CD20/CD3	26 (46,3)	25 (41,7)

Los valores están representados como el número (porcentaje) de casos por encima de la mediana.

Abreviaturas: CMIs, células mononucleares inflamatorias; GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.2.4. Expresión de los MMPs y TIMPs por los diferentes tipos celulares en la FT y en los ganglios axilares en 59 carcinomas mamarios.

MMPs y TIMPs		FT	GC	GNC
MMP1	CT	57(95)	12 (20)	6 (10)
	CMI	25 (41,7)	26 (43,3)	29 (48,3)
	FB	25 (41,7)	0 (0)	1 (1,7)
MMP7	CT	52(86,7)	10 (16,7)	3 (5)
	CMI	11 (18,3)	11 (18,3)	14 (23,3)
	FB	15 (25)	0 (0)	0 (0)
MMP13	CT	51 (85)	9 (15)	-
	CMI	15 (25)	33 (55)	-
	FB	6 (10)	0 (0)	-
TIMP1	CT	42 (70)	10 (16,7)	-
	CMI	6 (10)	28 (46,7)	-
	FB	6 (10)	0 (0)	-

Los valores están representados como el número (porcentaje) de casos positivos. Abreviaturas: CT, célula tumoral; CMIs, células mononucleares inflamatorias; FB, fibroblastos; FT, Frontera tumoral; GC, Ganglio centinela; GNC, Ganglio no centinela.

4.3. Relación entre la expresión de los diferentes factores en la frontera tumoral y la afectación neoplásica del ganglio centinela.

Las relaciones entre todos los factores evaluados en la frontera tumoral y la afectación tumoral del ganglio centinela se representan en la tabla 4.3.

Como se puede apreciar en ésta tabla, el conteo de vasos linfáticos en la frontera tumoral no se relacionó significativamente con la afectación del ganglio centinela. Sin embargo, existió una asociación significativa entre la invasión linfática tumoral en la frontera tumoral y la afectación neoplásica de los ganglios centinelas ($p=0,044$).

Ninguna de las expresiones de las MMPs en la frontera tumoral por los diferentes tipos celulares se asoció significativamente con la afectación del ganglio centinela. Sin embargo, la expresión de TIMP1, tanto por las células tumorales como por los CIMs o fibroblastos del estroma tumoral, se asoció negativamente y de forma significativa ($p=0,006$, $p=0,025$ y $p=0,025$, respectivamente) con la afectación tumoral del ganglio centinela.

Por el contrario, resultó llamativo comprobar como un número más elevado de CIMs CD68-positivas, o de CIMs CD138-positivas, se asociaron significativamente ($p=0,012$ y $p=0,017$, respectivamente), y de forma positiva, con la afectación tumoral de los ganglios centinela en el cáncer de mama.

Tabla 4.3. Relación entre la expresión de los diferentes factores en la FT y la afectación del GC en 59 carcinomas mamarios.

Factores a estudio		GC no afectado	GC afectado	Valor de <i>p</i>
Densidad vasos		9 (45)	19 (48,7)	1,000
Invasión linfática		3 (15)	18 (45)	0,044
MMP1	CT	20 (100)	37 (100)	-
	CMI	10 (50)	15 (40,5)	0,684
	FB	12 (60)	13 (35,1)	0,127
MMP7	CT	18 (90)	34 (91,9)	1,000
	CMI	4 (20)	7 (18,9)	1,000
	FB	7 (35)	8 (21,6)	0,436
MMP13	CT	16 (84,2)	35 (92,1)	0,647
	CMI	6 (31,6)	9 (23,7)	0,750
	FB	4 (21,1)	2 (5,3)	0,170
TIMP1	CT	19 (100)	23 (62,2)	0,006
	CMI	5 (26,3)	1 (2,7)	0,025
	FB	5 (26,3)	1 (2,7)	0,025
CD68		6 (30)	26 (68,4)	0,012
CD138		4 (20)	21 (56,8)	0,017
CD3		18 (90)	28 (70)	0,75
CD20		7 (35)	12 (30)	0,54

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje) positivos, salvo la Densidad de vasos, que son número (porcentaje) de casos por encima de la mediana. Abreviaturas: CT, célula tumoral; CMI, célula mononuclear inflamatoria; FB, fibroblastos; GC, Ganglio centinela.

4.4. Relación entre la expresión de los diferentes factores en la frontera tumoral y la afectación de los ganglios no centinela.

En la tabla 4.4 se representan las relaciones entre la expresión de los diferentes factores en la frontera tumoral y la afectación tumoral de los ganglios no centinela.

De todos los factores analizados, encontramos que solo la expresión de TIMP1 por las células tumorales y la invasión linfática tumoral en la frontera tumoral se asociaron significativamente con la afectación tumoral de los ganglios no centinela.

La expresión de TIMP1 por las células tumorales se asoció de forma negativa con la afectación de los ganglios no centinela ($p=0,015$), mientras que la invasión linfática tumoral en la frontera tumoral se asoció positivamente con la afectación de los ganglios no centinela ($p=0,005$).

No se han encontrado relaciones significativas entre la expresión de otros factores en la frontera tumoral y la afectación de los ganglios no centinela.

Tabla 4.4. Relación entre la expresión de diferentes factores en la frontera tumoral y la afectación tumoral de los ganglios no centinela en 59 carcinomas mamarios.

Factores a estudio		GNC no afectado Nº CM=40	GNC afectado Nº CM=19	Valor de <i>p</i>
Densidad vasos		20 (50)	8 (42,1)	0,773
Invasión linfática		9 (22)	12 (63,2)	0,005
MMP1	CT	39 (100)	18 (100)	-
	CMI	20 (51,3)	5(27,8)	0,169
	FB	20 (51,3)	5 (27,8)	0,169
MMP7	CT	36 (94,7)	16 (84,2)	0,408
	CMI	9 (23,7)	2 (10,5)	0,406
	FB	13 (34,2)	2 (10,5)	0,111
MMP13	CT	35 (92,1)	16 (84,2)	0,647
	CMI	12 (31,6)	3 (15,8)	0,339
	FB	5 (13,2)	1 (5,3)	0,647
TIMP1	CT	32 (86,5)	10 (52,6)	0,015
	CMI	5 (13,5)	1 (5,3)	0,625
	FB	5 (13,5)	1 (5,3)	0,625
CD68		20 (51,3)	12 (63,2)	0,567
CD138		17 (43,6)	8 (44,4)	1,000
CD3		33 (80,5)	13(68,5)	0,555
CD20		15(36,6)	4(21)	0,461

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje) positivos, salvo la Densidad de vasos, que son número (porcentaje) de los casos por encima de la mediana.

Abreviaturas: CM, carcinoma mamario; CT, célula tumoral; CMIs, células mononucleares inflamatorias; FB, fibroblastos; GNC, Ganglio no centinela.

4.5. Relación entre la expresión de los diferentes factores en el ganglio centinela con afectación neoplásica y la afectación de los ganglios no centinela.

En la tabla 4.5.1 se recogen las relaciones entre los factores en el ganglio centinela neoplásico y la afectación tumoral de los ganglios no centinela.

De todos los factores, tan solo la expresión de MMP1 por las CMIs peritumorales del ganglio centinela se asoció significativamente con la afectación tumoral de los ganglios no centinela ($p=0,001$).

Para la evaluación de relación entre la expresión de los factores CD3 y CD20 en el ganglio centinela neoplásico y la afectación de los ganglios no centinela, se ha calculado la relación entre ambos. Como se aprecia en la tabla 4.5.2, no se han obtenido asociaciones significativas.

Tabla 4.5.1. Relación entre la expresión de diferentes factores en el GC con afectación tumoral y la afectación de los GNC en 39 carcinomas mamarios.

Factores a estudio		GNC no afectado Nº CM=20	GNC afectado Nº CM=19	Valor de <i>p</i>
CD68		18 (94,7)	16 (88,9)	0,961
CD138		13 (65)	7 (41,2)	0,264
MMP1	CT	4 (30,8)	8 (47,1)	0,599
	CMI	4 (30,8)	16 (94,1)	0,001
	FB	0 (0)	0 (0)	-
MMP7	CT	4 (20)	6 (33,3)	0,573
	CMI	6 (30)	4 (22,2)	0,861
	FB	0 (0,0)	0 (0,0)	-
MMP13	CT	3 (14,3)	6 (31,6)	0,353
	CMI	13 (61,9)	12 (63,2)	1
	FB	0 (0)	0 (0)	-
TIMP1	CT	4 (19)	5 (26,3)	0,865
	CMI	13 (61,9)	11 (57,9)	1
	FB	0 (0)	0 (0)	-

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje) positivos.

Abreviaturas: CM, carcinoma mamario; CT, célula tumoral; CMIs, células mononucleares inflamatorias; FB, fibroblastos; GC, Ganglio centinela; GNC, Ganglio no centinela.

Tabla 4.5.2. Relación de la expresión de CD3 y CD20 en el GC neoplásico y la afectación de GNC en 39 carcinomas mamarios.

Tipo de relación	GNC no afectado Nº CM=20	GNC afectado Nº CM=19	Valor de <i>p</i>
CD3/CD20	7 (33,3)	9 (47,4)	0,561
CD20/CD3	15 (71,4)	9 (47,4)	0,219

Los valores están representados como el número (porcentaje) de casos por encima de la mediana.

Abreviaturas: CM, carcinoma mamario; GC, Ganglio centinela; GNC, Ganglio no centinela.

4.6 Análisis de la concordancia entre la expresión de los distintos factores en la frontera tumoral y en el ganglio centinela.

En el presente estudio también evaluamos la posible concordancia entre la expresión de los factores que fueron determinados a la vez en la frontera tumoral y en los ganglios centinela, relacionando si el ganglio centinela tenía afectación tumoral o no.

Las tablas de 4.6.1 a 4.6.17 representan relaciones entre la expresión de los diferentes factores en la frontera tumoral y en los ganglios centinela con y sin afectación tumoral. No hemos encontrado una concordancia significativa entre las expresiones de éstos factores en la frontera tumoral y en los GC con o sin afectación neoplásica.

Tabla 4.6.1. Relación entre la expresión de CD68 en la FT y en GC sin afectación tumoral.

CD68		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	6(37,5)	4 (25)	10(62,5)
	Positivos	0(0)	6(37,5)	6(37,5)
Total		6(37,5)	10(62,5)	16(100)

$P=0,062$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.2. Relación entre la expresión de CD68 en la FT y en GC con afectación tumoral.

CD68		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	0(0)	10 (28,6)	10(28,6)
	Positivos	2(5,7)	23(65,7)	25(71,4)
Total		2(5,7)	33(94,3)	35(100)

$P=0,908$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.3. Relación entre la expresión de CD138 en la FT y en GC sin afectación tumoral.

CD138		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	6(37,5)	6(37,5)	12(75)
	Positivos	3(18,8)	1(6,3)	4(25)
Total		9(56,3)	7(43,8)	16(100)

$P=0,771$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.4. Relación entre la expresión de CD138 en la FT y en GC con afectación tumoral.

CD138		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	9(26,5)	5(14,7)	14(41,2)
	Positivos	6(17,6)	14(41,2)	20(58,8)
Total		15(44,1)	19(55,9)	34(100)

$P=0,103$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.5. Relación entre la expresión de MMP1 por las CMIs en la FT y en GC con afectación tumoral.

MMP1 - CMI		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	4(13,8)	14(48,3)	18(62,1)
	Positivos	6(20,7)	5(17,2)	11(37,9)
Total		10(34,5)	19(65,5)	29 (100)

$P=0,169$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.6. Relación entre la expresión de MMP7 por las CT en la FT y en GC con afectación tumoral.

MMP7 - CT		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	3(8,6)	0 (0)	3(8,6)
	Positivos	22(62,9)	10(28,6)	32 (91,4)
Total		25(71,4)	10(28,6)	35(100)

$p=0,633$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CT, célula tumoral; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.7. Relación entre la expresión de MMP7 por las CMI en la FT y en GC con afectación tumoral.

MMP7 - CMI		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	22(62,9)	6(17,1)	28(80)
	Positivos	4(11,4)	3(8,6)	7(20)
Total		26(74,3)	9(25,7)	35 (100)

$P=0,499$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.8. Relación entre la expresión de MMP13 por las CT en la FT y en GC con afectación tumoral.

MMP13 - CT		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	1(2,6)	2 (5,3)	3(7,9)
	Positivos	28(73,7)	7(18,4)	35(92,1)
Total		29(76,3)	9(23,7)	38(100)

$P=0,264$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CT, célula tumoral; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.9. Relación entre la expresión de MMP13 por las CMI en la FT y en GC sin afectación tumoral

MMP13 - CMI		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	6(42,9)	3 (21,4)	9(64,3)
	Positivos	1(7,1)	4(28,6)	5(35,7)
Total		7(50)	7(50)	14(100)

$P=0,265$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.10. Relación entre la expresión de MMP13 por las CMI en la FT y en GC con afectación tumoral

MMP13 - CMI		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	13(34,2)	16 (42,1)	29(76,3)
	Positivos	2(5,3)	7(18,4)	9(23,7)
Total		15(39,5)	23(60,5)	38(100)

$P=0,411$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral

Tabla 4.6.11. Relación entre la expresión de TIMP1 por las CT en la FT y en GC con afectación tumoral.

TIMP1 - CT		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	12(32,4)	2 (5,4)	14(37,8)
	Positivos	16(43,2)	7(18,9)	23(62,2)
Total		28(75,7)	9(24,3)	37(100)

$P=0,474$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CT, célula tumoral; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.12. Relación entre la expresión de TIMP1 por las CMI en la FT y en GC sin afectación tumoral.

TIMP1 - CMI		GC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
FT	Negativos	6(42,9)	3(21,4)	9(64,3)
	Positivos	5(35,7)	0(0)	5(35,7)
Total		11(78,6)	3(21,4)	14(100)

$P=0,437$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.13. Relación entre la expresión de TIMP1 por las CMI en la FT y en GC con afectación tumoral.

TIMP1 - CMI		GC		Total
FT	casos	Negativos	Positivos	
	Negativos	14(37,8)	22 (59,5)	36(97,3)
	Positivos	1(2,7)	0(0)	1(2,7)
Total		15(40,5)	22(59,5)	37(100)

$P=0,845$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; FT, frontera tumoral.

Tabla 4.6.14. Relación entre la expresión de CD3 en la FT y GC sin afectación tumoral.

CD3		GC		Total
FT	casos	< Mediana	> Mediana	
	Negativos	1(7,7)	0(0)	1(7,7)
	Positivos	9(69,2)	3(23,1)	12(92,3)
Total		10(76,9)	3(23,1)	13(100)

$P=0,263$.

Los valores están presentados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.
Abreviaturas: FT, frontera tumoral; GC, ganglio centinela.

Tabla 4.6.15. Relación entre la expresión de CD3 en la FT y GC con afectación tumoral.

CD3		GC		Total
FT	casos	< Mediana	> Mediana	
	Negativos	3(7,7)	9(0)	12(7,7)
	Positivos	13(69,2)	14(23,1)	27(92,3)
Total		16(76,9)	23(23,1)	39(100)

$P=0,397$.

Los valores están presentados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.
Abreviaturas: FT, frontera tumoral; GC, ganglio centinela.

Tabla 4.6.16. Relación entre la expresión de CD20 en la FT y GC sin afectación tumoral.

CD20		GC		Total
	casos	< Mediana	> Mediana	
FT	Negativos	2(15,4)	6(46,2)	8(61,5)
	Positivos	1(7,7)	4(30,4)	5(38,5)
Total		3(23,1)	10(76,9)	13(100)

$P=0,630$.

Los valores están presentados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.
Abreviaturas: FT, frontera tumoral; GC, ganglio centinela.

Tabla 4.6.17. Relación entre la expresión de CD20 en la FT y GC con afectación tumoral.

CD20		GC		Total
	casos	< Mediana	> Mediana	
FT	Negativos	16(40)	12(30)	28(70)
	Positivos	7(17,5)	4(12,5)	11(30)
Total		23(57,5)	16(42,5)	39(100)

$P=0,635$.

Los valores están presentados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.
Abreviaturas: FT, frontera tumoral; GC, ganglio centinela.

4.7. Análisis de concordancia de la expresión de los distintos factores en el ganglio centinela y los ganglios no centinela.

En el presente estudio también evaluamos la posible concordancia entre la expresión de los diferentes factores que fueron determinados a la vez en el ganglio centinela y en los ganglios no centinela, relacionando si el ganglio no centinela tenía afectación tumoral o no.

Las tablas de 4.7.1 a 4.7.11 representan relaciones entre la expresión de los diferentes factores en el ganglio centinela y ganglio no centinela, según la afectación neoplásica o no de GC.

