

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



PROGRAMA DE DOCTORADO
INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES
MÉDICO-QUIRÚRGICAS

**EXPRESIÓN Y SIGNIFICACIÓN CLÍNICA
DE LAS CITOQUINAS
EN EL CÁNCER DE MAMA**

María de los Ángeles Miranda Peláez
Tesis Doctoral
2014

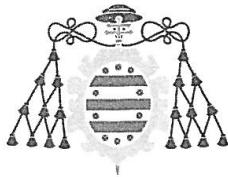
UNIVERSIDAD DE OVIEDO



PROGRAMA DE DOCTORADO
INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES
MÉDICO-QUIRÚRGICAS

**EXPRESIÓN Y SIGNIFICACIÓN CLÍNICA
DE LAS CITOQUINAS
EN EL CÁNCER DE MAMA**

Maria de los Angeles Miranda Peláez
Tesis Doctoral
2014



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis

Español/Otro Idioma:

Expresión y significación clínica de las citoquinas en el cáncer de mama.

Inglés:

Expresion and clinical significance of cytokines in breast cancer.

2.- Autor

Nombre:

María de los Ángeles Miranda Peláez

DNI/Pasaporte/NIE:

Programa de Doctorado:

Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

Órgano responsable:

Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

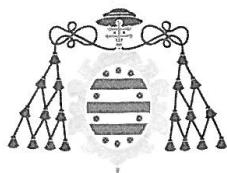
RESUMEN (en español)

El cáncer de mama es un tumor que destaca por su elevada incidencia, y un pronóstico dependiente del estadio y de la expresión de receptores celulares que actúan como factores pronósticos y predictivos de respuesta a tratamiento. En las últimas décadas se ha puesto de manifiesto la relación existente entre la inflamación y la oncogénesis y progresión del cáncer. El efecto de la inflamación sobre distintos tipos tumorales es mediado a través de la producción de determinadas citoquinas inflamatorias por las propias células del cáncer y el microambiente en el cual se desarrollan las células tumorales. Estas citoquinas podrían mediar su efecto por mecanismos autocrinos y paracrinos y por su interrelación con las proteínas de la matriz extracelular. Estudios recientes han investigado la posible relación entre los mecanismos que rigen la inflamación y su relación con la matriz extracelular como factores pronósticos en el cáncer de mama y podrían llevar al establecimiento de nuevas terapias dirigidas.

En el presente trabajo de tesis doctoral se ha investigado la expresión de las citoquinas IL-1, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- β y NFkB en carcinomas ductales invasivos de mama de 108 pacientes por un método inmunohistoquímico, analizando su expresión por las células tumorales, los fibroblastos y las células mononucleares inflamatorias (CMIs) del estroma tumoral, y su significación clínica así como su relación con la expresión de la metaloproteasa MMP-11 por las CMIs y su influencia en el pronóstico y la capacidad metastásica a distancia.

La inmunotinción para todas las proteínas estudiadas se localizó mayoritariamente en las células tumorales, sin embargo, la expresión de los distintos factores por los fibroblastos y/o las CMIs del estroma tumoral se detectó en un porcentaje menor de casos, salvo para el IFN β que fue positivo en todas las tinciones para los fibroblastos y CMIs. Los resultados mostraron una correlación significativamente positiva entre los valores de score de IL-5 e IL-17, IFN β , y NFkB; entre IL17 e IFN β y NFkB; y entre la expresión de IFN β y NFkB. Los valores de score de IL-1B y de IL-17 se relacionaron significativamente con el grado histológico, de tal forma que los tumores con valores elevados de esas dos citoquinas se encuentran más frecuentemente indiferenciados. También se pudo comprobar que los tumores HER-2 positivos mostraron valores significativamente más elevados de IFN β o NFkB. Por otra parte, los tumores con ganglios negativos mostraron valores significativamente más elevados de IL-6. Los tumores con valores elevados de IL-17 se asociaron con elevado grado histológico, los tumores HER-2 positivos con valores elevados de IFN β o NFkB, los tumores con ganglios negativos y estadio tumoral más temprano con valores más bajos de IL-6, y los tumores de tipo Basal-Like con valores elevados de IFN β .

En cuanto a la relación con la supervivencia, se ha encontrado que una elevada



expresión tumoral de IL-6 se asocia con una mayor probabilidad de tiempo libre de enfermedad (TLE) y de supervivencia global en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos, y que la expresión tumoral elevada de IFN β se asocia con una menor probabilidad de recurrencia tumoral en el subgrupo de pacientes con ganglios positivos. También la expresión de IL-1B se asoció con una mayor probabilidad de TLE y supervivencia total en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos. No se encontró asociación significativa entre la expresión de MMP-11 por las CMIs y las distintas citoquinas estudiadas.

En conclusión este trabajo determina la existencia de una relación entre la expresión de determinadas citoquinas inflamatorias y los factores pronósticos clásicos para el cáncer de mama, que en algunos casos pueden determinar el pronóstico de supervivencia y la probabilidad de desarrollar metástasis.

RESUMEN (en Inglés)

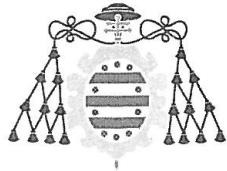
Breast cancer is a tumor that stands out for its high incidence, a stage -dependent prognosis and the expression of cellular receptors that act as prognostic and predictive factors of response to treatment. In the last decades it has been shown the relationship between inflammation and oncogenesis or cancer progression. The effect of inflammation on different tumor types is mediated through the production of certain inflammatory cytokines by cancer cells themselves and the tumor microenvironment in which tumor cells grow. These cytokines could mediate its effect through autocrine and paracrine mechanisms and by their interaction with extracellular matrix proteins. Recent studies have investigated the possible relationship between the mechanisms governing inflammation and its relationship with the extracellular matrix as prognostic factors in breast cancer that may lead to the establishment of new therapeutic strategies.

In this thesis we investigated the expression of the cytokines IL-1, IL-5, IL-6, IL-17, IFN β and NFkB in invasive ductal breast carcinomas of 108 patients by an immunohistochemical method, analyzing their expression by tumor cells, fibroblasts and mononuclear inflammatory cells (MICs) from tumor stroma, and its clinical significance and relationship with the expression of metalloproteinase MMP-11 by MICs and its influence on prognosis and distant metastatic capacity.

Immunostaining for all the proteins studied was mainly localized in tumor cells, however, the expression of the different factors by fibroblasts and / or MICs in tumor stroma was detected in a lower percentage of cases, except for IFN β that was positive in all staining for fibroblasts and MICs. The results showed a significant positive correlation between the values of score for IL-5 and IL-17, IFN β and NFkB; between IL-17 and IFN β and NFkB; and between the expression of IFN β and NFkB. Score values for IL-1B and IL-17 were significantly related to histologic grade, so that the tumors with high values of these two cytokines are most often undifferentiated. The results also showed that HER-2 positive tumors showed significantly higher levels of IFN β or NFkB. On the other hand, node negative tumors showed significantly higher IL-6 values. Tumors with high IL-17 values were associated with high histological grade, HER-2 positive tumors with elevated IFN β or NFkB values, node-negative and early tumor stage tumors with lower values of IL-6, and Basal-like tumors with higher IFN β values.

Regarding to the survival analysis, it has been showed that a high tumor expression of IL-6 was associated with a higher probability of disease free (DFS) and overall survival in the subgroup of patients with negative nodes, and that high tumor expression of IFN β was associated with a lower likelihood of tumor recurrence the subgroup of patients with positive nodes. Also, the expression of IL-1B was associated with a higher probability of DFS and overall survival in the subgroup of patients with negative nodes. No significant associations between the expression of MMP-11 by MICs and the different cytokines studied were found.

In conclusion, this study establish a relationship between the expression of certain



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado
Universidad de Oviedo



inflammatory cytokines and classic prognostic factors for breast cancer, that in some cases may determine the prognosis of survival and the probability of developing metastasis.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar constancia aquí de que la realización de este trabajo de investigación no se hubiera podido llevar a cabo sin la inestimable ayuda de otras personas, a las cuales deseo mostrar mi agradecimiento:

A los Directores de la Tesis Dr. Francisco Vizoso Piñeiro y Dr. Francisco Domínguez Iglesias, maestros y compañeros, de ejemplar vocación y calidad profesional, que con su ayuda eficaz, sabia dirección y continuo aliento han hecho posible la culminación del presente trabajo.

Al Tutor de la Tesis Profesor Safwan Escaf Barmadah, por su inestimable ayuda y consejo.

A todo el personal de la Unidad de Investigación del Hospital de Jove, por su desinteresada y constante colaboración.

A mi familia por su infinita paciencia y perseverante apoyo.

*A Daniel
A José
A María de los Ángeles
A Manuel*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN	4
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	5
1.2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	7
1.2.1. EDAD	8
1.2.2. FACTORES HEREDITARIOS	8
1.2.3. FACTORES HORMONALES	9
1.2.4. OTROS FACTORES	10
1.3. PROGRESIÓN CANCERÍGENA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	12
1.3.1. ONCOGENES	12
1.3.1.1. ONCOGÉN HER-2	12
1.3.1.2. c-MYC	13
1.3.1.3. Int 2	13
1.3.1.4. Bcl-1	13
1.3.1.5. Bcl-2	13
1.3.1.6. H-ras	14
1.3.2. GENES SUPRESORES TUMORALES	14
1.3.2.1. p53	14
1.3.2.2. GEN DEL RETINOBLASTOMA	15
1.3.2.3. nm23	15
1.3.3. OTRAS ALTERACIONES ONCOGÉNICAS	15
1.3.3.1. FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES	15
1.3.3.1.1. EGFR	16
1.3.3.1.2. FGF	16
1.3.3.1.3. PDGF	16
1.3.3.1.4. IGF-R	16
1.3.3.1.5. TGF-R	17
1.3.3.1.6. HGF	17
1.3.3.1.7. VEGF	17
1.3.3.4. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	17
1.3.4.1. INTEGRINAS	17
1.3.4.2. CADHERINAS	18
1.3.4.3. SELECTINAS	18
1.3.4.4. CD44	18
1.3.4.5. TENASCINA	19
1.3.4.6. SIALYL LEWIS-X	19
1.3.4.7. OTRAS	19
1.3.5. ANGIOGÉNESIS	19
1.3.6. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS Y SUS INHIBIDORES	20
1.3.6.1. SERÍN-PROTEASAS	20
1.3.6.2. CISTEÍN-PROTEASAS	21
1.3.6.3. ASPARTIL-PROTEASAS	21
1.3.6.4. METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR	22
1.3.6.4.1. MMP-1	23

1.3.6.4.2. MMP-2	24
1.3.6.4.3. MMP-7	24
1.3.6.4.4. MMP-8	25
1.3.6.4.5. MMP-9	25
1.3.6.4.6. MMP-11	25
1.3.6.4.7. MMP-13	25
1.3.6.4.8. MMP-14	26
1.3.6.5. INHIBIDORES DE LOS ENZIMAS PROTEOLÍTICOS	26
1.4. FACTORES PRONÓSTICOS	27
1.4.1. TAMAÑO TUMORAL	27
1.4.2. HISTOPATOLÓGIA	27
1.4.3. CONTENIDO DE ADN E ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN CELULAR	28
1.4.4. RECEPTORES HORMONALES Y PROTEÍNAS REGULADAS HORMONALMENTE	29
1.4.5. GANGLIOS LINFÁTICOS AXILARES	30
1.5. ESTROMA TUMORAL	31
1.6. INFLAMACIÓN Y CÁNCER	32
1.6.1. CITOQUINAS	34
1.6.1.1. IL-1	35
1.6.1.2. IL-5	35
1.6.1.3. IL-6	35
1.6.1.4. IL-17	37
1.6.1.5. IFN- β	38
1.6.1.6. NF κ β	38
II. OBJETIVOS	40
III. MATERIAL Y MÉTODOS	42
3.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS	43
3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES	43
3.3. MÉTODOS	44
3.3.1. ESTUDIO CLÍNICO	44
3.3.2. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	45
3.3.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	48
3.3.3.1. ELABORACIÓN DE MICROARRAYS	48
3.3.3.2. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA	50
3.3.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS	51
3.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
IV. RESULTADOS	54
4.1. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE IL-1B, IL-5, IL-6, IL- 17, IFN- β Y NF κ β	55
4.2. EXPRESIÓN GLOBAL (SCORE) DE LOS FACTORES EN LOS CARCINOMAS MAMARIOS	56
4.3. EXPRESIÓN DE LOS FACTORES POR LOS DISTINTOS	

TIPOS CELULARES	56
4.4. CORRELACIONES ENTRE LAS EXPRESIONES DE IL-1B, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- β Y NF κ β	57
4.5. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL (SCORE) DE LOS FACTORES CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO- PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES Y DE SUS TUMORES	61
4.6. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES POR LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	64
4.7. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL (SCORE) TUMORAL DE LOS FACTORES Y EL PRONÓSTICO DE LAS PACIENTES	67
4.8. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES POR LOS FIBROBLASTOS DEL ESTROMA TUMORAL Y EL PRONÓSTICO DE LAS PACIENTES	69
4.9. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS Y LA MMP-11 POR LAS CMIs DEL ESTROMA TUMORAL	70
V. DISCUSIÓN	74
VI. CONCLUSIONES	84
VII. BIBLIOGRAFÍA	87

ABREVIATURAS

ADN.....	Ácido desoxiribonucléico
Apo D.....	Apolipoproteína D
ARN.....	Ácido ribonucléico
AT.....	Ataxia-telangiectasia
Cat.....	Catepsina
CM.....	Cáncer de mama
CMI.....	Célula Mononuclear Inflamatoria
EGF.....	Factor de crecimiento epidérmico
CR.....	Coeficiente de regresión
EGF-R.....	Receptor del EGF
EMMPRIN.....	Inductores de metaloproteasas
FGF.....	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF-R.....	Receptor del FGF
HGF.....	Factor de crecimiento hepatocítico
IGF-1.....	Factor de crecimiento insulínico
IGF-1-R.....	Receptor del IGF-1
IHQ.....	Inmunohistoquímica
IL-1.....	Interleuquina 1
IL-5.....	Interleuquina 5
IL-6.....	Interleuquina 6
IL-17.....	Interleuquina 17
IFN-β.....	Interferón Beta

MMPs.....	Metaloproteasas de matriz extracelular
NFKB.....	Factor Nuclear kappa-B
PAIs.....	Inhibidores de los activadores del plasminógeno
PCNA.....	Antígeno de proliferación nuclear
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF.....	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGF-R.....	Receptor del PDGF
Pep C.....	Pepsinógeno C
PSA.....	Antígeno prostático específico
RA.....	Receptor de andrógenos
RE.....	Receptor de estrógenos
RP.....	Receptor de progesterona
SBR.....	Escala Scarff-Bloom-Richardson
SPF.....	Proporción de células en fase S
ST.....	Estromalisina
TGF-b.....	Factor de crecimiento transformante b
TGF-b-R.....	Receptor del TGF-b
TIMPs.....	Inhibidores de las metaloproteasas de matriz extracelular
TNF-β.....	Factor de Necrosis Tumoral Beta o Linfotoxina-alfa
tPA.....	Activador tisular del plasminógeno
uPA.....	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VEGF.....	Factor de crecimiento vascular epitelial

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El CM es la neoplasia maligna más frecuente de la población femenina en los países occidentales, una de cada ocho mujeres puede padecerlo, y su incidencia ha aumentado en los países en desarrollo en los últimos años. Datos de salud pública indican que la carga global de CM en las mujeres, medida por la incidencia, mortalidad y costos económicos, es sustancial y va en aumento (1). A nivel mundial, se estima que más de un millón de mujeres son diagnosticadas de cáncer de mama cada año: en el año 2008 se diagnosticaron 1.380.000 casos nuevos y más de 410.000 mujeres morirán de la enfermedad.

El CM representa casi el 30% de los tumores femeninos en nuestro país, diagnosticándose unos 22.000 casos nuevos cada año. Conocer la epidemiología ayudará a la identificación de pacientes de alto riesgo, en las que la investigación y la correcta gestión de la enfermedad tienen un papel esencial (2). Su máxima incidencia ocurre entre los 45 y los 65 años. En España, que presenta la incidencia más baja de Europa, la media se sitúa en 50,9 casos/ 100.000 habitantes mientras que la tasa ajustada de mortalidad en el año 2007 por 100.000 habitantes fue de 19,20.

En España murieron 131.746 personas de CM entre los años 1980 y 2005. Las tasas de mortalidad aumentaron hasta 1992, cuando se produjo un cambio en la tendencia (3). Se ha observado una relación de la incidencia del CM con la edad, de modo que se ha podido apreciar un aumento de la misma en mujeres mayores de 40 años, lo que se podría explicar por el aumento de su detección, los cambios en la dieta y el aumento de la edad de la mujer en su primer embarazo, por ello estrategias que identifiquen los factores de riesgo tratables y mejoren la detección precoz son esenciales (4).

Algunos autores han relacionado su incidencia con la raza, ya que se encontró que es más elevada en mujeres caucasianas que afroamericanas (5). En los países del norte de Europa su incidencia es elevada. En Alemania, es la primera causa de muerte en mujeres de 35 a 55 años, con una mortalidad estimada de 44,9/100000 mujeres (6-7). Las tasas de mortalidad en los países europeos,

muestran una tendencia a la estabilización progresiva, observándose un incremento de la mortalidad en mujeres mayores de 65 años y un descenso en grupos de edad más jóvenes (8). En el año 2008 se diagnosticaron en Europa 421.000 casos de CM, un 13% del total de tumores.

En nuestro país, la mortalidad por CM ha aumentado casi un 2,5% anual, lo que ha supuesto pasar de una tasa ajustada de 8,5 por 100.000 mujeres-año en los años 50 a una tasa de 24,3 en el último quinquenio, habiendo sido la causa de 5.663 muertes en el año 2000, confirmándose como la primera causa de mortalidad por cáncer y primera causa de años potenciales de vida perdidos.

La difusión de la mamografía se asoció significativamente con un considerable aumento de la incidencia de CM (6). Esta tendencia ascendente, sin embargo, se ha interrumpido en los años 90, de tal forma que actualmente la mortalidad por CM está descendiendo desde el año 1992, a ritmo de un 2% anual. Este patrón de disminución afecta a todas las comunidades autónomas, aunque el inicio del descenso se produce en diferente momento según el año de la implantación de los programas de diagnóstico precoz, que unidos a los avances en el tratamiento de la enfermedad explican esta progresiva disminución de la mortalidad en los últimos años.

La incidencia anual del CM en España es de más de 22.000 casos, constituyendo el 28,5% de todos los tumores que afectan a la mujer. La tasa ajustada de mortalidad en España fue de 15,9 fallecimientos/100.000h/año en el 2002. En España, el fallecimiento por CM representa unas 6000 mujeres al año, representando el 16,7 de todas las muertes por cáncer en la mujer, y el 3,3% del total de muertes en la mujer.

Si consideramos la media de edad al fallecimiento, la máxima frecuencia es de 66 años. Por regiones, la que se encuentra entre las de menor mortalidad es Navarra, pionera en 1990 de los programas de diagnóstico precoz. En Gran Canaria y Cataluña están las mayores tasas de mortalidad. En 2011, el número de mujeres fallecidas por CM fue de 6314, siendo la primera causa de mortalidad por cáncer en la mujer. Aunque, debido a múltiples factores anteriormente mencionados, están aumentando el número de casos de CM, la mortalidad se ha estabilizado gracias a la detección precoz y a los tratamientos personalizados.

En Asturias, según el estudio publicado por el Registro de Tumores del Principado de Asturias (RTPA) el número de casos de CM registrados entre los años 2001 y 2004 fue de 2.254, constituyendo el 24,9% de los tumores femeninos, seguidos por el cáncer colorectal con un 14,4%, y por el cáncer de cuerpo uterino con un 6,8%. En este mismo informe, las tasas de incidencia ajustadas por población europea han aumentado de forma significativa un 1,8% de media anual durante el periodo 1991-2004. En este periodo de tiempo el número total de casos incidentes de CM fue de 7.266 casos, con una media anual de casos incidentes de 519. El número de defunciones por CM fue de 2.639, con una media anual de 189. Según los grupos de edad, la mayor incidencia de CM en el año 2004 ocurrió en las mujeres del grupo de 75-79 años, seguido de las mujeres del grupo de 50-54 años, observándose un incremento de la edad respecto a los años anteriores. La tasa específica por 100.000 habitantes en este año y para el grupo de edad de mayor incidencia, fue de 242,3. En el Área de salud IV, correspondiente a Oviedo, se aprecia un aumento de la incidencia del número de casos, de 173 en el año 2001 a 198 en el 2004. En el Área de salud V, correspondiente a Gijón, se aprecia un ligero descenso, siendo el número de casos de 164 en el año 2001 y 160 en el 2004.

La supervivencia por CM ha aumentado considerablemente en los últimos años, incrementándose anualmente en un 1,4%. La supervivencia global en España a los 5 años del diagnóstico del tumor es del 82,8% (7), mejor que la media europea y equiparable a los países con mayores cifras de supervivencia.

1.2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

Múltiples factores han sido relacionados con el riesgo de desarrollar CM (9), aunque los estudios realizados reflejan que sólo explicarían algo menos de la mitad de los casos diagnosticados. Entre estos factores se incluyen la edad, la historia familiar, susceptibilidad genética, factores ambientales y reproductivos, exposición a hormonas, factores relacionados con la dieta, factores ambientales, factores socioeconómicos, factores relacionados con los estilos de vida y patología de la mama, así como antecedentes personales de CM.

1.2.1. EDAD

En aproximadamente el 50% de las mujeres que desarrollan CM no se identifica ningún factor de riesgo asociado, aparte de la edad y el sexo femenino. En el 80% de los casos son mujeres de más de 50 años, aunque los estudios no han demostrado de forma consistente que los factores de riesgo operen con más fuerza en ciertos grupos de edad (10). El riesgo relativo de más de 50 años vs. menos de 50 es de 6,5. No obstante, en los países desarrollados está aumentando su incidencia en mujeres más jóvenes. Además de la edad propiamente dicha influyen factores en relación con la misma, como toma de anticonceptivos orales en edad cada vez más temprana, y mayor edad en el primer embarazo, unida a una menor paridad.

1.2.2. FACTORES HEREDITARIOS

El hecho de tener un familiar de primer grado con CM aumenta de 2 a 3 veces el riesgo de padecerlo. El riesgo aumenta cuanto mayor sea el número de familiares afectados (8). Los últimos avances en la investigación del riesgo de cáncer de mama se centran en el descubrimiento de nuevos factores de riesgo del cáncer de mama genético y su significado en el contexto de los factores de riesgo no genéticos establecidos (11). Estudios epidemiológicos indican que el 5-10% de los CM pueden tener su origen en una herencia de alta penetrancia genética, siendo mayor esta incidencia en mujeres premenopáusicas y menores de 35 años (12-14). También es importante la edad del familiar con CM y el número de familiares afectados: el aumento del riesgo en una mujer cuya madre ha tenido CM a una edad avanzada puede ser muy pequeño, mientras que el de una mujer con varios familiares afectados a una edad temprana es muy superior al de la población general (15-16). Estudios realizados en familias con tumores múltiples de mama y ovario permitieron identificar dos genes cuya delección o inactivación se asocia con mayor probabilidad a estos tumores, destacando el BRCA1 y el BRCA2, con gran penetrancia para el CM (17). Estos genes actúan en el mantenimiento de la integridad genómica y están implicados en fenómenos de transcripción (18-19). Sus mutaciones se heredan con un patrón de herencia autosómico dominante, lo que supone que la probabilidad de transmitir la mutación a la descendencia es del 50%. El gen BRCA1 se descubrió en 1990, al ser localizado por Hall y posteriormente, en 1994 fue clonado por Miki (20).

Está localizado en el brazo largo del cromosoma 17, y se expresa en células con alta tasa de proliferación, como es el caso de situaciones como la pubertad y el embarazo, tras ser estimulado con progesterona y estrógenos (13).

Su mutación daría lugar a una proteína anómala, perdiendo su función y provocando el desarrollo tumoral, todo ello indica que el BRCA1 actúa como un gen supresor de tumores (18). Estudios realizados recientemente valoran la probabilidad estimada de presentar cáncer de mama en mujeres portadoras de los genes BRCA1 y BRCA2 en el 69%, mientras que la probabilidad de desarrollar cáncer de ovario es de aproximadamente 37% y 25% para los genes BRCA1 y BRCA2, respectivamente. Hay un mayor riesgo marginalmente significativo de desarrollar cáncer de ovario en familias BRCA1 que en las familias BRCA2 (19). Las mutaciones de este gen también se implican en la aparición de cáncer de próstata, ovario y colon (20). Estas mutaciones pueden encontrarse en un 7% de mujeres con historia familiar de CM, porcentaje bajo si lo comparamos con los casos de cáncer de mama y ovario, en los que aumenta al 16%.

Un segundo gen implicado en el CM es el BRCA2, localizado en el brazo largo del cromosoma 13. Sus mutaciones se pueden relacionar con un 30% de los CM hereditarios. También se ha relacionado con el CM en el varón y con un aumento del riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer, entre los que se incluyen cáncer de ovario, próstata, páncreas, esófago, uréter, estómago y cérvix (21). Este gen se puede inactivar por un gran número de mutaciones que producirían una proteína alterada, que impediría su actuación como gen supresor de tumores.

Otros genes relacionados con el CM son el gen TP53, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, el gen de la ataxia-telangiectasia, situado en el brazo largo del cromosoma 11, el gen H-ras 1, que parece estar asociado a CM y ovario, y el gen PTEN/MMAC localizado en el brazo largo del cromosoma 10, que está presente en un 4% de los CM (22).

1.2.3. FACTORES HORMONALES

Los estrógenos, como factores implicados en la etiología del CM estimularían la proliferación celular, favoreciendo la aparición de errores genéticos y dando lugar a la neoplasia. De modo que la menarquia precoz, la menopausia tardía y la nuliparidad, se asocian a un incremento de riesgo de CM, por la exposición a mayores niveles de estrógenos (14)

La edad temprana del primer embarazo sería un factor protector, así como la lactancia materna (15), posiblemente en relación con la maduración del tejido mamario como respuesta a los cambios hormonales, con lo que disminuiría el riesgo de displasia.

Otra asociación controvertida es la que existe entre los anticonceptivos orales y el aumento de riesgo de CM (16). Parece existir un aumento de riesgo de CM en mujeres premenopaúsicas en relación con la estimulación de la actividad proliferativa de las células madre del epitelio lobular producido por los anticonceptivos orales, aumentando el riesgo en relación a los años de su uso. También se ha observado un discreto aumento del riesgo en relación a la administración de estrógenos utilizados como terapia hormonal sustitutiva, cuando son empleados durante al menos 5 años (23).

Esta asociación entre las hormonas reproductivas y el CM (24), ha dado lugar a la utilización de antagonistas selectivos de los receptores estrogénicos como tratamiento en los tumores hormonodependientes, destacando el uso del Tamoxifeno. Se ha desarrollado un clasificador genético que puede predecir la respuesta al Tamoxifeno en relación a la positividad de los receptores estrogénicos en el CM.

1.2.4 OTROS FACTORES

Se incluyen factores relacionados con el estilo de vida, alimentación, exposiciones ambientales, factores biológicos y socioeconómicos. Entre los factores que dependen del estilo de vida destacan el tabaco, el alcohol y el sedentarismo. El tabaco constituye un factor de riesgo y está directamente relacionado con el número de cigarrillos consumidos. El riesgo aumenta en relación con el inicio del hábito tabáquico y es mayor en mujeres premenopaúsicas (25). El mecanismo de acción

estaría relacionado con variantes genéticas en la actividad de enzimas como N-acetiltransferasas e hidroxilasas que actuarían en la metabolización de los compuestos carcinogénicos del tabaco.

Otro factor de riesgo es el consumo de alcohol (26), sobre todo antes del primer embarazo, el cual se asoció consistentemente con mayor riesgo de CM, aunque no se ha demostrado una relación directa entre el tiempo de consumo y el riesgo de CM.

El ejercicio físico es un factor protector, y está en relación a la alteración que produce en los niveles hormonales de estrógenos.

En relación con los factores socioeconómicos, el CM es más frecuente en mujeres de clase social elevada, asociación que quizás sea consecuencia de una menor paridad. En cuanto a la raza algunos autores han relacionado su incidencia con la raza blanca (27), ya que se encontró que el CM es más frecuente en mujeres caucasianas que afroamericanas (5).

En relación con la alimentación, el consumo de ácidos grasos omega-3 poliinsaturados, que se encuentran en los aceites procedentes del pescado, constituye un factor protector. Estudios recientes han encontrado una asociación positiva entre ácidos grasos omega-6 y el aumento de riesgo de CM (28). El consumo de frutas y vegetales podría ser un factor protector del CM por su alto contenido de vitaminas y su efecto antioxidante, especialmente B-carotenos y vitaminas A, C y E.