Como se puede apreciar en las tablas, no hemos encontrado una correlación significativa de expresión de ninguno de los factores en el GC con o sin afectación tumoral y GNC.

Tabla 4.7.1. Relación entre la expresión de MMP1 por las CMI en GC sin afectación tumoral y en GNC.

MMP1 - CMI		GNC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
GC	Negativos	6(50)	2 (16,7)	8(66,7)
	Positivos	1(8,3)	3(25)	4(33,3)
Total		7(58,3)	5(41,7)	12(100)

$P=0,301$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.2. Relación entre la expresión de MMP1 por las CMI en el GC con afectación tumoral y en GNC.

MMP1 - CMI		GNC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
GC	Negativos	4(14,3)	6 (21,4)	10(35,7)
	Positivos	6(21,4)	12(42,9)	18(64,3)
Total		10(35,7)	18(64,3)	28(100)

$P=1$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.3. Relación entre la expresión de MMP7 por las CMI en el GC con afectación tumoral y en GNC.

MMP7 - CMI		GNC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
GC	Negativos	21(58,3)	7 (19,4)	28(77,8)
	Positivos	5(13,9)	3(8,3)	8(22,2)
Total		26(72,2)	10(27,8)	36(100)

$P=0,804$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: CMI, célula mononuclear inflamatoria; GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.4. Relación entre la expresión de CD68 en el GC sin afectación tumoral y en GNC.

CD68		GNC		Total
GC	casos	Negativos	Positivos	
	Negativos	3(23,1)	3(23,1)	6(46,2)
	Positivos	1(7,7)	6(46,2)	7(53,8)
Total		4(30,8)	9(69,2)	13(100)

$P=0,431$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.5. Relación entre la expresión de CD68 en el GC con afectación tumoral y en GNC.

CD68		GNC		Total
GC	casos	Negativos	Positivos	
	Negativos	0(0)	3 (8,1)	3(8,1)
	Positivos	4(10,8)	30(81,1)	34(91,9)
Total		4(10,8)	33(89,2)	50(100)

$P=1$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.6. Relación entre la expresión de CD138 en el GC sin afectación tumoral y en GNC.

CD138		GNC		Total
GC	casos	Negativos	Positivos	
	Negativos	6(46,2)	2 (15,4)	8(61,5)
	Positivos	3(23,1)	2 (15,4)	5(38,5)
Total		9(69,2)	4 (30,8)	13(100)

$P=1$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela

Tabla 4.7.7. Relación entre la expresión de CD138 en el GC con afectación tumoral y en GNC.

CD138		GNC		Total
	casos	Negativos	Positivos	
GC	Negativos	11(29,7)	6 (16,2)	17(45,9)
	Positivos	12(32,4)	8(21,6)	20(54,1)
Total		23(62,2)	14(37,8)	37(100)

$P=1$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela

Tabla 4.7.8. Relación entre la expresión de CD3 en GC sin afectación tumoral y en GNC.

CD3		GNC		Total
	casos	< mediana	>mediana	
GC	<mediana	7(58,3)	3(25)	10(83,3)
	>mediana	1(8,3)	1(8,3)	2(16,7)
Total		8(66,7)	4(33,3)	12(100)

$P=1$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.
Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.9. Relación entre la expresión de CD3 en GC con afectación tumoral y en GNC.

CD3		GNC		Total
	casos	< mediana	>mediana	
GC	<mediana	6(16,2)	8(21,6)	14(37,8)
	>mediana	11(29,7)	12(32,4)	23(62,2)
Total		17(45,9)	20(54,1)	37(100)

$P=1$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.
Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.10. Relación entre la expresión de CD 20 en GC sin afectación tumoral y GNC.

CD20		GNC		Total
GC	casos	<mediana	>mediana	
	<mediana	1(8,3)	1 (8,3)	2(16,6)
	>mediana	3(25)	7(58,3)	10(83,3)
Total		4(33,3)	8(66,7)	12(100)

$P=1$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.

Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.7.11. Relación entre la expresión de CD 20 en GC con afectación tumoral y GNC.

CD20		GNC		Total
GC	casos	<mediana	>mediana	
	<mediana	10(27)	11(29,7)	21(56,8)
	>mediana	11(29,7)	5(13,5)	16(43,2)
Total		21(56,8)	16(43,2)	37(100)

$P=0,342$.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje) de acuerdo a la mediana.

Abreviaturas: GC, ganglio centinela; GNC, ganglio no centinela.

4.8. Análisis de las combinaciones de diferentes factores en la frontera tumoral que pueden predecir la afectación tumoral de los ganglios centinela.

Tras evaluar las posibles combinaciones de distintos factores en la frontera tumoral, encontramos algunas de ellos que de forma significativa se relacionan con la afectación tumoral de los ganglios centinela.

Las combinaciones de la expresión de factores: la positividad de CD68 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral; la positividad de CD138 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral; la positividad de CD68 y negatividad de TIMP1 en las CMIs en la frontera tumoral; la positividad de CD138 y la negatividad de TIMP1 en las CMIs en la frontera tumoral; la positividad de CD3 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral; la positividad de CD68 y positividad CD138 en la frontera tumoral; se han relacionado positivamente y de forma llamativa con la afectación del GC ($p < 0,01$, para todas éstas combinaciones.)(Tablas 4.8.1, 4.8.2, 4.8.3, 4.8.4, 4.8.5 y 4.8.6, respectivamente).

También fue relacionado positivamente y de forma significativa la combinación de los factores: la positividad de CD3+ y positividad de CD68 en la frontera tumoral($p=0,011$); la positividad de CD3 y negatividad de TIMP1 en las CMIs en la frontera tumoral($p=0,019$); la negatividad de CD20 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral($p=0,022$); la negatividad de CD20 y positividad de CD68 en la frontera tumoral($p=0,029$), la positividad de CD3 y positividad de CD138 en la frontera tumoral($p=0,03$), con la afectación del GC (Tablas 4.8.7, 4.8.8, 4.8.9, 4.8.10, 4.8.11, respectivamente).

Otras combinaciones de expresión de los factores en la frontera tumoral no han demostrado relación con la afectación de GC (Tablas 4.8.12, 4.8.13, 4.8.14, 4.8.15, 4.8.16, 4.8.17 y 4.8.18).

De todas las combinaciones analizadas, en la frontera tumoral, las más destacadas para predecir la afectación de los GC fueron:

- ✓ La combinación de CD68+/TIMP1 (CT)-, ($p=0,001$), que mostró una sensibilidad del 27,78%, especificidad del 100% y de un valor predictivo negativo del 100%.

- ✓ La combinación de CD138+/TIMP1 (CT)-, ($p=0,002$), que mostró una sensibilidad del 25,71%, especificidad del 100% y de un valor predictivo negativo del 100%.

Tabla 4.8.1. Relación de combinaciones de expresión de CD68 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD68-/TIMP1-	0(0)	4(7,3)	4(7,3)
CD68-/TIMP1+	13(23,6)	7(12,7)	20(36,4)
CD68+/TIMP1-	0(0)	10(18,2)	10(18,2)
CD68+/TIMP1+	6(10,9)	15(27,3)	21(38,2)
Total	19(34,5)	36(65,5)	55(100)

P=0,001

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.2. Relación de combinaciones de expresión de CD138 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD138-/TIMP1-	0(0)	5(9,3)	5(9,3)
CD138-/TIMP1+	15(27,8)	10(18,5)	25(46,3)
CD138+/TIMP1-	0(0)	9(16,7)	9(16,7)
CD138+/TIMP1+	4(7,4)	11(20,4)	15(27,8)
Total	19(35,2)	35(64,8)	54(100)

P=0,002

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.3. Relación de combinaciones de expresión de CD68 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD68-/TIMP1-	10(18,2)	10(18,2)	20(36,4)
CD68-/TIMP1+	3(5,5)	0(0)	3(5,5)
CD68+/TIMP1-	4(7,3)	24(43,6)	28(50,9)
CD68+/TIMP1+	2(3,6)	2(3,6)	4(7,3)
Total	19(34,5)	36(65,5)	55(100)

P=0,004

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.4. Relación de combinaciones de expresión de CD138 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD138-/TIMP1-	10(18,5)	14(25,9)	24(44,4)
CD138-/TIMP1+	5(9,3)	1(1,9)	6(11,1)
CD138+/TIMP1-	4(7,4)	20(37)	24(44,4)
Total	19(35,2)	35(64,8)	54(100)

P=0,006

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.5. Relación de combinaciones de expresión de CD3 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD3-/TIMP1-	0(0)	2(3,6)	2(3,6)
CD3-/TIMP1+	2(3,6)	7(12,5)	9(16,1)
CD3+/TIMP1-	0(0)	12(21,4)	12(21,4)
CD3+/TIMP1+	17(30,4)	16(28,6)	33(58,9)
Total	19(33,9)	37(66,1)	56(100)

P=0,006

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela

Tabla 4.8.6. Relación de combinaciones de expresión de CD68 y CD138 en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD68-/CD138-	11(19,2)	7(12,3)	18(31,5)
CD68-/CD138+	3(5,3)	5(8,8)	8(14,1)
CD68+/CD138-	5(8,7)	9(15,8)	14(24,5)
CD68+/CD138+	1(1,8)	16(28,1)	17(29,9)
Total	20(35,2)	37(65)	57(100)

P=0,008.

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.7. Relación de combinaciones de expresión de CD3 y CD68 en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD3-/CD68-	1(1,6)	4(6,9)	5(8,6)
CD3-/CD68+	1(1,7)	7(12,1)	8(13,8)
CD3+/CD68-	13(22,4)	8(13,8)	21(36,2)
CD3+/CD68+	5(8,6)	19(32,8)	24(41,4)
Total	20(34,5)	38(65,5)	58(100)

P=0,011

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela

Tabla 4.8.8. Relación de combinaciones de expresión de CD3 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD3-/TIMP1-	2(3,6)	9(16,1)	11(19,6)
CD3+/TIMP1-	12(21,4)	27(48,2)	39(69,6)
CD3+/TIMP1+	5(8,9)	1(1,8)	6(10,7)
Total	19(33,9)	37(66,1)	56(100)

P=0,019

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.9. Relación de combinaciones de expresión de CD20 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD20-/TIMP1-	0(0)	11(19,6)	11(19,6)
CD20-/TIMP1+	12(21,4)	14(25)	26(46,4)
CD20+/TIMP1-	0(0)	3(5,4)	3(5,4)
CD20+/TIMP1+	7(12,5)	9(16,1)	16(28,6)
Total	19(33,9)	37(66,1)	56(100)

P=0,022

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.10. Relación de combinaciones de expresión de CD20 y CD68 en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD20-/CD68-	11(19)	10(17,2)	21(36,2)
CD20-/CD68+	2(3,4)	16(27,6)	18(31)
CD20+/CD68-	3(5,2)	2(3,4)	5(8,6)
CD20+/CD68+	4(6,9)	10(17,2)	14(24,1)
Total	20(34,5)	38(65,5)	58(100)

P=0,029

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.11. Relación de combinaciones de expresión de CD3 y CD138 en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD3-/CD138-	2(3,5)	4(7)	6(10,5)
CD3-/CD138+	0(0)	6(10,5)	6(10,5)
CD3+/CD138-	14(24,6)	12(21,1)	26(45,6)
CD3+/CD138+	4(7)	15(26,3)	19(33,3)
Total	20(35,1)	37(64,9)	57(100)

P=0,03

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela

Tabla 4.8.12. Relación de combinaciones de expresión de CD3 y CD20 en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD3-/CD20-	2(3,4)	9(15,3)	11(18,6)
CD3-/CD20+	0(0)	3(5,1)	3(5,1)
CD3+/CD20-	11(18,6)	19(30,5)	30(42,2)
CD3+/CD20+	7(11,9)	9(15,3)	16(27,1)
Total	20(33,9)	39(66,1)	59(100)

$P=0,312$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.13. Relación de combinaciones de expresión de CD20 y CD138 en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD20-/CD138-	11(19,3)	12(21,1)	23(40,4)
CD20-/CD138+	2(3,5)	13(22,8)	15 (26,3)
CD20+/CD138-	5(8,8)	4(7)	9(15,8)
CD20+/CD138+	2(3,5)	8(14)	10(17,5)
Total	20(35,1)	37(64,9)	57(100)

$P=0,06$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela

Tabla 4.8.14. Relación de combinaciones de expresión de CD20 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD20-/TIMP1-	10(17,9)	25(44,6)	35(62,5)
CD20-/TIMP1+	2(3,6)	0(0)	2(3,6)
CD20+/TIMP1-	4(7,1)	11(19,6)	15(26,8)
CD20+/TIMP1+	3(5,4)	1(1,8)	4(7,1)
Total	19(33,9)	37(66,1)	56(100)

$P=0,053$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.15. Relación de combinaciones de expresión de CD3 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD3-/TIMP1-	1(2,3)	6(13,6)	7(15,9)
CD3+/TIMP1-	13(29,5)	24(54,5)	37(84,1)
Total	14(31,8)	30(68,2)	44(100)

$P=0,520$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).

Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.16. Relación de combinaciones de expresión de CD20 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD20-/TIMP1-	9(20,5)	22(50)	31(70,5)
CD20+/TIMP1-	5(11,4)	8(18,2)	13(29,5)
Total	14(31,8)	30(68,2)	44(100)

$P=0,540$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.17. Relación de combinaciones de expresión de CD68 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD68-/TIMP1-	9(20,9)	10(23,3)	19(44,2)
CD68+/TIMP1-	5(11,6)	19(44,2)	24(55,8)
Total	14(32,6)	29(67,4)	43(100)

$P=0,129$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

Tabla 4.8.18. Relación de combinaciones de expresión de CD138 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GC.

Grupos	GC no afectado	GC afectado	Total
CD138-/TIMP1-	10(23,8)	10(23,8)	20(47,6)
CD138+/TIMP1-	4(9,5)	18(42,9)	22(52,4)
Total	14(33,3)	28(66,7)	42(100)

$P=0,063$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GC, ganglio centinela.

4.9. Análisis de las combinaciones de expresión de los distintos factores en la frontera tumoral que pueden predecir la afectación tumoral de GNC.

En éste estudio también hemos realizado análisis de las combinaciones de distintos factores en la frontera tumoral para predecir la afectación del ganglio no centinela.

Hemos encontrado que se han relacionado negativamente y de forma significativa ($P < 0,01$) las combinaciones de expresión de factores de negatividad de CD138 en la frontera tumoral y negatividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral; negatividad de CD68 en la frontera tumoral y negatividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral, con la afectación de GNC (Tablas 4.9.1 y 4.9.2, respectivamente). También se ha relacionado negativamente y de forma significativa la combinación de expresión de factores positividad de CD3 en la frontera tumoral y positividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral ($p = 0,011$); negatividad de CD20 en la frontera tumoral y positividad de TIMP1 en las células tumorales en la frontera tumoral ($p = 0,22$), con la afectación del GNC (Tablas 4.9.3 y 4.9.4, respectivamente).

El resto de las combinaciones de expresión de factores en la frontera tumoral no se han relacionado con la afectación del GNC (Tablas de 4.9.5 a 4.9.17).

De todas las combinaciones de factores, analizadas en la frontera tumoral, las más destacadas para predecir la afectación tumoral de los ganglios no centinela fueron:

- ✓ La combinación CD138-/TIMP1 (CT)-, ($p = 0,05$), con una sensibilidad del 27.78%, especificidad del 100% y un valor predictivo negativo del 100%.
- ✓ La combinación CD68-/TIMP1 (CT)-, ($p = 0,07$), con una sensibilidad del 21.05 %, especificidad del 100 % y un valor predictivo negativo del 100 %.