La obesidad está asociada con un mayor riesgo de CM , y un mayor riesgo de recurrencia (29). El exceso de peso se considera factor de riesgo en mujeres postmenopáusicas, en relación con los altos niveles que presentan de hormonas esteroideas y la relación del tejido graso con su metabolismo. Estas mujeres con sobrepeso presentan hiperinsulinemia y aumento del factor de crecimiento insulínico, que inhibe la apoptosis y estimula la proliferación celular, contribuyendo al desarrollo tumoral.

Las radiaciones ionizantes también han sido asociadas con un incremento del riesgo de CM (30-31). Son contundentes los indicios de los efectos de las radiaciones ionizantes sobre las mamas y el desarrollo del carcinoma, derivados de estudios de seguimiento de los sobrevivientes de las explosiones atómicas de Japón, y en mujeres

expuestas a altas dosis de radiaciones ionizantes para el tratamiento de la tuberculosis y las mastitis.

1.3. PROGRESIÓN CANCERÍGENA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

La progresión del CM se debe a la capacidad de las células tumorales para producir señales de crecimiento autocrino, insensibilizar a los mecanismos responsables de inhibir su crecimiento, evitar la apoptosis y poder replicarse, posibilitando la angiogénesis, la invasión tisular y la diseminación metastásica (32).

Entre los genes implicados en todos estos mecanismos destacamos los siguientes, por su implicación en las alteraciones del control celular, de la proliferación celular y de la apoptosis o muerte celular programada.

1.3.1. ONCOGENES

Son genes que han sufrido alguna alteración en su función de codificar proteínas responsables del control de la proliferación y diferenciación celular, de modo que permiten a la célula pasar de una mitosis a otra, manteniéndola continuamente estimulada.

1.3.1.1. Oncogén HER-2

También denominado c-erbB-2, localizado en el cromosoma 17, codifica la proteína p185, es análogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (33). Su sobreexpresión, en el 15-30% de los CM invasivos y en el 80% de los no invasivos, se ha relacionado con un mayor tamaño tumoral, tipo histológico desfavorable, pobre grado histológico, alta actividad proliferativa, alto índice mitótico y ganglios positivos (34). Por otra parte, su sobreexpresión induce en las células tumorales un aumento de la motilidad y adhesión relacionadas con el incremento de su potencial metastásico. Tiene relevancia la sobreexpresión de este gen para predecir la respuesta a la quimioterapia y a la terapia hormonal, identificando a las mujeres con CM que podrían beneficiarse con el tratamiento. De manera que en los pacientes con sobreexpresión de este gen se ha observado menor respuesta a la quimioterapia, mayor tendencia a la

recurrencia tumoral y menor supervivencia en pacientes con ganglios linfáticos axilares sin afectación tumoral (35). Actualmente ha demostrado ser de gran utilidad un anticuerpo específico contra el dominio extracelular del c-erbB-2, el trastuzumab, incluido en el tratamiento de CM, con una respuesta significativa y mayor supervivencia. No obstante, al ser uno de sus efectos secundarios la cardiotoxicidad, se están desarrollando nuevos inhibidores de tirosin-cinasa (36).

1.3.1.2. c-myc

Este protooncogén, que inhibe la diferenciación celular y por lo tanto actúa como factor inmortalizante, está amplificado en aproximadamente el 20% de los CM, y se asocia con un comportamiento clínico más agresivo del tumor. El potencial tumorigénico de la sobreexpresión de c-myc en el tejido mamario ha sido confirmada por tanto *in vitro* como en modelos *in vivo* de cáncer de mama. Se ha visto que la radiación ionizante induce la expresión de c-myc (31).

1.3.1.3. Int 2

El gen Int 2, localizado en el brazo largo del cromosoma 13, codifica una proteína homóloga al factor de crecimiento fibroblástico. Está amplificado en un 15% de los TM y se relaciona con un pronóstico más desfavorable. En los pacientes con ganglios negativos, la amplificación del gen Int-2 podría ser un factor pronóstico importante e independiente, útil para identificar pacientes con alto riesgo de recidiva locoregional independientemente de la edad del paciente. Int-2 podría ser un marcador de la inestabilidad genética que ocurre en etapas tempranas y tardías de desarrollo del tumor (37).

1.3.1.4. bcl-1

El prooncogen bcl-1 codifica la ciclina D1, proteína relacionada con la regulación del ciclo celular. Su sobreexpresión en CM se asocia con un pronóstico más desfavorable. Se ha hecho referencia a una protección específica contra el CM mediante la ablación de la ciclina D1 (38).

1.3.1.5. bcl-2

El oncogen bcl-2 sintetiza una proteína que protege de la muerte celular programada o apoptosis, pero no promueve la proliferación celular. Su papel es contradictorio, ya que su sobreexpresión se asocia a mejor respuesta a las terapias adyuvantes y un pronóstico más favorable, pudiendo tener valor predictivo en la respuesta a tamoxifeno como tratamiento adyuvante de CM con ganglios positivos (39). Se asocia también a tumores de bajo grado, índices mitóticos bajos, sin necrosis y que no expresan la proteína p53.

1.3.1.6. Hras

La sobreexpresión de la proteína Hras ha sido relacionada con la afectación ganglionar y un mayor tamaño tumoral. Se trata de un oncogén involucrado en el proceso de carcinogénesis con efectos directos sobre la proliferación celular y la tumorigénesis. Su expresión puede ser modulada por metales como el cadmio (40).

1.3.2 GENES SUPRESORES TUMORALES

Son genes que controlan el ciclo celular, inhibiendo la proliferación celular excesiva. Si sufren una mutación y pierden su función aumenta la probabilidad de que se produzca un tumor. Se pueden encontrar en la mayoría de los carcinomas (41).

1.3.2.1. TP53

Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 17. La fosfoproteína que codifica activa la transcripción de genes que frenan el ciclo celular, activa además genes que promueven la apoptosis y la reparación del ADN dañado. También interviene en la estabilidad genómica y en la segregación de cromosomas. Su mutación produce una proteína incapaz de controlar la proliferación celular, dando como resultado el desarrollo del tumor (42). Ante la exposición a agentes que dañan el ADN, como carcinógenos, citostáticos, radiaciones ionizantes y luz UV, se elevan los niveles celulares de esta proteína.

La mutación del gen p53 es la anomalía genética que más se observa en los CM, estimándose que se produce entre el 14 y el 58% de los casos, correspondiendo las menores tasas de expresión a carcinomas no invasivos y llegando a expresarse en el 50% de los CM familiares (43).

Numerosos estudios correlacionan la expresión de esta mutación con tumores más agresivos (44), asociándose a variables pronósticas adversas como mayor tamaño tumoral, grado histológico indiferenciado, aneuploidía, sobreexpresión del oncogen c-erb-2, estado negativo de RE/RP, invasión vascular y resistencia a la terapia (45). Por ello, la determinación de la sobreexpresión de este gen, o de su producto inactivo, ha adquirido importancia en la valoración pronóstica de los pacientes con CM, y se relaciona con una menor supervivencia libre de enfermedad y con una menor supervivencia global, tanto en pacientes con ganglios negativos como positivos (46).

1.3.2.2. Gen del retinoblastoma

Este gen, que se activa a través de un complejo sistema de ciclinas y quinasas que son inhibidas por otros genes supresores de tumores, tiene un importante papel en el ciclo celular, constituyendo un eje regulador involucrado en la mayoría de los tumores humanos. Recientemente, se ha sugerido su importancia en cuanto a la opción terapéutica, dado que su ausencia confiere una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia (47).

1.3.2.3. nm23

Es un gen supresor de metástasis y su pérdida aumenta el potencial metastásico de estas células (48). Su expresión reducida lleva a un comportamiento tumoral más agresivo y se ha relacionado con aneuploidía celular y estado ganglionar positivo.

1.3.3. OTRAS ALTERACIONES ONCOGÉNICAS

1.3.3.1. Factores de crecimiento y sus receptores

Los factores de crecimiento son polipéptidos que intervienen en la regulación autocrina del crecimiento, y las células que los segregan poseen receptores

específicos para ese factor respondiendo a su estimulación. Su sobreexpresión daría como resultado una acción oncogénica.

Los factores de crecimiento involucrados en el CM son : el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), las proteína c-erbB-2, c-erbB-3 y c-erbB-4, los receptores del factor de crecimiento insulínico (IGF-R) y factores de crecimiento afines (IGF-I-R, IGF-II-R), el receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β -R), los receptores de factores de crecimiento fibroblástico (FGF-R), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y su receptor (PDGF-R), el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y su receptor (Met) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

1.3.3.1.1 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El factor de crecimiento epidérmico se compone de 53 aminoácidos que forman una cadena polipeptídica que, tras unirse al dominio externo de su receptor en la superficie celular, da lugar a respuestas celulares entre las que se incluyen la estimulación de la replicación del ADN y la división celular. Dicha acción es mediada a través de su receptor (EGFR), que es una glicoproteína transmembrana con un dominio extracelular y un dominio tirosín-cinasa intracelular. Su forma activada que es una fosforilación del EGFR (PEGFR) se correlaciona con un peor pronóstico y mayor agresividad del CM(49).

1.3.3.1.2. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Constituye una familia de siete péptidos con acción mitógena y de mediación en la angiogénesis (50). Aunque se ha demostrado que las células del CM son capaces de producir FGF, su papel pronóstico en el CM es controvertido.

1.3.3.1.3. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Posee acción mitógena sobre las celulas tumorales al unirse a su receptor, el PDGF-R, el cual se ha visto expresado en los tumores de mama. Se relaciona su presencia con un estadío avanzado de la enfermedad, menor supervivencia y mal pronóstico (51).

1.3.3.1.4. Receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-R)

Su sobreexpresión se ha relacionado con mayor tamaño tumoral y grado histológico indiferenciado. Su activación se produce por autofosforilación por su ligando, el IGF-I, que se ha visto aumentado en el suero de los pacientes con CM (52).

IGF-I actúa como regulador del ciclo celular mediante el control de proliferación celular, diferenciación y apoptosis, estimulando la síntesis de hormonas sexuales esteroideas y aumentando su biodisponibilidad (53).

Se han observado niveles plasmáticos aumentados de IGF-II-R e IGF-II en pacientes con CM, lo que apoya el papel mitogénico de esos factores en esta neoplasia, aunque no parece que dicha expresión tenga valor pronóstico.

1.3.3.1.5. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

El TGF- β , ligando del TGF- β -R posee un importante efecto inhibidor de progresión tumoral al actuar sobre el ciclo celular, de modo que su expresión se ha relacionado con un pronóstico favorable (54), dado que el TGF- β es un modulador de la angiogénesis al regular la proliferación endotelial, la migración celular, el metabolismo de la matriz extracelular y la expresión de moléculas de adhesión.

1.3.3.1.6. El factor de crecimiento hepatocítico (HGF)

El HGF induce la proliferación celular y la angiogénesis (55). En el CM se ha relacionado con mal pronóstico, mayor tamaño tumoral, estado nodal positivo y evidencia histológica de invasión vascular.

1.3.3.1.7. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

El VEGF es el factor angiogénico más importante, y se ha demostrado que los pacientes con altos niveles de VEGF presentan menor supervivencia libre de enfermedad y menor supervivencia global, así como una mayor tasa de recurrencias locales. El VEGF-A y el VEGF-C se han caracterizado por un peor pronóstico mediante la inducción de la angio y linfogénesis (56).

1.3.4. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Son moléculas directamente relacionadas con la invasión tumoral y la formación de metástasis. Se trata de estructuras situadas en la superficie celular cuya función es la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. Se agrupan en cuatro grupos principales: integrinas, cadherinas, selectinas y miembros de la familia de las inmunoglobulinas.

1.3.4.1. Integrinas

Son heterodímeros compuestos de subunidades alfa y beta, que se pueden combinar dando como resultado distintas funciones. Interaccionan con componentes de la matriz extracelular y cierto tipo de células, mediando la adhesión celular y la adhesión con la matriz extracelular. Según el tipo de integrina y la cantidad que esté presente, el pronóstico varía, así niveles altos de la integrina A2B1 confiere mejor pronóstico. La expresión de la A3B1 se asocia con un mayor poder invasivo y metástasis, al aumentar la producción de la proteasa gelatinasa (57).

1.3.4.2. Cadherinas

Son moléculas de adhesión celular, calcio-dependientes, mediante interacciones homofílicas. La cadherina relacionada con el CM es la E-cadherina, los niveles reducidos de esta molécula en pacientes con CM se asocia a un peor pronóstico, siendo tumores de mayor potencial metastásico, independientemente del estado ganglionar y tamaño tumoral. E-cadherina se clasifica como un supresor tumoral (58). La determinación de E-cadherina por inmunohistoquímica está siendo usada como herramienta para diferenciar entre lesiones ductales y lobulares.

1.3.4.3. Selectinas

Se trata de receptores de adhesión cuya estructura está formada por: un dominio lectina, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, dos o más dominios tipo proteína reguladora del complemento, una región transmembrana y una región intracitoplasmática corta en el extremo carboxilo terminal. Se distinguen 3 tipos: L-selectina, P-selectina y E-selectina; que se unen a través de su dominio lectina a diversos oligosacáridos, que están conjugados con proteínas transmembrana. La selectina relacionada con el CM es la E-selectina, que se

expresa por las células endoteliales que rodean a las células tumorales y se une a través de su lectina a un carbohidrato de dichas células, contribuyendo a la unión de las células tumorales y el endotelio vascular y facilitando así la diseminación tumoral, por lo que se utiliza como marcador de metástasis a distancia (59).

1.3.4.4. CD44

Estas moléculas de adhesión son antígenos de superficie relacionados con la interacción célula- matriz extracelular y la motilidad que tienen lugar en el fenómeno de invasión tumoral.

Se ha relacionado la expresión de formas variables de CD44 con metástasis en ganglios linfáticos regionales y factores pronósticos adversos, siendo la determinación de CD44, uno de los factores pronósticos independientes más importantes para predecir la invasión ganglionar en tumores mamarios menores de 2 cm. En los últimos años, CD44 ha llamado la atención debido a su utilidad como marcador de células madre y ha surgido como una diana terapéutica potencial (60).

1.3.4.5. Tenascina

Glicoproteína de la matriz extracelular que disminuye la adhesión celular, se correlaciona significativamente con el grado nuclear, grado histológico y la mitosis, y en su localización periductal se asocia con una mayor probabilidad de invasión, siendo un factor pronóstico adverso de recidiva local y metástasis. Participa en la migración celular y su expresión elevada en el borde invasivo tumoral, se relaciona directamente con un aumento en la expresión de marcadores de proliferación celular (61).

1.3.4.6. Sialyl Lewis X

Se trata de un antígeno expresado por las células tumorales, que facilita la adhesión al endotelio vascular, permitiendo la invasividad y las metástasis, La determinación de sus niveles séricos puede tener valor pronostico (62).

1.3.4.7. Otras

El producto de la expresión del gen MUC1 puede expresar las siguientes glicoproteínas de membrana en las células mamarias: CA 15.3, MCA, CA 459, CA

27.29, CASA y Truquant BR. Actúan interfiriendo en el proceso de adhesión celular y escapan al reconocimiento del sistema inmune, de modo que la determinación en plasma de niveles elevados de estas proteínas se relaciona con una mayor diseminación tumoral (63). El uso de ADNc que codifica MUC1, puede permitir el procesamiento de antígeno endógeno y, por lo tanto, aumentar la inmunogenicidad y mejorar la supervivencia de los pacientes con tumores malignos epiteliales metastáticos (64).

1.3.5. ANGIOGÉNESIS

En 1972 Brem y cols. relacionaron la intensidad de la angiogénesis tumoral con la agresividad tumoral, ya que aporta los nutrientes esenciales para la progresión de las células tumorales. Cuanto más intensa sea la angiogénesis peor será el pronóstico y mayor la probabilidad de desarrollar recurrencias, independientemente del estado ganglionar. Además, se ha relacionado la angiogénesis con mayor radioresistencia (65). Actualmente se contempla como opción terapeútica el uso de inhibidores de la angiogénesis.

1.3.6. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS Y SUS INHIBIDORES

Entre los mecanismos de propagación tumoral destacan estas proteínas que tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular y la membrana basal, estimular la proliferación y diferenciación celular, reducir la adhesividad de las células cancerosas y promover la migración celular y la angiogénesis. Por lo tanto, son factores muy importantes en la tumorogénesis. Estas proteínas pueden ser producidas tanto por las células tumorales como por células del tejido mesenquimal, que circundan el tejido lesionado, cobrando importancia el tejido circundante como característica fenotípica del CM (66). Cada tipo de tumor utiliza de manera diferente estos enzimas en los mecanismos de actuación implicados en la propagación tumoral.

Dependiendo de los sustratos de la matriz celular sobre los que actúen: elastina, trombospondina, ácido hialurónico, factor von Willebrand laminina, colágeno, fibronectina, y proteoglicanos, se distinguen cuatro familias de enzimas proteolíticas: serín-proteasas, cisteín-proteasas, aspartil-proteasas y metaloproteasas.

1.3.6.1. Serín-proteasas

Grupo de enzimas proteolíticos que, mediante un residuo de serina activado se unen al sustrato para catalizar la hidrólisis de grupos peptídicos. Existen varias serín-proteasas implicadas en procesos tumorales:

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) que interviene en la cascada de coagulación, ya que cataliza el paso de plasminógeno a plasmina, y actúa en la degradación de la matriz extracelular, tanto en condiciones normales, en la remodelación extracelular, como en la progresión metastásica del tumor (67). Las células tumorales poseen en su superficie receptores para el uPA, de tal manera que de esa unión resulta un potencial para la propagación e invasión tumoral.

El uPA puede, además, activar determinadas metaloproteasas de la matriz extracelular, estimular la angiogénesis, inhibir la apoptosis y favorecer la diseminación celular y metástasis en diversos tumores sólidos (68). De modo que la expresión del uPA está relacionada con un pronóstico más desfavorable en pacientes con CM y, especialmente, en aquellas pacientes con ganglios negativos, en las que se puede identificar subgrupos de mayor agresividad (35).

Dentro del grupo de serín-proteasas relacionadas con el CM está el tPA. A diferencia del uPA, la expresión del tPA se relaciona con menor agresividad, un pronóstico más favorable y con la positividad de receptores estrogénicos. Se ha descrito, además, que los niveles de tPA en el CM muestran una correlación inversa con el uPA. Aunque los niveles de tPA no predicen la respuesta al tratamiento, especialmente la terapia sistémica adyuvante (69).

Otro miembro de la familia de las serín proteinasas es el antígeno específico prostático (PSA), con actividad proteolítica similar a la tripsina y quimotripsina. Su producción tisular está regulada por los andrógenos. Además de ser producido por la glándula prostática, también puede ser producido por el tejido mamario, aunque no está clara su posible relación con la afectación ganglionar y la formación de metástasis a distancia (70).

1.3.6.2. Cisteín-proteasas

Son enzimas proteolíticos lisosómicos, que contienen un residuo de cisteína como centro activo de su molécula, se sintetizan en forma inactiva, y su función radica en el recambio tisular fisiológico. Las enzimas cisteín proteasas implicadas en el CM son, la catepsina B (cat B) y la catepsina L (cat L), que se relacionan con pronóstico adverso y mayor poder invasivo y formación de metástasis (71).

1.3.6.3. Aspartil-proteasas

Son enzimas proteolíticos con ácido aspártico en su lugar activo. En relación con el CM se han descrito dos: el pepsinógeno C y la catepsina D (cat D).

La Cat D es un enzima proteolítico que se encuentra, en bajas concentraciones, en los lisosomas de todas las células. Es producido por las células tumorales mamarias bajo la influencia estrogénica (72). Entre sus funciones están promover la proliferación celular, degradar la matriz extracelular y activar a otros enzimas proteolíticos involucrados en la invasión tumoral, como la catepsina B y la catepsina L. Su expresión se asocia a mal pronóstico, ya que sus niveles aumentados indican mayor agresividad tumoral. Para ello, es necesaria la mutación de los aminoácidos 27-44 de la región de activación peptídica, siendo esta mutación la que estimula las acciones de la cat D en el CM (73).

El pepsinógeno C (pep C) es una proteasa que interviene en la digestión de las proteínas en el estómago, pero también puede ser sintetizado por células cancerosas de origen mamario y por células epiteliales de los quistes mamarios. También se ha descrito que los niveles de expresión tumoral de Pep C están relacionados con el grado histológico bien diferenciado de los tumores y con el estado positivo de sus RE. Además, la producción de Pep C está inducida por andrógenos, por lo que los tumores productores de Pep C tendrían dependencia androgénica. Por otro lado, ha sido demostrada que la expresión tumoral de pep C es un factor pronóstico favorable, que independiente del estado ganglionar está asociado a una evolución favorable (74). Así mismo, se ha comprobado la expresión de PepC en ginecomastias y en un alto porcentaje de CM en varones, por lo que el Pep C puede jugar un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades mamarias de los varones.

1.3.6.4. Metaloproteasas de matriz extracelular

Las MMPs constituyen un grupo de enzimas proteolíticas con características comunes: dos átomos de zinc necesarios para la actividad proteolítica, un residuo de cisteína que interactúa con el zinc y una metionina que mantiene estable el lugar activo de zinc (75). Pueden clasificarse en 4 familias con diferente especificidad de sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromalisinas y metaloproteasas de membrana. Además, existen MMPs que poseen características especiales, y por tanto constituyen entidades propias, no siendo incluidas en los grupos anteriores, como son la macrófago-metalloelastasa, la estromalisina-3 , la enamelisina y la MMP-19. Las MMPs desempeñan un papel importante en comportamientos celulares tales como la diferenciación, proliferación, migración celular, angiogénesis, apoptosis y defensa del huésped. Están ampliamente distribuidas en el organismo humano con un papel esencial en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo y la remodelación tisular (76), la menstruación la cicatrización de las heridas (77). También las MMPs han sido implicadas en procesos patológicos, destacando las enfermedades degenerativas, enfermedad periodontal, artritis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares inflamatorias y desórdenes hematológicos (78). Pero su principal interés se ha centrado en el proceso de invasión tumoral y potencial metastásico (79). Su papel en la tumorogénesis viene dada a través de varios mecanismos tales como estimular el crecimiento celular tumoral activando factores de crecimiento, promover la angiogénesis gracias a su actividad fibrinolítica y colagenolítica, activación de integrinas y VEGF, e induciendo metástasis mediante la degradación de componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular.

Se ha observado mediante estudios de hibridación *in situ* que en los CM la mayor cantidad de MMPs se encuentran en el estroma peritumoral, especialmente en los fibroblastos (80). Así se ha descrito que los fibroblastos expresan MMPs e inducen a las células tumorales a sintetizarlas a través de un mecanismo paracrino mediante la secreción de interleuquinas, interferones, factores de crecimiento e inductores de metaloproteasas de matriz extracelular (EMMPRIN) contribuyendo a la angiogénesis, al estimular la producción de MMPs por las células endoteliales, y al crecimiento tumoral (81). De modo que la expresión de MMPs en CM se asocia con un pronóstico desfavorable.

Las MMPs principalmente relacionadas con el CM son:

1.3.6.4.1. MMP-1

La MMP-1 (colagenasa intersticial) es una colagenasa que degrada el colágeno tipo I y III, así como la gelatina. Se encarga del recambio normal del colágeno, y aumenta su actividad en la cicatrización de las heridas para lograr la remodelación de la matriz extracelular. Su presencia en el CM, se relaciona con un mayor tamaño tumoral (82), y su expresión por parte de los fibroblastos se correlaciona con la aparición de metástasis (83).

Sus niveles elevados se han relacionado en el CM con una elevada capacidad de producir metástasis óseas, así como de invasión de tejidos blandos a través de mecanismos de degradación de la matriz, angiogénesis y activación de osteoclastos (84).

Existen estudios que han establecido una correlación positiva y significativa entre la expresión global de MMP-1 en el ganglio centinela positivo, y la afectación de los ganglios no centinela; de manera que, en ninguno de los casos de ganglio centinela con expresión negativa de MMP-1 en las CMIs presentaba ganglios no centinela afectados; mientras que todos los casos de ganglios no centinela afectados mostraron una expresión positiva de MMP-1 por las CMIs del ganglio centinela, siendo la sensibilidad de la expresión de MMP-1 por las CMIs de los ganglios centinela positivos del 100%, con un valor predictivo negativo del 100% y una especificidad del 61,5% para predecir la afectación de los ganglios linfáticos axilares no centinela. Si este resultado se confirma en estudios más amplios, podría ayudar a evitar la realización de disecciones axilares innecesaria en un porcentaje significativo de casos (50-68%) después de la identificación de un ganglio centinela metastático (85).

1.3.6.4.2. 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. Su síntesis se puede llevar a cabo tanto por las células tumorales como por el estroma peritumoral, reflejando el importante papel en la fisiopatología tumoral de la interacción tumor-estroma (86). Se asocia la expresión

de MMP-2 con la progresión tumoral, siendo por tanto un buen determinante de malignidad en CM (87). También se ha visto en el CM una correlación de la MMP-2 y el estado menopáusico, de modo que hasta tres cuartas partes de los tumores mamarios de mujeres pre menopáusicas muestran elevados niveles de MMP-2, mientras que en las mujeres post menopáusicas solamente se encuentran en una cuarta parte de los casos (88).

1.3.6.4.3. MMP-7

La MMP-7 (matrilisina) es una estromalisina que degrada la fibronectina, la laminina y el colágeno tipo IV. Puede ser expresada por los fibroblastos y por las células inflamatorias mononucleares. Se ha demostrado que su eliminación disminuye la invasividad y enlentece el crecimiento tumoral (89) y sus niveles elevados se asocian con mayor agresividad y mayor aparición de metástasis a distancia (83).

1.3.6.4.4. MMP-8

La MMP-8 o colagenasa-2 o neutrofílica, producida fundamentalmente por neutrófilos. Está asociada a muchos procesos inflamatorios. En el CM su expresión se correlaciona con baja afectación ganglionar y buen pronóstico. Se trata de un factor de protección que reduce el potencial metastásico de las células tumorales (90).

1.3.6.4.5. MMP-9

La MMP-9 o gelatinasa B interviene en la degradación de colágeno IV, V, VII, IX y X, gelatina y elastina. Su elevación se produce al iniciarse el proceso de malignización, y se ha detectado su expresión en los CM "in situ". Destaca su papel pronóstico, útil en el seguimiento de pacientes intervenidas de CM, al observarse tras la cirugía un destacado descenso de sus valores séricos (91).

1.3.6.4.6. MMP-11

La MMP-11 o estromalisina-3 se expresa por las células del estroma peritumoral interviniendo en la degradación de laminina proteoglicanos, fibronectina y regiones no helicoidales del colágeno IV (82). Su expresión por las células moleculares inflamatorias del estroma peritumoral está asociada a mayor invasividad

y peor pronóstico (83)., así como con un elevado perfil molecular inflamatorio de los carcinomas mamarios.

1.3.6.4.7. MMP-13

La MMP-13 o colagenasa-3 es un enzima proteolítico que tiene un papel importante en la destrucción del cartílago articular al degradar el colágeno tipo II. También puede degradar otros componentes de la matriz extracelular como proteoglicanos, gelatinas, colágeno tipo IV, tenascina y fibronectina. La MMP-13 se puede expresar por las células tumorales y por los fibroblastos, y mientras que para unos autores predomina en las células tumorales (92) y para otros en los fibroblastos, aunque recientemente se ha observado igual grado de expresión por ambos tipos celulares .También se ha señalado que puede facilitar la progresión de carcinoma *in situ* hacia la carcinoma invasivo.

Además, la elevación de sus niveles se ha correlacionado con mayor afectación de los ganglios linfáticos, por lo que tiene un importante papel como marcador de metástasis ganglionares (93-94).

1.3.6.4.8. MMP-14

La MMP-14 o metaloproteasa de membrana tipo 1, es una enzima llave y su mecanismo de acción consiste en activar la pro-MMP-13 y la MMP-2 en la superficie celular. Su expresión se asocia a evolución desfavorable y presencia de metástasis ganglionares. Se ha encontrado una fuerte asociación entre su expresión por las células estromales y mal pronóstico (83).

1.3.6.5. Inhibidores de los enzimas proteolíticos

Para cada familia de enzimas proteolíticas se han descrito inhibidores específicos. Estos pueden ser producidos tanto por las células tumorales como por el estroma adyacente al tejido lesionado. Dentro de ellos, tenemos básicamente dos tipos, los inhibidores de las metaloproteasas (TIMPs) y los inhibidores de los activadores de plasminógeno (PAIs).

Los TIMPs descritos en la actualidad son el TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Se trata de glicoproteínas que se unen a las formas activas de las MMPs inhibiendo su actividad. Y dado que los TIMPs son inhibidores de las

metaloproteasas, puede resultar paradójico la existencia de relación positiva entre ellos y la progresión tumoral, pero los TIMPs también pueden promover la proliferación de algunos tipos celulares y favorecer la expansión tumoral, disminuyendo la apoptosis (95). Se ha relacionado la expresión aumentada del TIMP-1 y TIMP-2 en el CM con un pronóstico desfavorable . Se ha evidenciado que la expresión de TIMP-2 por las células tumorales y las células inflamatorias mononucleares, TIMP-3 por los fibroblastos y TIMP-1 por las células mononucleares inflamatorias está asociada con un mayor índice de metástasis a distancia (83).En relación a los inhibidores de los activadores del plasminógeno existen dos tipos PAI-1 y PAI-2. Existen estudios que demuestran que la expresión de PAI-1 se correlaciona con peor pronóstico (96), quizás por el papel importante que desempeña en la angiogénesis. También puede ser utilizado como marcador pronóstico en pacientes con ganglios negativos, de modo que aquellas pacientes con CM y ganglios negativos y que no expresan PAI-1, no sean consideradas como candidatas a recibir quimioterapia adyuvante (97).

Respecto al PAI-2, sus niveles elevados están relacionados con un pronóstico favorable. La determinación de estos factores en los tejidos ha sido realizada por test inmuno-enzimáticos (ELISA) (98). Se ha considerado que podría ofrecer un efecto beneficioso en el tratamiento de CM la utilización de inhibidores sintéticos de enzimas proteolíticas, ya que dos de ellos, el batimastato y el marimastato (99), inhibidores sintéticos de las MMPs, disminuyen la progresión tumoral en diversos tipos de carcinomas.

1.4 FACTORES PRONÓSTICOS

1.4.1. TAMAÑO TUMORAL

Numerosos estudios han demostrado que los tumores de mayor tamaño tienen recurrencias en periodos más breves de tiempo y menor supervivencia. Por ello el marcador pronóstico más importante en pacientes con CM y ganglios axilares negativos es el tamaño tumoral, correlacionándose con la supervivencia libre de enfermedad y con la supervivencia total (100).

1.4.2. HISTOPATOLOGÍA

Aunque existe una relación entre algunos de los subtipos histológicos y el pronóstico en el cáncer de mama, los más potentes predictores pronósticos patológicos son el grado histológico y el estadio patológico.

Todos los CM deben ser graduados. Actualmente el sistema de graduación empleado es el grado histológico combinado de Nottingham (Elston-Ellis, modificación del sistema de Scarff-Bloom-Richardson). El grado histológico combinado evalúa la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y la ratio de mitosis. Cada variable se evalúa en un score de 1, 2 ó 3, y los scores son sumados para producir un grado combinado. Existe una relación entre el grado y el pronóstico en términos de supervivencia a cinco años, de modo que en estadio ganglionar positivo y grado I, la supervivencia es del 86%, del 70% en grado II, y del 57% en tumores de grado histológico III (101).

1.4.3. CONTENIDO DE ADN E ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

Las células cancerosas de muchos CM tienen cantidades anormales de ADN y son aneuploides, a diferencia de las células normales que son diploides. Se ha relacionado los tumores diploides con mejor pronóstico, siendo el índice de supervivencia sin enfermedad mayor para los tumores diploides que para los aneuploides. En diversos estudios se ha encontrado que la ploidía o cuantificación del contenido de ADN, es factor pronóstico en pacientes con estadio ganglionar positivo, aunque no en pacientes con ganglios libres de enfermedad. La citometría permite determinar la capacidad de proliferación del CM y la proporción de células en fase S (SPF). De manera que a mayor SPF peor es el pronóstico, y su determinación a través de una muestra obtenida por punción aspiración con aguja fina puede ser relevante en pacientes no sometidas a cirugía (102).

Otro elemento utilizado como factor pronóstico, es la determinación, mediante anticuerpos monoclonales, de antígenos asociados al ciclo celular, que son expresados únicamente por células en división continua. Entre estos, destaca la determinación del Ki67 mediante el anticuerpo monoclonal MIB-1 (103), siendo un excelente marcador de proliferación, que se relaciona con el tamaño tumoral, la afectación axilar, el grado histológico y la invasión vascular, siendo un marcador de

mal pronóstico en relación con la supervivencia y la probabilidad de recidiva local(104). También se incluirían en este apartado el KiS1 y 5, el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) y la familia de las ciclinas, destacando las ciclinas D1, E1 y E2, cuya sobreexpresión en CM se asocia a tumores más agresivos y con mayor resistencia al tratamiento. La sobreexpresión de ciclina A también se ha asociado a peor pronóstico y ha sido identificada como marcador independiente de recurrencia de CM (105).

1.4.4. RECEPTORES HORMONALES Y PROTEÍNAS REGULADAS HORMONALMENTE

Existe una relación entre CM y las hormonas, y por ello los tumores hormono-dependientes son susceptibles de tratamiento con terapia hormonal (106-107). Demostraron el valor predictivo de la determinación de receptores estrogénicos (RE). La positividad de RE se correlaciona con mayor supervivencia, y es un factor pronóstico independiente para predecir la supervivencia tras la recaída (108).

Del mismo modo, la positividad de los receptores de progesterona (RP) también es indicativo de buen pronóstico en el CM, prediciendo un intervalo libre de enfermedad superior y una mayor supervivencia total, especialmente en CM en estadio II y en aquellos pacientes tratados con quimioterapia y/o hormonoterapia (108).. E igual que ocurre con los RE, en caso de recurrencia local, la presencia de RP también es indicativo de mayor supervivencia y supervivencia libre de enfermedad (109).

También ha sido demostrado, que los receptores de andrógenos (RA), se asocian a un pronóstico favorable en los pacientes con CM, y son indicadores de respuesta al tratamiento con progestágenos (110).

Además de los receptores hormonales, existen proteínas reguladas hormonalmente: la pS2 y la apolipoproteína D (apo D), con significación clínica en el CM. La expresión de la pS2, proteína de bajo peso molecular similar a los factores de crecimiento, está regulada por estrógenos. Por ello esta proteína se relaciona con la presencia de RE y RP en los CM y su expresión se relaciona con un pronóstico más favorable (111). La apo D es una glicoproteína involucrada en el transporte lipídico, y sus niveles elevados se relacionan con CM bien diferenciados,

observándose niveles bajos en los tumores moderadamente o pobremente diferenciados. Los niveles bajos de apo D también están asociados a un menor tiempo libre de enfermedad y menor supervivencia (112). En relación a la expresión de apo D en los ganglios linfáticos afectados, no se ha demostrando una relación con el pronóstico de la enfermedad, lo que sugiere una mayor importancia de las características biológicas del tumor primario (113).

1.4.5. GANGLIOS LINFÁTICOS AXILARES

En el CM la región fundamental de drenaje es la axilar, y por ello la afectación de los ganglios axilares se considera uno de los factores pronósticos más importantes del CM, tanto como predictor de recurrencia de la enfermedad, como de supervivencia libre de enfermedad. Actualmente se considera su afectación como el principal factor pronóstico de esta enfermedad (114-115). Se ha señalado que el riesgo de padecer recurrencia local a los 10 años es de un 30-40 % en aquellas pacientes con más de 4 ganglios afectos y de un 7-15 % en aquellas mujeres sin afectación ganglionar.

El ganglio centinela, primer ganglio que recibe la linfa desde la mama, tiene un gran interés, tanto si es negativo y ya no será necesaria la realización de la resección de los ganglios axilares, como si es positivo, ya que en un elevado porcentaje de los casos la enfermedad está confinada en dicho ganglio. Por lo tanto es un marcador de buen pronóstico la no afectación del ganglio centinela, que refleja el estadio ganglionar en las pacientes con CM (116). Actualmente se emplean diversos métodos para evaluar la afectación del ganglio centinela durante la cirugía como citología por impronta o raspado, inmunocitoquímica rápida, secciones congeladas y combinaciones de los mismos, junto a nuevas técnica moleculares, como el OSNA (One-step-nucleic acid amplification). La afectación ganglionar metastásica y el número de ganglios afectados, se relaciona directamente con el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global del CM (117). La resección del ganglio centinela se diseñó para disminuir los efectos secundarios de la cirugía de los ganglios linfáticos, pero cuando el ganglio centinela está afectado se completa la disección de los ganglios linfáticos axilares de forma rutinaria debido a la posibilidad de que los ganglios no centinelas estén afectados por células tumorales. Según estudios existe entre un 50 y un 68% de las pacientes con ganglio centinela positivo,

siendo éste es el único ganglio de la axila afectado por células tumorales (118). Hoy en día se pretende evitar las disecciones de los ganglios linfáticos axilares extensas en pacientes con un bajo riesgo de recurrencia axilar.

1.5. ESTROMA TUMORAL

A pesar de que hasta hace pocos años las células epiteliales malignas han marcado la evaluación de los factores pronósticos de los tumores, al principio de los 70, Folkman (119) estudió el papel esencial de los vasos sanguíneos en el desarrollo tumoral, y a partir de ese momento aumentó el interés en el papel del estroma tumoral. El estroma tumoral está compuesto por una gran variedad de tipos celulares no-epiteliales, que incluyen células inflamatorias, fibroblastos y células vasculares. En el CM se encuentra alterado, tanto en su composición celular, como en el fenotipo de su matriz extracelular y de los fibroblastos que lo componen. Los resultados que se presentan en estudios actuales ponen en relieve los mecanismos por los que las células epiteliales del CM pueden aprovechar la biología de células del estroma para soportar la progresión tumoral (120). En condiciones fisiológicas el estroma actúa como una importante barrera a la transformación de las células epiteliales, pero en el CM su comportamiento cambia y se está dando cada vez más importancia a la influencia de las células del estroma tumoral sobre las células tumorales, siendo reconocido su papel de apoyo en la carcinogénesis (121). Se ha demostrado que el compartimiento estromal experimenta cambios en respuesta a lesiones epiteliales emergentes, y tiene un papel destacado en la iniciación del cáncer y su progresión, incluyendo el reclutamiento de nuevas células estromales que estimulan el crecimiento y la remodelación de la matriz extracelular, de modo que el fenotipo del tumor se regula de una manera compleja como resultado de las interacciones entre células malignas y el estromal (122). Así como la variación en los programas transcripcionales refleja la diversidad biológica de las células tumorales, y el tipo de expresión génica de las células epiteliales malignas mamarias distingue grupos asociados con la expresión de RE o el estado de HER2 (123), la expresión de genes del estroma tumoral distingue grupos relacionados con el pronóstico y puede predecir el resultado clínico en el CM (124).

Actualmente múltiples estudios demuestran la sobreexpresión de distintos factores por el estroma peritumoral y su relación con el CM. Se ha descrito que la expresión de MMP-11 por las CMI de los carcinomas de mama se relaciona con una elevada probabilidad de desarrollar metástasis a distancia, así como con la expresión de niveles elevados de IL-1, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- β Y NFkB. Por tanto estos factores, están implicados en la diafonía entre los tumores y su microambiente inflamatorio, como factores pronósticos y pueden presentar atractivas dianas terapéuticas (125). Se ha demostrado la existencia de un fenotipo alterado en los fibroblastos asociados al CM, sugiriendo que el CM podría alterar la naturaleza de sus fibroblastos peritumorales e incrementar su capacidad proliferativa y la secreción de factores de crecimiento, proteasas y proteínas de la matriz extracelular(126). De manera que los fibroblastos derivados del tumor exhiben características biológicas diferentes a las de los fibroblastos procedentes del tejido mamario no tumoral. Además, se ha demostrado que las células malignas del CM son capaces de reclutar fibroblastos en el interior de los tumores produciendo un microambiente idóneo para el crecimiento tumoral. Y se ha demostrado que los fibroblastos del estroma tumoral afectan al crecimiento, diferenciación e invasión de las células epiteliales normales y malignas de mama. Sin embargo, a pesar del creciente reconocimiento de la importancia de las interacciones entre estroma y tumor en la progresión del cáncer, se sabe poco acerca de los factores responsables de la regulación de la diafonía entre los fibroblastos del estroma y las células neoplásicas (127), aunque se sugiere un papel activo del estroma tumoral en la progresión del cáncer. Así, múltiples estudios han acumulado evidencias de que cambios en el comportamiento del estroma y su interacción con las células tumorales están íntimamente ligadas con el proceso de tumorigénesis, invasión tumoral y metástasis (128).

1.6. INFLAMACIÓN Y CÁNCER

La respuesta inflamatoria es una secuencia de eventos desencadenada por una lesión física, química o infecciosa de los tejidos. La inflamación es un mecanismo que elimina el agente responsable de la lesión e inicia la reparación de los tejidos mediante una respuesta inmunitaria innata y adaptativa bien coordinada.

Pero un fallo en el preciso control de esta respuesta inmune, puede perturbar el microambiente celular, conduciendo a alteraciones en los genes relacionados con el cáncer, y modificando proteínas cruciales implicadas en el ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis. Esta relación ya fue descrita en el siglo I por el médico romano Aulus Cornelius Celsus. Rudolf Virchow, médico alemán del siglo XIX, postuló que la microinflamación que resulta de la continua irritación, conduce a la mayoría de las enfermedades crónicas, como puede ser el cáncer (129). En los últimos años estudios experimentales y clínicos han podido confirmar esta hipótesis (130). Hoy se estima que las infecciones subyacentes y las reacciones inflamatorias están vinculadas al 25% de todos los casos de cáncer.

La evidencia indica que la infiltración de leucocitos puede promover fenotipos tumorales, tales como la angiogénesis, el crecimiento y la invasión(131). Esto puede ser debido a que células inflamatorias probablemente pueden influir en la promoción del cáncer mediante la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y proteasas, que estimulan la proliferación y la invasividad de las células cancerosas (132-133).

La acumulación de datos clínicos para tumores sólidos muestra una correlación entre la alta densidad de la infiltración de leucocitos en los tumores y la mala evolución de los pacientes con tumores malignos de distintos orígenes, como el de mama (134).

Destacan asociaciones ya conocidas entre procesos inflamatorios y cáncer, como la esofagitis crónica y el carcinoma esofágico sobre esófago de Barrett (135), la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) y el cáncer colorrectal(136), la hepatitis viral B y C o cirrosis hepática alcohólica y el hepatocarcinoma , la infección cervical por virus del papiloma humano y el cáncer de cuello de útero, la prostatitis y el cáncer de próstata, la pancreatitis y el cáncer de páncreas, o la infección gástrica por el *Helicobacter pylori* y el cáncer de estómago (137).

Cuando se produce una lesión tisular, ya sea física, química o infecciosa, se desencadena una secuencia de eventos que constituyen la respuesta inflamatoria, que generalmente elimina el agente responsable de la lesión e inicia la reparación de tejidos mediante una respuesta inmune. Este proceso acumula en los tejidos

lesionados células y mediadores solubles de manera coordinada y, generalmente, después de la eliminación del patógeno invasor y la cicatrización de heridas, la inflamación disminuye. Sin embargo, una inflamación sin resolver por cualquier fallo en el control preciso de la respuesta inmune puede continuar perturbando el microambiente celular, conduciendo a alteraciones en los genes relacionados con el cáncer y a la modificación de proteínas de señalización celular, involucradas en el ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis.

Se ha demostrado que las células inflamatorias mononucleares (CIM) a menudo están presentes en una etapa muy temprana del desarrollo del tumor (138). Las células inmunes(macrófagos, mastocitos, granulocitos, linfocitos, células natural Killer (NK), y células dendríticas), representan la primera línea de defensa, activándose y dando lugar a la secreción de citoquinas y quimiocinas que provocan una remodelación de la matriz celular y activan células estromales locales; tales como adipocitos, fibroblastos, células vasculares, que reclutando leucocitos circulantes en el tejido dañado (inflamación aguda) que, finalmente, llevan a cabo la eliminación de los agentes patógenos.

Esta secreción de citoquinas, por parte de las células inflamatorias, tales como el interferón- γ , el factor de necrosis tumoral (TNF), las interleuquinas (IL)-1 α / β o IL -6 y el factor nuclear-kappa B (NF- κ B), constituye uno de los principales enlaces entre la inflamación y la tumorogénesis, y puede ser clave para permitir que células tanto preneoplásicas como malignas, escapen a la apoptosis (139), actuando como factores iniciadores y promotores de la carcinogénesis.

1.6.1. CITOQUINAS

Las citoquinas son un conjunto de proteínas de pequeño peso molecular sintetizadas por multitud de células, especialmente las células del sistema inmune. Su función es inmunorreguladora, siendo fundamentales en la comunicación y en las interacciones que establecen las células del sistema inmune entre sí y con otras células, regulan la duración y la amplitud de la respuesta inmune, tanto innata como específica, reclutan células a la zona de conflicto e inducen la generación de nuevas células a partir de los precursores hematopoyéticos. Los objetivos últimos consisten en eliminar el patógeno y reparar los tejidos dañados y para ello intervienen en la

inflamación y en la hematopoyesis de distintos tipos celulares activando a macrófagos, eosinófilos, células NK y neutrófilos.

Dentro de las citoquinas tenemos las interleuquinas, los interferones, los factores de necrosis tumoral, los factores estimulantes de colonias, los factores estimulantes de crecimiento y las quimioquinas, que desempeñan funciones importantes revisadas en múltiples estudios (140-141).

En relación al CM tienen especial importancia las siguientes citoquinas.

1.6.1.1. Interleuquina-1 (IL-1)

La familia de la IL-1 está compuesta por dos factores (IL-1 α e IL-1 β), dos receptores transmembrana (IL-1RI e IL-1RII) y el receptor antagonista IL-1Ra. La IL-1 α se localiza en la membrana celular o en el citosol, y se cree que regula el medio intracelular. Los genes que la codifican se encuentran en el brazo largo del cromosoma 2. Se produce principalmente en los macrófagos, aunque también puede ser sintetizada por los neutrófilos, linfocitos T y B, células epiteliales y fibroblastos. La enzima convertidora de IL-1 β (ICE) la transforma en su forma activa madura.

La IL-1 es una citoquina pluripotente responsable del funcionamiento fisiológico normal, que puede ir desde la permeabilidad vascular, la aparición de fiebre durante una sepsis, hasta la secreción de citoquinas adicionales en enfermedades autoinmunes. La IL-1 es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda. Actúa sobre el sistema nervioso central produciendo sueño y anorexia. La IL-1 también estimula la liberación de hormonas hipofisarias e incrementa el número de células precursoras en la médula ósea, estimula la expresión de CD 54 en las células endoteliales, la liberación del factor tisular, la activación linfocitaria, la producción de IL-6 Y CSF, promueve la expresión de los genes que la producen, así como la síntesis de prostaglandinas, hormonas pituitarias, colagenasas, leucotrienos, interleukina-8 y de ciertos prooncogenes como c-fos y c-jun. Además estimula el sistema inmunológico para impulsar la producción de los linfocitos.

Así pues, existe un equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de la IL-1, que puede tener acciones estimuladoras e inhibitorias sobre diversos tipos celulares y promover la apoptosis de otras. Actualmente se estudia su papel en CM y en la regulación de la proliferación de células mamarias (142).

1.6.1.2. Interleuquina-5 (IL-5)

Es una glicoproteína que forma parte de la familia hematopoyética y está producida por los Linfocitos T Helper-2 y por los mastocitos. Es secretada en forma glicosilada por LT CD4+ activados del tipo Th2. Es esencial en la proliferación y diferenciación de las células precursoras de los eosinófilos, así como en el mantenimiento de la actividad de los eosinófilos maduros, siendo la responsable de la eosinofilia en infecciones parasitarias. Sobre los linfocitos B actúa incrementando su proliferación y estimulando la producción de IgA. Induce la proliferación de la célula T y la generación de LTC, coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL-3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción de Ig E e Ig G 4, induce la expresión y liberación de CD 23, la clase II del CMH en la células B, y cambia de TH a TH2. Aumenta la secreción de inmunoglobulinas y actúa como mediador en la activación de los eosinófilos. El aumento de los niveles de IL-5 en suero en el momento del diagnóstico es indicativo de alteraciones inmunológicas posiblemente relacionadas con marcadores genéticos de susceptibilidad de CM (143).

1.6.1.3. Interleuquina-6 (IL-6)

Es una glicoproteína cuyo gen está localizado en el cromosoma 7. Esta potente citoquina pleiotrópica puede ser expresada por diferentes tipos celulares como fibroblastos y células tumorales en respuesta a una amplia variedad de estímulos, como infección bacteriana o viral, inflamación y citoquinas inflamatorias. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF α . Es una citoquina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria que interviene en un gran número de actividades biológicas de procesos inflamatorios normales, mecanismos de defensa inmune y modulación del crecimiento celular. La IL-6 ha sido conocida por ser miembro del triunvirato de citoquinas que dirige la respuesta inflamatoria aguda (TNF, IL-1, IL-6). Es un pirógeno endogéno que estimula la producción de ACTH en la hipófisis, interviene en la producción de inmunoglobulinas,

diferenciación de linfocitos B, activación de linfocitos T citotóxicos y células plasmáticas. Es la responsable, junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A. También desempeña un papel importante en la regulación de la hematopoyesis, la activación de células inmunes, la inflamación y la carcinogénesis.

La mayoría de los genes diana de la IL6 están involucrados en la progresión del ciclo celular y supresión de la apoptosis, lo que apoya la importancia de la IL6 en la formación del tumor. Además la expresión elevada de sus niveles en suero se relaciona con el estadío del CM y con un pronóstico desfavorable y desarrollo de metástasis, ya que la IL-6 activa los factores de crecimiento del epitelio, HGF y otros factores promoviendo la proliferación celular y el crecimiento del tumor (144-150). También estimula la angiogénesis y la vascularización tumoral a través de la regulación en la síntesis de VEGF (151) y la migración de las células endoteliales, facilitando la diseminación de los tumores sólidos. Por ello múltiples estudios han relacionado la IL6 con el CM y su mal pronóstico (146). También se ha relacionado su expresión con la resistencia a tratamientos antitumorales, de modo que las células tumorales resistentes a agentes quimioterápicos producen altos niveles de IL6 (152), por lo que, esta citoquina promueve que la célula tumoral escape de la muerte celular inducida por la quimioterapia. Lo que ha abierto nueva líneas terapéuticas que antagonizan la señalización de IL-6 (153).

1.6.1.4. Interleuquina-17

La familia de la IL-17 está compuesta por seis miembros (IL-17A o IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17F) y es producida por células T helper (TH) 17 y por otras células inmunológicas, como las CD8+ citotóxicas (TC17), células T natural killer (NKT), células de la inmunidad innata y neutrófilos o monocitos, que tienen la capacidad de producir IL- 17 bajo determinadas condiciones patológicas. Su gen se encuentra en el cromosoma 6p12. Es una citoquina que actúa como un potente mediador en reacciones de tipo retardado mediante el aumento de la producción de quimioquinas en diversos tejidos para reclutar monocitos y neutrófilos al lugar de la inflamación. Induce la proliferación, la diferenciación y la citotoxicidad de las células de las NK.

La interleuquina 17 actúa de forma sinérgica con el factor de necrosis tumoral y la IL-1. Participa en la inducción y la mediación de respuestas proinflamatorias y se asocia con las respuestas alérgicas. Induce la producción de prostaglandinas y muchas otras citoquinas como IL-6, IL-1 β , TGF- β , TNF- α , IL-8, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos, células endoteliales y células epiteliales.

La IL-17 parece proporcionar una relación directa o indirecta entre las células T y la respuesta inflamatoria y hematopoyética. Entre sus efectos destaca la remodelación de las vías respiratorias y se ha relacionado con muchas enfermedades como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, asma, lupus, rechazo de aloinjertos y proceso inflamatorio en relación con infartos. Determinados estudios han demostrado que la expresión de la IL-17 por los macrófagos, promueve una mayor invasión celular en el CM y aumenta la densidad de los microvasos, por ello para el CM puede ser un importante factor pronóstico y potencial diana terapeútica. (154).

1.6.1.5. Interferón-beta (IFN- β)

El IFN- β está producido por fibroblastos y células epiteliales. Su síntesis puede ser inducida por virus, ARN de doble cadena, microorganismos, TNF e IL-1. Es una glicoproteína cuyo gen se ubica en el cromosoma 9p22. El IFN- β está implicado en la regulación de las respuestas inmunes humorales inespecíficos y la respuesta inmune contra infecciones virales. Aumenta la expresión de antígenos HLA de clase 1 y bloquea la expresión de antígenos de HLA de clase 2 estimulados por IFN- γ . Estimula las células NK y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la actividad de las células T supresoras y la síntesis de la IgE. En monocitos el IFN- β induce la síntesis de neopterina. También mejora la concentración de β -2-microglobulina en suero e inhibe selectivamente la expresión de algunos genes mitocondriales.

El IFN- β muestra una actividad antiproliferativa contra un número de líneas celulares establecidas a partir de tumores sólidos. En el CM es un actor implicado en la diafonía entre los tumores y su microambiente inflamatorio, y puede cobrar valor como factor pronóstico y posible diana terapéutica (125).

1.6.1.6. Factor Nuclear Kappa Beta (NFkB)

El Factor Nuclear kappa B (NFkB, Factor Nuclear Potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) es un complejo proteico que actúa como factor de transcripción del ADN. Se encuentra en la mayor parte de tipos celulares implicado en la respuesta celular a estímulos como el stress, citoquinas, anfígenos bacterianos o virales y otros, y desempeña un papel en la regulación de la respuesta inmune. Todos los miembros de la familia de NFkB comparten una estructura homóloga con la oncoproteína retroviral v-Rel. El Receptor activador del NFkB (RANK) es un miembro de la familia del Receptor del Factor Necrosis Tumoral (TNFR). El NFkB actúa como regulador en vías de señalización celular promoviendo la transcripción de genes fundamentales en relación con la proliferación y supervivencia celular. En células tumorales NFkB puede activarse por mutación de genes que codifican sus factores de transcripción o en genes que controlan su actividad. Otra forma de activación es por proceso autocrino debido a la secreción por las propias células tumorales. En cáncer de mama se ha demostrado que la expresión del receptor del NFkB en tumores primarios puede ser un marcador predictivo de metástasis óseas y mal pronóstico (155).

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudiar la expresión global de las citoquinas IL-1, IL-5, IL-6, IL-17, IFN-β y NFkB en 108 pacientes con cáncer de mama
2. Evaluar la expresión de las citoquinas en los diferentes tipos celulares principales que forman parte del tumor: células cancerosas y células estromales (fibroblastos y células mononucleares inflamatorias).
3. Analizar la relación entre la expresión de las citoquinas y las características clínico-patológicas de los carcinomas de mama.
4. Evaluar el impacto de la expresión de las citoquinas en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global de las pacientes con cáncer de mama.
5. Investigar la relación entre la expresión de MMP-11 por las celular mononucleares inflamatorias y la expresión de las diferentes citoquinas, así como evaluar su posible valor complementario sobre la evaluación pronóstica de las pacientes con cáncer de mama.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Fundación Hospital de Jove y el Comité de Ética e Investigación del Hospital de Cabueñes.

2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Estudio retrospectivo de 108 pacientes de sexo femenino con carcinoma de mama diagnosticadas en los hospitales de Jove y Hospital de Cabueñes del Área V (Gijón) del Principado de Asturias, cuyas muestras están almacenadas en los Bancos de Tumores de dichos centros.

Para el presente estudio se comenzó revisando las historias clínicas de las pacientes con cáncer de mama de los archivos de los hospitales antedichos. De todos estos casos se extrajeron 108 de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron los siguientes:

- Pacientes mujeres intervenidas en hospitales del Área V entre los años 1992-2002.
- Tipos histológicos de cáncer de mama: sólo se estudiaron casos con carcinoma ductal invasivo (NOS).
- Ausencia de metástasis sistémicas al diagnóstico.
- Neoplasias unilaterales.

Como criterios de exclusión se tuvieron en cuenta:

- Muestras de tumor primario no óptimas para los análisis.
- Pacientes sin información del estado de los ganglios regionales.
- Historia anterior de neoplasias, excepto: cáncer de piel no melanoma, carcinoma de cérvix *in situ*, carcinoma ductal *in situ*, o carcinoma lobulillar *in situ* de mama.
- Tumores no resecables.
- Cáncer de mama bilateral invasivo.

- Desarrollo de recurrencia loco-regional durante el periodo de seguimiento clínico.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía.

Del total de pacientes que cumplieron estos criterios, se extrajo aleatoriamente una muestra de 108 pacientes que fueron balanceadas en grupos de tamaño similar, con respecto a la presencia o ausencia de metástasis en ganglios axilares y al desarrollo de metástasis a distancia durante el periodo de seguimiento clínico.

Todas las pacientes fueron tratadas en los Hospitales citados de acuerdo a los protocolos terapéuticos vigentes. El estudio se adhirió a las regulaciones nacionales en materia legislativa.