Tabla 4.9.1. Relación de combinación de expresión de CD138 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD138-/TIMP1-	0(0)	5(9,3)	5(9,3)
CD138-/TIMP1+	20(37)	5(9,3)	25(46,3)
CD138+/TIMP1-	5(9,3)	4(7,4)	9(16,7)
CD138+/TIMP1+	11(20,4)	4(7,4)	15(27,8)
Total	36(66,7)	18(33,3)	54(100)

P=0,005

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.2. Relación de combinación de expresión de CD68 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD68-/TIMP1-	0(0)	4(7,3)	4(7,3)
CD68-/TIMP1+	17(30,9)	3(5,5)	20(36,4)
CD68+/TIMP1-	5(9,1)	5(9,1)	10(18,2)
CD68+/TIMP1+	14(25,5)	7(12,7)	21(38,2)
Total	36(65,5)	19(34,5)	55(100)

P=0,007

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.3. Relación de combinación de expresión de CD3 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD3-/TIMP1-	0(0)	2(3,6)	2(3,6)
CD3-/TIMP1+	5(8,9)	4(7,1)	9(16,1)
CD3+/TIMP1-	5(8,9)	7(12,5)	12(21,4)
CD3+/TIMP1+	27(48,2)	6(10,7)	33(58,9)
Total	37(66,1)	19(33,9)	56(100)

P=0,011

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.4. Relación de combinación de expresión de CD20 y TIMP1 en CT en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD20-/TIMP1-	3(5,4)	8(14,3)	11(19,6)
CD20-/TIMP1+	19(33,9)	7(12,5)	26(46,4)
CD20+/TIMP1-	2(3,6)	1(1,8)	3(5,4)
CD20+/TIMP1+	13(23,2)	3(5,4)	16(28,6)
Total	37(66,1)	19(33,9)	56(100)

P=0,022

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.5. Relación de combinación de expresión de CD3 y CD20 en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD3-/CD20-	6(10)	5(8,3)	11(18,3)
CD3-/CD20+	2(3,3)	1(1,7)	3(5)
CD3+/CD20-	20(33,3)	10(16,7)	30(50)
CD3+/CD20+	13(21,7)	3(5)	16(26,7)
Total	41(68,3)	19(31,7)	60(100)

$P=0,524$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.6. Relación de combinación de expresión de CD3 y CD68 en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD3-/CD68-	3(5,2)	2(3,4)	5(8,6)
CD3-/CD68+	4(6,9)	4(6,9)	8(13,8)
CD3+/CD68-	16(27,6)	5(8,6)	21(36,2)
CD3+/CD68+	16(27,6)	8(13,8)	24(41,4)
Total	39(67,2)	19(32,8)	58(100)

$P=0,580$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.7. Relación de combinación de expresión de CD20 y CD68 en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD20-/CD68-	14(24,1)	7(12,1)	21(36,2)
CD20-/CD68+	10(17,2)	8(13,8)	18(31)
CD20+/CD68-	5(8,6)	0(0)	5(8,6)
CD20+/CD68+	10(17,2)	4(6,9)	14(24,1)
Total	39(67,2)	19(32,8)	58(100)

$P=0,300$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.8. Relación de combinación de expresión de CD3 y CD138 en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD3-/CD138-	4(7)	2(3,5)	6(10,5)
CD3-/CD138+	3(5,3)	3(4,3)	6(10,5)
CD3+/CD138-	18(31,6)	8(14)	26(45,6)
CD3+/CD138+	14(24,6)	5(8,8)	19(33,3)
Total	39(68,4)	18(31,6)	57(100)

$P=0,752$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.9. Relación de combinación de expresión de CD20 y CD138 en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD20-/CD138-	15(26,3)	8(14)	23(40,4)
CD20-/CD138+	9(15,8)	6(10,5)	15(26,3)
CD20+/CD138-	7(12,3)	2(3,5)	9(15,8)
CD20+/CD138+	8(14)	2(3,5)	10(17,5)
Total	39(68,4)	18(31,6)	57(100)

$P=0,662$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.10. Relación de combinación de expresión de CD3 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD3-/TIMP1-	5(8,9)	6(10,7)	11(19,6)
CD3+/TIMP1-	27(48,2)	12(21,4)	39(69,6)
CD3+/TIMP1+	5(8,9)	1(1,8)	6(10,7)
Total	37(66,1)	19(33,9)	56(100)

$P=0,217$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.11. Relación de combinación de expresión de CD20 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD20-/TIMP1-	20(35,7)	15(26,8)	35(62,5)
CD20-/TIMP1+	2(3,6)	0(0)	2(3,6)
CD20+/TIMP1-	12(21,4)	3(5,4)	15(26,8)
CD20+/TIMP1+	3(5,4)	1(1,8)	4(7,1)
Total	37(66,1)	19(33,9)	56(100)

$P=0,294$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.12. Relación de combinación de expresión de CD68 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD68-/TIMP1-	14(25,5)	6(10,9)	20(36,4)
CD68-/TIMP1+	3(5,5)	0(0)	3(5,5)
CD68+/TIMP1-	17(30,9)	11(20)	28(50,9)
CD68+/TIMP1+	2(3,6)	2(3,6)	4(7,3)
Total	36(65,5)	19(34,5)	55(100)

$P=0,481$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.13. Relación de combinación de expresión de CD138 y TIMP1 en CMI en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD138-/TIMP1-	15(27,8)	9(16,7)	24(44,4)
CD138-/TIMP1+	5(9,3)	1(1,9)	6(11,1)
CD138+/TIMP1-	16(29,6)	8(14,8)	24(44,4)
Total	36(66,7)	18(33,3)	54(100)

$P=0,626$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.14. Relación de combinación de expresión de CD3 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD3-/TIMP1-	3(6,8)	4(9,1)	7(15,9)
CD3+/TIMP1-	24(54,5)	13(29,5)	37(84,1)
Total	27(61,4)	17(38,6)	44(100)

$P=0,501$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.15. Relación de combinación de expresión de CD20 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD20-/TIMP1-	18(40,9)	13(29,5)	31(70,5)
CD20+/TIMP1-	9(20,5)	4(9,1)	13(29,5)
Total	27(61,4)	17(38,6)	44(100)

$P=0,723$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.16. Relación de combinación de expresión de CD68 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD68-/TIMP1-	12(27,9)	7(16,3)	19(44,2)
CD68+/TIMP1-	14(32,6)	10(23,3)	24(55,8)
Total	26(60,5)	17(39,5)	43(100)

$P=0,994$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.9.17. Relación de combinación de expresión de CD138 y TIMP1 en FB en la FT y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD138-/TIMP1-	12(28,6)	8(19)	20(47,6)
CD138+/TIMP1-	14(33,3)	8(19)	22(52,4)
Total	26(61,9)	16(38,1)	42(100)

$P=1$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

4.10. Análisis de combinaciones de distintos factores en el ganglio centinela con afectación neoplásica que pueden predecir la afectación de los ganglios no centinela.

En éste trabajo también hemos planteado relacionar la combinación de expresión de distintos factores en el GC con afectación neoplásica y la afectación de GNC.

Las relaciones entre las combinaciones de la expresión los factores en el GC y la afectación de GNC, se detallan en las tablas 4.10.1 y 4.10.2. Como se puede apreciar, no se han encontrado relaciones significativas entre las combinaciones de factores en el GC con afectación tumoral y la afectación de los GNC.

Tabla 4.10.1. Relación de combinación de expresión de CD68 y CD138 en GC neoplásico y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD68-/CD138-	1(2,8)	2(5,6)	3(8,3)
CD68+/CD138-	5(13,9)	8(22,2)	13(36,1)
CD68+/CD138+	13(36,1)	7(19,4)	20(55,6)
Total	19(52,8)	17(47,2)	36(100)

$P=0,256$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

Tabla 4.10.2. Relación de combinación de expresión de CD3 y CD20 en GC neoplásico y la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD3-/CD20-	1(2,5)	4(10)	5(12,5)
CD3-/CD20+	5(12,5)	6(15)	11(27,5)
CD3+/CD20-	12(30)	6(15)	18(45)
CD3+/CD20+	3(7,5)	3(7,5)	6(15)
Total	21(52,5)	19(47,5)	40(100)

$P=0,284$

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

4.11. Análisis de combinaciones de distintos factores en la frontera tumoral y en el GC neoplásico que pueden predecir la afectación de los ganglios no centinelas.

Igualmente, nos hemos planteado combinar la expresión de los distintos factores en la frontera tumoral y en el GC neoplásico para predecir la afectación de los GNC.

Hemos encontrado la relación significativa de la combinación de la positividad de Invasión linfática en la frontera tumoral y positividad de la expresión de MMP1 por las CMIs en el GC neoplásico con la afectación de los GNC ($p=0,001$) (Tabla 4.11.1).

También se ha demostrado una relación significativa de la combinación de la positividad de CD68 Y CD138 en la frontera tumoral y positividad de la expresión de MMP1 por las CMIs en el GC neoplásico con la afectación de los GNC ($p=0,015$) (Tabla 4.11.2).

Tabla 4.11.1. Relación de combinación de la Invasión linfática en la FT y la expresión de MMP1 por las CMI en el GC neoplásico, con la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
IL-/MMP1-	6(20)	0(0)	6(20)
IL-/MMP1+	3(10)	5(16,7)	8(26,7)
IL+/MMP1-	3(10)	1(3,3)	4(13,3)
IL+/MMP1+	1(3,3)	11(36,7)	12(40)
Total	13(43,3)	17(56,7)	30(100)

P=0,001

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela; IL, invasión linfática.

Tabla 4.11.2. Relación de combinación de expresión de CD68 y CD138 en la FT y expresión de MMP1 por las CMI en el GC neoplásico, con la afectación de los GNC.

Grupos	GNC no afectado	GNC afectado	Total
CD68-/CD138-/MMP1-	1(3,6)	0(0)	1(3,6)
CD68-/CD138-/MMP1+	1(3,6)	4(14,3)	5(17,9)
CD68-/CD138+/MMP1+	1(3,6)	3(10,7)	4(14,3)
CD68+/CD138-/MMP1-	0(0)	1(3,6)	1(3,6)
CD68+/CD138-/MMP1+	0(0)	3(10,7)	3(10,7)
CD68+/CD138+/MMP1-	7(25)	0(0)	7(25)
CD68+/CD138+/MMP1+	2(7,1)	5(17,9)	7(25)
Total	12(42,9)	16(57,1)	28(100)

P=0,015

Los valores están representados como el número de casos (porcentaje).
Abreviaturas: GNC, ganglio no centinela.

V.DISCUSIÓN

En el presente estudio investigamos la expresión de diversos factores de importancia biológica en la frontera tumoral de los carcinomas mamarios invasivos, así como en los ganglios axilares. En total realizamos 590 determinaciones, lo que nos permitió encontrar algunos hallazgos nuevos de interés clínico sobre la metastatización axilar en el cáncer de mama.

Primeramente analizamos si la expresión de determinados factores en la frontera tumoral podría influir en la metastatización ganglionar. Esto parece lógico si consideramos que la frontera tumoral tiene una gran importancia biológica, pues es la zona donde tienen lugar las más importantes interacciones entre las células tumorales y las células del organismo huésped del tumor, lo que tiene una gran importancia biológica como zona origen de señales biológicas, que pueden influir en la progresión tumoral. Además, tenemos que considerar que en el estroma intratumoral existe una pérdida importante de los vasos linfáticos intratumorales en el cáncer de mama, y que los pocos existentes están colapsados debido a la gran presión existente en el tumor y, por tanto, no resultan funcionantes^{414, 415}. No obstante, otra situación diferente puede ocurrir en la frontera tumoral. En esta localización se ha descrito que los carcinomas mamarios muestran un incremento de la densidad de vasos linfáticos en relación con el tejido mamario normal⁴¹⁶, ya que existen factores liberados por los tumores que pueden propiciar el desarrollo extraordinario de esos vasos a partir de los preexistentes en el tejido mamario peritumoral, y así alterar la dinámica del flujo linfático.

Nuestros resultados mostraron una variabilidad en el conteo de vasos linfáticos en la periferia tumoral, lo que resulta indicativo de la heterogeneidad biológica de los carcinomas mamarios en cuanto su capacidad de inducir linfangiogénesis. A "priori" una mayor densidad de vasos linfáticos adyacentes a las células tumorales podría favorecer una mayor probabilidad de migración de las células cancerosas hacia los ganglios axilares. Sin embargo, aunque existió una tendencia positiva, nuestros resultados no mostraron una asociación significativa entre el conteo de los vasos linfáticos y la afectación tumoral de los ganglios axilares. Ello parece indicar que la mayor densidad de vasos linfáticos no es un factor lo suficientemente potente como para predecir la metastatización ganglionar en el cáncer de mama. Sin embargo, la invasión tumoral linfática en la

frontera tumoral si se relacionó significativamente con una mayor probabilidad de afectación del GC. Ello parece indicar que es más importante la capacidad invasiva de las células cancerosas que el número de vasos linfáticos de cara a conseguir el avance tumoral hacia los ganglios centinela en el cáncer de mama.

Por otra parte, ninguna de las expresiones de MMPs evaluadas en la frontera tumoral se asoció significativamente con la afectación tumoral del ganglio centinela. La expresión de MMPs, tanto en el centro tumoral como en la frontera tumoral, y tanto por las células cancerosas como por las células estromales (fibroblastos y CMIs), se han asociado con una mayor incidencia de desarrollo de metástasis a distancia⁴¹⁷. Ello parece debido a su papel en la degradación de la membrana basal y matriz extracelular, que son aspectos moleculares claves en la invasión tumoral y metástasis. Además, de otras acciones conocidas de las MMPs que pueden promover la progresión tumoral, como la angiogénesis.

Se han encontrado importantes asociaciones entre la expresión de algunas MMPs o TIMPs en el estroma intratumoral y el desarrollo de metástasis hematógenas²³⁸. No obstante, se ha señalado que el mecanismo de metástasis linfática ganglionar es diferente del proceso de metastatización hematógena en el cáncer de mama. Así por ejemplo, la expresión del MMP1 por las CMIs en el GC se ha asociado con la progresión tumoral a través del sistema linfático y afectación del resto de los ganglios axilares³⁴². Sin embargo, la expresión de esa metaloproteasa no se ha relacionado con el desarrollo de metástasis hematógenas en cáncer de mama²³⁸. Resulta también significativo que la expresión de TIMP1 se ha relacionado con el desarrollo de metástasis hematógenas en el cáncer de mama²³⁸.

Sin embargo, nuestros resultados indican que la expresión del TIMP1, tanto en las células cancerosas, como por los fibroblastos o las CIMs del estroma tumoral, se asocian negativamente y de forma significativa con la afectación tumoral del ganglio centinela. Como ya se ha señalado, los TIMPs son proteínas multifuncionales que, además de su papel inhibitor las MMPs, pueden promocionar la progresión tumoral a través de su efecto inductor de apoptosis²³⁸. No obstante, en nuestro caso, se asociación significativa y negativamente con la afectación de ganglio centinela, ello sugiere que los TIMPs pueden contribuir en

algún modo a proteger de la metastatización ganglionar mediante algún bloqueo enzimático de las MMPs.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la presencia elevada de células de CD68 positivas y CD138 positivas (macrófagos y células dendríticas, respectivamente), se relacionó con una mayor probabilidad de afectación tumoral de ganglio centinela.

Por un lado, la presencia elevada de macrófagos en la frontera tumoral se asoció significativamente con el desarrollo de metástasis hematógenas³³⁰. Algunos nuestros resultados también apuntan a que la infiltración elevada de este tipo de células inflamatorias se asocia con la metastatización ganglionar. Estas asociaciones, indicativas de que la infiltración tumoral de macrófagos se asocia con una mayor agresividad tumoral, está de acuerdo con diversos estudios que indican la asociación entre la infiltración de macrófagos y una mayor progresión tumoral. Así, se ha descrito que existe evidencia que apoya la hipótesis de que la inflamación participa en la provisión de condiciones que conducen al cáncer. Una inflamación sin resolver debido a cualquier el fracaso en el control preciso de la respuesta inmune puede continuar para perturbar el microambiente celular , lo que conduce a alteraciones en los genes relacionados con el cáncer y la modificación de las proteínas celulares cruciales involucradas en el ciclo celular , reparación del ADN y la apoptosis . Además, hay datos que indican que células inflamatorias y mediadores inmunomoduladores presentes en la progresión del tumor influyen el microambiente tumoral y la metástasis. Históricamente, leucocitos infiltrantes de tumor han sido considerados como manifestaciones de un mecanismo de defensa intrínseca contra el desarrollo tumores. Sin embargo, existe un aumento de la evidencia que indica que la infiltración de leucocitos puede promover fenotipos tumorales, tales como la angiogénesis, el crecimiento y la invasión. Esto puede ser debido a que las células inflamatorias probablemente pueden influir la promoción del cáncer mediante la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, quimiocinas y proteasas, que estimulan la proliferación y el potencial invasivo de las células cancerosas⁴¹⁸.

Un hallazgo interesante de nuestro estudio es el hecho de que la presencia más elevada de células dendríticas CD138 positivas en la frontera tumoral se

asocia con una mayor probabilidad de afectación de ganglio centinela en el cáncer de mama.

Desde su descubrimiento, se ha descrito que las células dendríticas son las principales células presentadores de los antígenos, desempeñando un papel central en la respuesta inmune. Ello se debe a su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos de forma óptima a los linfocitos T, y de generar respuestas inmunes específicas. De hecho, las células dendríticas estimulan a los linfocitos T de una manera más potente que los macrófagos o los linfocitos B. Su expresión de MHC (moléculas del complejo de histocompatibilidad) es entre 10 y 100 veces mayor que la de los linfocitos B⁴¹⁹.