3. MÉTODOS

Para la presente tesis se realizaron estudios clínicos, estudios anatomo-patológicos, estudios inmunohistoquímicos y análisis estadístico de los resultados obtenidos. Los datos fueron recogidos en tablas de datos informatizadas elaboradas de acuerdo con la metodología expuesta a continuación.

3.1. Estudio clínico

Se revisaron las historias clínicas y hojas de seguimiento de las 108 pacientes seleccionadas con carcinoma ductal invasivo de mama considerándose las siguientes variables clínicas:

Datos clínico-epidemiológicos:

- nombre, edad, sexo, antecedentes de cáncer de mama.
- Fecha y tipo de intervención quirúrgica.
- Recurrencia: definida como toda recidiva tumoral tanto local como a distancia (metástasis).

- Supervivencia libre de enfermedad: definida como el tiempo transcurrido entre la fecha de intervención quirúrgica y la fecha de diagnóstico de la recurrencia tumoral.
- Estatus de la paciente: situación de la paciente al finalizar el estudio, viva, muerta por causa del tumor, muerta por otras causas.

3.2. Estudio Anatomopatológico

Para el estudio anatomopatológico se revisaron los informes anatomopatológicos correspondientes a las 108 pacientes y se extrajeron de los mismos los siguientes datos:

- Localización de la neoplasia: derecha vs. izquierda.
- Tamaño de la neoplasia: dos dimensiones.

Se extrajeron de los archivos de los servicios de Anatomía Patológica las preparaciones histológicas correspondientes a cada uno de los casos. El número de secciones histológicas con tumor en cada caso osciló entre dos y seis, con una media de cuatro. De los bloques con tejido tumoral se realizaron nuevas secciones que fueron teñidas con hematoxilina-eosina y que fueron evaluadas microscópicamente en supervisión por dos patólogos de reconocida experiencia en el cáncer de mama para obtener los siguientes datos histológicos

- Tipo histológico. Solamente se estudiaron neoplasias con tipo histológico de Carcinoma Ductal Invasivo.
- Grado histológico. Se utilizó el sistema de graduación combinado Nottingham/Tenovus de acuerdo con las recomendaciones de CAP/AJCC de 2012.
- Carcinoma *in situ* acompañante. La clasificación del carcinoma *in situ* se realizó según las recomendaciones del protocolo CAP/AJCC 2012 (101).
- Estatus de márgenes quirúrgicos.
- Otros factores pronósticos: invasión linfovascular, invasión perineural, presencia de necrosis en componente invasivo.
- Estatus ganglionar: número de ganglios aislados del vaciamiento axilar, número de ganglios metastatizados.

- Estadio. Patológico / clínico de acuerdo con las recomendaciones de CAP/AJCC 2012 (101).

La Tabla 3.1. recoge las características clínico-patológicas de los pacientes y de sus tumores.

Tabla 3.1. Características generales de las 108 pacientes con cáncer de mama.

Características	Sin Recurrencia N	Con Recurrencia N
Casos totales	62	46
Mediana de la edad (años)		
<53	32 (51.6)	21
≥53	30 (48.4)	25
Menopausia		
Premenopausica	28	16
Postmenopausica	34	30
Tamaño tumoral		
T1	36	14
T2	26	32
Estatus ganglionar		
N-	41	20
N+	23	33
Grado Histológico (N/T)		
I	21	10
II	21	16
III	20	20
HER2 estatus		
Negativo	44	37
Positivo	16	9
Receptores estrogénicos		
Negativo	17	16
Positivo	45	26
Receptores de progesterona		
Negativo	18	22
Positivo	44	20
Grupos basales		
Luminal A	31	19
Luminal B	12	7
Her2	4	2
Basal-like	13	14
No basal vs. basal-like		
No basales	47	28
Basal-like	13	14
Estadío tumoral		
Estadío I	18	3
Estadío II	29	20
Estadío III	6	8
Radioterapia adyuvante		
No	42	25
Si	20	21
Terapia sistémica adyuvante		
TMX	23	8
QMT	16	18
QMT+TMX	20	14
Sin tratamiento	3	6

En las pacientes que desarrollaron metástasis a distancia se utilizó como punto final de seguimiento el momento de diagnóstico de la metástasis.

3.3. Estudio inmunohistoquímico

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron sobre tejidos extraídos de los bloques tisulares que habían sido procesados de forma rutinaria y embebidos en parafina. Con el objetivo de facilitar la homogeneidad de la técnica, el estudio inmunohistoquímico se realizó sobre secciones montadas en microarrays, de acuerdo con la técnica descrita a continuación.

3.3.1. Elaboración de Microarrays

Para la elaboración de los microarrays se seleccionaron áreas del bloque tisular con tejido tumoral después de la revisión de las secciones teñidas con hematoxilina-eosina.

En concreto se crearon mallas de tejido, siendo seleccionadas las zonas no necróticas del tumor por dos patólogos con experiencia en el proceso (Dr. Luis Ovidio González y Dr. Francisco Domínguez Iglesias). En cada bloque de tejido se puncionaron estas áreas obteniéndose dos cilindros por cada tumor de 1.5 mm de diámetro, que posteriormente se introdujeron dentro de un bloque receptor de parafina vacío. Para ello se utilizó un sistema manual (Beecker Instruments, Sun Praerie, WI, USA) (figura 3.1.).

De cada caso se obtuvieron un total de cuatro cilindros del tumor primario. Dos de esos cilindros correspondían al área central del tumor, y otros dos a la frontera tumoral invasiva. La frontera invasiva fue definida como el área de avance tumoral, que corresponde a los 2 mm de margen rodeando al tumor y conteniendo células tumorales. Con las muestras de las pacientes se elaboraron los bloques receptores multitejido a los que se añadió tejido mamario normal como control interno. Se elaboró un bloque para el centro tumoral y otro para la frontera.

De los bloques se procedió a obtener secciones de 5 µm de espesor mediante un micrótomo (Leika Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), transfiriéndose cada una de dichas muestras a su correspondiente portaobjetos de superficie adherente. Una de dichas secciones se tiñó con hematoxilina-eosina para comprobar que contenía las muestras representativas de los diferentes tumores.

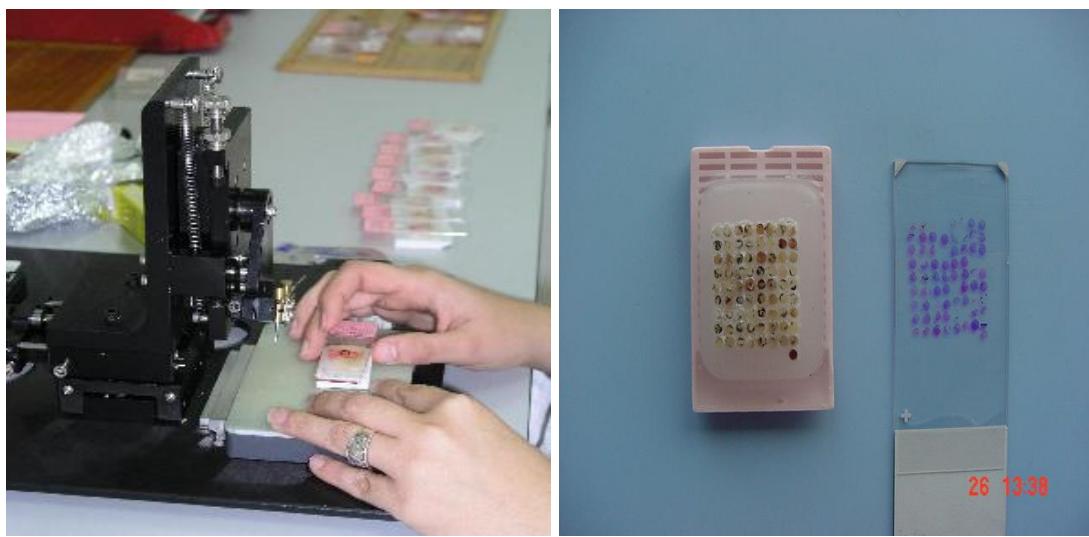


Figura 3.1. Procedimiento de elaboración de los microarrays. Elaboración manual de los bloques de microarrays (izq) y bloque y sección teñida con HE (dcha).

3.3.2. Técnica inmunohistoquímica

Para el procedimiento inmunohistoquímico las secciones de los microarrays fueron desparafinadas y rehidratadas en alcoholes de graduación creciente, según el modo convencional.

Se realizó un procedimiento de recuperación antigénica 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 (Target Retrieval Solution, Dako), mientras el otro contiene como solución de recuperación antigénica tampón citrato, pH6 (Target Retrieval Solution, Dako) usando uno u otro dependiendo de las características del anticuerpo primario. Este sistema provocó el calentamiento de las muestras a 95°C durante 20 minutos, atemperándolas posteriormente hasta 65°C. Finalmente, en todos los casos las secciones se mantuvieron un mínimo de 5 minutos en tampón de lavado.

A continuación las secciones se introdujeron en bandejas especiales de un inmunoteñidor automático (Auto-Stainer. Dako) donde se realizó la técnica de inmunohistoquímica siguiendo los siguientes pasos: a) lavado en tampón; b) bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min; c) incubación con anticuerpos primarios (Tabla 5); d) lavado en tampón (Wash Buffer,

Dako) para eliminar el exceso de anticuerpo; e) incubación de los cortes con el sistema de amplificación de polímeros de dextrano durante 30 min (EnVisionTM 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 tampón; h) revelado del marcaje inmunohistoquímico utilizando como cromógeno tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) (Dako) durante 7 min y 30 seg.; i) contra-tinción con hematoxilina de Harris durante 2 min.; j) las muestras se lavaron, se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente, llevándolas a xilol, y se montaron con la ayuda de un montador automático para posteriormente ser observadas al microscopio óptico Olympus BX51.

En la tabla 3.2. se exponen las principales características de los anticuerpos monoclonales en relación con la técnica IHQ empleada.

Tabla 3.2. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Referencia	Recuperación antigénica	Dilución	Tiempo de incubación	Linker
IL-1β	NB600-633 Bionova	pH6	1:200	120'	NO
IL-5	sc-7887 Santa Cruz	pH 6	1:50	30'	NO
IL-6	H3569-B01P Bionova	pH6	1:300	120'	SI
IL-17	251552 Abbiotec	pH6	1:200	120'	NO
IFNβ	T3236 Epitomics	pH9	1:800	60'	NO
NFkB	1546-1 Epitomics	pH9	1:1500	60'	NO

Se incluyeron controles negativos y positivos conocidos para asegurar la especificidad de la técnica. La calidad de las tinciones inmunohistoquímicas fue evaluada por los patólogos citados más arriba previamente a su análisis.

3.4. Análisis cuantitativo de las tinciones inmunohistoquímicas

Para cada anticuerpo se estudió la localización de la inmunorreactividad en la muestra, el porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción de las mismas. En todos los casos se realizó una cuantificación del área teñida. Para ello se empleó un sistema de análisis de imagen que utiliza microscopio Olympus BX51 y un software adaptado al mismo (Analysis, Soft imaging system, Münster, Alemania) (Figura 3.2).

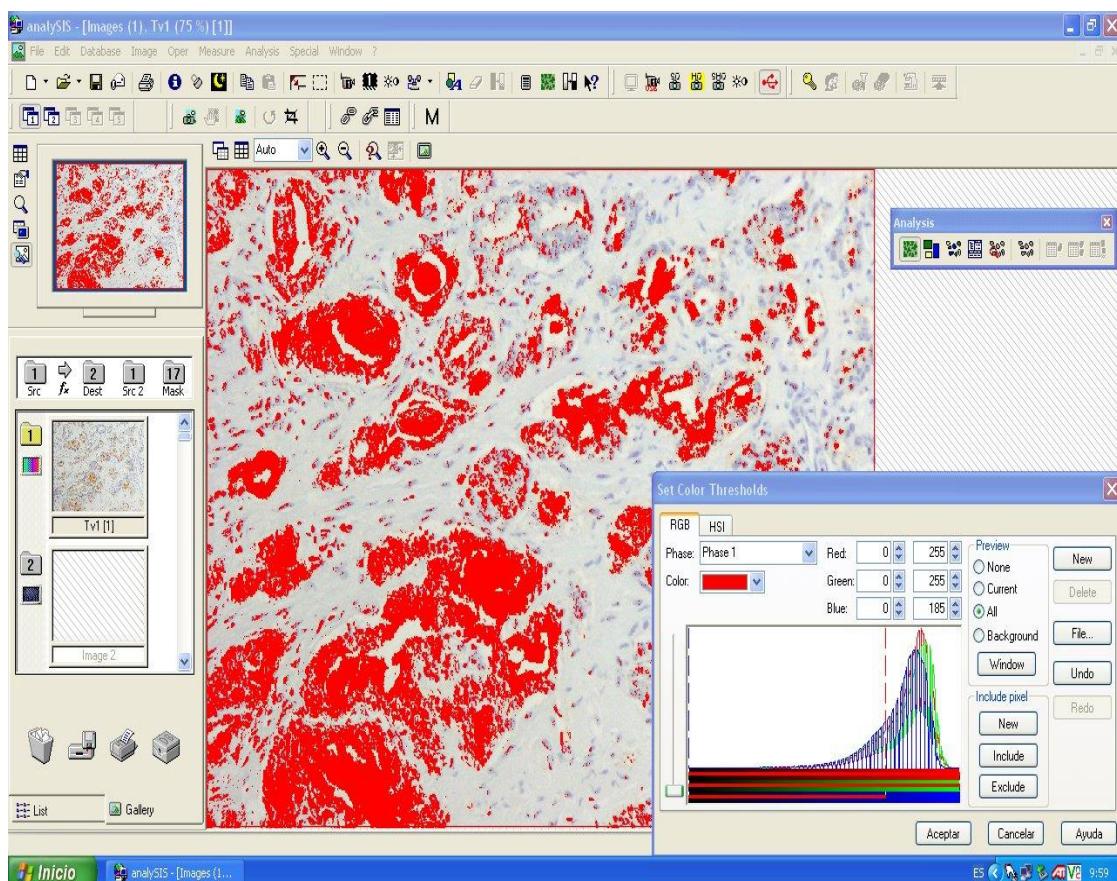


Figura 3.2. Programa específico de software que calcula automáticamente el porcentaje de células teñidas.

Cada muestra se tiñó con el anticuerpo a estudio y se contrastó con la tinción con hematoxilina, ya que los umbrales ópticos son diferentes para cada tipo de tinción. Se analizó cada una de las dos muestras de cada paciente con un objetivo de 400x, estudiando dos áreas teñidas con el anticuerpo. Obteniéndose de cada campo un porcentaje de área teñida resultante de la relación entre el área teñida y el área no teñida. Este porcentaje de área teñida para cada muestra será la media de

la obtenida en los dos campos analizados. La intensidad de la tinción se cuantificó en una escala numérica de 0 a 3, reflejando 0 la ausencia de tinción, 1 la tinción débil, 2 la tinción moderada y 3 la tinción intensa. Así mismo, se calculó un valor de tinción, mediante hoja de cálculo, multiplicando la intensidad de la misma por el porcentaje de células teñidas. Este score global fue entonces promediado entre el número de cilindros que fueron realizados para cada paciente. Si en un determinado cilindro no había tumor, entonces no se dio ningún score para ese cilindro y se tomó como resultado definitivo el del otro.

La evaluación de la tinción inmunohistoquímica global se basó sobre la tinción de áreas correspondientes tanto a las células tumorales como a las células estromales. No obstante, en el presente estudio también evaluamos la tinción inmunohistoquímica para cada uno de los principales tipos celulares: células tumorales, fibroblastos y células mononucleares inflamatorias (CMIs). Se pueden distinguir las células estromales de las células cancerosas ya que éstas últimas son de mayor tamaño. Además, los fibroblastos son células alargadas, mientras que las CMIs son células redondas. Por otra parte, mientras que las células cancerosas están dispuestas formando un patrón acinar o trabecular, las células estromales están dispersas.

3. 5. Análisis estadístico

Para los distintos análisis estadísticos, se utilizó el programa SPSS versión 17.0 (SPSS Inc. Richmond, CA, USA). Las diferencias en porcentajes fueron calculadas con la prueba del Chi-cuadrado. Los datos se analizaron dividiendo las pacientes en grupos de acuerdo con sus características clínico-patológicas. Para valorar las diferencias entre grupos se aplicaron los test de Mann-Whitney y de Kruskall-Wallis. La correlación entre la expresión de los factores a estudio ha sido llevada a cabo mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Para la estimación de probabilidad de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en las pacientes con cáncer de mama, se ha utilizado el método no paramétrico de Kaplan-Meier y el test de log-Rank. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con un nivel de probabilidad del 5% ($p<0,05$).

IV. RESULTADOS

4.1. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE IL-1B, IL-5, IL-6, IL-17, IFN-β Y NFkB EN EL CÁNCER DE MAMA

Con el objetivo de analizar la expresión de los diferentes factores a analizar, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para cada factor evaluado (IL-1B, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- β y NFkB) en los carcinomas mamarios. En la siguiente Figura 4.1 se pueden observar las imágenes globales de tinción para algunos de los anticuerpos utilizados.

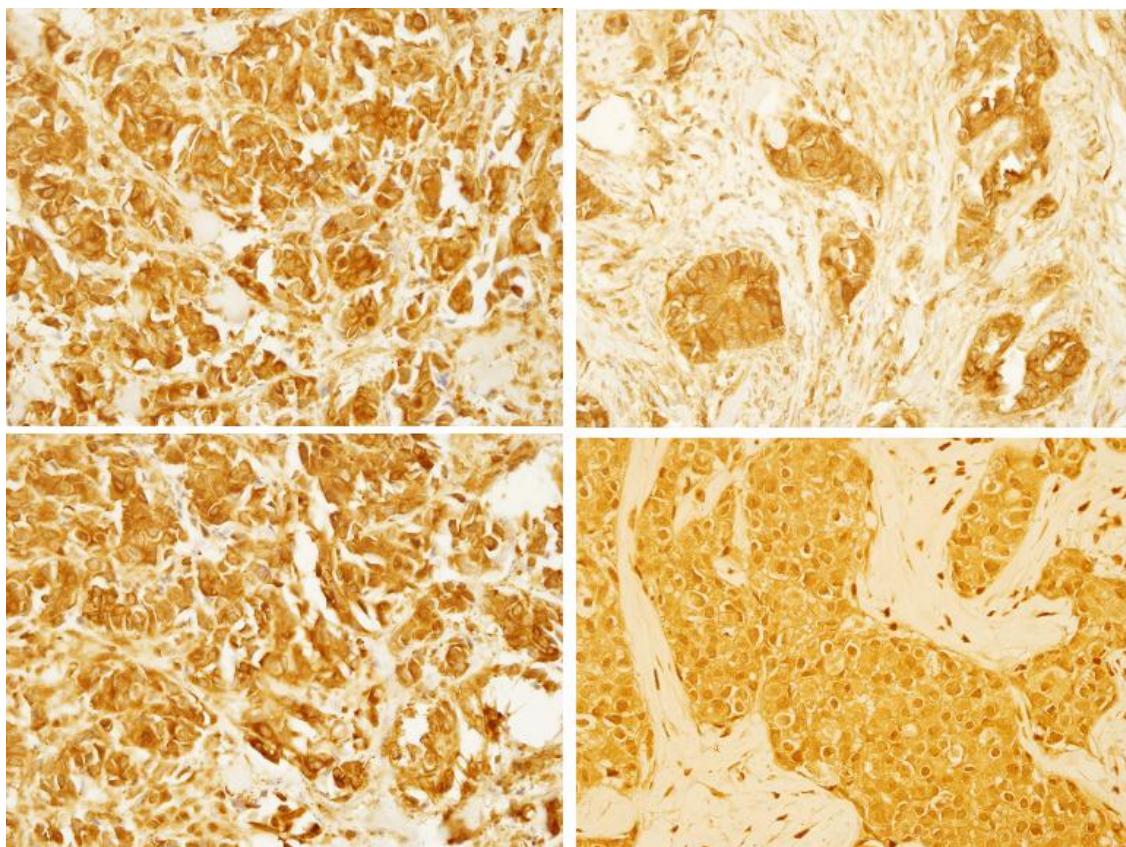


Figura 4.1.: Ejemplos de inmunotinciones positivas para IL-1B (supra izq.), IL-17 (supra dcha.), IL-6 (infra izq) y INFb1 (infra dcha.) (20x).

La inmunotinción para todas las proteínas estudiadas se localizó en el citoplasma de los casos positivos de células cancerosas, como de los casos positivos de fibroblastos o CMIs.

4.2. EXPRESIÓN GLOBAL (SCORE) DE LOS FACTORES EN LOS CARCINOMAS MAMARIOS

La tabla 4.1. recoge la expresión global (score) de los factores a estudio en función de su mediana e intervalo. Como se puede apreciar existió una amplia variabilidad de esos valores globales de tinción inmunohistoquímica.

Tabla 4.1. Expresión global de IL-1B, IL-5, IL-6, IL-17, IFN-B Y NFKB de los carcinomas mamarios.

FACTOR	Mediana del SCORE	SCORE (valor mínimo)	SCORE (valor máximo)
IL-1B	163,70	0,00	281,01
IL-5	125,26	0,00	242,33
IL-6	63,58	0,00	231,39
IL-17	159,52	0,00	291,07
IFN-B	145,35	56,44	266,83
NFKB	147,90	0,00	291,62

4.3. EXPRESIÓN DE LOS FACTORES POR LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES

En este estudio también se ha evaluado el porcentaje de tinciones positivas para cada tipo celular analizado (células tumorales, fibroblastos y células mononucleares inflamatorias (CMIs)). Como se puede apreciar en la tabla 4.2, la inmunotinción para todas las proteínas estudiadas se localizó mayoritariamente en las células tumorales. Sin embargo, la expresión de los distintos factores por los fibroblastos y/o las CMIs del estroma tumoral ocurrió en un porcentaje menor de casos, salvo para el IFN-β que fue positivo en todas las tinciones para los fibroblastos y CMIs.

Por otra parte, cabe señalar que cuando un factor fue expresado por un determinado tipo celular, al menos el 80% de esas células fueron positivas.

Tabla 4.2. Expresión de IL-1B, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- β y NFkB por las células epiteliales, fibroblastos y CMIs de los carcinomas mamarios.

FACTOR	Cel. Tumorales	Fibroblasto	CMI
	N (%)	N (%)	N (%)
IL-1B	96 (88,9)	77 (71,3)	81 (75,0)
IL-5	86 (79,6)	38 (35,2)	52 (48,1)
IL-6	93 (86,1)	36 (33,3)	42 (38,9)
IL-17	90 (83,3)	60 (55,6)	65 (60,2)
IFN- β	98 (90,7)	98 (90,7)	97 (89,8)
NFkB	99 (91,7)	71 (65,7)	71 (65,7)

Los valores están representados como número de casos (porcentajes).

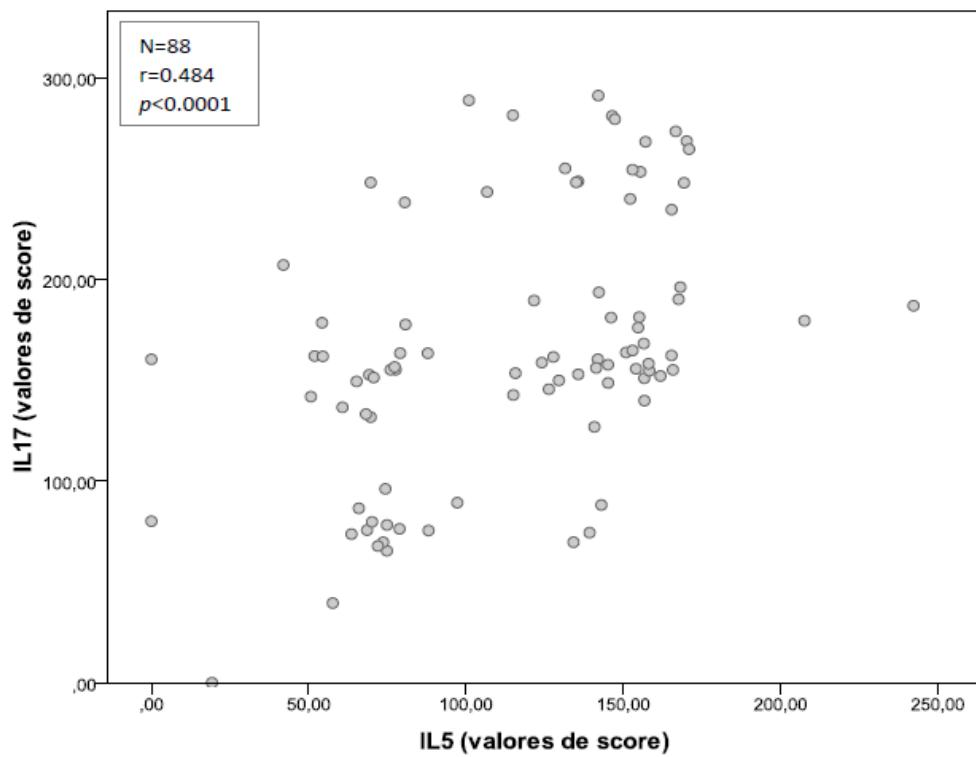
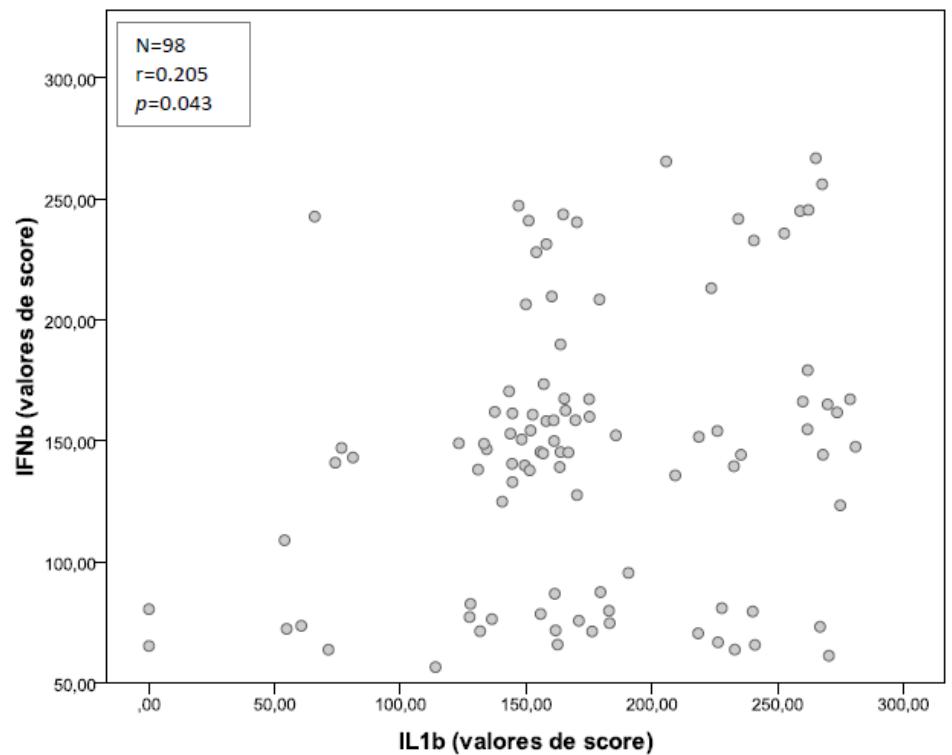
4.4. CORRELACIONES ENTRE LAS EXPRESIONES DE IL-1B, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- β y NFkB