No obstante, existen evidencias que indican que el papel de las células dendríticas en los tumores puede estar alterado. Así, por ejemplo, se ha descrito que las células tumorales de melanoma pueden producir ciertas citoquinas inmunosupresoras, como la IL-10 o IFN- γ , que pueden inducir un fenotipo inmunosupresor en las células dendríticas⁴²⁰⁻⁴²². Estas células expresan la enzima inmunosupresora Indolamina 2,3- dihidroxifenol (IDO), lo que condiciona una inhibición de la proliferación de las células T, tanto "in vitro"⁴²³ como "in vivo"⁴²⁴. En base a esa hipótesis, podríamos especular con que la ineficiencia de la acción antitumoral de las células dendríticas podría ocasionar un incremento de su reclutamiento en la frontera tumoral, y que ello estuviese asociado con el mayor potencial de migración de las células cancerosas hacia el ganglio centinela en el cáncer de mama.

Otra hipótesis posible de la relación entre el incremento de células dendríticas en la frontera tumoral y una mayor posibilidad de metástasis en el ganglio centinela es que, considerando la capacidad fagocítica de las células dendríticas, interiorizando posiblemente macromoléculas de células tumorales con efecto inmunosupresor, su posterior migración desde la frontera tumoral al ganglio centinela posibilita un efecto facilitador de la colonización posterior de las células tumorales en el ganglio. En este sentido, es sabido que los tumores pueden producir sustancias inmunosupresivas de efecto inmunomodulador en los ganglios centinelas⁴²⁵. De hecho, se ha descrito en el cáncer de mama que en los ganglios axilares metastásicos hay una menor presencia de células T citotóxicas en relación

con los ganglios no metastásicos⁴²⁶. Asimismo, resultan interesantes los recientes datos de que el bloqueo del drenaje hacia los nódulos linfáticos de moléculas y linfocitos, tales como células dendríticas, mediante la utilización de nanopartículas, remodela la respuesta inmune antitumoral⁴²⁷. Interesantemente, se ha descrito que la administración local de factor estimulante de colonias granulocito/macrófago incrementa el número y efecto de activación antitumoral de las células dendríticas en el ganglio centinela de los melanomas⁴²⁸ lo que sugiere la posibilidad de la modificación del estado de activación de las células dendríticas como posible herramienta terapéutica en el cáncer de mama.

Por otra parte, también tenemos que considerar la posibilidad de la importancia del tipo de célula dendrítica en cuanto a su influencia sobre la migración de la célula tumoral. En este estudio utilizamos como marcador para las mismas el CD138, pero existen otros tipos de células dendríticas que pueden ser reconocidas con otros marcadores de superficie, tales como CD1a, CD 208, etc.

El CD 138 por lo general, se expresa con elevada densidad celular en las células plasmáticas normales y malignas, así como las células linfoplasmocitoides^{429, 430}. En el tejido maduro, CD138 es expresada por el epitelio simple y estratificado, fibroblastos, queratinocitos estratificados y células endoteliales⁴³¹.

También investigamos en el presente estudio la posible influencia de la combinación del número de células CD68 (+) y CD138 (+) sobre la afectación tumoral del ganglio centinela. Así, pudimos comprobar como la presencia incrementada de ambas poblaciones de células inflamatorias se asoció con una mayor probabilidad de metástasis ganglionar. Recientemente, Eiró et.al³³⁸ encontraron que la elevada relación CD68/CD3+CD20 en la frontera tumoral se relaciona con una mayor probabilidad de metástasis a distancia (metástasis hematógenas) en el cáncer de mama. Por lo tanto, nuestros datos podrían indicar que la mayor presencia de las poblaciones de CD68 (+) y CD 138 (+) en la frontera tumoral podría resultar más bien indicativa de metástasis linfáticas en cáncer de mama. Ello ahondaría, de alguna manera, en el concepto de que las metástasis hematógenas y las linfáticas dependen de mecanismos biológicos diferentes, también en el escenario de la inmunidad celular.

En el presente estudio también investigamos si alguno de los factores analizados en la frontera tumoral de los carcinomas mamarios se relaciona con afectación de los ganglios no centinela. De todos los factores analizados, tan solo la expresión de TIMP1 por la célula tumoral y la invasión linfática se asociaron significativamente con la afectación tumoral de los ganglios no centinela. La expresión de TIMP1 por las células tumorales se relacionó negativamente con afectación de los ganglios no centinela. Como ya señalamos más arriba, la no expresión de TIMP1 por las células tumorales les puede otorgar a éstas la ventaja de una mayor capacidad invasiva intrínseca. De modo, que de mantenerse esta propiedad de las células cancerosas una vez que alcanzan los ganglios centinela, podrían tener una mayor capacidad invasiva al no inhibir la actividad proteolítica de las MMPs.

Por otra parte, resultó llamativo comprobar que la invasión tumoral linfática en la frontera tumoral se asoció de forma significativa y positiva con la afectación tumoral de los ganglios no centinela. Ello nos induce considerar que ese hallazgo en la frontera tumoral refleja una mayor potencialidad invasiva de las células cancerosas que, una vez migradas a los ganglios centinelas, pueden mostrar también en esa localización la capacidad invasiva necesaria para metastatizar en los siguientes ganglios de la cadena linfática axilar. En todo caso, ese resultado derivado de nuestro estudio nos induce a considerar que la valoración de la invasión tumoral linfática en la frontera tumoral puede contribuir, en combinación con otros posibles parámetros, a una mejor predicción de la afectación de los ganglios no centinela en el cáncer de mama.

En relación con la relación entre los factores analizados en el ganglio centinela positivo y la afectación tumoral de los ganglios no centinelas, tan solo encontramos que la expresión de MMP1 por los CMIs peritumorales del ganglio centinela afectado, se relaciona significativamente y de forma positiva con la afectación de afectación tumoral de los ganglios no centinela. Este resultado está de acuerdo con los resultados de Eiró et.al³⁴², reflejando que la expresión de MMP1 por las CMIs es un potente predictor de la cascada metastásica a través de la cadena ganglionar linfática axilar en el cáncer de mama. Como señalan esos autores, ese hallazgo resulta indicativo del compromiso de las células inflamatorias

en la progresión tumoral y del papel biológico relevante de la MMP1 en la degradación de la matriz extracelular.

En relación con el primero de esos aspectos existen muchas evidencias indicando un papel de las células inflamatorias del estroma en la progresión tumoral. Así, por una parte, el crecimiento tumoral y la invasión se asocian con muerte celular significativa, algunos de las cuales se produce por apoptosis o necrosis. Es bien sabido que las células necróticas liberan numerosos mediadores de la inflamación que son un potente estimulador de macrófagos. Por otro parte, las células tumorales pueden inducir una respuesta inflamatoria en respuesta a citocinas y quimiocinas que secretan, reclutando así diversos tipos células inflamatorias⁴¹⁷.

Por otra parte, se ha señalado la importancia biológica de la MMP1 en la progresión tumoral, debido fundamentalmente a su capacidad de degradar elementos de la matriz extracelular, facilitando de esa forma la invasión tumoral y las metástasis. Así, se ha descrito que la MMP1 escinde varios componentes de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno de los tipos I (el componente principal del tejido conectivo), II, III, VII, VIII y IX, así como los inhibidores de serinproteasas, y la macroglobulina $\alpha 2$. Así pues, la capacidad degradativa de la MMP -1 puede ser la responsable de promover la extensión tumoral a través de los ganglios linfáticos³⁴².

Nuestros resultados no muestran ninguna relación entre la proporción de los distintos tipos de células inflamatorias en los ganglios centinela metastásicos y la afectación tumoral de los ganglios no centinela. Como se ha señalado más arriba, se ha postulado que el ganglio centinela recibe drenaje de sustancias provenientes del tumor primario que pueden inducir inmunosupresión⁴³². De hecho, se han descrito alteraciones de la respuesta de las células inflamatorias, tales como las dendríticas, en los ganglios metastásicos en comparación con los ganglios no metastásicos⁴³³⁻⁴³⁶. Sin embargo, nuestros resultados no evidencian que el grado de infiltración de los diferentes tipos de células inflamatorias analizadas en el ganglio centinela influya sobre la afectación de los ganglios no centinela.

Otra de las cuestiones que nos planteamos en el presente estudio es evaluar si existe la concordancia entre la expresión de los diversos factores analizados entre los diferentes localizaciones tumorales.

No encontramos ninguna concordancia significativa entre los factores evaluados en la frontera tumoral y en los ganglios centinela, y en los distintos tipos celulares analizados. En cuanto a las células tumorales, estos resultados parecen indicar que éstas pueden experimentar una cierta transformación una vez que alcanza el primer ganglio de la axila.

En cuanto a las CMI observamos que tampoco existen concordancias significativas de expresión de los factores analizados, entre los de la frontera tumoral y los del ganglio centinela, tanto en los casos sin afectación tumoral del mismo como en la situación en las que existe afectación. En la primera de esas situaciones podríamos entender que el contacto de las células inflamatorias con las células cancerosas hace que aquellas muestren un diferente fenotipo que cuando no están en contacto con las células cancerosas de forma próxima. Pero la segunda situación sugiere que el fenotipo de las células inflamatorias varía en las dos localizaciones tumorales (frontera tumoral y ganglio centinela), probablemente dependiendo de factores relacionados con su diferente microambiente tumoral. También podríamos especular con que un diferente fenotipo de las células cancerosas una vez que alcanzan los ganglios, podría inducir cambios fenotípicos diferentes en las células inflamatorias.

Así pues, todos esos datos parecen reflejar la heterogeneidad de los carcinomas mamarios que se traduce en una gran variabilidad de expresión de factores, no solo por las propias células tumorales, sino también por las células estromales del microambiente tumoral. Esa variabilidad no solo ocurre entre los diferentes carcinomas mamarios sino también, como parecen corroborar nuestros resultados, entre las diferentes localizaciones tumorales.

En el presente estudio también investigamos si algunas de las posibles combinaciones de factores en la frontera tumoral pueden contribuir a una mayor precisión en la predicción de afectación tumoral del ganglio centinela. De todas las combinaciones posibles en la frontera tumoral, encontramos que la de

CD68 +/TIMP1-(CT) y CD138+/TIMP1-(CT), mostraron ambas una especificidad y valor predictivo negativo del 100% para predecir la afectación del ganglio centinela. Otras combinaciones analizadas en la frontera tumoral para predecir la afectación tumoral de los ganglios no centinela, que mostraron resultados significativos, fueron La combinación CD138-/TIMP1- (CT) y CD68-/TIMP1-(CT), ambas con una especificidad y un valor predictivo negativo del 100%. Esos datos, de confirmarse en otros estudios, podrían contribuir a identificar mujeres en las que podría incluso, evitarse la técnica del ganglio centinela.

En definitiva, nuestros resultados contribuyen a conocer mejor los complejos factores relacionados con la metastatización ganglionar en el cáncer de mama. Consideramos que en base a nuestros datos pueden plantearse futuros estudios de cara a mejorar la predicción de la afectación del ganglio centinela y no centinela en el cáncer de mama.

VI. CONCLUSIONES

1. El análisis de la densidad de vasos linfáticos peritumorales ha mostrado que no existe una relación significativa entre el conteo de vasos linfáticos en la frontera tumoral y la afectación del ganglio centinela, así como de los ganglios no centinela en el cáncer de mama.

2. Existe una relación significativa entre la invasión de los vasos linfáticos peritumorales por células cancerosas y la afectación del ganglio centinela y de los ganglios no centinela.

3. La expresión de TIMP1, tanto por las células tumorales como por los CMIs o fibroblastos del estroma tumoral, se asocia negativamente y de forma significativa con la afectación tumoral del ganglio centinela. Y la expresión de TIMP1 por las células tumorales en la frontera tumoral se asocia de forma negativa con la afectación de los ganglios no centinela. Sin embargo ninguna de las expresiones de las MMPs en la frontera tumoral por los diferentes tipos celulares se asocia significativamente con la afectación del ganglio centinela y de los ganglios no centinela.

4. El análisis de expresión de MMPs y TIMPs por las células cancerosas en el ganglio centinela, mostró que la expresión de MMP1 por las CMIs peritumorales del ganglio centinela se asoció significativamente con la afectación tumoral de los ganglios no centinela.

5. En cuando la evaluación de las variaciones de las poblaciones de células inflamatorias (CD3, CD20, CD68 y CD138), así como sus fenotipos de expresión de MMPs y TIMPs, en la periferia tumoral y su posible relación con la afectación del ganglio centinela y de los ganglios no centinela:

5.1. La expresión de CD68 y CD138 por las CMIs en la periferia tumoral se asocia significativamente con la afectación del ganglio centinela en cáncer de mama.

5.2. Las combinaciones de la expresión de factores en la frontera tumoral: la positividad de CD68 y negatividad de TIMP1 en las células

tumorales, la positividad de CD138 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales, la positividad de CD68 y negatividad de TIMP1 en las CMIs, la positividad de CD138 y la negatividad de TIMP1 en las CMIs, la positividad de CD3 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales, la positividad de CD68 y positividad CD138, la positividad de CD3 y positividad de CD68, la positividad de CD3 y negatividad de TIMP1 en las CMIs, la negatividad de CD20 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales, la negatividad de CD20 y positividad de CD68, la positividad de CD3 y positividad de CD138, se asocia positivamente y de forma significativa con la afectación del GC en cáncer de mama.

6. Las combinaciones de la expresión de factores en la frontera tumoral: negatividad de CD138 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales, negatividad de CD68 y negatividad de TIMP1 en las células tumorales, positividad de CD3 y positividad de TIMP1 en las células tumorales, negatividad de CD20 y positividad de TIMP1 en las células tumorales, se relacionan negativamente y de forma significativa con la afectación de los GNC. Hay una relación significativa de la combinación de factores como la positividad de Invasión linfática en la frontera tumoral y positividad de la expresión de MMP1 por las CMIs en el GC neoplásico con la afectación de los GNC.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, E Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL; CONCORD Working Group. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008 Aug; 9(8):730-56.
2. OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2004.
3. Lacey J V , Kreimer AR, Buys SS, Marcus MP, Shih-Chen Chang, Leitzmann MF, Hoover R, Prorok PC, Hartge P. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* 2009, 9:84 doi: 10.1186/1471-2407-9-84.
4. Dillon et al, 1998. Dillon, D.A., Howe, C.L., Bosari, S., Costa, J. The molecular biology of breast cancer: accelerating clinical applications. *Crit. Rev. Oncog.*, 9: 125-140, 1998.
5. Ford D, Easton DF, Peto J: Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet* 57:1457-62, 1995.
6. Peto J, Collins N, Barfoot R, et al: Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:943- 9, 1999.
7. Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, et al: The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:467-73, 2001

8. Breast cancer risk reduction. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) practical guidelines in oncology 2010. Ft. Washington (PA): National Comprehensive Cancer Network; 2009.
9. Colditz GA, Baer HJ, Tamimi RM. Breast cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2006.
10. Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2005; 7(3):131–142.
11. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14(4):907–933.
12. Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2002; 7(1):3–15.
13. Lord SJ, Bernstein L, Johnson KA, et al. Breast cancer risk and hormone receptor status in older women by parity, age of first birth, and breastfeeding: a case-control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention* 2008; 17(7):1723–1730.
14. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Research* 2006; 8(4):R43.

15. Lambe M, Hsieh CC, Chan HW, et al. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden. *Breast Cancer Research and Treatment* 1996; 38(3):305–311.
16. Vatten LJ, Romundstad PR, Ødegård RA, et al. Alpha-fetoprotein in umbilical cord in relation to severe pre-eclampsia, birth weight and future breast cancer risk. *British Journal of Cancer* 2002; 86(5):728–731.
17. Terry MB, Perrin M, Salafia CM, et al. Preeclampsia, pregnancy-related hypertension, and breast cancer risk. *American Journal of Epidemiology* 2007; 165(9):1007–1014.
18. Nechuta S, Paneth N, Velie EM. Pregnancy characteristics and maternal breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *Cancer Causes and Control* 2010; 21(7):967–989.
19. Tamimi R, Laggiou P, Vatten LJ, et al. Pregnancy hormones, pre-eclampsia, and implications for breast cancer risk in the offspring. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention* 2003; 12(7):647–650.
20. Vatten LJ, Romundstad PR, Trichopoulos D, Skjærven R. Pre-eclampsia in pregnancy and subsequent risk for breast cancer. *British Journal of Cancer* 2002; 87(9):971–973.

21. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *The Lancet* 2002; 360(9328):187–195.
22. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic Reviews* 1993; 15(1):36–47.
23. Dickson RB, Pestell RG, Lippman ME. Cancer of the breast. In: DeVita VT Jr., Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Vol. 1 and 2. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
24. Titus-Ernstoff L, Hatch EE, Hoover RN, et al. Long-term cancer risk in women given diethylstilbestrol (DES) during pregnancy. *British Journal of Cancer* 2001; 84(1):126–133.
25. Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, et al. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2006; 15(8):1509–1514.
26. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 347(9017):1713–1727.

27. Beral V, Banks E, Reeves G. Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet* 2002; 360: 942-942
28. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. 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. *British Journal of Cancer* 2002; 87(11):1234-1245.
29. Allen NE, Beral V, Casabonne D, et al. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101(5):296-305.
30. Cross AJ, Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2004; 44(1):44-55.
31. Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science* 2004; 95(4):290-299.
32. Ito N, Hasegawa R, Sano M, et al. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 1991; 12(8):1503-1506.

33. Kato T, Ohgaki H, Hasegawa H, et al. Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Carcinogenesis* 1988; 9(1):71–73.
34. Kato T, Migita H, Ohgaki H, et al. Induction of tumors in the Zymbal gland, oral cavity, colon, skin and mammary gland of F344 rats by a mutagenic compound, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis* 1989; 10(3):601–603.
35. Ohgaki H, Kusama K, Matsukura N, et al. Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, from broiled sardine, cooked beef and beef extract. *Carcinogenesis* 1984; 5(7):921–924.
36. Ohgaki H, Hasegawa H, Suenaga M, et al. Induction of hepatocellular carcinoma and highly metastatic squamous cell carcinomas in the forestomach of mice by feeding 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis* 1986; 7(11):1889–1893.
37. Shirai T, Sano M, Tamano S, et al. The prostate: A target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Research* 1997; 57(2):195–198.
38. WCRF/AICR Expert Report. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective 2007. Retrieved September 27, 2010.

39. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993; 15 (1): 17-35.
40. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362 (9382): 419-27.
41. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C, et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95 (16): 1218-226.
42. Luo J, Margolis KL, Wactawski-Wende J, Horn K, Messina C, Stefanick ML, Tindle HA, Tong E and Rohan TE. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2011 Mar 1; 342 :d1016.
43. Piver MS, Marchetti DL. Breast carcinoma. En: Piver MS, dir. *Manual of gynecologic oncology and gynecology*. Boston: Little Brown, 2005: 315-325.
44. Ballard-Barbash R, Friedenreich CM, Courneya KS, Siddiqi SM, McTiernan A, Alfano CM. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Jun 6;104(11):815-40.
45. Loprinzi P, Cardinal B, Smit E, Winters-Stone K. Physical activity and breast cancer risk. *Journal of Exercise Science & Fitness*. 2012 June; 10 (1).

46. Irwin M, George S, Matthews C. Physical Activity and Breast Cancer: Prevention, Survival, and Mechanisms. President's Council on Fitness, Sports & Nutrition. 2010 Sept; 11(3).
47. Anzuini F, Battistella A, Izzotti A. Physical activity and cancer prevention: a review of current evidence and biological mechanisms. *J prev med hyg.* 2011; 52: 174-180.
48. Neilson H, Friedenreich C, Brockton N, Millican R. Physical Activity and Postmenopausal Breast Cancer: Proposed Biologic Mechanisms and Areas for Future Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18:11-27.
49. Calle E, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer.* 2004; 4: 579-591.
50. Croce CM (January 2008). «Oncogenes and cancer». *The New England Journal of Medicine* 358 (5): pp. 502–11. doi:10.1056/NEJMra072367.
51. Hanahan D, Weinberg RA (2000). «The hallmarks of cancer». *Cell* 100 (1): pp. 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
52. Shift-work and cancer. The IARC Monographs Vol. 98 and beyond: Exposure assessment and new results. Kurt Straif, MD MPH PhD. 2009.
53. Ergonomía ocupacional sc. Nº 46. La rotación por turnos de trabajo probable cancerígeno para el ser humano. Vallejo González JL, 07/2009.

54. Julio Domingo Jiménez Luque, Trabajo a turnos y nocturno.
<http://www.prevencionar.com/2011/05/10>.
55. Work Health and Safety Act 2011 N°10. New South Wales.
56. Alberts B, Hohnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science; 2002. ISBN 54-282-1351-8.
57. Kaptain S, Tan L, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diag Mol Pathol*. 2001, 10: 139-152.
58. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human Breast Cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogen. *Science* 1987, 235: 177-182.
59. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1995; 229, 974-976.
60. Brandt-Rauf PW. The c-erbB transmembrane growth factor receptors as serum biomarkers in human cancer studies. *Mutation Res*. 1995 ; 333, 203-208.

61. Berger MS, Locher GW, Saurer S et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* 1998; 48: 1238-1243.

62. Fontana X, Ferrari P, Namer M et al. C-erbB2 gene amplification and serum level of CerbB2 oncoprotein at primary breast cancer diagnosis. *Anticancer Research* 1994; 14: 2099-2104

63. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER-2 testing: A review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol* 2003. 16: 173-182.

64. Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER +) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol* 2001; 12(4): 525-533.

65. González-Vela MC, Garijo MF, Fernández F, Val-Bernal JF. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. *Histol Histopathol* 2001;

66. Bracko M, Us-Krasovec M, Cufer T, Lamovec J, Zidar A, Goehde W. Prognostic significance of DNA ploidy determined by high-resolution flow cytometry in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23: 56-66.

67. Jones BA, Kasi SV, Howe C, Lachman M, et al. "Las diferencias entre Afro-Americanas y blancas en el carcinoma de la mama." *Cancer*, September 15, 2004; 101:1293-1301.
68. Maass N, Hojo T, Rosel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 2001 Jun; 34(4): 303-307.
69. Liu G-Y, Luo Q, Xiong B, Pan C, Yin P, Liao H-F, et al. Tissue array for Tp53, C-myc, CCND1 gene overexpression in different tumors. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 21; 14(47):7199-207.
70. McNeil CM, Sergio CM, Anderson LR, Inman CK, Eggleton SA, Murphy NC, et al. c-Myc overexpression and endocrine resistance in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Dec; 102(1-5):147-55.
71. Brenna SMF, Zeferino LC, Pinto GA, Souza RA, Andrade LAL, Vassalo J, et al. c-Myc protein expression is not an independent prognostic predictor in cervical squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Apr;35(4):425-30.
72. Ismail MF, Aly MS, Khaled HM, Mohamed HM. Detection of HER-2/neu, c-myc amplification and p53 inactivation by FISH in Egyptian patients with breast cancer. *Ger Med Sci*. 2009 Jan; 7:Doc03.

73. Leslie, KO. and Howard, E., Oncogenes and antioncogenes Ni human breast carcinoma. *Pathology Annual*, 1992. 27: p. 321-342.
74. John B. Faust and Timothy C. Meeker., Amplification and Expression of the bcl-1 Gene in Human Solid Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 1992; 52:2460-2463.
75. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. 1993; 366:643-654.
76. Hae-Young Yong,* Jin-Sun Hwang,* Hwajin Son,* Hae-In Park,† Eok-Soo Oh,† Hyun-Hwi Kim,‡ Do Kyun Kim,§ Wahn Soo Choi,§ Bong-Jin Lee,‡ Hyeong-Reh Choi Kim, and Aree Moon., Identification of H-Ras-Specific Motif for the Activation of Invasive Signaling Program in Human Breast Epithelial Cells. *Neoplasia*. Feb 2011; 13(2): 98-107.
77. Alberts B, Hohnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2004). *Biología molecular de la célula*. ISBN 54-282-1351-8.
78. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends *Carcinogenesis*. 2002 Apr; 23(4):541-7. PMID 11960904.
79. Murphree AL, Benedict WF (March 1984). «Retinoblastoma: clues to human oncogenesis». *Science* 223 (4640): pp. 1028-33.
80. Deborah L. Burkhardt, Julien Sage Cellular mechanisms of tumour suppression by retinoblastoma gene, *Nat Rev Cancer* 8: 675-682, 2008.

81. Belev B, Alerić I, Vrbanec D, Petrovecki M, Unusic J, Jakić-Razumović J Nm23 gene product expression in invasive breast cancer--immunohistochemical analysis and clinicopathological correlation. *Acta Oncol.* 2002; 41(4):355-61.
82. Steeg PS, de la Rosa A, Flatow U, MacDonald NJ, Benedict M, Leone A. *Breast Cancer Res Treat.* 1993; 25(2):175-87.
83. Nahta R, Hortobagyi GN, Esteva FJ, Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *Oncologist* 2003, 8: 5-17.
84. Masakazu Toi, Akihiko Osaki, Hirofumi Yamada, Tetsuya Toge. Epidermal growth factor receptor expression as a prognostic indicator in breast cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology.* 1991. 27:977-980.
85. Magkou C, Nakopolou L, Zoubouli Ch, Karali K, Theohari I, Bakarakos P, Ginnopoulou I. Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(3): R49
86. Kumar, MBBS, MD, FRCPath, V.; Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD and Jon Aster, MD. «Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair». En Saunders (Elsevier). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* (8th edición).
87. Smith K, Fox S.B, Whitehouse R, Tailor M, Greenall M, Clarke J, Harris A.L. Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann Oncol* (1999) 10 (6): 707-713.

88. Heldin Ch, Platelet-derived growth factor - an introduction. Cytokine Growth Factor Rev 2004; 15:195-6.
89. Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. Cytokine Growth Factor Rev 2004; 15:205-13.
90. Fredriksson L, LI H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. Cytokine Growth Factor Rev 2004; 15:197-204.
91. Jnes A.V, Cross N.C. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. Cell Mol Life Sci 2004; 61:2912-23.
92. Nardon E, Buda I, Stanta G, Buratti E, Fonda M, Cattin L. Insulin-like growth factor system gene expression in women with type 2 diabetes and breast cancer. J Clin Pathol. 2003;56:599-604
93. Beattie J, Allan G, Lochrie J, Flint D. Insulin-like growth factor – binding protein – 5 (IGFBP-5): A critical member of the IGF axis. Biochem J. 2006;395:1-19
94. Giovanucci E. Insulin, insulin – like growth factors and colon cancer: A review of the evidence. J Nutr. 2001;131:3109-3120.
95. Malin A, Dai Q, Yu H, Shu X, Jin F, Gao Y, et al. Evaluation of the synergistic effect of insulin resistance and insulin-like growth factors on the risk of breast carcinoma. Cancer. 2004;100(4):694-700.

96. Ibrahim YH, Yee D. Insulin – like growth factor 1 and cancer risk. *Growth Horm IGF Res.* 2004;14:261- 269.
97. Kucab JE, Dunn SE. Role of IGF-1R in mediating breast cancer invasion and metastasis. *Breast Dis.* 2003;17:41-47
98. Massagué J. TGF β and cancer. *Cell* 2008, 134:215-230.
99. Seoane J. Escaping from the TGF β anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 2006, 27:2148-2156.
100. Maemura M¹, Iino Y, Yokoe T, Horiguchi J, Takei H, Koibuchi Y, Horii Y, Takeyoshi I, Ohwada S, Morishita Y. Serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Lett.* 1998 Apr 24;126(2):215-20.
101. Saunders (Elsevier), ed. «Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair». *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (8th edición).*
102. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-442.
103. Aiello LP, Avery R, Arrigg R, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE. Vascular endothelial growth factor in ocular

- fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Eng J Med* 1994;331:1480-1487.
104. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol.* 1995;26:86-91.
105. González-Amaro R, Sánchez- Madrid F. Cell Adhesion molecules: Selectins and integrins. *Crit Rev Immunol* 1999; 19:389-429.
106. Macías C. Moléculas de adhesión. En: Suardíaz J, Cruz C, Colina A. Laboratorio Clínico. Cap. 11. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2004.
107. Mackay ChR, Imhof BA. Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today* 1993; 14:99-102.
108. Spring FA, Dalchau R, Daniels GL, Mallinson G, Judson PA, Parsons SF, Fabre JW, Anstee DJ (May 1988). "The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene" . *Immunology* 64 (1): 37-43.
109. F.J. Vizoso Piñeiro. A. Martínez Merino. J. Vázquez Rojo. M.L. Lamelas Suárez-Pola. A. Rodil. J.L. García Muñiz. Significación biológica y clínica de las enzimas proteolíticas y sus inhibidores en los carcinomas humanos. *Cir. Esp.* 2000; 68: 471-485.

110. Rochefort H, Capony F, García M, Cavailles V, Freiss G, Chambon M et al
Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells. A role
in carcinogenesis? *J Cell Biochem* 1987; 35: 17-29.
111. Montcourier P, Mangeat PH, Salazar G, Morisset M, Sahuquet A, Rochefort H
Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acid
vesicles. *Cancer Res* 1990; 56: 6045-6054.
112. García M, Platet N, Lliaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet JP et al
Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis.
Stem Cells 1996; 14: 642-650.
113. Sánchez LM, Freije JMP, Merino AM, Vizoso F, Foltmann B, López-Otín C
Isolation and characterization of a pepsin C zymogen produced by human
breast tissues. *J Biol Chem* 1992; 267: 24725-24731.
114. Díez-Itza I, Sánchez LM, Allende MT, Vizoso F, Ruibal A, López-Otín C
Zn-alpha2-glicoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with
clinical, histological and biochemical parameters. *Eur J Cancer* 1993; 29A:
1256-1260.
115. Vizoso F, Sánchez LM, Díez-Itza I, Merino AM, López-Otín C
Pepsinogen C is a new prognostic marker in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 54-
61.

116. . Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139-266.
117. Saksela O, Rifkin DB Cell-associated plasminogen action, regulation and physiological function. *Ann Rev Cell Biol* 1988; 4: 93-126.
118. Duffy MJ Urokinase plasminogen activator and malignancy. *Fibrinolysis* 1993;7:295-302.
119. Miles LA, Plow EF Plasminogen receptors: ubiquitous sites for cellular regulation of fibrinolysis. *Fibrinolysis* 1988; 2: 61-71.
120. Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T The activation of prourokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 1986; 261: 3486-3489.
121. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M et al Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J Biol Chem* 1991; 266: 5147-5152.
122. Goretzki L, Schmitt M, Mann KH, Calvete J, Chucholowski N, Kramer M et al Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett* 1992; 297: 112-118.

123. Mangel W.F. Better reception for urokinase. *Nature* 1990; 344: 488-489.
124. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F et al Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res* 1992; 52: 6101-6105.
125. Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H et al Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 195-208.
126. Duffy MJ, Reilly D, McDermott E, O'Higgins, Fennelly JJ, Andreasen PA Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. *Cancer* 1994; 74: 2276-2280.
127. De Witte JH, Sweep CGJ, Klijn JGM, Grebenschikov N, Peters HA, Look MP et al Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (UpA) and its inhibitor (PAI) in cytosols and pellet extracts derived from 892 breast cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 1190-1198.
128. Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen MR Tissue-type plasminogen activator, a new prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 1348-1349.
129. Jänicke F, Graeff H, Schmitt M Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast

- cancer. *Semin Thromb Hemost* 1991; 17: 303-312.
130. Butler WB, Kirkland WL, Gargala TL, Goran N, Kelsey WH, Berlinsky PJ Steroid stimulation of plasminogen activator production in a human breast cancer cell line (MCF-7). *Cancer Res* 1983; 43: 1637-1641.
131. Duffy MJ, O'Grady P, Simon J, Rose M, Lijnen HR. Tissue-type plasminogen activator in breast cancer: relationship with estradiol and progesterone receptor. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 621-623.
132. Lilja HA A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985; 76: 1899-1903.
133. Henttu P, Liao S, Vihko P Androgens up-regulate the human prostate-specific antigen messenger ribonucleic acid (mRNA), but down-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. *Endocrinology* 1992; 130: 766-772.
134. Oesterling JE Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991; 145: 907-923.
135. Iwakiri J, Grandbois K, Wehmer N, Graves HCB, Stamey T An analysis of urinary prostate specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate specific antigen by the periurethral glands. *J Urol* 1993; 149: 783-786.