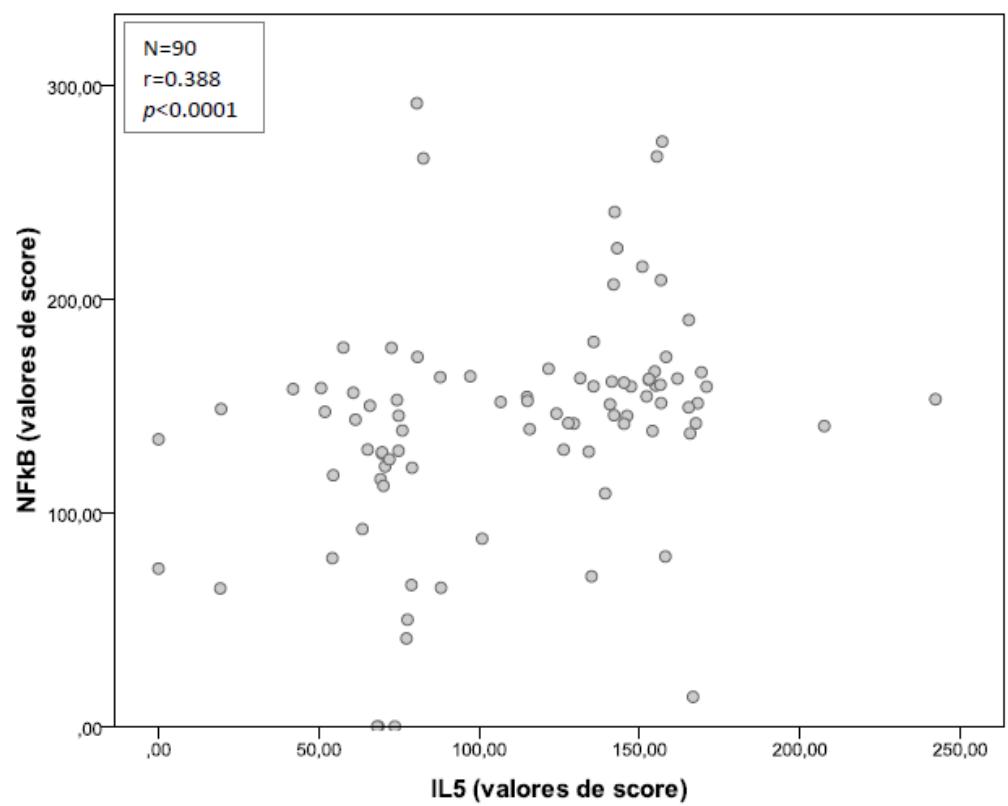
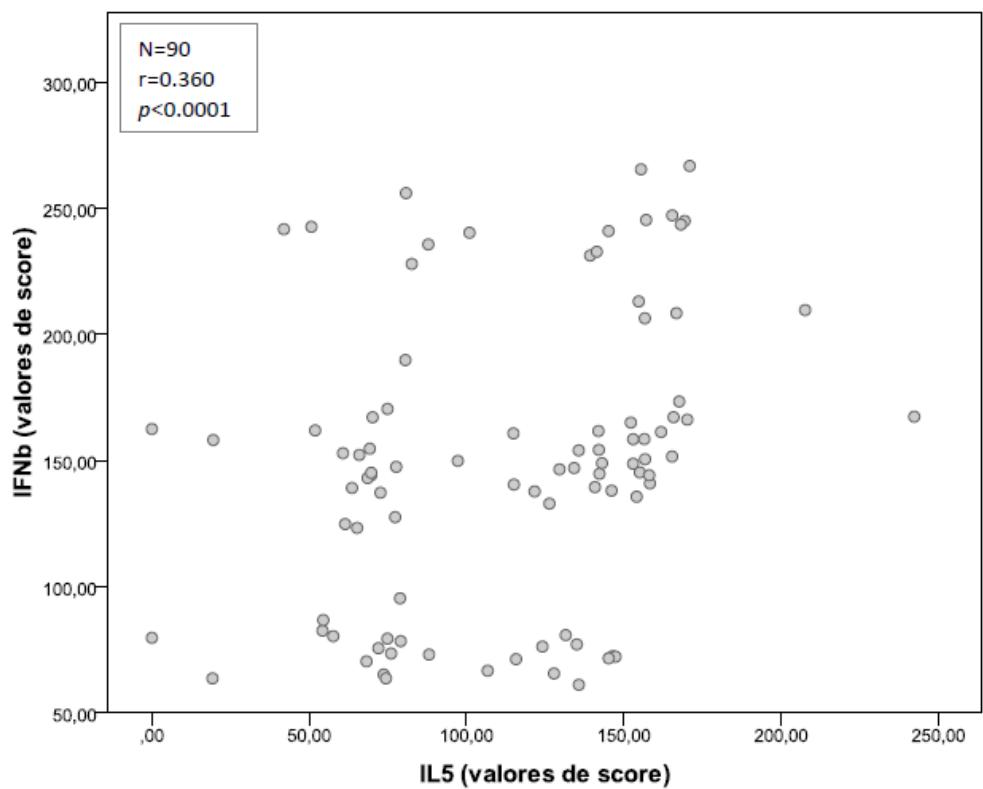
La tabla 4.3 y la figura 4.2 muestran las correlaciones entre todos los factores analizados en los carcinomas mamarios. Se utilizó el método no paramétrico de Spearman para analizar esos resultados. Como se puede observar en la tabla, se han encontrado varias correlaciones significativas entre proteínas en los carcinomas mamarios. Los resultados muestran una correlación significativamente positiva entre los valores de score de IL-1B e IFN- β ($p:0,043$), IL-5 e IL-17 ($p<0,0001$), IFN- β ($p<0,0001$), y NFkB ($p<0,0001$); entre IL17 e IFN- β ($p:0,001$) y NFkB ($p<0,0001$); y entre la expresión de IFN- β y NFkB ($p<0,0001$).

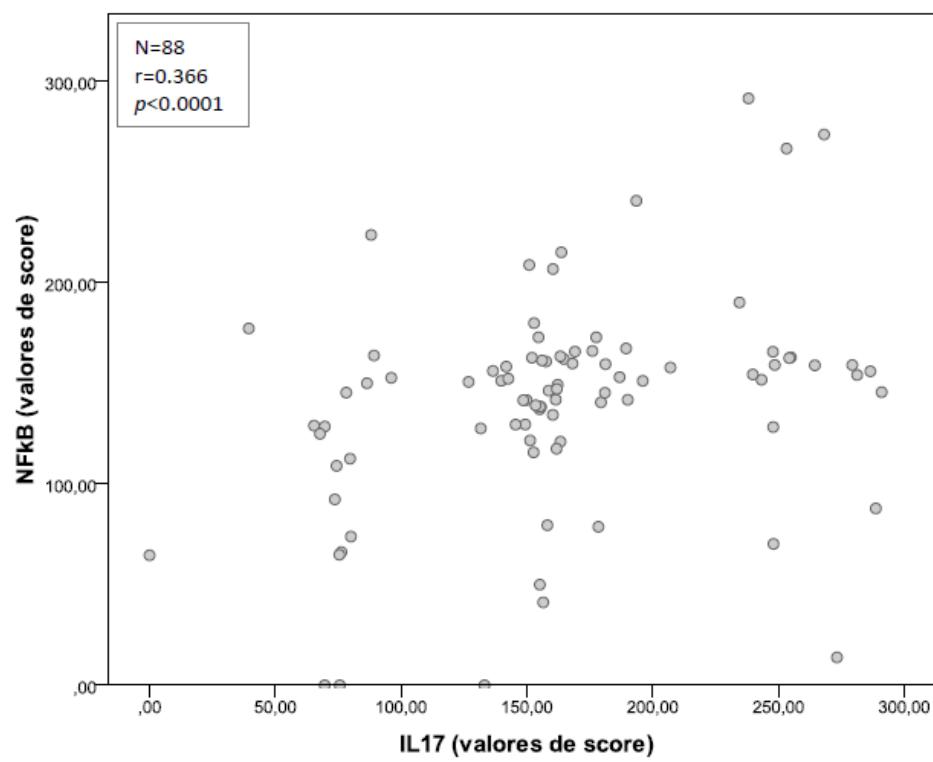
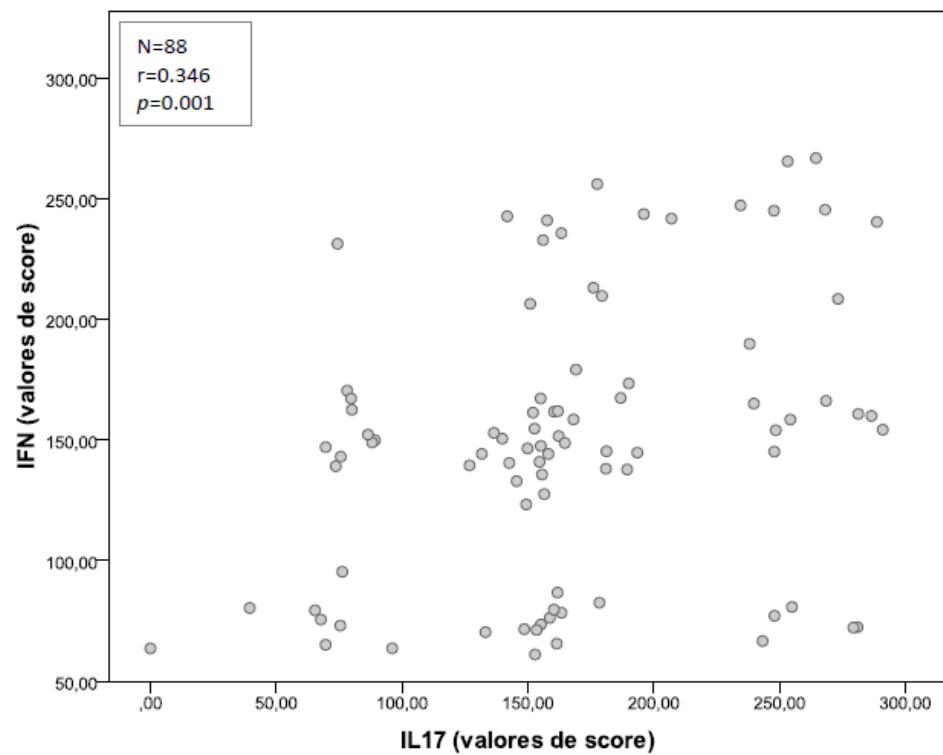
Tabla 4.3. Correlaciones entre la expresión simultánea de los factores a estudio de los carcinomas mamarios.

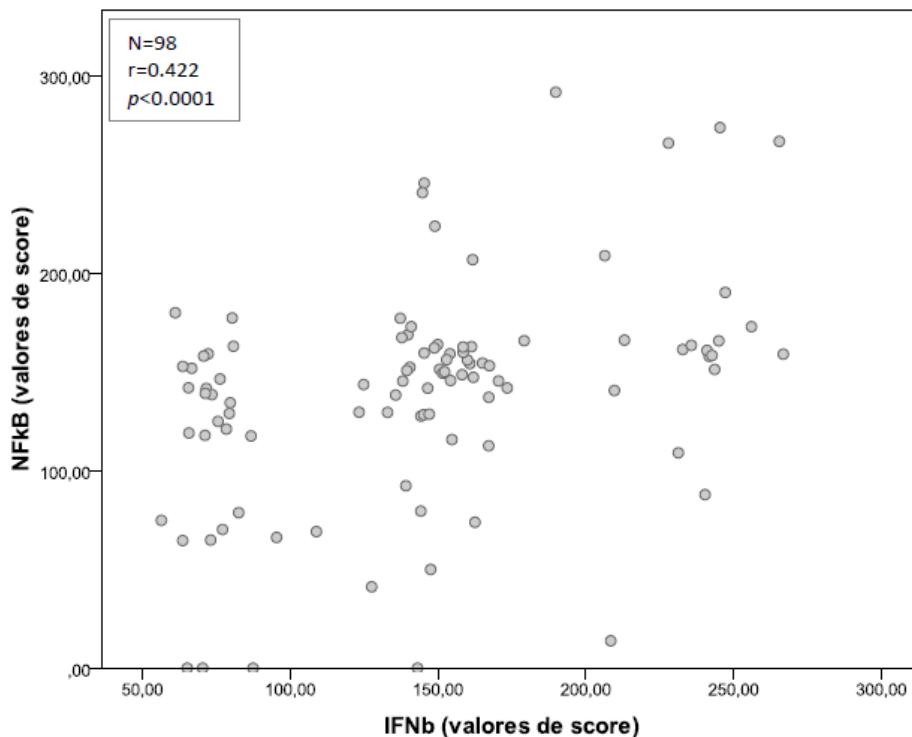
	IL-1B	IL-5	IL-6	IL-17	IFN- β	NFkB
IL-1B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IL-5	$p:0,334$	-----	-----	-----	-----	-----
IL-6	$p:0,173$	$p:0,696$	-----	-----	-----	-----
IL-17	$p:0,115$	$p<0,0001$	$p:0,082$	-----	-----	-----
IFN- β	$p:0,043$	$p<0,0001$	$p:0,917$	$p:0,001$	-----	-----
NFkB	$p:0,478$	$p<0,0001$	$p:0,279$	$p<0,0001$	$p<0,0001$	-----

Figura 4.2. Relación de las correlaciones significativas entre los diferentes factores del estudio.









4.5. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL (SCORE) DE LOS FACTORES CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES Y DE SUS TUMORES

La tabla 4.4. representa las relaciones entre la expresión global (score) como variable continua de los diferentes factores y las características clínico-patológicas de las pacientes y de sus tumores. Como se puede apreciar en esa tabla, los valores de score de IL-1B y de IL-17 se relacionan significativamente con el grado histológico ($p=0,032$ y $p=0,010$, respectivamente). De tal forma que los tumores con valores elevados de esas dos citoquinas fueron más frecuentemente indiferenciados. También se pudo comprobar que los tumores HER-2 positivos mostraron valores significativamente más elevados de IFN- β o NFkB ($p=0,023$ y $p=0,021$, respectivamente). Por otra parte, los tumores con ganglios negativos mostraron valores significativamente más elevados de IL-6 ($p=0,018$).

Tabla 4.4. Relación entre la expresión global de los factores y las características clínicopatológicas de los carcinomas mamarios.

CARACTERÍSTICAS	IL-1 N; mediana (rango)	IL-5 N; mediana (rango)	IL-6 N; mediana (rango)	IL-17 N; mediana (rango)	IFN-β N; mediana (rango)	NFkB N; mediana (rango)
Edad (mediana)						
≤53 años	51; 166.8 (0-278.6)	48; 127.8(0-170.2)	50; 62.3 (0-231.4)	49; 156.1(39.5-291.1)	51; 149.0(61.1-245.4)	51; 150.1 (0-291.6)
<53 años	51; 161.4(54.8-281.0)	44; 121.1 (0-242.3)	47; 68.2 (0-177.4)	41; 161.8 (0-288.8)	51; 144.2(56.4-266.8)	51; 143.6 (0-266.7)
ESTADO MENOPÁUSICO						
Premenopáusica	41; 166.8 (0-274.9)	38; 135.0(42.0-171.0)	40; 61.5 (0-231.4)	39; 156.1(39.5-286.6)	41; 145.2(61.1-266.8)	41; 146.4 (0-240.7)
Postmenopáusica	61; 163.7(54.8-281.0)	54; 115.4 (0-242.3)	57; 68.2 (0-177.4)	51; 161.5 (0-291.1)	61; 145.4(56.4-265.5)	61; 148.6 (0-291.6)
TAMAÑO TUMORAL						
T1	44; 163.1(65.9-273.7)	41; 135.7(19.3-207.7)	42; 65.0 (0-168.0)	40; 155.9 (0-288.8)	46; 150.2(56.4-265.5)	46; 143.6 (0-266.7)
T2	58; 164.2 (0-281.0)	51; 115.1 (0-242.3)	55; 63.6 (0-231.4)	50; 161.7(39.5-291.1)	56; 139.7(63.7-266.8)	56; 151.0 (0-291.6)
ESTADO GANGLIONAR						
N-	53; 162.5(53.9-273.7)	45; 139.3 (0-242.3)	49; 85.1 (0-177.4)	42; 161.1 (0-291.1)	54; 145.1(56.4-265.5)	54; 147.1 (0-291.6)
N+	49; 166.8 (0-281.0)	47; 115.8 (0-171.0)	48; 49.8 (0-231.4)	48; 157.3(39.5-268.5)	48; 146.8(63.7-266.8)	48; 148.3 (0-273.7)
GRADO HISTOLÓGICO	p=0.032			p=0.010		
SBR I (bien diferenciado)	28; 148.4(53.9-275.0)	21; 101.0(19.3-161.9)	25; 71.4 (0-177.4)	21; 149.4 (0-288.8)	26; 139.7(56.4-242.7)	29; 129.6 (0-223.8)
SBR II (mod. diferenciado)	34; 177.1 (0-281.0)	35; 115.8(19.5-242.3)	33; 63.3 (0-159.0)	33; 155.6(39.5-281.3)	36; 153.5(65.6-266.8)	34; 147.9 (0-291.6)
SBR III (poco diferenciado)	40; 166.3 (0-278.9)	36; 133.3 (0-170.2)	39; 63.6 (3.1-231.4)	36; 172.6(67.8-291.1)	40; 145.3(63.7-265.5)	39; 152.8 (0-273.7)
HER2-neu					p=0.023	p=0.021
Negativo	77; 163.4 (0-278.9)	71; 115.8 (0-242.3)	74; 63.4 (0-231.4)	70; 156.3 (0-291.1)	77; 141.0(56.4-266.8)	78; 242.7 (0-291.6)
Positivo	23; 175.2(54.8-281.0)	20; 139.0(19.5-207.7)	22; 65.1 (15.6-165.2)	19; 177.6(89.3-286.6)	24; 152.8(72.3-156.1)	23; 159.1 (0-265.8)
R. ESTROGÉNICOS						
Negativos	31; 166.8(54.8-275.1)	29; 131.5 (0-170.2)	28; 65.8 (3.1-152.2)	27; 158.7(65.4-291.1)	32; 138.4(70.4-265.5)	30; 144.6(0-291.6)
Positivos	68; 162.6 (0-281.0)	61; 121.7 (0-242.3)	66; 70.0 (0-231.4)	61; 160.3 (0-288.8)	66; 149.4(56.4-266.8)	68; 149.7 (0-273.7)
R. PROGESTERONA						
Negativos	39; 166.8 (0-281.0)	37; 134.2 (0-170.2)	36; 65.8 (3.1-168.0)	34; 159.0(39.5-291.1)	38; 142.9(61.1-265.5)	37; 148.6 (0-291.6)
Positivos	60; 162.6(53.9-278.9)	53; 121.7(19.3-242.3)	58; 69.4 (0-231.4)	54; 159.5 (0-288.8)	60; 149.4(56.4-266.8)	61; 147.2 (0-273.7)
GRUPOS BASALES						
Luminal A	48; 159.7 (0-278.9)	44; 121.1 (0-242.3)	47; 72.6 (0-231.4)	45; 152.9 (0-288.8)	47; 146.5(56.4-266.8)	49; 141.9 (0-273.7)
Luminal B	18;192.3(148.2-281)	16; 116.5(19.5-207.7)	18; 65.1 (22.0-165.2)	15; 176.1(89.3-286.6)	18;156.1(135.7-256)	18; 158.5(50.0-265.9)
Basal-like	26; 268.5(74.1-275.0)	25; 124.1 (0-170.2)	24; 65.8 (3.1-152.2)	23; 157.7(65.4-291.1)	26; 140.2(70.4-265.5)	25; 143.6 (0-291.6)
HER2	5; 147.0 (54.8-259.0)	4; 156.4(126.4-169.3)	4; 54.6 (15.6-141.4)	4; 241.2(145.5-279.4)	6; 110.2 (72.3-247.2)	5; 159.1 (0-190.2)
ESTADÍO TUMORAL						
Estadio I	17; 176.3(68.5-273.7)	15;135.7 (19.3-165.8)	16; 87.9 (0-168.0)	14; 154.0 (0-288.8)	19; 138.1(56.4-265.5)	18; 125.6(64.6-266.7)
Estadio II	49; 166.8 (0-275.0)	44; 118.4 (0-242.3)	47; 72.6 (0-231.4)	45; 162.3(67.8-291.1)	48; 143.9(63.7-266.8)	47; 148.6 (0-240.7)
Estadio III	14; 163.7(73.6-281.0)	13; 145.2 (0-169.3)	13; 59.9 (15.6-154.0)	13; 155.6(69.7-268.2)	13; 148.8(71.6-247.2)	13; 141.6(50.0-273.7)
RADIOTERAPIA ADYUVANTE					p=0.046	
No	62; 166.0(53.9-275.0)	53; 101.0 (0-242.3)	58; 75.9 (0-231.4)	51; 161.5 (0-291.1)	63; 140.5(61.1-256.1)	63; 149.3 (0-291.6)
Si	40; 159.1 (0-281.0)	39; 141.4 (0-207.7)	39; 55.0 (0-159.0)	39; 157.7(39.5-281.0)	39; 150.6(56.4-266.8)	39; 146.4 (0-273.7)
TERAPIA SISTÉMICA ADYUV.					p=0.025	
TMX	29; 165.2(68.5-269.9)	24; 121.4(19.3-242.3)	25; 85.9 (0-231.4)	25; 162.0 (0-288.8)	28; 150.2(63.7-256.1)	28; 141.2(13.8-245.6)
QMT	32; 151.4 (0-273.7)	30; 130.3 (0-170.2)	31; 73.1 (3.1-177.4)	28; 157.1(65.4-291.1)	33; 144.8(56.4-265.5)	33; 145.6 (0-291.6)
QMT+TMX	33; 169.6 (0-281.0)	32; 126.9 (0-171.0)	34; 58.0 (0-175.5)	31; 158.7(39.5-286.6)	33; 147.5(63.7-266.8)	33; 151.2(50.0-273.7)

También se analizaron las posibles relaciones de los factores con las características clínico-patológicas, considerando los tumores dicotomizados de acuerdo al valor de la mediana del score para cada uno de los factores (Tabla 4.5.). Así, los resultados muestran que los tumores con valores elevados de IL-17 se asocian con elevado grado histológico ($p=0.032$), los tumores HER-2 positivos con valores elevados de IFN- β o NFkB ($p=0.041$ y $p=0.015$, respectivamente), los tumores con ganglios negativos con estadio tumoral más temprano con valores más bajos de IL-6, y los tumores de tipo Basal-Like con valores elevados de IFN- β ($p=0.020$). Así mismo, resultó llamativo comprobar que los tumores de tipo Basal-Like mostraban valores elevados de NFkB, cercanos a la significación estadística ($p=0.052$).

Tabla 4.5. Relación entre la expresión global de factores (score) y características clínico-patológicas de los carcinomas mamarios.

CARACTERÍSTICAS	Nº	IL-1	1L-5	1L-6	IL-17	IFN-B	NFKB
EDAD <=53 >53	51 51	27(54) 23(46) P:0,552	24(52,29) 22(47,8) P:1,00	23(47,9) 25(52,1) P:0,614	21(47,7) 23(52,3) P:0,298	27(52,9) 24(47,1) P:0,692	27(52,9) 24(47,1) P:0,692
ESTADO Premenopáusica Postmenopáusica	41 61	21(42) 29(58) P:0,871	20(43,5) 26(56,5) P:0,832	18(37,5) 30(62,5) P:0,594	17(38,6) 27(61,4) P:0,505	20(39,2) 31(60,8) P:1,00	20(39,2) 31(60,8) P:1,00
TAMAÑO TUMORAL T1 T2	44 58	21(42) 29(58) P:0,978	24(52,2) 22(47,8) P:0,208	21(43,8) 27(56,3) P:1,00	17(38,6) 27(61,4) P:0,383	28(54,9) 23(45,1) P:0,073	21(41,2) 30(58,8) P:0,551
ESTADO GANGLIONAR N- N+	53 49	24(48) 26(52) P:0,557	24(52,2) 22(47,8) P:0,677	33(68,8) 15(31,3) P:0,001	22(50) 22(50) P:0,683	26(51) 25(49) P:0,843	27(52,9) 24(47,1) P:1,00
GRADO HISTOLÓGICO SBRI (bien diferenciado) SBRII (moderadamente d.) SBRIII (poco diferenciado)	28 34 40	9(18) 19(38) 22(44) P:0,111	9(19,6) 17(37) 20(43,5) P:0,637	13(27,1) 16(33,3) 19(39,6) P:0,958	6(13,6) 15(34,1) 23(52,3) P:0,032	10(19,6) 22(43,1) 19(37,3) P:0,196	12(23,5) 17(33,3) 22(43,1) P:0,472
HER2-neu Negativo Positivo	77 23	37(75,5) 12(24,5) P:0,913	34(73,9) 12(26,1) P:0,482	36(76,6) 11(23,4) P:1,00	30(69,8) 13(30,2) P:0,086	34(66,7) 17(33,3) P:0,041	33(66) 17(34) P:0,015
RECEPTORES ESTROGÉNICOS Negativos Positivos	31 68	17(34,7) 32(65,3) P:0,616	16(34,8) 30(65,2) P:0,760	14(29,2) 34(70,8) P:1,00	12(27,9) 31(72,1) P:0,749	12(23,5) 39(76,5) P:0,073	13(26,5) 36(73,5) P:0,511
RECEPTORES PROGESTERONA Negativos Positivos	39 60	21(42,9) 28(57,1) P:0,622	21(45,7) 25(54,3) P:0,496	18(37,5) 30(62,5) P:1,00	17(39,5) 26(60,5) P:1,00	17(33,3) 34(66,7) P:0,345	19(38,8) 30(61,2) P:1,00
GRUPOS BASALES Luminal A Luminal B Her2 Basal-like	48 18 5 26	21(43,8) 10(20,8) 15(31,3) 2(4,2) P:0,620	22(47,8) 8(17,4) 12(26,1) 4(8,7) P:0,268	24(51,1) 9(19,1) 12(25,5) 2(4,3) P:1,00	20(47,6) 10(23,8) 9(21,4) 3(7,1) P:0,240	24(47,1) 15(29,4) 10(19,6) 2(3,9) P:0,020	21(43,8) 14(29,2) 10(20,8) 3(6,3) P:0,052
ESTADÍO TUMORAL Estadio I Estadio II Estadio III	17 49 14	11(24,4) 27(60) 7(15,6) P:0,690	8(21,1) 20(52,6) 10(26,3) P:0,136	12(29,3) 25(61) 4(9,8) P:0,059	4(11,1) 26(72,2) 6(16,7) P:0,154	7(17,9) 22(56,4) 10(25,6) P:0,068	5(14,7) 24(70,6) 5(14,7) P:0,219
RADIOTERAPIA ADYUVANTE No Si	62 40	33(66) 17(34) P:0,392	21(45,7) 25(54,3) P:0,035	35(72,9) 13(27,1) P:0,016	27(61,4) 17(38,6) P:0,505	27(52,9) 24(47,1) P:0,103	33(64,7) 18(35,3) 0,684
TERAPIA SISTÉMICA ADYUVANTE TMX QMT QMT+TMX Sin tratamiento	32 29 32 11	15(30) 12(24) 18(36) 5(10) P:0,429	12(26,1) 16(34,8) 16(34,8) 2(4,3) P:0,849	17(35,4) 17(35,4) 12(25) 2(4,2) P:0,052	15(34,1) 12(27,3) 15(34,1) 2(4,5) 0,527	17(33,3) 15(29,4) 18(35,3) 1(2) P:0,097	11(21,6) 16(31,4) 19(37,3) 5(9,8) P:0,462

4.6 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES POR LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

A continuación se analizaron las relaciones entre la expresión de los distintos factores por los fibroblastos y CMIs del estroma respectivamente, y las características clínico-patológicas de las pacientes y sus tumores.

Cabe señalar que no se analizaron esas relaciones con la expresión de los factores por las propias células tumorales, ya que estas fueron en casi todos los tumores positivas para los diferentes factores.

Como se puede observar en las tablas 4.6. y 4.7., los tumores de mujeres de más avanzada edad mostraron más frecuentemente expresión positiva del NFkB en los fibroblastos y las CMIs, si bien esas diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0.058$ y $p=0.055$, respectivamente). Así mismo una asociación similar fue observada para el estado menopáusico.

Tabla 4.6. Relación entre la expresión de los factores por los fibroblastos del estroma tumoral y las características clínico-patológicas de los carcinomas mamarios.