136. Kamoshida S, Tsutsumi Y Extra prostatic localization of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen: distribution in cloacogenic glandular epithelium and sex-dependent expression in human anal gland. *Hum Pathol* 1990; 21: 1108-1111.
137. Van Krieken TH Prostate marker immunoreactivity in salivary gland neoplasms. A rare pitfall in immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 410-414.
138. Yu H, Diamandis EP Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clin Chem* 1995b; 41: 54-58.
139. Diamandis EP, Yu H, Sutherland DJA Detection of prostate-specific antigen immunoreactivity in breast cancer tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32: 301-310.
140. Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJA Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem* 1994; 27: 75-79.
141. Yu H, Giai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJA, Levesque MA et al Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 2104-2110.
142. Yu H, Diamandis EP, Monne M, Croce CM. Oral contraceptive-induced expression of prostate specific antigen in the female breast. *J Biol Chem* 1995;

- 270: 6615-6618.
143. Diamandis EP, Helle SI, Yu H, Melegos DN, Lundgren S, Lonning PE
Prognostic value of plasma prostate specific antigen after megestrol acetate
treatment in patients with metastatic breast carcinoma. *Am Cancer* 1999; 85:
891-898
144. Foekens JA, Diamandis EP, Yu H, Look MP, Meijer-van Gelder ME, van Putten
WLJ et al Expression of prostate-specific antigen (PSA) correlates with poor
response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *Br J Cancer* 1999;
79: 886-894.
145. Gunette RS, Mooibroek M, Wong K, Wong P, Tenniswood M Cathepsin B, a
cysteine protease implicated in metastatic progression, is also expressed
during regression of the rat prostate and mammary glands. *Eur J Biochem*
1994; 226: 311-321.
146. Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG Procession of the
amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*
1992; 255: 728-730.
147. Murnane MJ, Sheahan K, Ozdemirli M, Shuja S Stage-specific increases in
cathepsin B messenger RNA content in human colo-rectal carcinoma. *Cancer*
Res 1991; 51: 1137-1142.
148. Sloane BF, Moin K, Rozhin J Cathepsin B and its endogenous inhibitors: role
in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 1: 153-160.

149. Kane SE, Gottesman MM The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 127-136
150. Velasco G, Ferrando AA, Puente XS, Sánchez LM, López-Otín C Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 27136-27142.
151. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 1992; 282: 273-278.
152. Sinha AA, Gleason DF, Staley NA, Wilson MJ, Sameni M, Sloane BF Cathepsin B in angiogenesis of human prostate: An immunohistochemical and immunoelectron microscopic analysis. *Anat Rec* 1995; 241: 353-362.
153. Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF, Reddy PK, Sameni M, Sloane BF Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate* 1995; 26: 171-178.
154. Maciewicz RA, Wardale RJ, Etherington DJ, Paraskeva C Immunodetection of cathepsin B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colo-rectal tumour cell lines. *Int J Cancer* 1989; 43: 478-486.
155. Campo E, Muñoz J, Miquel R, Palacín A, Cardesa A, Sloane BF et al Cathepsin B expression in colo-rectal carcinomas correlates with tumor progression and

- shorted patient survival. *Am J Pathol* 1994; 145: 301-309.
156. Foekens JA, Kos J, Peters HA, Krasovec M, Look MP, Cimerman N et al
Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer.
J Clin Oncol 1998; 16: 1013-1021.
157. McGuire TM, Shering SG, Duggan CM, McDermott EW, Higgins NJO, Duffy MJ
High levels of cathepsin B predict poor outcome in patients with breast
cancer. *Int J Biol Markers* 1998; 13: 139-144.
158. Budihna M, Skrk J, Zakotnik B, Gabrijelcic D, Lindtner S Prognostic value of
total cathepsin B in invasive ductal carcinoma of the breast. *Eur J Cancer*
1995; 31: 661-664.
159. Woessner J Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective
tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.
160. Belaaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, Zimonjic DB, Popescu N, Silverman
GA et al Human macrophage metalloelastase: genomic organization,
chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J Biol
Chem* 1994; 270: 14568-14575.
161. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM et al A novel
metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast
carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699-704.

162. Pendás AM, Knäuper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S et al Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem* 1997; 272: 4281-4286.
163. Llano E, Pendás AM, Knäuper V, Sorsa T, Salo T, Salido E et al Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemist* 1997; 36: 15101-15108.
164. Shima I, Sasaguri Y, Kusakawa J, Yamana H, Fujita H, Kakegawa T et al Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behaviour of esophageal carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 2747-2753.
165. Matrisian LM Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 1990; 6: 121-125.
166. Wolf C, Chenerd MP, Durand de Grossouvre P, Bellocq JP, Chambon P, Basset P Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 870-872.
167. Delaissé JM, Vaes G Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. *Biology and Physiology of the Osteoclast*. Boca Raton: CRC Press, 1992; 289-314.
168. Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary

- epithelial function during involution. *J Cell Biol* 1992; 118: 1272-1282.
169. Jeffrey JJ Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin Perinatol* 1991; 15: 118-126.
170. Harris ED Jr Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277-1289.
171. Page RC The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991; 26: 230-242.
172. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DCC et al Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunology* 1997; 72: 155-161.
173. Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 1997; 122: 264-272.
174. Guedez L, Lim MS, Stetler-Stevenson WG The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Critical Rev Oncog* 1996; 7: 205-225.
175. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.

176. Hähnel E, Harvey JM, Joyce R, Robbins PD, Sterret GF, Hähnel R Stromelysin-3 expression in breast cancer biopsies: clinico-pathological correlations. *Int J Cancer* 1993; 55: 771-774.
177. . Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Trygvasson K Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 1992; 52: 1336-1341.
178. Pyke C, Ralfklar E, Tryggvason K, Dano K Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 1993; 142: 359-365.
179. Ota S, Miyajima Y, Nakashima A, Morimatsu M, Yakushiji M Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in cervical neoplasia: Immunohistochemical and in situ hybridation studies. *Int J Oncol* 1994; 5: 1301-1304.
180. Tryggvason K, Höyhty M, Pyke C Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 209-218.
181. Uría JA, Stahle-Bäckdahl M, Seiki M, Fueyo A, López-Otín C Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res* 1997; 57: 4882-4888.

182. Uría JA, Jiménez MG, Balbín M, Freije JMP, López-Otín C Differential effects of TGF- α on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; 273: 9769-9777.
183. Linder C, Engel G, Auer G, Strander H, Linder S Distribution of stromelysin-3 mRNA transcripts and microvessels in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42: 207-213.
184. Ahmad A, Hanby A, Dublin E, Poulsom R, Smith P, Barnes D et al 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* 1998; 152: 721-728.
185. Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset KP et al Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/ SPARC genes. *Int J Cancer* 1995; 64: 70-75.
186. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nature Med* 1996; 2: 461-462.
187. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 1998; 185: 256-261.

188. Kawashima A, Okada Y, Nakanishi I, Ueda Y, Iwata K, Roessner A
Immunolocalization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of
metalloproteinases in human chondrosarcomas. *Gen Diagn Pathol* 1997; 142:
129-137.
189. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG Prediction of colorectal cancer
relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin
Oncol* 1996; 14: 3133-3140.
190. Allgayer H, Babic R, Beyer BCM, Grützner KU, Tarabichi A, Schildberg FW
Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. *Oncol
1998; 55: 152-160.*
191. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nictolis M, Garbisa S et al
Tissue and serum metalloproteinase (MMP-2) expression un advanced
ovarian serous cystoadenocarcinomas: clinical and prognostic implications.
Anticancer Res 1995; 15: 2799-2804.
192. Talvensaaari-Mattila A, Pääkkö P, Höyhty M, Blanco-Sequeiros G,
Turpeenniemi-Hujanen T Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive
protein. A marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 1998; 83:
1153-1162.
193. Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, Murakami Y, Nishitani M, Kagawa S
Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of
metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 1997; 82: 1359-
1366.

194. Lamelas ML Expresión y significación clínica de la colagenasa-3 en los carcinomas mamarios. [Tesis doctoral]. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo, 1998.
195. Gómez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122.
196. Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkkowski AS, Carmichael DF Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res* 1988; 48: 5539-5545.
197. DeClerck YA, Pérez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; 52: 701-708.
198. Brian J, Wang Y, Smith MR, Kim H, Jacobs C, Jackman J et al Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-3). *Carcinogenesis* 1996; 9: 1805-1811.
199. Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 1994; 162: 499-510.

200. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A et al TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998; 75: 246-253.
201. Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Nawby AC Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 1999; 79: 1347-1355.
202. Polette M, Clavel C, Birembaut P, De Cleck YA Localization by in situ hybridization of mRNAs encoding stromelysin 3 and tissue inhibitors of metallo-proteinases TIM-1 and TIMP-2 in human head and neck carcinomas. *Path Res Pract* 1993; 189: 1052-1057.
203. Urbanski SJ, Edwards DR, Hershfield N, Huchcroft SA, Shaffer E, Sutherland L et al Expression pattern of metalloproteinases and their inhibitors changes with the progression of human sporadic colorectal neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 1993; 2: 81-89.
204. Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 899-906.
205. Mimori K, Mori M, Shiraishi T, Fujie T, Baba K, Haraguchi M et al Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1997; 76: 531-536.

206. McCarthy K, Maguire T, McGreal G, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 84: 44-48.
207. Agrez MV, Meldrum CJ, Sim ATR, Aebersold RH, Clark IM, Cawston TE et al A fibroblast elongation factor purified from colon carcinoma cells shares sequence identity with TIMP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 590-600.
208. Chesler L, Golde DW, Bersch N, Johnson MD Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood* 1995; 86: 4506-4515.
209. Foekens JA, Buessecker F, Peters HA, Krainick U, Van Putten WLJ, Look MP et al Plasminogen activator inhibitor-2: prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 1423-1427.
210. Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type I on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res* 1994; 54: 6539-6548.
211. Foekens JA, Schmitt M, Van Putten WL, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F et al Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1648-1658.
212. Montesano R, Pepper MS, Mohlesteinlein U, Risau W, Wagner PP, Orci T Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic

- behavior of endothelial cells expressing the middle T-oncogene. *Cell* 1990; 62: 435-445.
213. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K et al High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1993; 53: 2513-2521.
214. . Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, et al Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 2900-2907.
215. Pedersen H, Brunner N, Francis D, Osterlind K, Ronne E, Hansen HH et al Prognostic impact of urokinase, unokinase receptor and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res* 1994; 54: 4671-4675.
216. Verspaget HW, Sier CFM, Ganesh S, Griffioen G, Lamers CBHM Prognostic value of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 101: 1522-1528.
217. Ganesh S, Sier CFM, Heerding MM, van Krieken JHJM, Griffioen G, Welvaart K et al Contribution of plasminogen activators and their inhibitors to the survival prognosis of patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 75: 1793-1801
218. Fernandez-Garcia B, Eiró N, Marín L, González-Reyes S, González LO, Lamelas ML, Vizoso FJ. Expression and prognostic significance of fibronectin

- and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology*. 2014 Mar;64(4):512-22. doi: 10.1111/his.12300. Epub 2013 Nov 28.
219. M. J. Sánchez, T. Payer, R. De Angelis, N. Larrañaga, R. Capocaccia, C. Martínez. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981–2012. *Annals of Oncology* 21 (Supplement 3): iii30–iii36, 2010. (doi:10.1093/annonc/mdq090).
220. Duffi MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, ÓHaggins N. Metalloproteases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; 252-257.
221. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C et. al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer cell* 2003; 3: 57-549.
222. Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, Junquera S, Sanchez R et. al. Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology* 2008; 53: 403-425.
223. Eck SM, Hoopes PJ, Petrella BL, Coon CL, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinase 1 promotes breast cancer angiogenesis and osteolysis in a novel in vivo model. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 116: 79-90.
224. Tryggvason K, Höyhtyää M, Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 209-218.

225. Das S, Banerji A, Frei E, Chatterice A. Rapid expression and activation of MMP2 and MMP9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. *Life Sci* 2008; 82: 467-476.
226. Decock J, Hendrickx W, Drijkoningen M, Wildiers H, Niven P, Smeets A. Matrix metalloproteinase expression patterns in luminalA type breast carcinomas. *Disease Markers* 2007; 23: 189-196.
227. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002; 21: 2245-2252.
228. Gutiérrez-Fernández, A.; Fueyo, A.; Folgueras, A. R. & López-Otín, C. (2008) Matrix Metalloproteinase-8 Functions as a Metastasis Suppressor through Modulation of Tumor Cell Adhesion and Invasion. *Cancer Res.* 68: 2755-2763.
229. Rha SY, Kim JH, Roh JK, Min JS, Kim BS et. Al. Sequential production and activation of matrix-metalloproteinase-9 (MMP9) with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 43: 175-181.
230. Quaranta M, Daniele A, Coviello M, Venneri MT, Abbate I, Caringella ME et. Al. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA15,3 in breast cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 3593-3600.
231. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM et. al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699-704.

232. Engel G, Hessemeyer K, Auer G, Baackdahi M, Eriksson E, Linder S. Correlation between stromelisin-3 level and outcome of human breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 58:1-7.
233. Mitchel PJ, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, et. al. Cloning, expression and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97: 761-768.
234. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Collagenase-3 (Matrix Metalloproteinase 13) is preferentially localized in the Deep layer of human arthritic cartilage in situ. *Arthritis Rheumatism* 1997; 40: 1653-1661.
235. Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G, Thiebaut C, Lemaire V, Dacquembronne E, Duhem T, Lebrun A, Dejonghe MJ, Huet G. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18:171-178.
236. Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S. et. Al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognosis of invasive breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8:83.
237. Jung Kim H, Park Ch, Woo Park B, Lee H, Hee Jing W. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast. *Yonsei Med J* 2006; 47: 333-342.
238. Vizoso FJ, González L.O., Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML et. al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 903-911.

239. Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90. [PubMed: 21296855]
240. Herszenyi, L., M. Plebani, P. Carraro, M. De Paoli, G. Roveroni, et al. (1999) The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. *Cancer* 86: 1135-42. [PubMed: 10506696]
241. Fields, G.B. (2013) Interstitial collagen catabolism. *J Biol Chem* 288: 8785-93. [PubMed: 23430258]
242. Brinckerhoff, C.E., J.L. Rutter, and U. Benbow (2000) Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 6: 4823-30. [PubMed: 11156241]
243. Overall, C.M. and C. Lopez-Otin (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2: 657-72. [PubMed: 12209155]
244. Demers, M., J. Couillard, S. Belanger, and Y. St-Pierre (2005) New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. *Crit Rev Immunol* 25: 493-523. [PubMed: 16390324]
245. Sternlicht, M.D. and Z. Werb (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516. [PubMed: 11687497]
246. Sbardella, D., G.F. Fasciglione, M. Gioia, C. Ciaccio, G.R. Tundo, et al. (2012) Human matrix metalloproteinases: an ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med* 33: 119-208. [PubMed: 22100792]

247. Lakatos, G., I. Hritz, M.Z. Varga, M. Juhasz, P. Miheller, et al. (2012) The impact of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis* 30: 289-95. [PubMed: 22722554]
248. Altadill, A., N. Eiro, L.O. Gonzalez, S. Junquera, J.M. Gonzalez-Quintana, et al. (2012) Comparative analysis of the expression of metalloproteases and their inhibitors in resected crohn's disease and complicated diverticular disease. *Inflamm Bowel Dis* 18: 120-30. [PubMed: 21438097]
249. Brinckerhoff, C.E. and L.M. Matrisian (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 207-14. [PubMed: 11994741]
250. Iyer, R.P., N.L. Patterson, G.B. Fields, and M.L. Lindsey (2012) The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H919-30. [PubMed: 22904159]
251. Eiro, N. and F.J. Vizoso (2012) Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg* 4: 62-72. [PubMed: 22530080]
252. Herszenyi, L., G. Lakatos, I. Hritz, M.Z. Varga, G. Cierny, et al. (2012) The role of inflammation and proteinases in tumor progression. *Dig Dis* 30: 249-54. [PubMed: 22722549]
253. Eaden, J., K. Abrams, A. Ekbom, E. Jackson, and J. Mayberry (2000) Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 145-53. [PubMed: 10651654]

254. van der Woude CJ, Kleibeuker, J.H, Homan M, Jansen P.L, Moshage H. Expression of apoptosis related proteins during malignant progression in chronic ulcerative colitis. *J Clin Pathol.* 2005; 58(8):811-4.
255. Matsuzaki, K., M. Murata, K. Yoshida, G. Sekimoto, Y. Uemura, et al. (2007) Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 46: 48-57. [PubMed: 17596875]
256. Hussain, S.P., P. Amstad, K. Raja, S. Ambs, M. Nagashima, et al. (2000) Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 60: 3333-7. [PubMed: 10910033]
257. Kuper, H., H.O. Adami, and D. Trichopoulos (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 248: 171-83. [PubMed: 10971784]
258. Shuman Moss, L.A., S. Jensen-Taubman, and W.G. Stetler-Stevenson (2012) Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am J Pathol* 181: 1895-9. [PubMed: 23063657]
259. Herszenyi, L., I. Hritz, G. Lakatos, M.Z. Varga, and Z. Tulassay (2012) The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 13: 13240-63. [PubMed: 23202950]
260. Gonzalez, L., N. Eiro, L.O. Gonzalez, A. Andicoechea, E. Barbon, 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: 2063-71. [PubMed: 22488635]
261. Fernandez-Gomez, J., S. Escaf, L.O. Gonzalez, A. Suarez, S. Gonzalez-Reyes, 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: 171-6. [PubMed: 21244194]
262. Altadill, A., M. Rodriguez, L.O. Gonzalez, S. Junquera, M.D. Corte, et al. (2009) Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 41: 740-8. [PubMed: 19372066]
263. Yonemura, Y., Y. Endo, T. Takino, K. Sakamoto, E. Bandou, et al. (2000) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase enhances lymph node metastasis of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 18: 321-7. [PubMed: 11448063]
264. Ala-Aho, R., N. Johansson, A.H. Baker, and V.M. Kahari (2002) Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Int J Cancer* 97: 283-9. [PubMed: 11774278]
265. Hojilla, C.V., G.A. Wood, and R. Khokha (2008) Inflammation and breast cancer: metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer. *Breast Cancer Res* 10: 205. [PubMed: 18394187]
266. Turk, V., J. Kos, and B. Turk (2004) Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer? *Cancer Cell* 5: 409-10. [PubMed: 15144947]
267. Egeblad, M. and Z. Werb (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-74. [PubMed: 11990853]
268. Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H.C. Crawford, S. Vermeulen, et al. (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114: 111-118. [PubMed: 11112695]