CARACTERÍSTICAS	Nº	IL-1	1L-5	1L-6	IL-17	IFN-B	NFKB
EDAD							
<=53	51	38(49,4)	19(50)	17(47,2)	35(58,3)	50(51)	31(43,7)
>53	51	39(50,6) p:1,000	19(50) p:0,596	19(52,8) p:0,662	25(41,7) p:0,331	48(49) p:1,00	40(56,3) p:0,058
ESTADO							
Premenopáusica	41	30(39)	17(44,7)	13(36,1)	28(46,7)	40(40,8)	24(33,8)
Postmenopáusica	61	47(61) p:0,943	21(55,3) p:0,968	23(63,9) p:0,656	32(53,3) p:0,425	58(59,2) p:1,00	47(66,2) p:0,055
TAMAÑO TUMORAL							
T1	44	34(44,2)	17(44,7)	16(44,4)	26(43,3)	42(42,9)	32(45,1)
T2	58	43(55,8) p:0,521	21(55,3) p:1,00	20(55,6) p:1,00	34(56,7) p:0,813	56(57,1) p:1,00	34(54,9) p:1,00
ESTADO GANGLIONAR							
N-	53	45(58,4)	13(34,2)	21(58,3)	35(58,3)	50(51)	36(50,7)
N+	49	32(41,6) p:0,029	25(65,8) p:0,070	15(41,7) p:0,414	25(41,7) p:0,006	48(49) p:1,00	35(49,3) p:0,741
GRADO HISTOLÓGICO							
SBRI (bien diferenciado)	28	18(23,4)	8(21,1)	12(33,3)	13(21,7)	24(24,5)	20828,2
SBRII (moderadamente d.)	34	27(35,1)	16(42,1)	9(25)	22(36,7)	35(35,7)	22(31)
SBRIII (poco diferenciado)	40	32(41,6) p:0,885	14(36,8) p:0,835	15(41,7) p:0,274	25(41,7) p:0,717	39(39,8) p:1,00	29(40,8) p:0,492
HER2							
Negativo	77	56(74,7)	27(73)	29(82,9)	46(78)	76(78,4)	51(72,9)
Positivo	23	19(25,3) p:0,441	10(27) p:0,214	6(17,1) p:0,394	13(22) p:0,981	21(21,6) p:1,00	19(27,1) p:0,213
REC. ESTROGÉNICOS							
Negativos	31	23(30,3)	8(21,6)	10(28,6)	16(27,1)	31(32,6)	17(25)
Positivos	68	53(69,7) p:0,576	29(78,4) p:0,067	25(71,4) p:1,00	43(72,9) p:0,495	64(67,4) p:1,00	51(75) p:0,115
REC. PROGESTERONA							
Negativos	39	27(35,5)	12(32,4)	14(40)	23(39)	38(40)	22(32,4)
Positivos	60	49(64,5) p:0,184	25(67,6) p:0,187	21(60) p:0,823	36(61) p:1,00	57(60) p:1,00	46(67,6) p:0,151
GRUPOS BASALES							
Luminal A	48	37(50)	20(55,6)	19(55,9)	31(53,4)	47(50)	34(50,7)
Luminal B	18	14(18,9)	8(22,2)	5(14,7)	11(19)	16(17)	16(23,9)
Her2	5	18(24,3)	6(16,7)	9(26,5)	14(24,1)	26(27,7)	14(20,9)
Basal-like	26	5(6,8) p:0,397	2(5,6) p:0,121	1(2,9) p:0,761	2(3,4) p:0,771	5(5,3) p:1,00	3(4,5) p:0,138
ESTADIO TUMORAL							
Estadio I	17	15(23,8)	5(16,1)	7(26,9)	11(22,4)	16(20,8)	8(16,7)
Estadio II	49	38(60,3)	17(54,8)	15(57,7)	32(65,3)	48(62,3)	31(64,6)
Estadio III	14	10(15,9) p:0,471	9(29) p:0,119	4(115,4) p:0,763	6(12,2) p:0,152	13(16,9) p:1,00	9(18,8) p:231
RADIOTERAPIA AD.							
No	62	49(63,6)	18(47,4)	25(69,4)	37(61,7)	60(61,2)	41(57,7)
Si	40	28(36,4) p:0,281	20(52,6) p:0,249	11(30,6) p:0,195	23(38,3) p:0,322	38(38,8) p:1,00	30(42,3) p:0,351
TERAPIA SISTÉMICA AD.							
TMX	32	26(33,8)	11(28,9)	14(38,9)	19(31,7)	26(26,5)	17(23,9)
QMT	29	21(27,3)	9(23,7)	16(44,4)	17(28,3)	31(31,6)	20(28,2)
QMT+TMX	32	25(32,5)	17(44,7)	5(13,9)	20(33,3)	34(34,7)	29(40,8)
Sin tratamiento	11	5(6,5) p:0,038	1(2,6) p:0,090	1(2,8) p:0,004	4(6,7) p:0,605	7(7,1) p:1,00	5(7) p:0,119

Tabla 4.7. Relación entre la expresión de los factores por las CMIs del estroma tumoral y las características clínico-patológicas de los carcinomas mamarios.

CARACTERÍSTICAS	Nº	IL-1	1L-5	1L-6	IL-17	IFN-B	NFKB
EDAD =<53 >53	51 51	39(48,1) 42(51,9) p:0,594	29(55,8) 23(44,2) p:0,953	22(52,4) 20(47,6) p:1,00	37(56,9) 28(43,1) p:0,485	50(51,5) 47(48,5) p:0,984	31(43,7) 40(56,3) p:0,058
ESTADO Premenopáusica Postmenopáusica	41 61	31(38,3) 50(61,7) p:0,689	24(46,2) 28(53,8) p:0,647	17(40,5) 25(59,5) p:1,00	31(47,7) 34(52,3) p:0,215	40(41,2) 57(58,8) p:1,00	24(33,8) 47(66,2) p:0,055
TAMAÑO TUMORAL T1 T2	44 58	41(41,8) 57(58,2) p:0,741	26(50) 26(50) p:0,417	19(45,2) 23(54,8) p:1,00	27(41,5) 38(58,5) p:0,405	42(43,3) 55(56,7) p:1,00	22(45,1) 39(54,9) p:1,00
ESTADO GANGLIONAR N- N+	53 49	44(54,3) 37(45,7) p:0,472	24(46,2) 28(53,8) p:1,00	23(54,8) 19(45,2) p:0,725	35(53,8) 30(46,2) p:0,078	49(50,5) 48(49,5) p:1,00	36(50,7) 35(49,3) p:0,741
GRADO HISTOLÓGICO SBRI (bien diferenciado) SBRII (moderadamente d.) SBRIII (poco diferenciado)	28 34 40	19(23,5) 30(37) 32(39,5) p:0,566	14(26,9) 21(40,4) 17(32,7) p:0,185	13(31) 12(28,6) 17(40,5) p:0,512	15(23,1) 23(35,4) 27(41,5) p:0,824	24(24,7) 34(35,1) 39(40,2) p:0,403	20(28,2) 22(31) 29(40,8) p:0,492
HER2 Negativo Positivo	77 23	60(75,9) 19(24,1) p:0,801	40(78,4) 11(21,6) p:0,769	33(80,5) 8(19,5) p:0,588	51(79,7) 13(20,3) p:0,995	75(78,1) 21(21,9) p:1,00	51(72,9) 19(27,1) p:0,213
RECEPTORES ESTROGÉNICOS Negativos Positivos	31 68	25(31,3) 55(68,8) p:0,845	17(32,7) 35(67,3) p:0,987	14(33,3) 28(66,7) p:0,534	18(28,1) 46(71,9) p:0,638	30(31,9) 64(68,1) p:0,71	17(25) 51(75) p:0,115
RECEPTORES PROGESTERONA Negativos Positivos	39 60	28(35) 52(65) p:0,076	20(38,5) 32(61,5) p:0,571	17(40,5) 25(59,5) p:0,699	25(39,1) 39(60,9) p:0,980	37(39,4) 57(60,6) p:0,837	22(32,4) 46(67,6) p:0,151
GRUPOS BASALES Luminal A Luminal B Her2 Basal-like	48 18 5 26	38(48,7) 15(19,2) 21(26,9) 4(5,1) p:0,928	25(49) 9(17,6) 15(29,4) 2(3,9) p:0,878	20(48,8) 7(17,1) 13(31,7) 1(2,4) p:0,544	34(54) 11(17,5) 16(25,4) 2(3,2) p:0,775	47(50,5) 16(17,2) 25(26,9) 5(5,4) p:0,450	34(50,7) 16(23,9) 14(20,9) 3(4,5) p:0,138
ESTADÍO TUMORAL Estadío I Estadío II Estadío III	17 49 14	16(24,6) 36(55,4) 13(20) p:0,192	10(21,7) 27(58,7) 9(19,6) p:0,944	8(24,2) 20(60,6) 5(15,2) p:0,893	11(20) 35(63,6) 9(16,4) p:0,797	16(21,1) 47(61,8) 13(17,1) p:0,736	8(16,7) 31(64,6) 9(18,8) p:0,231
RADIOTERAPIA ADYUVANTE No Si	62 40	49(60,5) 32(39,5) p:1,00	31(59,6) 21(40,4) p:0,500	28(66,7) 14(33,3) p:0,306	38(58,5) 27(41,5) p:0,867	59(60,8) 38(39,2) p:1,00	41(57,7) 30(42,3) p:0,351
TERAPIA SISTÉMICA ADYUVANTE TMX QMT QMT+TMX Sin tratamiento	32 29 32 11	27(33,3) 22(27,2) 27(33,3) 5(6,2) p:0,014	15(28,8) 16(30,8) 20(38,5) 1(1,9) p:0,096	14(33,3) 18(42,9) 9(21,4) 1(2,4) p:0,034	19(29,2) 20(30,8) 22(33,8) 4(6,2) p:0,938	26(26,8) 30(30,9) 34(35,1) 7(7,2) p:0,535	17(23,9) 20(28,2) 29(40,8) 5(7) p:0,119

4.7. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GLOBAL (SCORE) TUMORAL DE LOS FACTORES Y EL PRONÓSTICO DE LAS PACIENTES

En el presente estudio se ha evaluado la significación pronóstica de todos los factores analizados en todas las pacientes incluidas en el presente estudio.

Inicialmente se analizó el valor pronóstico de los valores globales (score), y que fueron dicotomizados en base al valor de la mediana del score para cada factor, en el conjunto de mujeres con cáncer de mama.

La figura 4.3 muestra las curvas de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global determinadas para el conjunto de las pacientes. Como se puede apreciar, las pacientes con valores intratumorales elevados de IL-6 mostraron unas mayores probabilidades de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global en comparación con las pacientes con valores más bajos de esa citoquina ($p=0.003$ y $p=0.004$, respectivamente).

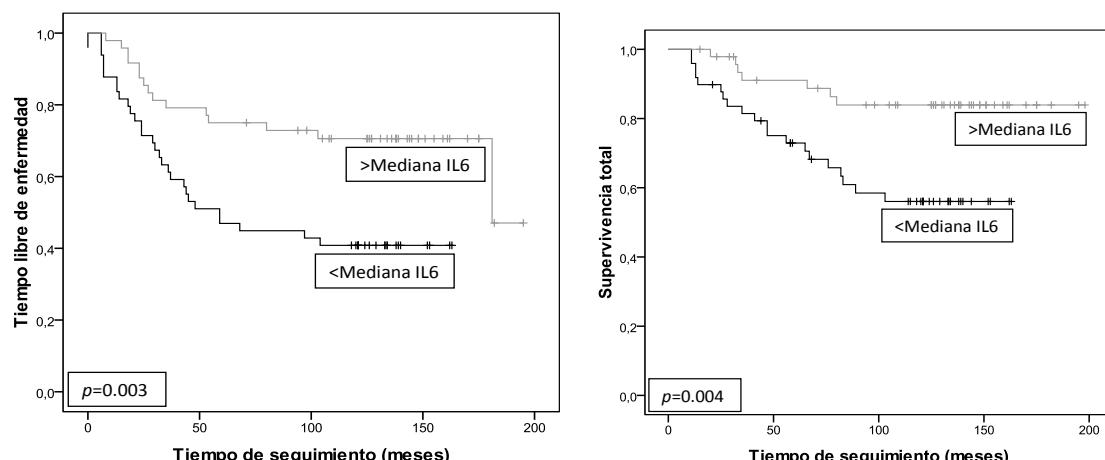
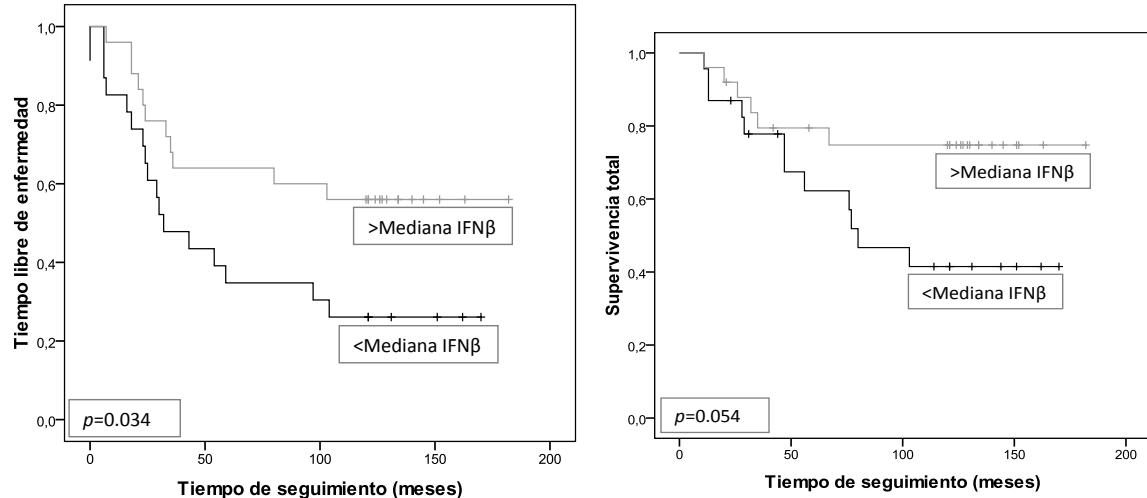
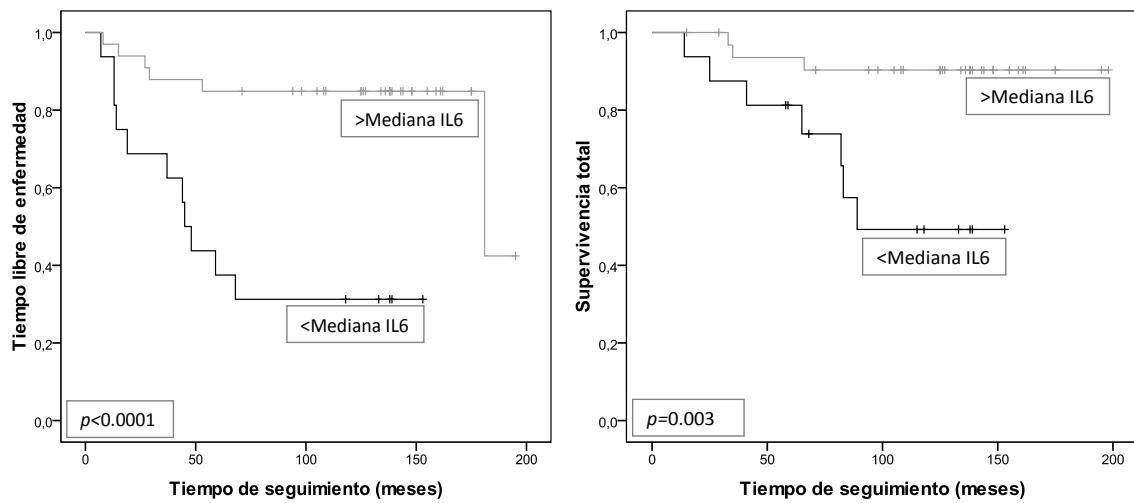


Figura 4.3. Curvas de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global según la expresión de IL-6.

También se evaluó el impacto pronóstico de los valores de score de cada factor en los diferentes subgrupos de pacientes clasificados de acuerdo al estado de afectación ganglionar. Los resultados demostraron que la elevada expresión tumoral de IL-6 se asoció con una mayor probabilidad de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos ($p<0.0001$ y $p=0.003$ respectivamente) (figura 4.4). Por otra parte también se observó que la expresión tumoral elevada de IFN- β se asocia con una menor probabilidad de

recurrencia tumoral en el subgrupo de pacientes con ganglios positivos ($p=0.034$) (figura 4.5)



4.8. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES POR LOS FIBROBLASTOS DEL ESTROMA TUMORAL Y EL PRONÓSTICO DE LAS PACIENTES

Se analizaron las curvas de TLE y supervivencia determinados en el conjunto de los pacientes en base a la expresión de cada factor por los fibroblastos del estroma tumoral. Así, la expresión de IL-1 β por los fibroblastos del estroma tumoral se asoció con una menor probabilidad de recurrencia tumoral y mayor supervivencia global de los pacientes ($p=0.002$ y $p=0.007$ respectivamente) (figura 4.6).

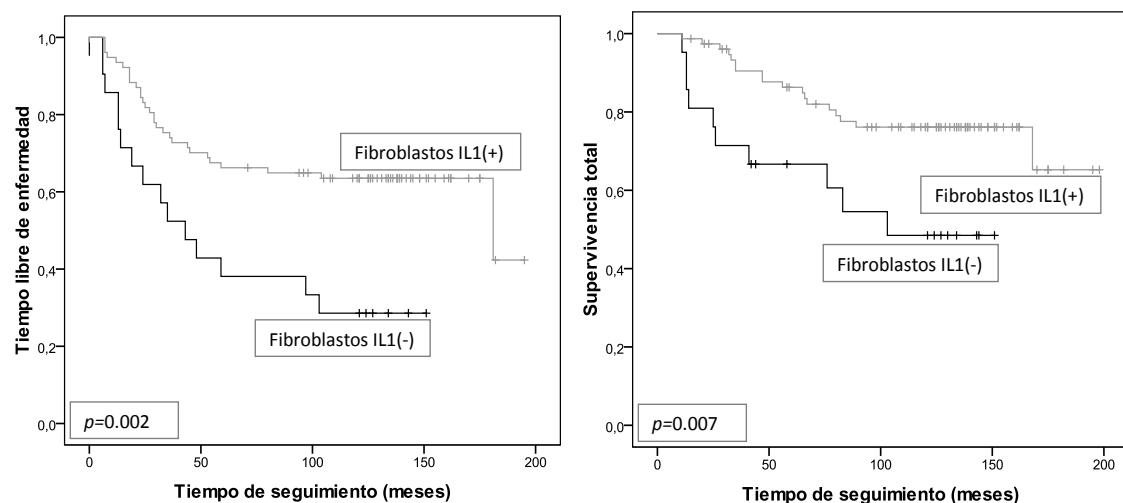


Figura 4.6. Tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global según la expresión de IL1 en fibroblastos estromales.

La figura 4.7. muestra las curvas de TLE y supervivencia en los subgrupos de pacientes clasificados en función del estado ganglionar. De entre todas esas evaluaciones, se encontró que la expresión de IL-1 β por los fibroblastos del estroma tumoral en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos se asoció significativamente con el pronóstico. Así, y de forma similar a lo observado en el grupo total de pacientes, la expresión de IL-1 β se asoció con una mayor probabilidad de TLE y supervivencia en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos ($p<0.0001$ para ambas) (figura 4.7).

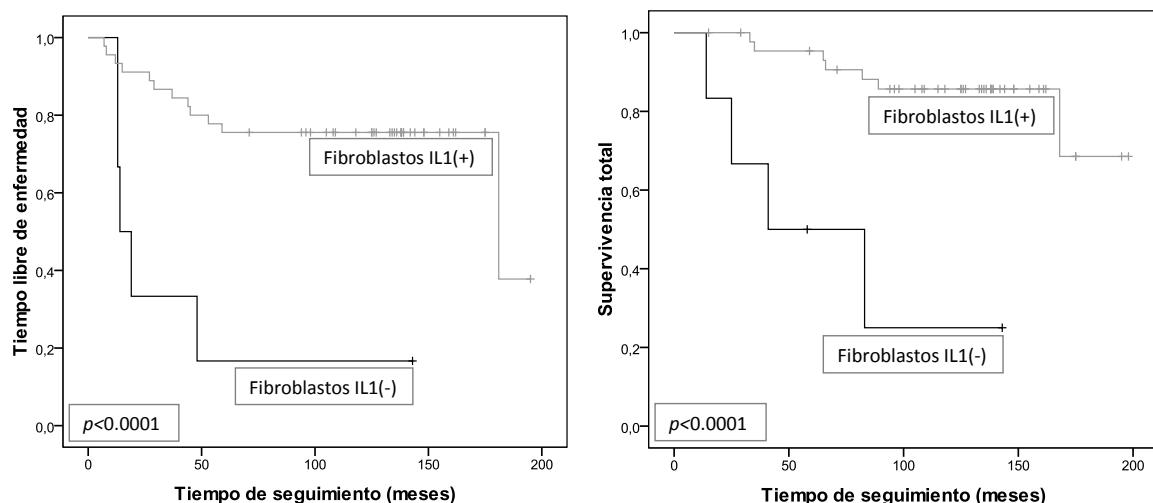


Figura 4.7. Curvas de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global según la expresión de IL-1B en fibroblastos y estado ganglionar.

4.9 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS Y LA DE MMP-11 POR LAS CMIS DEL ESTROMA TUMORAL

Puesto que las citoquinas seleccionadas para el estudio lo fueron en base a que mostraban sobreexpresión previa de los tumores CMIs MMP-11 positivos, además de un pronóstico favorable, nos pareció razonable evaluar la posible relación entre esas expresiones proteicas, así como investigar el impacto pronóstico de la expresión de las citoquinas sobre el "status" de expresión de MMP-11 por las CMIs. Como muestra la tabla 4.8., no se encontraron relaciones significativas entre la expresión de MMP-11 CMIs y los valores de SCORE para las diferentes citoquinas.

Tabla 4.8. Relación entre la expresión de MMP-11 por las CMIs del estroma tumoral y los valores de score de las citoquinas en los carcinomas mamarios.

Factores	Tumores con CMIs MMP11-	Tumores con CMIs MMP11+
	mediana (intervalo)	mediana (intervalo)
IL1	164.2 (0-281.1)	163.9 (60.6-262.0)
IL5	121.7 (0-207.7)	134.2 (50.7-242.3)
IL6	69.2 (0-177.4)	61.9 (0-231.4)
IL17	161.5 (0-291.1)	156.1 (67.8-254.3)
IFNb	145.3 (56.4-266.8)	147.1 (63.7-242.7)
NFkB	145.4 (0-291.6)	151.0 (0-265.8)

Por otra parte y como muestran las tablas 4.9. y 4.10., tampoco se encontraron diferencias significativas de las expresiones de citoquinas por las células del estroma tumoral (fibroblastos o CMIs) entre los grupos de tumores clasificados en función de la expresión de MMP-11 por las CMIs.

Tabla 4.9. Relación entre la expresión de citoquinas por los fibroblastos del estroma tumoral en función de la expresión de MMP-11 por las CMIs.

FACTORES	Tumores con CMIs MMP11-	Tumores con CMIs MMP11+
	N(%)	N(%)
IL1	50 (52)	26 (27)
IL5	24 (27)	14 (16)
IL6	19 (20)	15 (15)
IL17	36 (40)	24 (26)
IFNb	63 (64)	35 (36)
NFkB	43 (43)	27 (27)

Tabla 4.10. Relación entre la expresión de citoquinas por los CMIs del estroma tumoral en función de la expresión de MMP-11 por las CMIs.

FACTORES	Tumores con CMIs MMP11-	Tumores con CMIs MMP11+
	N(%)	N(%)
IL1	52 (53)	28 (29)
IL5	31 (35)	21 (24)
IL6	25 (26)	15 (15)
IL17	39 (43)	26 (29)
IFNb	63 (64)	34 (35)
NFkB	43 (43)	27 (27)

En cuanto al impacto pronóstico de la expresión de las citoquinas sobre el "status" de expresión de MMP-11 por los CMIs del estroma tumoral, se encontraron diversas asociaciones significativas. De las diversas evaluaciones realizadas, se vió que los valores elevados de score para la IL-6 se asociaron significativamente con un mayor TLE y supervivencia en el subgrupo de pacientes con tumores CMIs

negativos (figura 4.8.) mientras que los valores de score elevados de IFN- β se asociaron significativamente con una mayor probabilidad de TLE (figura 4.9.).

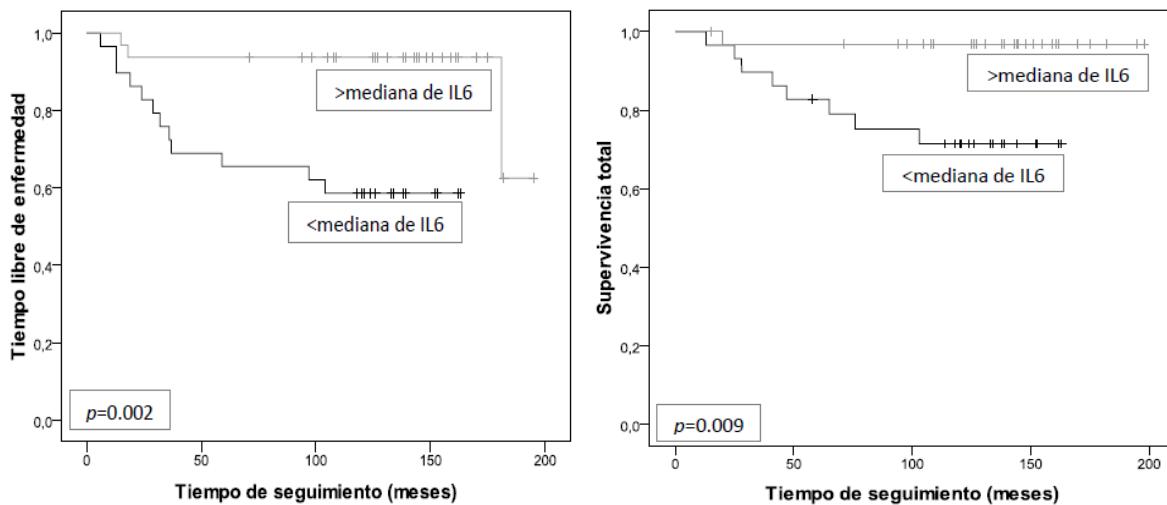


Figura 4.8. Probabilidad de TLE y supervivencia en función de los valores de score de IL-6 dicotomizados en base al valor de su mediana en el subgrupo de pacientes con tumores con CMIs MMP11 negativos.

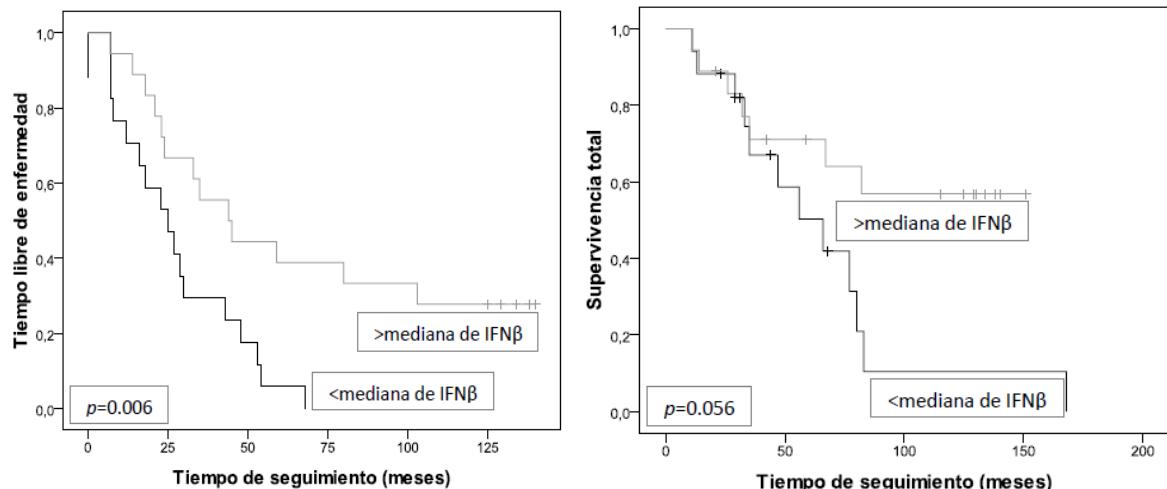


Figura 4.9. Probabilidad de TLE y supervivencia en función de los valores de score de IFN- β dicotomizados en base al valor de su mediana en el subgrupo de pacientes con tumores con CMIs MMP11 negativos.

Al evaluar el tipo celular que expresa cada factor, los resultados indican que la expresión de IL-1 β por los fibroblastos (figura 4.10.) o por los CMIs (figura 4.11.) se asocia significativamente con un menor TLE y una menor supervivencia en el subgrupo de pacientes con tumores con CMIs MMP-11 negativos.

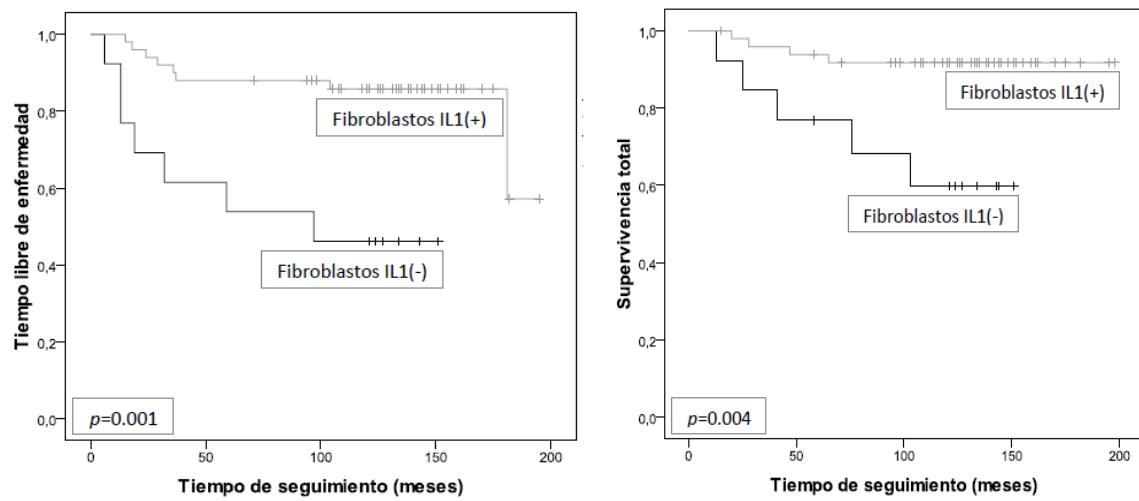


Figura 4.10. Curvas de tiempo libre de enfermedad (TLE) y Supervivencia total en función de la expresión de IL1 por los Fibroblastos, en el subgrupo de pacientes con tumores con CMIs MMP11 negativos.

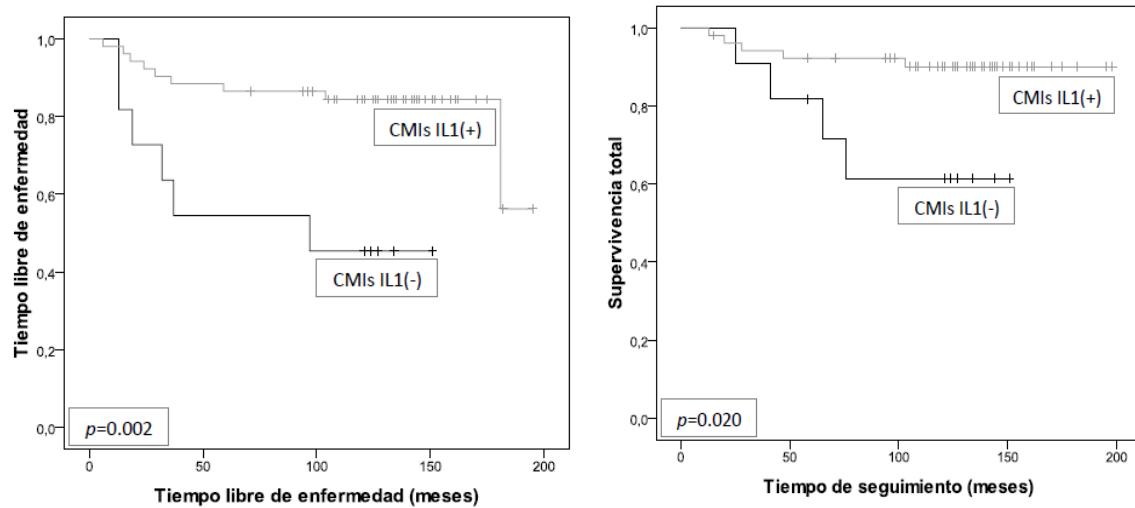


Figura 4.11. Curvas de tiempo libre de enfermedad (TLE) y Supervivencia total en función de la expresión de IL1 por las CMIs, en el subgrupo de pacientes con tumores con CMIs MMP11 negativos.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El presente estudio analiza por primera vez a nuestro conocimiento la expresión por técnica inmunohistoquímica de seis citoquinas inflamatorias en el cáncer de mama que pueden tener relevancia biológica en este proceso. Nuestros resultados indican su expresión por las células tumorales en la inmensa mayoría de los carcinomas mamarios, mientras que existió una variabilidad de su expresión por los fibroblastos y células mononucleares inflamatorias. Además la variabilidad en la expresión de esas proteínas por esas células estromales mostró en algunos casos un valor pronóstico significativo. Cada día se van acumulando nuevos datos que apoyan la relación entre la inflamación y el desarrollo de carcinomas humanos. Es sabido que existen procesos inflamatorios crónicos que condicionan un mayor riesgo de desarrollar carcinomas. En este contexto se sitúa, por ejemplo, la asociación entre colitis y cáncer colorrectal (136), la de gastritis por Helicobácter pílori y cáncer gástrico (137), la de prostatitis y cáncer de próstata. Ello puede deberse, en parte, a que mediadores de la inflamación, como las citoquinas inflamatorias, pueden influir en cambios moleculares que facilitan el desarrollo tumoral (139). En relación con el cáncer de mama cabe señalar que recientemente se han descrito diferencias en la expresión química de citoquinas y sus receptores como diferencias en sus niveles séricos, entre mujeres de origen africano y de origen caucásico que pueden explicar diferencias raciales en la incidencia de esta neoplasia. Por tanto, el estudio de las citoquinas inflamatorias en el cáncer de mama resulta un campo atractivo de investigación de cara a conocer mejor el comportamiento evolutivo de este tumor, obteniendo así nuevos aspectos biológicos que contribuyan a una mejor estimación pronóstica.

De la amplia gama de citoquinas inflamatorias existentes debemos seleccionar para su estudio aquellas relacionadas con la mejor, caracterización del proceso inflamatorio asociado al cáncer de mama recientemente Eiró y cols. (156) describieron que la expresión génica de IL-1B, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- β y NFkB, está presente en elevados niveles en tumores con alta probabilidad de metástasis hematopoyéticas y expresión de MMP-11 por las CMIs del estroma tumoral. Previamente Vizoso y cols.(83), describieron que la presencia de ese fenotipo de

CMI estabas asociada con una elevada ocurrencia de metástasis en el cáncer de mama y que podría, por tanto, resultar indicativa de un perfil inflamatorio asociado a agresividad en el cáncer de mama. Por todo ello, en el presente estudio se consideró de interés profundizar en el significado clínico de la expresión de esas citoquinas inflamatorias en el cáncer de mama mediante la técnica inmunohistoquímica que nos permite realizar una evaluación morfológica de la expresión de los diferentes factores. De esta forma podemos diferenciar la expresión por las células tumorales de la expresión por las células del estroma. Nuestros resultados evidencian la expresión de las citoquinas investigadas por las células tumorales en la inmensa mayoría de los carcinomas mamarios analizados. Por ello podemos asumir que esa situación representa un hecho casi universal de la transformación maligna del epitelio mamario que conduce a la producción por las células transformadoras de mediadores reconocidos de la inflamación con propiedades propiciadoras de la progresión tumoral.

La familia de las IL-1 tiene unos 11 miembros que se han relacionado con la patogénesis de muchas enfermedades (157). En condiciones fisiológicas, la IL-1B es esencialmente producida por macrófagos activados, e induce una gran variedad de genes relacionados como IL-5, IL-6, IL-8, oncogenes (c-fos, c-myc, c-jum) IFN-B , MMPs, TNF y TGF-B (158-161). La sobreexpresión de IL-1Bse ha descrito en tumores sólidos, tales como de mama, colon, pulmón y de cabeza y cuello. En algunos tumores IL-1, así como otras citoquinas inflamatorias son inducidas por oncogenes que trasforman la célula promoviendo así un microambiente que favorece la invasividad y la fase de metástasis. La producción de IL-1 por células tumorales fue asociada con agresividad tumoral en distintos tipos de carcinomas murinos y humanos (162). Se ha señalado que la IL-1 influencia el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis a través de la activación de la angiogénesis en la inflamación (163).

La interacción de la IL-1B con su receptor IL-1R-1 sobre las células inflamatorias induce la migración de las células y la formación de túbulos, principalmente a través de la activación de la proteína cinasa activada-mitógena-p-38 (MAPK), y la cinasa-2 MAPK activada (164).

Además, la IL 1-B regula la expresión del VEGF y sus receptores sobre las células endoteliales (165). Esto resulta relevante ya que la inducción de la angiogénesis es considerada como un aspecto esencial del cáncer para su crecimiento y diseminación (166).

Por otra parte, la IL-1B como citoquina pro-inflamatoria tiene efectos dramáticos sobre la generación de células mieloides en la célula ósea y sobre su reclutamiento en los lugares donde anida el tumor, así como el fenotipo y función de esas células en el microambiente tumoral (167).

Recientemente se ha descrito que la inhibición de la IL-1B reduce el desarrollo tumoral en ratones inyectados subcutáneamente con células tumorales (168). Además se han desarrollado nuevos agentes neutralizantes de IL-1 tales como antiIL-1B humanizado, así como otros agentes que indirectamente inhiben la producción de IL-1B que pueden ellos tener efecto potencialmente terapéutico en el cáncer (169).

En el presente estudio se ha encontrado la expresión de IL-1 β en el 88,9% de las células tumorales. Los valores de score (tinción global para la citoquina) mostraron una cierta variabilidad, lo que nos condujo a la identificación de una relación positiva entre esos valores y un mayor grado histológico de los tumores. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que los valores de score de IL-1 β dicotomizados de acuerdo a su valor de la mediana no se relacionaron significativamente con el pronóstico de las pacientes.

No obstante, es importante señalar que los valores de score representan la expresión de los factores en todo el contexto morfológico de los tumores, incluyendo tanto las células cancerosas como las células del estroma tumoral (los fibroblastos asociados a tumores y las CMIs). Pero el análisis inmunohistoquímico nos permite la evaluación diferenciada de las expresiones proteicas entre esos tipos de células dentro del escenario tumoral.

Asimismo se comprobó que la expresión de IL-1 β por los fibroblastos o por los CMIs del estroma tumoral se asoció significativamente con una menor tasa de recurrencias tumorales y con una mayor supervivencia en el conjunto de las pacientes y también en el subgrupo de pacientes con glanglios negativos. Estos

datos son, a nuestro conocimiento, nuevos en la literatura científica, y pueden indicar dos aspectos diferentes. Por un lado, la expresión de IL-1 β por las células cancerosas parece que contribuye a la agresividad biológica característica de este proceso. Sin embargo, la expresión de esta citoquina por las células del estroma parece corresponderse más bien con un fenotipo de estas células con un comportamiento con menor complicidad con la progresión tumoral.

La IL-5 es esencialmente producida en condiciones fisiológicas por los linfocitos T-helper tipo 2 y los mastocitos, estimula el crecimiento de las células B e incrementa la producción de inmunglobulina. Esta proteína ha sido muy poco estudiada en patología tumoral. Recientemente se ha encontrado asociado con el desarrollo de cáncer de vejiga urinaria, donde parece que participa en la migración, invasión y expresión de MMPs siendo por ello propuesta como diana terapéutica potencial en esa neoplasia (170). En el cáncer de mama, Eiró y cols. (156) descubrieron que la expresión génica de esta citoquina en los tumores primarios se asocia con una mayor ocurrencia de metástasis a distancia. En el presente estudio la IL-5 fue expresada por las células tumorales en la inmensa mayoría de los carcinomas mamarios. Además nuestros resultados también demuestran la expresión global (valores de score) de esta citoquina se correlacionan significativamente con la de IL-17, IFN β y NFkB, en los carcinomas mamarios. Sin embargo los resultados del presente estudio también muestran que la expresión de IL-5 por las CMIs se asoció con una mayor probabilidad de supervivencia en el conjunto de los pacientes, así como el subgrupo de pacientes con ganglios negativos. Ello parece indicar también que la expresión de esa citoquina por los CMIs puede resultar indicativa de un fenotipo de células inflamatorias de posible efecto antitumoral, a pesar de que su expresión por las células cancerosas tenga otra significación biológica más bien asociada con la agresividad tumoral.

La IL-6 es otra citoquina expresada por las células tumorales en la inmensa mayoría de los carcinomas mamarios de nuestro estudio. Es sabido que la IL-6, aparte de ser expresada por células estromales, tales como los linfocitos-T-Like y fibroblastos, lo es también por las células cancerosas. Sin embargo, los estudios sobre la significación biológica o clínica de los carcinomas mamarios resultan con los niveles séricos circundantes de IL-6 elevados. Se asociaron con un peor pronóstico en cáncer de mama, especialmente en los tumores HER-negativos (171)

Sin embargo, también se ha descrito una correlación entre la expresión de IL-6 con buen pronóstico de los carcinomas mamarios mientras que la expresión de esta citoquina en los tumores avanzados puede contribuir a la progresión tumoral (172). De alguna forma esta última observación está de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, demostrando una correlación significativamente positiva de los valores de score de IL-6 con tumores en estadio menos avanzado así como con tumores con ganglios negativos. Además, considerando que en la población a estudio de casos con cáncer de mama no se incluye tumores avanzados localmente o con metástasis a distancia, los resultados aquí presentados están también en la línea de las observaciones de Karczewska ya que se observa que los valores elevados de score de IL-6 se asocian con una menor supervivencia libre de la enfermedad y supervivencia total del conjunto de las pacientes, así como también del subgrupo de ganglios negativos. No obstante es importante considerar la posible contribución del tipo celular en el pronóstico de futuros estudios (célula tumoral/célula antitumoral). En este sentido resultó llamativo el hallazgo de que la expresión de IL-6 por las propias células cancerosas se asoció con un mayor grado histológico de los tumores, si bien como ya se comentó más arriba existían procesos con expresión negativa de IL-6 por las células cancerosas. En este contexto también resulta relevante el reciente hallazgo de Neiva y cols. (173) de que la expresión de la IL-6 es más elevada en las células endoteliales que en las células tumorales mismas y contribuye al crecimiento tumoral.

La IL-17 desempeña un papel relevante en la inflamación y en enfermedades autoinmunes. La IL-17 induce la secreción de cantidad de citoquina y quimoquinas por distintos tipos celulares tales como células mieloides. Las reclutan monocitos y neutrófilos en los lugares de inflamación (174). Su papel en el cáncer ha sido muy poco estudiado y su significación de acuerdo a diferentes estudios resulta contradictoria habiéndose descrito tanto papeles pretumorales como antitumorales en diferentes modelos de cánceres (175). Entre los efectos antitumorales se ha descrito que la IL-17 promueve el rechazo de las células tumorales mediante una activación de un mecanismo dependiente de los linfocitos C (176). Entre sus efectos pretumorales se encuentra la inflación provocada por el tumor, la cual facilita la proliferación y supervivencia de las células malignas, la formación de un microambiente tumoral inmunosupresor mediante la quimio atracción de células

inmunosupresoras y citoquinas, la supresión de la inmunovigilancia contra el tumor mediada por células citotóxicas o promoviendo la angiogénesis tumoral. En relación con este último aspecto, se ha descrito que la IL-15 induce a los fibroblastos y a las células tumorales a producir una variedad e factores angiogénicos, tales como VEGA, PGE1, PGE2 o quimoquinas I (177). También se ha descrito que en el cáncer de mama la IL-17 induce factores angiogénicos tales como VEGF, CXLL8, MMP-2, MMP-9 y se asocia con mal pronóstico (178). Recientemente también se ha descrito un mecanismo por el cual la IL-17 promueve la tumorogénesis memoria a través de una vía antiapoptosica mediada por el NFkB (179). Recientemente también se ha descrito que la neutralización sistémica de la IL-17 reduce significativamente las metástasis de cáncer de mama en un modelo murino de artritis mediante la reducción de la expresión de CXCL12/SDF-1 en los nichos metástasicos (180). Así mismo se ha descrito que un incremento de las células expresando IL-17 en los tumores se asocia con un elevado grado histológico de los tumores y con un periodo menor libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama (181). Los resultados del presente estudio también muestran una relación significativamente positiva entre los valores elevados de score de IL-17 y un grado histológico indiferenciado de los tumores. Sin embargo, no se pudo encontrar una asociación significativa de esos valores con el pronóstico de las pacientes.

Es sabido que la producción de NFkB por los linfocitos T o B, macrófagos, fibroblastos o células endoteliales es inducida por otras citoquinas tales como IL-1, IL-2, TNF o CSF. La expresión de IFN- β en el cáncer de mama ha sido poco estudiada. Esta citoquina es conocida principalmente por su acción antiviral y la única relación conocida hasta hace poco con el cáncer de mama se debía la relación de este proceso con el virus del papiloma humano (182) .

Es sabido que el IFN- β tiene acciones biológicas que pueden resultar antitumorales tales como antiproliferativas, proapoptósicas, antiangiogénicas e immunoreguladoras (183).

Recientemente se ha descrito que IFN- β induce apoptosis en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Asimismo nuestros resultados demuestran una relación significativamente positiva entre la expresión de IFN- β y el status positivo para HER-2, lo que podría reflejar un mecanismo inmunitario de respuesta ante la presencia

oncológica. Sin bien la expresión de IFN- β también resulta mayor en los tumores con fenotipo luminal B. También encontramos que los elevados niveles de score de IFN- β se asocian con una menor probabilidad de desarrollo de metástasis a distancia en los pacientes con ganglios positivos, esa observación parece estar en la línea de recientes hallazgos que demuestran que los interferones tipo 1 secretados por las células tumorales inducen respuestas inmunes antimetastásicas que previenen las metástasis del cáncer de mama al tejido óseo (184).

El NFkB tiene un papel central en los procesos relacionados con la inflamación. Los resultados de este estudio muestran una elevada expresión de este factor en la inmensa mayoría de los carcinomas mamarios. Ello está de acuerdo con observaciones previas que demuestran que el NFkB está frecuentemente sobreexpresado en los carcinomas mamarios en comparación con el tejido mamario normal (185). El NFkB regula la expresión de numerosas proteínas anti-apoptóticas asociadas con la supervivencia tumoral tales como bcl-x_e, bcl-2, XIAP, C-FLIP, IAP-1, IAP-2 y Survivina. También regula al alza la expresión de genes relacionados con la Ciclina D1, C-myc y Cox-2. Además existen numerosos estudios que apoyan el papel de NFkB en la regulación de la inflamación y progresión tumoral (186).

Por otra parte la expresión de NFkB es un factor conocido en su promoción de quimioresistencia de los tumores sólidos (187). Además se ha demostrado que la actividad de cascada de las señales activadas por NFkB está asociada con la carcinogénesis, especialmente en tumores con un fenotipo agresivo y con un estado de negatividad para los RE (188). En esta línea se sitúan los resultados aquí presentados, mostrando una relación significativamente positiva entre los valores de expresión global de NFkB y la expresión del oncogén HER-2.

En el presente estudio se han seleccionado las citoquinas a evaluar partiendo de la base de que previamente se ha demostrado su sobreexpresión génica en carcinomas de mama que mostraron expresión positiva de MMP-11 por las CMIs de su estroma tumoral (125). Esta selección se consideró especialmente relevante considerando que los tumores mamarios con CMIs MMP-11 positivos parecen corresponder a un fenotipo altamente asociado con el desarrollo de metástasis (83).

Por tanto, se consideró también razonable analizar la expresión de las diversas citoquinas en base a la clasificación de los tumores en cuanto a la

expresión de MMP-11 por las CMIs de los tumores. Así, inesperadamente se pudo observar que no existieron asociaciones significativas entre los valores globales de tinción inmunohistoquímica para las diferentes citoquinas y la expresión MMP-11 por los CMIs. Ello parece indicar que no existe una relación directa entre la expresión génica de esas citoquinas y su expresión proteica evaluada de forma global mediante técnica inmunohistoquímica. Por otra parte tampoco se encontraron concordancias significativas entre la expresión de MMP-11 por CMIs y la expresión de las diferentes citoquinas por los diferentes tipos celulares analizados de los carcinomas mamarios. Ello conduce a considerar que no existe una relación directa entre esas expresiones proteicas y que pueda corresponder a mecanismos diferentes en el contexto de la fisiopatología tumoral de los carcinomas mamarios. Partiendo de este concepto, en el presente estudio también se planteó si la evaluación de la expresión tumoral de las distintas citoquinas analizadas podría ayudar a complementar y mejorar el valor pronóstico de la expresión de MMP-11 por CMIs.

En la población a estudio se confirmó el potente valor pronóstico de la expresión de MMP-11 por los CMIs del estroma tumoral. Además los resultados también evidenciaron que los valores de score de IL-6 elevados se asociaron con una menor probabilidad de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global en el subgrupo de pacientes con CMIs negativos para las MMP-11. Incluso en el subgrupo de pacientes con tumores MMP-11 positivos y a pesar de que en este subgrupo la mayoría de las pacientes desarrollaron metástasis, la expresión global de IFN- β se asoció significativamente con un pronóstico más favorable de las pacientes. Ello sugiere que la evaluación de la expresión de determinadas citoquinas puede mejorar la precisión pronóstica, ya de por sí potente de la MMP-11, en el cáncer de mama.

Además se pudo comprobar que la evaluación de la expresión IL-1B por los fibroblastos o por los CMIs mejoró significativamente la evaluación pronóstica en el subgrupo de pacientes con tumores con MICs MMP-11 negativos. Así, como la expresión de las citoquinas por esos tipos tumorales del estroma tumoral se asocia con unas mayores probabilidades de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia total en ese subgrupo de pacientes. Esos resultados inducen a considerar que la expresión de IL-1B puede resultar un posible marcador útil de un fenotipo de células

estromales asociadas con un pronóstico más favorable contribuyendo así a una mejor caracterización funcional del estroma de los carcinomas mamarios.

En definitiva, los resultados de este estudio demuestran la existencia de una variabilidad de la expresión de citoquinas inflamatorias en los carcinomas, que tienen en algunos casos impactos sobre el pronóstico de las pacientes. Por otra parte, si bien la expresión de las citoquinas evaluadas fue encontrada en la mayoría de las células tumorales de la inmensa mayoría de los tumores, la expresión por los fibroblastos CMIs del estroma resultó ser más variable. Además, la expresión de alguna de esas citoquinas por los tipos celulares podría resultar indicativa de un fenotipo de células estromales asociadas con una menor agresividad tumoral. En conclusión, todos estos hallazgos pueden contribuir a una mejor evaluación pronóstica en el cáncer de mama y pueden dar lugar a futuras investigaciones sobre la dinámica funcional entre el tumor y el estroma de esta neoplasia, que tanta importancia tiene tanto sanitaria como socialmente.

VI. CONCLUSIONES

A continuación se exponen la conclusiones del estudio a cerca de la expresión de las citoquinas inflamatorias investigadas en el presente estudio IL-1, IL-5, IL-17, IFN- β y NFkB, en las muestras de pacientes con cáncer de mama.

1. Los valores de expresión global (valores de score) de las diferentes citoquinas mostraron un gran variabilidad de las mismas, con valores de score que van de 0 a 291,62.
2. Más del 90% de los carcinomas mamarios mostraron la expresión de las citoquinas por las células tumorales. Sin embargo, ese porcentaje fue menor para los fibroblastos (del 33,3% al 90,7%) y para las células mononucleares inflamatorias (del 38,9% al 89,8%) del estroma tumoral.
3. Los valores de expresión global (score) de IL-6 se relacionaron negativamente con la afectación ganglionar. Los valores de score elevados de IL-17 se asociaron con un grado histológico más indiferenciado de los tumores. Los valores de score de IFN- β y NFkB se relacionaron significativamente con la expresión de HER-2, mientras que los de IFN- β se asociaron positivamente con el fenotipo tumoral luminal-B.
4. Los valores de score de IL-6 se asocian positivamente con una mayor probabilidad de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia total de las pacientes. Asimismo, la expresión de IL-1 por los fibroblastos y las células mononucleares inflamatorias (CMIs) del estroma tumoral, y la expresión de IL-5 por las CMIs, se asocian con un pronóstico favorable de las pacientes.
5. No existieron relaciones significativas entre la expresión de MMP-11 por las CMIs y la expresión de las diferentes citoquinas en los carcinomas mamarios. Sin embargo, la expresión tumoral global de IL-6, así como la expresión de IL-1 por los

fibroblastos o por las CMIs, se asocian con un pronóstico más favorable en el grupo de pacientes con tumores con CMIs MMP-11 negativas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Coughlin, S.S.and D.U. Ekwueme. (2009). Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol* 33:315-8.
2. Ban KA and Godellas CV. (2014). Epidemiology of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 23:409-422.
3. Vidal Lancis, C., J.M. Martinez-Sanchez, M. Mateos Mazon, and M. Peris Tuser. (2010). Breast cancer mortality trend in Spain and its autonomous communities during the period 1980-2005. *Rev Esp Salud Publica* 84:53-9.
4. Bhikoo R, Srinivasa S, Yu TC, Moss D and Hill AG. (2011). Systematic review of breast cancer biology in developing countries (part 1): Africa, the middle East, eastern europe, Mexico, the Caribbean and South america. *Cancers (Basel)* 3:2358-81.
5. Sondik, E.J. (1994). Breast cancer trends. Incidence, mortality, and survival. *Cancer* 74:995-9.
6. Martinez-Alonso, M., E. Vilaprinyo, R. Marcos-Gragera, and M. Rue. (2010). Breast cancer incidence and overdiagnosis in Catalonia (Spain). *Breast Cancer Res* 12:R58.
7. Richards, M. (2007). EUROCARE-4 studies bring new data on cancer survival. *Lancet Oncol* 8:752-3.
8. (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 358:1389-99
9. Advani P and Moreno-Aspitia A. (2014). Current strategies for the prevention of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 6:59-71.

- 10.Trentham-Dietz A, Sprague BL, Hampton JM, Miglioretti DL, Nelson HD, Titus LJ, Egan KM, Remington PL and Newcomb PA. (2014). Modification of breast cancer risk according to age and menopausal status: a combined analysis of five population-based case-control studies.*Breast Cancer Res Treat* 145:165-75.
11. Fasching PA, Ekici AB, Wachter DL, Hein A, Bayer CM, Häberle L Loehberg CR, Schneider M, Jud SM, Heusinger K, Rübner M, Rauh C, Bani MR, Lux MP, Schulz-Wendtland R, Hartmann A and Beckmann MW. (2013). Breast Cancer Risk - From Genetics to Molecular Understanding of Pathogenesis. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 73:1228-1235.
12. Diez, O., B. Campos, and M. Baiget. (2000). [Molecular diagnosis of hereditary cancer]. *Med Clin (Barc)* 115:190-7.
13. Tram E Savas S and Ozcelik H.(2013). Missense variants of uncertain significance (VUS) altering the phosphorylation patterns of BRCA1 and BRCA2.*PLoS One* 8:e62468.
- 14.La Vecchia, C., E. Negri, S. Franceschi, and F. Parazzini. (1992). Non-contraceptive oestrogens and breast cancer: an update. *Int J Cancer* 50:161-2.
- 15.(2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 360:187-95.
16. (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 350:1047-59.
17. Laloo, F and Evans, DG.(2012). Familial breast cancer. *Clin Genet* 82:105-14.
18. Christou CM and Kyriacou K (2013). BRCA1 and Its Network of Interacting Partners. *Biology (Basel)* 2:40-63.
19. Beristain E , Ibáñez B, Vergara I, Martínez-Bouzas C, Guerra I and Tejada MI. (2010).Breast and ovarian cancer risk evaluation in families with a disease-causing mutation in BRCA1/2. *J Community Genet* 1:91-9.
20. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM and Ding W.(1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*266:66-71.

21. Berman DB, Costalas J, Schultz DC, Grana G, Daly M and Godwin AK. (1996) A common mutation in BRCA2 that predisposes to a variety of cancers is found in both Jewish Ashkenazi and non-Jewish individuals. *Cancer Res* 56:3409-14
22. Tsou HC, Teng DH, Ping XL, Brancolini V, Davis T, Hu R, Xie XX, Gruener AC, Schrager CA, Christiano AM, Eng C, Steck P, Ott J, Tavtigian SV and Peacocke .(1997). The role of MMAC1 mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in BRCA1-negative cases. *Am J Hum Genet* 61:1036-43.
23. Chang-Claude J, Dunning A, Schnitzbauer U, Galmbacher P, Tee L, Wjst M, Chalmers J, Zemzoum I, Harbeck N, Pharoah PD and Hahn H.(2003). The patched polymorphism Pro1315Leu (C3944T) may modulate the association between use of oral contraceptives and breast cancer risk. *Int J Cancer* 103:779-83.
24. Habashy HO, Powe DG, Abdel-Fatah TM, Gee JM, Nicholson RI, Green AR, Rakha EA and Ellis IO.(2012). A review of the biological and clinical characteristics of luminal-like oestrogen receptor-positive breast cancer. *Histopathology* 60:854-63.
25. Khuder, S.A., A.B. Mutgi, and S. Nugent. (2001). Smoking and breast cancer: a meta-analysis. *Rev Environ Health* 16:253-61.
26. Colditz GA, Bohlke K and Berkey CS. (2014). Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast Cancer Res Treat* 145:567-79.
27. Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL and Thun MCA . (2006). Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *Cancer J Clin* 56:168-83.
28. de Lorgeril, M. and P. Salen. (2012). New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *BMC Med* 10:50.
29. Jain, R., H.D. Strickler, E. Fine, and J.A. Sparano. (2013). Clinical studies examining the impact of obesity on breast cancer risk and prognosis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 18:257-66.
30. Colditz GA, Baer HJ and Tamimi RM.(2006). Breast cancer epidemiology and prevention. Oxford University Press; 2006. pp. 995–1012.
31. Calaf, G.M. and T.K. Hei. (2004). Ionizing radiation induces alterations in cellular proliferation and c-myc, c-jun and c-fos protein expression in breast epithelial cells. *Int J Oncol* 25:1859-66.