269. Manes, S., M. Llorente, R.A. Lacalle, C. Gomez-Mouton, L. Kremer, 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: 6935-45. [PubMed: 10066747]
270. Fingleton, B., T. Vargo-Gogola, H.C. Crawford, and L.M. Matrisian (2001) Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia* 3: 459-68. [PubMed: 11774028]
271. Stetler-Stevenson, W.G. (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103: 1237-41. [PubMed: 10225966]
272. Cornelius, L.A., L.C. Nehring, E. Harding, M. Bolanowski, H.G. Welgus, et al. (1998) Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 161: 6845-52. [PubMed: 9862716]
273. Witty, J.P., T. Lempka, R.J. Coffey, Jr., and L.M. Matrisian (1995) Decreased tumor formation in 7,12-dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell apoptosis. *Cancer Res* 55: 1401-6. [PubMed: 7882342]
274. Agarwal, D., S. Goodison, B. Nicholson, D. Tarin, and V. Urquidi (2003) Expression of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) and tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1) correlates with the absence of metastasis in an isogenic human breast cancer model. *Differentiation* 71: 114-25. [PubMed: 12641565]
275. Koyama, Y., H. Naruo, Y. Yoshitomi, S. Munesue, S. Kiyono, et al. (2008) Matrix metalloproteinase-9 associated with heparan sulphate chains of GPI-anchored cell surface proteoglycans mediates motility of murine colon adenocarcinoma cells. *J Biochem* 143: 581-92. [PubMed: 18216069]

276. Kwan, J.A., C.J. Schulze, W. Wang, H. Leon, M. Sariahmetoglu, et al. (2004) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J* 18: 690-2. [PubMed: 14766804]
277. Si-Tayeb, K., A. Monvoisin, C. Mazzocco, S. Lepreux, M. Decossas, et al. (2006) Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol* 169: 1390-401. [PubMed: 17003494]
278. Cuadrado, E., A. Rosell, M. Borrell-Pages, L. Garcia-Bonilla, M. Hernandez-Guillamon, et al. (2009) Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 398-410. [PubMed: 18985055]
279. Ip, Y.C., S.T. Cheung, and S.T. Fan (2007) Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 46: 225-30. [PubMed: 17219425]
280. Mannello, F. and V. Medda (2012) Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem* 47: 27-58. [PubMed: 22226510]
281. Hadler-Olsen, E., B. Fadnes, I. Sylte, L. Uhlin-Hansen, and J.O. Winberg (2011) Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J* 278: 28-45. [PubMed: 21087458]
282. Jones, J.L., P. Glynn, and R.A. Walker (1999) Expression of MMP-2 and MMP-9 their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 189: 161-8. [PubMed: 10547569]
283. Talvensaaari-Mattila, A., P. Paakko, G. Blanco-Sequeiros, and T. Turpeenniemi-Hujanen (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. [PubMed: 11245340]
284. Grieu, F., W.Q. Li, and B. Iacopetta (2004) Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 88: 197-204. [PubMed: 15609121]
285. Li, H.C., D.C. Cao, Y. Liu, Y.F. Hou, J. Wu, et al. (2004) 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. [PubMed: 15538048]
286. Sivula, A., A. Talvensaaari-Mattila, J. Lundin, H. Joensuu, C. Haglund, et al. (2005) Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 89: 215-20. [PubMed: 15754118]
287. Pellikainen, J.M., K.M. Ropponen, V.V. Kataja, J.K. Kellokoski, M.J. Eskelinen, et al. (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: 7621-8. [PubMed: 15569994]
288. Jones, J.L. and R.A. Walker (1997) Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol* 183: 377-9. [PubMed: 9496252]
289. Mimori, K., H. Ueo, C. Shirasaka, and M. Mori (2001) Clinical significance of MT1-MMP mRNA expression in breast cancer. *Oncol Rep* 8: 401-3. [PubMed: 11182063]
290. Nielsen, B.S., F. Rank, J.M. Lopez, M. Balbin, F. Vizoso, et al. (2001) Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. *Cancer Res* 61: 7091-100. [PubMed: 11585740]

291. Schrohl, A.S., M.N. Holten-Andersen, H.A. Peters, M.P. Look, M.E. Meijer-van Gelder, et al. (2004) Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 2289-98. [PubMed: 15073104]
292. Schrohl, A.S., I.J. Christensen, A.N. Pedersen, V. Jensen, H. Mouridsen, 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: 164-72. [PubMed: 12672830]
293. Nakopoulou, L., E.G. Panayotopoulou, I. Giannopoulou, P. Alexandrou, S. Katsarou, et al. (2002) Stromelysin-3 protein expression in invasive breast cancer: relation to proliferation, cell survival and patients' outcome. *Mod Pathol* 15: 1154-61. [PubMed: 12429794]
294. McCarthy, K., T. Maguire, G. McGreal, E. McDermott, N. O'Higgins, et al. (1999) High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 84: 44-8. [PubMed: 9988231]
295. Ree, A.H., V.A. Florenes, J.P. Berg, G.M. Maelandsmo, J.M. Nesland, et al. (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: 1623-8. [PubMed: 9815852]
296. Remacle, A., K. McCarthy, A. Noel, T. Maguire, E. McDermott, et al. (2000) High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 89: 118-21. [PubMed: 10756061]

297. Visscher, D.W., M. Hoyhtya, S.K. Ottosen, C.M. Liang, F.H. Sarkar, et al. (1994) Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer* 59: 339-44. [PubMed: 7927938]
298. Wieczorek, E., E. Reszka, J. Gromadzinska, and W. Wasowicz (2012) Genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in breast cancer. *Neoplasma* 59: 237-47. [PubMed: 22296495]
299. Nakopoulou, L., I. Tsirmpa, P. Alexandrou, A. Louvrou, C. Ampela, et al. (2003) MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 77: 145-55. [PubMed: 12602913]
300. Talvensaaari-Mattila, A., P. Paakko, M. Hoyhtya, G. Blanco-Sequeiros, and T. Turpeenniemi-Hujanen (1998) Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 83: 1153-62. [PubMed: 9740080]
301. Talvensaaari-Mattila, A., P. Paakko, and T. Turpeenniemi-Hujanen (2003) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer* 89: 1270-5. [PubMed: 14520459]
302. Hirvonen, R., A. Talvensaaari-Mattila, P. Paakko, and T. Turpeenniemi-Hujanen (2003) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2)N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 77: 85-91. [PubMed: 12602907]
303. Del Casar, J.M., S. Gonzalez-Reyes, L.O. Gonzalez, J.M. Gonzalez, S. Junquera, et al. (2010) Expression of metalloproteases and their inhibitors in different histological types of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 811-9. [PubMed: 19916023]

304. Fisher, E.R., S. Anderson, E. Tan-Chiu, B. Fisher, L. Eaton, et al. (2001) Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer* 91: 1679-87. [PubMed: 11309768]
305. Galea, M.H., R.W. Blamey, C.E. Elston, and I.O. Ellis (1992) The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22: 207-19. [PubMed: 1391987]
306. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432: 332-7. [PubMed: 15549095]
307. Liotta, L.A. and E.C. Kohn (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375-9. [PubMed: 11357145]
308. De Wever, O. and M. Mareel (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200: 429-47. [PubMed: 12845611]
309. Soini, Y., T. Hurskainen, M. Hoyhtya, A. Oikarinen, and H. Autio-Harminen (1994) 72 KD and 92 KD type IV collagenase, type IV collagen, and laminin mRNAs in breast cancer: a study by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 42: 945-51. [PubMed: 8014478]
310. Heppner, K.J., L.M. Matrisian, R.A. Jensen, and W.H. Rodgers (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 149: 273-82. [PubMed: 8686751]
311. Brummer, O., S. Athar, L. Riethdorf, T. Loning, and H. Herbst (1999) Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 435: 566-73. [PubMed: 10628798]

312. Nakopoulou, L., I. Giannopoulou, H. Gakiopoulou, H. Liapis, A. Tzonou, et al. (1999) Matrix metalloproteinase-1 and -3 in breast cancer: correlation with progesterone receptors and other clinicopathologic features. *Hum Pathol* 30: 436-42. [PubMed: 10208466]
313. Coussens, L.M. and Z. Werb (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-7. [PubMed: 12490959]
314. Lin, E.Y. and J.W. Pollard (2004) Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 90: 2053-8. [PubMed: 15164120]
315. Johnson, J.P., G. Riethmuller, and V. Schirmacher (1989) Tumor immunology: Paul Ehrlich's heritage. *Immunol Today* 10: S35-7. [PubMed: 2679644]
316. Daniel, D., C. Chiu, E. Giraudo, M. Inoue, L.A. Mizzen, et al. (2005) CD4+ T cell-mediated antigen-specific immunotherapy in a mouse model of cervical cancer. *Cancer Res* 65: 2018-25. [PubMed: 15753402]
317. Edsparr, K., P.H. Basse, R.H. Goldfarb, and P. Albertsson (2011) Matrix metalloproteinases in cytotoxic lymphocytes impact on tumour infiltration and immunomodulation. *Cancer Microenviron* 4: 351-60. [PubMed: 22161319]
318. Gonzalez, L.O., I. Pidal, S. Junquera, M.D. Corte, J. Vazquez, 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: 957-63. [PubMed: 17848954]
319. Jiang, X., C.M. Dutton, W.N. Qi, J.A. Block, N. Garamszegi, et al. (2005) siRNA mediated inhibition of MMP-1 reduces invasive potential of a human chondrosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 202: 723-30. [PubMed: 15499569]

320. Basset, P., J.P. Bellocq, C. Wolf, I. Stoll, P. Hutin, et al. (1990) A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348: 699-704. [PubMed: 1701851]
321. Basset, P., J.P. Bellocq, O. Lefebvre, A. Noel, M.P. Chenard, et al. (1997) Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 26: 43-53. [PubMed: 9246540]
322. Freije, J.M., I. Diez-Itza, M. Balbin, L.M. Sanchez, R. Blasco, et al. (1994) Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269: 16766-73. [PubMed: 8207000]
323. Knauper, V., S. Cowell, B. Smith, C. Lopez-Otin, M. O'Shea, et al. (1997) The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 272: 7608-16. [PubMed: 9065415]
324. Knauper, V., C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight, and G. Murphy (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271: 1544-50. [PubMed: 8576151]
325. Strongin, A.Y., I. Collier, G. Bannikov, B.L. Marmer, G.A. Grant, et al. (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-8. [PubMed: 7890645]
326. Guedez, L., L. Courtemanch, and M. Stetler-Stevenson (1998) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 92: 1342-9. [PubMed: 9694723]

327. Guedez, L., A.J. McMarlin, D.W. Kingma, T.A. Bennett, M. Stetler-Stevenson, et al. (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol* 158: 1207-15. [PubMed: 11290537]
328. Del Casar, J.M., L.O. Gonzalez, E. Alvarez, S. Junquera, L. Marin, 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. [PubMed: 19241156]
329. Gonzalez, L.O., S. Gonzalez-Reyes, L. Marin, L. Gonzalez, J.M. Gonzalez, et al. (2010) Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumour stromal mononuclear inflammatory cells and those at the invasive front of breast carcinomas. *Histopathology* 57: 862-76. [PubMed: 21166700]
330. Eiro, N., L. Gonzalez, L.O. Gonzalez, B. Fernandez-Garcia, M.L. Lamelas, et al. (2012) Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *PLoS One* 7: e49047. [PubMed: 23145063]
331. Eiró N, G.L. Fernandez-Garcia B, and V. FJ (2013) Cytokines related to MMP-11 expression by inflammatory cells and breast cancer metastasis. *OncolImmunology* In press.
332. Heng, B., W.K. Glenn, Y. Ye, B. Tran, W. Delprado, et al. (2009) Human papilloma virus is associated with breast cancer. *Br J Cancer* 101: 1345-50. [PubMed: 19724278]
333. Aggarwal, B.B., S. Shishodia, S.K. Sandur, M.K. Pandey, and G. Sethi (2006) Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72: 1605-21. [PubMed: 16889756]

334. Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S.K. Narula, P.J. Zavodny, et al. (2003) Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101: 2620-7. [PubMed: 12411307]
335. Bachelot, T., I. Ray-Coquard, C. Menetrier-Caux, M. Rastkha, A. Duc, et al. (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: 1721-6. [PubMed: 12771987]
336. Saijo, Y., M. Tanaka, M. Miki, K. Usui, T. Suzuki, 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: 469-75. [PubMed: 12077278]
337. Kato, T., H. Furumoto, T. Ogura, Y. Onishi, M. Irahara, et al. (2001) Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 735-8. [PubMed: 11401524]
338. Eiro, N., I. Pidal, B. Fernandez-Garcia, S. Junquera, M.L. Lamelas, et al. (2012) Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS One* 7: e52796. [PubMed: 23300781]
339. Garcia, M.F., S. Gonzalez-Reyes, L.O. Gonzalez, S. Junquera, N. Berdize, 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: 324-34. [PubMed: 20412339]
340. Domenech, A., A. Benitez, M.T. Bajen, Y. Ricart, A. Rodriguez-Gasen, 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: 422-7. [PubMed: 19039302]
341. Huang, X., S. Chen, L. Xu, Y. Liu, D.K. Deb, et al. (2005) Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res* 65: 3470-8. [PubMed: 15833883]
342. Eiro, N., L.O. Gonzalez, S. Atienza, J.M. Gonzalez-Quintana, N. Beridze, et al. (2013) Prediction of metastatic breast cancer in non-sentinel lymph nodes based on metalloprotease-1 expression by the sentinel lymph node. *Eur J Cancer* 49: 1009-17. [PubMed: 23063352]
343. Wong, S.Y. and R.O. Hynes (2006) Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle* 5: 812-7. [PubMed: 16627996]
344. Padera, T.P., A. Kadambi, E. di Tomaso, C.M. Carreira, E.B. Brown, et al. (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296: 1883-6. [PubMed: 11976409]
345. Burke HB, Henson DE. Criteria for prognostic factors and for an enhanced prognostic sistem cáncer 1993; 72: 3131-5.
346. Domínguez MA, Marcos M, Meiriño R, et al. Factores predictivos y pronósticos en el cáncer de mama temprano. *Anales Sis San Navarra* 2001;24:99-110.
347. Yoshimoto M, Sakamoto G, Ohashi Y. Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. *Cancer* 1193;72(10):2993-3001.

348. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M Eds. American Joint Committee on Cancer . Cancer staging handbook. Sixth Edition TNM Classification of malignant tumors 2002. p: 257-281.
349. Masood S. Prognostic factors in breast cancer. *Breast J* 1997; 3: 267-283
350. Fisher B, Slack NH, Ausman RK, Bross IDJ. Location of breast carcinoma and prognosis. *Surg Gynecol Obstet* 1969; 129: 705-716.
351. National Center for health statistics. SEER Cancer statistics review 1973-1995. Bethesda MD: US National Cancer Institute 1998.
352. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D y cols. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists. Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 124: 966-78.
353. Breast. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347-76.
354. Sobin L, Wittekind C. *UICC: TNM classification of Malignant Tumours*. 5th ed. New York: John Wiley; 1997.
355. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992;20(6):479-89.
356. Elston CW, Ellis IO. 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* 1991;19(5):403-10.

357. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):966-78.
358. Porter GJ, Evans AJ, Pinder SE, et al. Patterns of metastatic breast carcinoma: influence of tumour histological grade. *Clin Radiol* 2004;59(12):1094-8.
359. Dawood S, Broglio K, Gonzalez-Angulo A, Buzdar A, Hortobagyi G, Giordano S. Trends in Survival Over the Past Two Decades Among White and Black Patients With Newly Diagnosed Stage IV Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(30):Publicación electrónica adelantada el 25 de Agosto de 2008 como 10.1200/JCO.2007.14.1168.
360. Ernst MF, van de Poll-Franse LV, Roukema JA, et al. Trends in the prognosis of patients with primary metastatic breast cancer diagnosed between 1975 and 2002. *Breast* 2007;16(4):344-51.
361. Fields RC, Jeffe DB, Trinkaus K, et al. Surgical resection of the primary tumor is associated with increased long-term survival in patients with stage IV breast cancer after controlling for site of metastasis. *Ann Surg Oncol* 2007;14(12):3345-51.
362. Vlastos G, Rapiti E, Bouchardy C, et al. Optimal loco-regional treatment of the primary tumor in metastatic breast cancer patients is associated with a significant survival advantage. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106(Sup 1):S233. Abst 5077.

363. Nieto Y, Nawaz S, Jones RB, et al. Prognostic model for relapse after highdose chemotherapy with autologous stem-cell transplantation for stage IV oligometastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(3):707-18.
364. Jimeno A, Amador ML, Gonzalez-Cortijo L, et al. Initially metastatic breast carcinoma has a distinct disease pattern but an equivalent outcome compared with recurrent metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2004;100(9):1833-42.
365. Babiera GV, Rao R, Feng L, et al. Effect of primary tumor extirpation in breast cancer patients who present with stage IV disease and an intact primary tumor. *Ann Surg Oncol* 2006;13(6):776-82.
366. Rapiti E, Verkooijen HM, Vlastos G, et al. Complete excision of primary breast tumor improves survival of patients with metastatic breast cancer at diagnosis. *J Clin Oncol* 2006;24(18):2743-9.
367. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002.
368. World Health Organization. Histologic typing of breast tumor. *Tumori* 1982; 68. 181.
369. Beahrs O.H., Henson D.E., Hutter R.W., Meyers M.H. (eds.): *Manual of Staging of Cancer*, 3rd edition. Philadelphia, J.B.Lippincott, 1988.
370. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al. Tumor microvasses density, p53 expresión, tumor size, and peritumoral lymphatic invasion are relevant prognostic markers in node negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12:454-66.

371. Fisher ER, Fisher B. Lobular carcinoma of the breast: an overview. *Ann Surg* 1977; 185: 377-85.
372. Solin L.J. Fowble B.L. Yeh I. et al.: Microinvasive ductal carcinoma of the breast treated with breast conserving surgery and definitive irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992. 23: 961-968.
373. Andersen J, Thorpe SM, King WJ, Rose C; Christensen I, Rasmussen BB, Poulsen HS. The prognostic value of immunohistochemical estrogen receptor analysis in paraffin-embedded and frozen sections versus that of steroid-binding assays. *Eur J Cancer* 1990, 26: 442-449.
374. Zaccanti, G. 1991. Prognostic factors in resectable breast cancer. *Sem. Oncol.* 18:53-57.
375. Maynard. P., Davis, C., Blamey, R. et al. 1978. Relationship between estrogen-receptor content and histological grade in human primary breast tumors. *Br. J. Cancer* 38:745-748.
376. Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER +) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol* 2001 Apr; 12(4): 525-533.
377. Beatson, G.T. 1896. On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Suggestions for new methods of treatment with illustrative cases. *Lancet* 2:104-107.
378. Babiera GV, Rao R, Feng L, et al. Effect of primary tumor extirpation in breast cancer patients who present with stage IV disease and an intact primary tumor. *Ann Surg Oncol* 2006;13(6):776-82.

379. Rapiti E, Verkooijen HM, Vlastos G, et al. Complete excision of primary breast tumor improves survival of patients with metastatic breast cancer at diagnosis. *J Clin Oncol* 2006;24(18):2743-9.
380. Singhakowinta A, Potter HG, Buroker TR, Samal B, Brooks SC, Vaitkevicius VK. Estrogen receptor and natural course of breast cancer. *Ann Surg* 1976;183(1):84-8.
381. Bafford AC, Burstein HJ, Barkley CR, et al. Breast surgery in stage IV breast cancer: impact of staging and patient selection on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2008.
382. Howell A, Barnes DM, Harland RN, et al. Steroid-hormone receptors and survival after first relapse in breast cancer. *Lancet* 1984;1(8377):588-91.
383. Barkley C, Bafford A, Burstein H, et al. Breast surgery for women presenting with stage IV breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106(Sup 1):S235. Abst 5085.
384. Gross GE, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. Multiple progesterone receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res* 1984;44(2):836-40.
385. Spataro V, Price K, Goldhirsch A, et al. Sequential estrogen receptor determinations from primary breast cancer and at relapse: prognostic and therapeutic relevance. The International Breast Cancer Study Group (formerly Ludwig Group). *Ann Oncol* 1992;3(9):733-40.
386. Hortobagyi GN, Smith TL, Legha SS, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1983;1(12):776-86.

387. Fields RC, Jeffe DB, Trinkaus K, et al. Surgical resection of the primary tumor is associated with increased long-term survival in patients with stage IV breast cancer after controlling for site of metastasis. *Ann Surg Oncol* 2007;14(12):3345-51.
388. Blanchard D, Bathia P, Hilsenbeck S, Elledge R. Does surgical management of stage IV breast cancer affect outcome? *Breast Cancer Res Treat* 2006;100(Sup 1):S118. Abst 2110.
389. Dunphy FR, Spitzer G, Fornoff JE, et al. Factors predicting long-term survival for metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow support. *Cancer* 1994;73(8):2157-67.
390. Nomura Y, Tashiro H, Osaki A. Long term survival and the prognostic factors of advanced breast cancer patients treated with adrenalectomy. *Breast Cancer Res Treat* 1995;33(1):47-54.
391. Pentheroudakis G, Fountzilias G, Bafaloukos D, et al. Metastatic breast cancer with liver metastases: a registry analysis of clinicopathologic, management and outcome characteristics of 500 women. *Breast Cancer Res Treat* 2006;97(3):237-44.
392. Zinser JW, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Smith TL, Fraschini G. Clinical course of breast cancer patients with liver metastases. *J Clin Oncol* 1987;5(5):773-82.
393. Gabos Z, Sinha R, Hanson J, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5658-63.

394. Lagerwaard FJ, Levendag PC, Nowak PJ, Eijkenboom WM, Hanssens PE, Schmitz PI. Identification of prognostic factors in patients with brain metastases: a review of 1292 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43(4):795-803.
395. Lin NU, Bellon JR, Winer EP. CNS metastases in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(17):3608-17.
396. Tham YL, Sexton K, Kramer R, Hilsenbeck S, Elledge R. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases. *Cancer* 2006;107(4):696-704.
397. Diaz-Canton EA, Valero V, Rahman Z, et al. Clinical course of breast cancer patients with metastases confined to the lungs treated with chemotherapy. The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience and review of the literature. *Ann Oncol* 1998;9(4):413-8.
398. Elder EE, Kennedy CW, Gluch L, et al. Patterns of breast cancer relapse. *Eur J Surg Oncol* 2006;32(9):922-7.
399. Briasoulis E, Karavasilis V, Kostadima L, Ignatiadis M, Fountzilias G, Pavlidis N. Metastatic breast carcinoma confined to bone: portrait of a clinical entity. *Cancer* 2004;101(7):1524-8.
400. Haagensen CD. The natural history of breast carcinoma. In: Haagensen CD, ed. *Diseases of the Breast*. (Third edition). Philadelphia:W.B Saunders Company,1986; (chapter 41):635-718.
401. Veronesi V, Salvadori B, Saccozzi R, Del Vecchio M, Cascinelli N, Greco M, et al. Radiotherapy after breast preserving surgery in women with localized cancer of the breast. *N Engl J Med*. 1993;328:1587-91.
402. Sarp S, Fioretta G, Verkooijen HM. Tumor location of the lower inner quadrant

is associated with an impaired survival for women with early-stage breast cancer . *Ann Surg Oncol*. 2007;14(3):1031-9.

403. Han W, Kim SW, Park IA, et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer* 2004;4:82.
404. Hartley MC, McKinley BP, Rogers EA. Differential expression of prognostic factors and effect on survival in young breast cancer patients a case control study. *Am Surg*. 2006;72(12):1189-94.
405. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg*. 2004;240:306-12.
406. Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2006;42:357-62.
407. Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, De Laurentiis M, Morabito A, Gallo C, et al. The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer*. 1995;76:1772-8.
408. Hoda SA, Hoda RS, Merlin S, Shamonki J, Rivera M. Issues relating to lymphovascular invasion in breast carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2006;13:308-15.
409. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, et al. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br J Cancer*. 2006;94:1643-9.

410. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg.* 2002;235:10-26.
411. Mohammed RA, Martin SG, Gill MS, Green AR, Paish EC, Ellis IO. Improved methods of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and has important clinical consequences. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:1825-33.
412. Mohammed RA, Martin SG, Mahmmod AM, Macmillan RD, Green AR, Paish EC, et al. Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: findings from a large case series with long-term follow-up. *J Pathol.* 2011;223:358-65
413. Kuroda H, Nakai M, Ohnisi K, Ishida T, Kuroda M, Itoyama S. Vascular invasion in triplenegative carcinoma of the breast identified by endothelial lymphatic and blood vessel markers. *Int J Surg Pathol.* 2010;18:324-9.
414. Vleugel MM, Bos R, van der Groep P, et al. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2004;57:746-51.
415. Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, et al. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1449-55.
416. Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, et al. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1449-55.
417. L. O .Gonzalez, S. Gonzalez-Reyes, L.Marin,L. Gonzalez,J. M. Gonzalez, M. L Lamelas, A.M. Merino,Elena Rodriguez, I. Pidal,J. M del Casar, A. Andicoechea, Francisco Vizoso. 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, 862–876. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03723

418. Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg* 2012; 4(3): 62-72.
419. Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med.* 1983; 157:613-27.
420. Steenbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002; 99(7): 2468-76
421. Takayama T, Tahara H, Thomson AW. Differential effects of myeloid dendritic cells retrovirally transduced to express mammalian or viral interleukin-10 on cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell functions and resistance to tumor growth. *Transplantation.* 2001; 71(9): 1334-40.
422. Munn DN, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002; 297: 1867-70.
423. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatt I U, Battista Ferrara G. Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Exp Med.* 2002; 19; 196(4): 459–468

424. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191-3.
425. Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. . Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol* 2006, 6(9): 659-70
426. Mansfield AS, Heikkila P, von Smitten K, Vakkila J, Leidenius M. Metastasis to sentinel lymph nodes in breast cancer is associated with maturation arrest of dendritic cells and poor co-localization of dendritic cells and CD8+ T cells. *Virchows Arch*, 2011; 459: 391-8
427. Thomas SN, Vokali E, Lund AW, Hubbell JA, Swartz MA. Targeting the tumor-draining lymph node with adjuvanted nanoparticles reshapes the anti-tumor immune response. *Biomaterials* 2014; 35(2): 814-24.
428. Vuylsteke RJ, Molenkamp BG, Gietema HA, van Leeuwen PA, Wijnands PG, Vos W, van Diest PJ, Scheper RJ, Meijer S, de Gruijl TD. Local administration of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor increases the number and activation state of dendritic cells in the sentinel lymph node of early-stage melanoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 8456-60
429. Sebestyén A, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol.* 1999; 104:412-9.
430. Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol* 1999;104:152-62.

431. Wijdenes J, Clément C, Klein B, Dore J-M. New B-cell CD antigens. BC29: CD138 (syndecan-1) workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 249-52.
432. Botella-Estrada, R, Dasí F, Ramos D, Nagore E, Herrero MJ, Giménez J, Fuster C, Sanmartín O, Guillén C, Aliño S. Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes. *Melanoma Res.* 2005;15: 99-106
433. Bembenek A, Li J, Loddenkemper C, Kemmner W, Stein H, Wernecke KD, Schlag PM. Presence of mature DC-Lamp+ dendritic cells in sentinel and non-sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Eur .j. surg. oncol.* 2008; 34:514-8
434. Poindexter NT, Sahin A, Hunt KK, Grimm EA. Analysis of dendritic cells in tumor-free and tumor-containing sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Breast cancer Res* 2004 (4): R 408-15
435. Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *Plos Med.* 2005; 2:284
436. Mastuura k, Yamaguchi Y, Ueno H, Osaki A, Arihiro K, Toge T. Maturation of dendritic cells and T-cell responses in sentinel lymph nodes from patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2006; 106:1227.
437. Slattery ML, Kerber RA: A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. The Utah Population Database. *Jama* 270:1563-8, 1993.

438. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, et al: The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 77:2318-24, 1996.
439. Hoskins KF, Stopfer JE, Calzone KA y cols. Assesment and counselling for women with a family history of breast cancer. A guide to clinicians. *JAMA* 1995; 273:557-585.
440. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, et al: The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 336:1401-8, 1997. 40
441. Claus, E.B., Risch, N., Thompson, W.D. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am. J. Hum. Genet.*, 48: 232-242, 1991.
442. Borresen, A.L., Andersen, T.I., Garber, J., Barbier-Piroux, N., Thorlacius, S., Eyfjord, J., Ottestad, L., Smith-Sorensen, B., Hovig, E., Malkin, D. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res.*, 52: 3234-3236, 1992.
443. Gatti, R.A., Tward, A., Concannon, P. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol. Genet. Metab.*, 68: 419-423, 1999
444. Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):115-9
445. Chen, J., Birkholtz, G.G., Lindblom, P., Rubio, C., Lindblom, A. The role of ataxiatelangiectasia heterozygotes in familial breast cancer. *Cancer Res.*, 58: 1376-1379, 1998.

446. Hunter, D.J., Hankinson, S.E., Hough, H. et al. (1997) A prospective study of NAT2 acetylation genotype, cigarette smoking and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*, 18, 2127–2132.
447. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Wilsher P, McClelland RA, Hoyle HB, Kyme Sr, Finlay P, Blame RW, Nicholson RI. Immunocytochemical localization of bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994; 59: 619- 628.
448. Parry, B.R, Hung, N.A., McCall, J.L. & Phipps, RF. (1993) Apparent regression of rectal polyps in a patient with Gardner's syndrome receiving concomitant tamoxifen therapy. *Aust. N.Z J. Surg.*, 63,578-579
449. Elledge RM et. al. Bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer : a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 15: 1916, 1997.
450. McGrogan AG, Bonichon F, Mascarel M, Trojani M, Durand M, Avril A et. al. Prognostic value of p53 in breast invasive ductal carcinoma: an immunohistochemical study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 71-81.
451. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Galazios G, Sivridis E. Molecular analysis of local relapse in high-risk breast cancer patients: can radiotherapy fractionation and time factors make a difference? *British Journal of Cancer* 2003; 88: 711-717.
452. Ariad S, Seymour L, Bezwoda WR, Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate of progression. *Breast Cancer Res Treat*, 1991; 20: 11-16.

453. Bronzert D, Pantazis P, Antoniadis HN, Kasid A, Davidson N, Deckson RB et. al. Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 57-63.
454. Takeichi, M. (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102, 639-655.
455. Yap A., Briehner W. & Gumbiner B. (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 13, 119-146.
456. Silva, Leonard Da MD; Parry, Suzanne MSc; Reid, Lynne BSc; Keith, Patricia BSc; Waddell, Nic PhD; Kossai, Myriam MSc; Clarke, Catherine PhD; Lakhani, Sunil R. FRCPath; Simpson, Peter T. PhD. Aberrant Expression of E-cadherin in Lobular Carcinomas of the Breast. *American Journal of Surgical Pathology*: May 2008 - Volume 32 - Issue 5 - pp 773-783.
457. Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Moertarin R, et.al. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP9) activity. *Int J Cancer* 2000; 87: 336-342.
458. Bevilacqua M.P., Nelson R.M., 1993. Selectins. *The Journal of Clinical Investigation* 91:379.
459. Bofanti R., Furie B.C., Furie B. and Wagner D.D., 1989. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73:1109-1112.
460. Matsuura N, Narita T, Mitsuoka C, Kimura N, Kannagi R, Imai T et. al. Increased concentration of soluble E-selectin in the sera of breast cancer patients. *Anticancer Res* 1997; 17: 1367-1372.

461. Ruibal A., 2001, Biological study of breast cancer. Time to thinking. Cirugía Española, Volumen 69, p. 433 - 435
462. De La Torre M, Heldin P, Bergh J. Expression of the CD44 glycoprotein (lymphocyte-homing receptor) in untreated human breast cancer and its relationship to prognostic markers. *Anticancer Res* 1995; 15: 2791-2796.
463. Yamaguchi A, Ding K, Maehara M, Goi T, Nakagawara G. Expression of nm23-H1 gene and Sialyl Lewis X antigen in breast cancer. *Oncology* 1998; 55: 357-362.
464. Von Mensdorff-Pouilly S, Snijdewint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 343-356.