- 32.Trosko JE, Chang CC, Upham BL and Tai MH. (2004) Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. Ann N Y Acad Sci 1028:192-201.
33. Konecny G, Fritz M, Untch M, Lebeau A, Felber M, Lude S, Beryt M, Hepp H, Slamon D and Pegram M.(2001). HER-2/neu overexpression and in vitro chemosensitivity to CMF and FEC in primary breast cancer.Breast Cancer Res Treat 69:53-63.
34. Pectasides D, Gaglia A, Arapantoni-Dadioti P, Bobota A, Valavanis C, Kostopoulou V, Mylonakis N and Karabelis A, (2006). HER-2/neu status of primary breast cancer and corresponding metastatic sites in patients with advanced breast cancer treated with trastuzumab-based therapy.Anticancer Res 26:647-53.
35. Zemzoun I, Kates RE, Ross JS, Dettmar P, Dutta M, Henrichs C, Yurdseven S, Höfler H, Kiechle M, Schmitt Mand Harbeck N. (2003). Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. J Clin Oncol 21:1022-8.
36. Widakowich C, Dinh P, de Azambuja E, Awada A and Piccart-Gebhart M.(2008). HER-2 positive breast cancer: what else beyond trastuzumab-based therapy?Anticancer Agents Med Chem 8:488-96.
37. Naidu R, Wahab NA, Yadav M, Kutty MK and Nair S.(2001). Detection of amplified int-2/FGF-3 gene in primary breast carcinomas using differential polymerase chain reaction.Int J Mol Med 8:193-8.
- 38 . Yu Q, Geng Y and Sicinski P. (2001) Nature. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. Nature 411:1017-21.
39. Cardoso F, Paesmans M, Larsimont D, Durbecq V, Bernard-Marty C, Rouas G, Dolci S, Sotiriou C,Piccart MJ, and Di Leo A.(2004).Potential predictive value of Bcl-2 for response to tamoxifen in the adjuvant setting of node-positive breast cancer. Clin Breast Cancer. 2004 Dec;5(5):364-9.
40. Petanidis S, Hadzopoulou-Cladaras M, and Salifoglou A.(2013). Cadmium modulates H-ras expression and caspase-3 apoptotic cell death in breast cancer epithelial MCF-7 cells.J Inorg Biochem 121:100-7.
41. Hedau S, Jain N, Husain SA, Mandal AK, Ray G, Shahid M, Kant R, Gupta V, Shukla NK, Deo SS and Das BC.(2004). Novel germline mutations in breast cancer susceptibility genes BRCA1, BRCA2 and p53 gene in breast cancer patients from India. Breast Cancer Res Treat 88:177-86.
42. Zellars RC, Hilsenbeck SG, Clark GM, Allred DC, Herman TS, Chamness GC and Elledge RM.(2000). Prognostic value of p53 for local failure in mastectomy-treated breast cancer patients.J Clin Oncol. 18:1906-13.

43. Bánkfalvi A, Tory K, Kemper M, Breukelmann D, Cubick C, Poremba C, Füzesi L, Lellè RJ and Böcker W.(2000). Clinical relevance of immunohistochemical expression of p53-targeted gene products mdm-2, p21 and bcl-2 in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 196:489-501.
44. Sawaki M, Ito Y, Akiyama F, Tokudome N, Horii R, Mizunuma N, Takahashi S, Horikoshi N, Imai T, Nakao A, Kasumi F, Sakamoto G and Hatake K.(2006). High prevalence of HER-2/neu and p53 overexpression in inflammatory breast cancer. *Breast Cancer* 13:172-8.
45. Vagunda V, Smardová J, Vagundová M, Jandáková E, Zaloudík J and Koukalová H.(2003). Correlations of breast carcinoma biomarkers and p53 tested by FASAY and immunohistochemistry. *Pathol Res Pract* 199:795-801.
46. Haffty BG and Lannin D.(2004). Is breast-conserving therapy in the genetically predisposed breast cancer patient a reasonable and appropriate option?. *Eur J Cancer* 40:1105-8.
47. Derenzini M, Donati G, Mazzini G, Montanaro L, Vici M, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M and Treré D.(2008). Loss of retinoblastoma tumor suppressor protein makes human breast cancer cells more sensitive to antimetabolite exposure. *Clin Cancer Res* 14:2199-209.
48. Zhao H, Jhanwar-Uniyal M, Datta PK, Yemul S, Ho L, Khitrov G, Kupershmidt I, Pasinetti GM, Ray T, Athwal RS and Achary MP.(2004). Expression profile of genes associated with antimetastatic gene: nm23-mediated metastasis inhibition in breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 109:65-70.
49. Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C, Karali K, Theohari I, Bakarakos P and Giannopoulou I.(2008). Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 10:R49.
50. Moffa AB, Tannheimer SL and Ethier SP.(2004). Transforming potential of alternatively spliced variants of fibroblast growth factor receptor 2 in human mammary epithelial cells. *Mol Cancer Res* 2:643-52.
51. Frings O, Augsten M, Tobin NP, Carlson J, Paulsson J, Pena C, Olsson E, Veerla S, Bergh J, Ostman A and Sonnhammer EL.(2013). Prognostic significance in breast cancer of a gene signature capturing stromal PDGF signaling. *Am J Pathol* 182:2037-47.
52. Krajcik RA, Borofsky ND, Massardo S and Orentreich N.(2002). Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding proteins, and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1566-73.

53. Lukanova A, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Hunt K, Rinaldi S, Zeleniuch-Jacquotte A, Haley NJ, Riboli E, Stattin P, Lundin E and Kaaks R.(2001). A cross-sectional study of IGF-I determinants in women.Eur J Cancer Prev 10:443-52.
54. Ammanamanchi S , Tillekeratne MP, Ko TC and Brattain MG.(2004). Endogenous control of cell cycle progression by autocrine transforming growth factor beta in breast cancer cells. Cancer Res 64:2509-15.
55. Jiang WG, Grimshaw D, Martin TA, Davies G, Parr C, Watkins G, Lane J, Abounader R, Laterra J and Mansel RE.(2003). Reduction of stromal fibroblast-induced mammary tumor growth, by retroviral ribozyme transgenes to hepatocyte growth factor/scatter factorand its receptor, c-MET.Clin Cancer Res 9:4274-81.
56. Mohammed RA, Martin SG, Gill MS, Green AR, Paish EC and Ellis IO.(2007). 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. 31:1825-33.
57. Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noonan DM, Natali PG and Albini A. (2000). The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity.Int J Cancer 87:336-42.
58. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB and Patil AV. (2911). E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer.N Am J Med Sci 3:227-33.
59. Shirure VS, Henson KA, Schnaar RL, Nimrichter Land Burdick MM. (2011). Gangliosides expressed on breast cancer cells are E-selectin ligands.Biochem Biophys Res Commun 406:423-9.
60. Louderbough JM and Schroeder JA. (2011). Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. Mol Cancer Res 9:1573-86.
61. Jahkola T, Toivonen T, Nordling S, von Smitten K and Virtanen I (1998). Expression of tenascin-C in intraductal carcinoma of human breast: relationship to invasion.Eur J Cancer 34:1687-92.
62. Ding KF and Wu JM. (2004). Expression of sialylated carbohydrate antigens and nm23-H1 gene in prognosis of breast cancer. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 33:326-30.
63. von Mensdorff-Pouilly, S., F.G. Snijderswint, A.A. Verstraeten, R.H. Verheijen, and P. Kenemans. (2000). Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. Int J Biol Markers 15:343-56.
64. Miles, D.W. and J. Taylor-Papadimitriou. (1998). Mucin based breast cancer vaccines. Expert Opin Investig Drugs 7:1865-77.

65. Koukourakis MI, Manolas C, Minopoulos G, Giatromanolaki A and Sivridis E (2003). Angiogenesis relates to estrogen receptor negativity, c-erbB-2 overexpression and early relapse in node-negative ductal carcinoma of the breast. *Int J Surg Pathol* 11:29-34.
66. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E and O'Higgins N. (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2:252-7.
67. Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates RE, Höfler H, Jänicke F, Graeff H and Schmitt M. (1999). Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Breast Cancer Res Treat* 54:147-57.
68. Annecke, K., M. Schmitt, U. Euler, M. Zerm, D. Paepke, S. Paepke, G. von Minckwitz, C. Thomssen, and N. Harbeck. (2008). uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem* 45:31-45.
69. Corte MD, Vérez P, Rodríguez JC, Roibás A, Domínguez ML, Lamelas ML, Vázquez J, García Muñiz JL, Allende MT, González LO, Fueyo A and Vizoso F. (2005). Tissue-type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat* 90:33-40.
70. Narita, D., A. Anghel, and M. Motoc. (2008). Prostate-specific antigen may serve as a pathological predictor in breast cancer. *Rom J Morphol Embryol* 49:173-80.
71. Decock, J., R. Paridaens, and T. Cufer. (2005). Proteases and metastasis: clinical relevance nowadays? *Curr Opin Oncol* 17:545-50.
72. Ioachim E¹, Tsanou E, Briassoulis E, Batsis Ch, Karavasilis V, Charchanti A, Pavlidis N and Agnantis NJ. (2003). Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. *Breast* 12:111-9.
73. Ohri, S.S., A. Vashishta, M. Proctor, M. Fusek, and V. Vetvicka. (2008). The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells. *Int J Oncol* 32:491-8.
74. Vizoso, F., L.M. Sanchez, I. Diez-Itza, A.M. Merino, and C. Lopez-Otin. (1995). Pepsinogen C is a new prognostic marker in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 13:54-61.
75. Chabottaux, V. and A. Noel. (2007). Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis* 24:647-56.

76. Werb, Z., C.M. Alexander, and R.R. Adler. (1992). Expression and function of matrix metalloproteinases in development. *Matrix Suppl* 1:337-43.
77. Kokorine, I., E. Marbaix, P. Henriet, Y. Okada, J. Donneze, Y. Eeckhout, and P.J. Courtoy. (1996). Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 109 (Pt 8):2151-60.
78. Guedez, L., M.S. Lim, and W.G. Stetler-Stevenson. (1996). The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Crit Rev Oncog* 7:205-25.
79. Demers, M., J. Couillard, S. Belanger, and Y. St-Pierre. (2005). New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. *Crit Rev Immunol* 25:493-523.
80. Holliday DL, Hughes S, Shaw JA, Walker RA and Jones JL. (2007). Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5A/5A genotype enhances breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res* 9:R67.
81. Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P and Yan L.(2005). Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 65:3193-9.
82. Duffy MJ, McGowan PM and Gallagher WM. (2008). Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 214:283-93.
83. Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM and García-Muñiz JL.(2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer*. 96:903-11.
84. Eck SM, Hoopes PJ, Petrella BL, Coon CI and Brinckerhoff CE. (2009). Matrix metalloproteinase-1 promotes breast cancer angiogenesis and osteolysis in a novel in vivo model. *Breast Cancer Res Treat* 116:79-90.
85. Eiró N, González LO, Atienza S, González-Quintana JM, Beridze N, Fernandez-Garcia B, Pérez-Fernández R, García-Caballero T, Schneider J and Vizoso FJ. (2013). Prediction of metastasis breast cancer in non-sentinel lymph nodes based on metalloprotease-1 expression by the sentinel lymph node. *Eur J Cancer* 49:1009-17.
86. Das S, Banerji A, Frei E and Chatterjee A. (2008). Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. *Life Sci* 82:467-76.
87. Chandru H, Sharada AC and Manjunath S (2007). Expression of matrix metalloproteinase (MMP-2) and extracellular matrix metalloproteinases inducer

(EMMPRIN) in benign and advanced breast cancer tissue samples. Biomed Khim. 53:461-7.

88. Decock J, Hendrickx W, Drijkoningen M, Wildiers H, Neven P, Smeets A and Paridaens R. (2007). Matrix metalloproteinase expression patterns in luminal A type breast carcinomas Dis Markers. 23:189-96.
89. Jiang WG , Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD, Mokbel K and Mansel RE. (2005). Targeting matrilysin and its impact on tumor growth in vivo: the potential implications in breast cancer therapy. Clin Cancer Res 11:6012-9.
90. Gutiérrez-Fernández A, Fueyo A, Folgueras AR, Garabaya C, Pennington CJ, Pilgrim S, Edwards DR, Holliday DL, Jones JL, Span PN, Sweep FC, Puente XS and López-Otín C. (2008). Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. Cancer Res 68:2755-63.
91. Quaranta M, Daniele A, Covello M, Venneri MT, Abbate I, Caringella ME, Di Tardo S, Divella R, Trerotoli P, Di Gennaro M, Schittulli F, Fransvea E and Giannelli G.(2007). MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. Anticancer Res 27:3593-600.
92. Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G, Thiebaut C, Lemaire V, Dacquembronre E, Duhem T, Lebrun A, Dejonghe MJ and Huet G. (2000). Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. Clin Exp Metastasis 18:171-8.
93. Zhang B, Liu YX, Cao WF, Cao XC, Ning LS and Hao XS. (2008). Relationship between the expression of matrix metalloproteinase-13 protein and other biomarkers, prognosis in invasive breast cancer. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 37:471-6.
94. Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S, Li H, Ning L, Fu L, Niu Y, Niu R, Sun B and Hao X.(2008).Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. BMC Cancer. 28;8:83.
95. Jiang Y, Goldberg ID and Shi YE . (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer.Oncogene 21:2245-52.
96. Croucher DR, Saunders DN, Stillfried GE and Ranson M.(2007). A structural basis for differential cell signalling by PAI-1 and PAI-2 in breast cancer cells. Biochem J 408:203-10.
97. Han B, Nakamura M, Mori I, Nakamura Y and Kakudo K.(2005). Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer (Review).Oncol Rep 14:105-12.
98. Mengèle K, Harbeck N, Reuning U, Magdolen V and Schmitt M.(2005).Tumor-associated prognostic factors of the plasminogen activator family: determination and clinical value of u-PA, t-PA, PAI-1, and PAI-2. Hamostaseologie 25:301-10

99. Rasmussen HS and McCann PP.(1997). Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* 75:69-75.
100. Rosen, P.P., S. Groshen, P.E. Saigo, D.W. Kinne, and S. Hellman. (1989). Patholo99. Rasmussen HSgical prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 7:1239-51.
101. Tawfik O, Kimler BF, Davis M, Stasik C, Lai SM, Mayo MS, Fan F, Donahue JK, Damjanov I, Thomas P, Connor C, Jewell WR, Smith H and Fabian CJ.(2007). Grading invasive ductal carcinoma of the breast: advantages of using automated proliferation index instead of mitotic count. *Virchows Arch* 450:627-36.
102. Gazic, B., J. Pizem, M. Bracko, T. Cufer, S. Borstnar, Z. Pohar-Marinsek, and M. Us-Krasovec. (2008). S-phase fraction determined on fine needle aspirates is an independent prognostic factor in breast cancer - a multivariate study of 770 patients. *Cytopathology* 19:294-302.
103. Spyrats F, Ferrero-Poüs M, Trassard M, Hacène K, Phillips E, Tubiana-Hulin M and Le Doussal V.(2002). Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer* 94:2151
104. Elkhuizen PH , Voogd AC, van den Broek LC, Tan IT, van Houwelingen HC, Leer JW and Van de Vijver MJ.(1999). Risk factors for local recurrence after breast-conserving therapy for invasive carcinomas: a case-control study of histological factors and alterations in oncogene expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45:73-83.
105. Michalides R, van Tinteren H, Balkenende A, Vermorken JB, Benraadt J, Huldij J and Van Diest P.(2002). Cyclin A is a prognostic indicator in early stage breast cancer with and without tamoxifen treatment. *Br J Cancer* 86:402-8.
106. Horwitz, K.B. and W.L. McGuire. (1975). Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* 189:726-7.
107. McGuire, W.L. (1975). Current status of estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer* 36:638-44.
108. Fisher, B., C. Redmond, E.R. Fisher, and R. Caplan. (1988). Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 6:1076-87.

109. Haffty, B.G., A. Hauser, D.H. Choi, N. Parisot, D. Rimm, B. King, and D. Carter. (2004). Molecular markers for prognosis after isolated postmastectomy chest wall recurrence. *Cancer* 100:252-63.
110. Birrell, S.N., D.M. Roder, D.J. Horsfall, J.M. Bentel, and W.D. Tilley. (1995). Medroxyprogesterone acetate therapy in advanced breast cancer: the predictive value of androgen receptor expression. *J Clin Oncol* 13:1572-7.
111. Foekens, J.A., M.C. Rio, P. Seguin, W.L. van Putten, J. Fauque, M. Nap, J.G. Klijn, and P. Chambon. (1990). Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 50:3832-7.
112. Diez-Itza, I., F. Vizoso, A.M. Merino, L.M. Sanchez, J. Tolivia, J. Fernandez, A. Ruibal, and C. Lopez-Otin. (1994). Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol* 144:310-20. 94
113. Lamelas, M.L., J. Vazquez, M.I. Enguita, J.C. Rodriguez, L.O. Gonzalez, A.M. Merino, and F. Vizoso. (2000). Apolipoprotein D expression in metastatic lymph nodes of breast cancer. *Int J Surg Investig* 2:285-93.
114. Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, Rose C, Andersson M, Bach F, Kjaer M, Gadeberg CC, Mouridsen HT and Jensen MB, Zedeler K.(1997). Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N Engl J Med* 337:949-55.
115. Arriagada R, Lê MG, Contesso G, Guinebretière JM, Rochard F and Spielmann M.(2002). Predictive factors for local recurrence in 2006 patients with surgically resected small breast cancer. *Ann Oncol* 13:1404-13.
116. Heuts EM, van der Ent FW, Hulsewé KW, Heeren PA and Hoofwijk AG.(2008). Incidence of axillary recurrence in 344 sentinel node negative breast cancer patients after intermediate follow-up. A prospective study into the accuracy of sentinel node biopsy in breast cancer patients. *Acta Chir Belg* 108:203-7.
117. Tavassoli FA.(2009). Challenges in breast pathology: new twists on old problems. *Arch Pathol Lab Med* 133:852-4.
118. Domènech A, Benítez A, Bajén MT, Ricart Y, Rodríguez-Gasén A, Palacín JA, Català I, Gil M, Pernas S, García A, Martín-Comín J.(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.
119. Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133:275-88.

120. Potter SM, Dwyer RM, Hartmann MC, Khan S, Boyle MP, Curran CE and Kerin MJ.(2012). Influence of stromal-epithelial interactions on breast cancer in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 131:401-11.
121. Bhowmick, N.A. and H.L. Moses. (2005). Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15:97-101.
122. Olsen CJ , Moreira J, Lukanidin EM and Ambartsumian NS.(2010).Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. *BMC Cancer* 19;10:444.
123. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D.(2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-52.
124. Finak, G., N. Bertos, F. Pepin, S. Sadekova, M. Souleimanova, H. Zhao, H. Chen, G. Omeroglu, S. Meterissian, A. Omeroglu, M. Hallett, and M. Park. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14:518-27.
125. Eiro, N., B. Fernandez-Garcia, L.O. Gonzalez, and F.J. Vizoso. (2013). Cytokines related to MMP-11 expression by inflammatory cells and breast cancer metastasis. *Oncoimmunology* 2:e24010.
126. Tyan, S.W., W.H. Kuo, C.K. Huang, C.C. Pan, J.Y. Shew, K.J. Chang, E.Y. Lee, and W.H. Lee. (2011). Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. *PLoS One* 6:e15313.
127. Trimis G, Chatzistamou I, Politis K, Kiaris H and Papavassiliou AG.(2008).Expression of p21waf1/Cip1 in stromal fibroblasts of primary breast tumors. *Hum Mol Genet* 17:3596-600.
128. Camp JT, Elloumi F, Roman-Perez E, Rein J, Stewart DA, Harrell JC, Perou CM and Troester MA.(2011).Interactions with fibroblasts are distinct in Basal-like and luminal breast cancers. *Mol Cancer Res* 9:3-13.
129. Heidland A, Klassen A, Rutkowski P and Bahner U.(2006). The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? *J Nephrol* 10:S102-9.
130. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7.

131. Coussens, L.M. and Z. Werb. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-7.
132. Le Bitoux, M.A. and I. Stamenkovic. (2008). Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochem Cell Biol* 130:1079-90.
133. Balkwill, F. and L.M. Coussens. (2004). Cancer: an inflammatory link. *Nature* 431:405-6.
134. Pollard, J.W. (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol* 84:623-30.
135. van der Woude, C.J., J.H. Kleibeuker, P.L. Jansen, and H. Moshage. (2004). Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis* 9:123-30.
136. 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.
137. Kuper, H., H.O. Adami, and D. Trichopoulos. (2000). Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 248:171-83.
138. Mantovani, A., T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena, and A. Sica. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 25:315-22.
139. Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441:431-6.
140. Campbell, J.J. and E.C. Butcher. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12:336-41.
141. Klein, J. and A. Sato. (2000). The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:702-9.
142. Maund, S.L., L. Shi, and S.D. Cramer. (2013). A role for interleukin-1 alpha in the 1,25 dihydroxyvitamin D₃ response in mammary epithelial cells. *PLoS One* 8:e81367.
143. Erdei, E., H. Kang, A. Meisner, K. White, G. Pickett, C. Baca, M. Royce, and M. Berwick. (2010). Polymorphisms in cytokine genes and serum cytokine levels among New Mexican women with and without breast cancer. *Cytokine* 51:18-24.
144. Hugo, H.J., S. Lebret, E. Tomaskovic-Crook, N. Ahmed, T. Blick, D.F. Newgreen, E.W. Thompson, and M.L. Ackland. (2012). Contribution of Fibroblast and Mast Cell (Afferent) and Tumor (Efferent) IL-6 Effects within the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*

145. Berger, F.G. (2004). The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality. *Breast Cancer Res Treat* 88:281-5.
146. Sasser, A.K., N.J. Sullivan, A.W. Studebaker, L.F. Hendey, A.E. Axel, and B.M. Hall. (2007). Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *FASEB J* 21:3763-70.
147. Salgado, R., S. Junius, I. Benoy, P. Van Dam, P. Vermeulen, E. Van Marck, P. Huget, and L.Y. Dirix. (2003). Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 103:642-6. 96
148. Knupfer, H. and R. Preiss. (2007). Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat* 102:129-35.
149. DeMichele, A., A.M. Martin, R. Mick, P. Gor, L. Wray, M. Klein-Cabral, G. Athanasiadis, T. Colligan, E. Stadtmauer, and B. Weber. (2003). Interleukin-6 -174G->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* 63:8051-6.
150. Zhang, G.J. and I. Adachi. (1999). Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res* 19:1427-32.
151. Dankbar, B., T. Padro, R. Leo, B. Feldmann, M. Kropff, R.M. Mesters, H. Serve, W.E. Berdel, and J. Kienast. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95:2630-6.
152. Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P and Rincón M. (2001) Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 61:8851-8.
153. Duan Z, Foster R, Bell DA, Mahoney J, Wolak K, Vaidya A, Hampel C, Lee H and Seiden MV.(2006). Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer.*Clin Cancer Res* 12:5055-63.
154. Bian G and Zhao WY.(2014). IL-17, an important prognostic factor and potential therapeutic target for breast cancer? *Eur J Immunol* 44:604-5.
155. Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, Gaeta L, Pantano F, Russo A, Ortega C, Porta C, Galluzzo S, Armento G, La Verde N, Caroti C, Treilleux I, Ruggiero A, Perrone G, Addeo R, Clezardin P, Muda AO and Tonini G.(2011). Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* 6:e19234.
156. Eiró N, González L, González LO, Fernandez-Garcia B, Lamelas ML, Marín L, González-Reyes S, del Casar JM and Vizoso FJ.(2012). Relationship between the

inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. PLoS One 7:e49047.

157. Mattii M, Ayala F, Balato N, Filotico R, Lembo S, Schiattarella M, Patruno C, Marone G and Balato A.(2013). The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is crucial in human allergic contact dermatitis pathogenesis: the role of IL-1 family members. *Exp Dermatol* 22:813-9.
158. Dinarello CA.(2010). Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev* 29:317-29.
159. Apte RN and Voronov E.(2002). Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol* 12:277-90.
160. Apte RS.(2010). Regulation of angiogenesis by macrophages. *Adv Exp Med Biol* 664:15-9.
161. Voronov E, Dotan S, Krelin Y, Song X, Elkabets M, Carmi Y, Rider P, Idan Cohen, Romzova M, Kaplanov I, and Apte RN.(2013). Unique Versus Redundant Functions of IL-1 α and IL-1 β in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 8:4:177.
162. Gemma A, Hosoya Y, Seike M, Uematsu K, Kurimoto F, Hibino S, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S and Emi M.(2001). Genomic structure of the human MAD2 gene and mutation analysis in human lung and breast cancers. *Lung Cancer* 32:289-95.
163. Salven P, Hattori K, Heissig B and Rafii S.(2002). Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J* 16):1471-3.
164. Jagielska J, Kapopara PR, Salguero G, Scherr M, Schütt H, Grote K, Schieffer B and Bavendiek U.(2012). Interleukin-1 assembles a proangiogenic signaling module consisting of caveolin-1, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), and MAPK-activated protein kinase 2 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1280-8.
165. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F and Fava RA.(1999). Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 115:176-82.
166. Folkman J.(2003).Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 13:159-67.
167. Apte RN and Voronov E.(2008). Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy?. *Immunol Rev* 222:222-41.

168. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, Abutbul S, Huszar M, Dinarello CA, Apte RN and Voronov E.(2013).The role of IL-1 β in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol* 190:3500-9.
169. Dinarello CA.(2011). A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 41:1203-17.
170. Lee EJ, Lee SJ, Kim S, Cho SC, Choi YH, Kim WJ, Moon SK.(2013). Interleukin-5 enhances the migration and invasion of bladder cancer cells via ERK1/2-mediated MMP-9/NF- κ B/AP-1 pathway: involvement of the p21WAF1 expression. *Cell Signal* 25:2025-38.
171. Cho YA, Sung MK, Yeon JY, Ro J and Kim J.(2013). Prognostic role of interleukin-6, interleukin-8, and leptin levels according to breast cancer subtype. *Cancer Res Treat* 45:210-9.
172. Karczewska A, Nawrocki S, Breborowicz D, Filas V and Mackiewicz A.(2000). Expression of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and glycoprotein 130 correlates with good prognoses for patients with breast carcinoma. *Cancer* 88:2061-71.
173. Neiva KG, Warner KA, Campos MS, Zhang Z, Moren J, Danciu TE and Nör JE.(2014).Endothelial cell-derived interleukin-6 regulates tumor growth. *BMC Cancer* 17;14:99.
- 174.Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S and Nakae. (2011). Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34:149-62.
175. Murugaiyan G and Saha B.(2009). Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 183:4169-75.
176. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH and Tartour E.(2002). Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood*. 99:2114-21.
177. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H and Lotze M.(2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101:2620-7.
178. Benevides L, Cardoso CR, Tiezzi DG, Marana HR, Andrade JM and Silva JS. (2013). Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur J Immunol* 43:1518-28.

179. Huang CK, Yang CY, Jeng YM, Chen CL, Wu HH , Chang YC, Ma C, Kuo WH, Chang KJ, Shew JY and Lee WH.(2014). Autocrine/paracrine mechanism of interleukin-17B receptor promotes breast tumorigenesis through NF- κ B-mediated antiapoptotic pathway. *Oncogene* 33:2968-77.
180. Roy LD, Sahraei M, Schettini JL, Gruber HE, Besmer DM and Mukherjee P. (2014). Systemic neutralization of IL-17A significantly reduces breast cancer associated metastasis in arthritic mice by reducing CXCL12/SDF-1 expression in the metastatic niches. *BMC Cancer* 27;14:225.
181. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ and Chen HH.(2013). Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology* 63:225-33.
182. Heng B, Glenn WK, Ye Y, Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, Whitaker NJ and Lawson JS.(2009). Human papilloma virus is associated with breast cancer. *Br J Cancer* 101:1345-50.
183. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR and Stark GR.(2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6:975-90.
184. Slaney CY, Möller A, Hertzog PJ and Parker BS.(2013). The role of Type I interferons in immunoregulation of breast cancer metastasis to the bone. *Oncoimmunology* 2:e22339.
185. Kim DW, Sovak MA, Zanieski G, Nonet G, Romieu-Mourez R, Lau AW, Hafer LJ, Yaswen P, Stampfer M, Rogers AE, Russo J and Sonenshein GE.(2000). Activation of NF- κ B/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis* 21:871-9.
186. Aggarwal BB, Ichikawa H, Garodia P, Weerasinghe P, Sethi G, Bhatt ID, Pandey MK, Shishodia S and Nair MG. (2006). From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 10:87-118.
187. Dai Y, Lawrence TS and Xu L.(2009). Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor- κ B. *Am J Transl Res* 1:1-15.
188. Nakshatri H and Goulet RJ Jr.(2002). NF- κ B and breast cancer. *Curr Probl Cancer.* 26:282-309.