

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA



ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA.

IMPLICACIÓN DE UROKINASA

COMO FACTOR DE NEOVASCULARIZACIÓN.

*Tesis doctoral presentada por D^a Elisabet Vidaña Márquez,
para aspirar al grado de doctor en Medicina y Cirugía.*

Almería, Abril de 1999.

***ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA.
IMPLICACIÓN DE UROKINASA
COMO FACTOR DE NEOVASCULARIZACIÓN.***

ABREVIATURAS.

aFGF: Factor de crecimiento fibroblástico ácido.

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico.

Desv. Tip.: Desviación Típica.

EFG: Factor de crecimiento epidérmico.

MMPPs: Matriz metaloproteinasas.

MRM: Mastectomía radical modificada.

NOR: Regiones de organización nuclear.

p53: Oncoproteína p53.

PAI-1: Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno.

PAI-2: Inhibidor tipo 2 del activador del plasminógeno.

PAI-3: Inhibidor tipo 3 del activador del plasminógeno.

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.

pS2: Proteína estrógeno dependiente.

QTP: Quimioterapia.

RE: Receptor estrogénico.

RP: Receptor progestagénico.

scu-PA/pro-UK: Precursor del activador del plasminógeno tipo urokinasa.

SF: Factor "scatter" o factor hepatocítico.

t-PA: Activador tisular del plasminógeno.

TGF β : Factor de crecimiento transformador β .

TGF α : Factor de crecimiento transformador α .

Tie: Receptor del factor de crecimiento endotelial.

TMX: Tamoxifeno.

u-PA: Activador del plasminógeno tipo urokinasa.

u-PAR: Receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa.

VA: Vaciamiento axilar.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial.

INDICE

INDICE

INTRODUCCION 1

I. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO EN EL CÁNCER DE MAMA 1

II. BIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA 8

1. Evolución histórica del concepto de cáncer de mama 8

2. Crecimiento natural del cáncer de mama 10

3. Proceso de invasión tumoral 14

III. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA 19

1. Concepto de angiogénesis o neovascularización 20

2. Métodos para determinar la actividad angiogénica 25

 A. Métodos inmunohistoquímicos 25

 B. Métodos bioquímicos 28

 C. Otros métodos 30

3. Valor pronóstico de la angiogénesis en el cáncer de mama 31

IV. FACTORES DE NEOVASCULARIZACIÓN EN EL CÁNCER DE MAMA 36

1. Activador del plasminógeno tipo urokinasa y cáncer de mama 36

 A. El sistema fibrinolítico en las neoplasias 36

Recuerdo histórico 36

<i>Componentes del sistema fibrinolítico</i>	37
- Plasminógeno y plasmina	37
- Activadores del plasminógeno	38
- Inhibidores del plasminógeno	41
B. Funciones del sistema fibrinolítico no asociado a neoplasias	44
C. El sistema fibrinolítico asociado a neoplasias	46
D. Expresión de u-PA, u-PAR y PAI-1 en las lesiones mamarias ...	49
<i>Tejido mamario normal</i>	50
<i>Lesiones mamarias benignas</i>	50
<i>Carcinoma ductal in situ</i>	50
<i>Carcinoma ductal invasivo</i>	51
E. Efecto de los activadores-inhibidores del plasminógeno en diferentes tipos de neoplasias	54
<i>Carcinoma de pulmón</i>	54
<i>Carcinoma de colon y recto</i>	54
<i>Carcinoma gástrico</i>	55
<i>Otras neoplasias</i>	55
2. Otros factores de neovascularización implicados en el cáncer de mama ...	57
A. Factor de crecimiento transformador α y β , y factor de crecimiento epidérmico	57
B. Factor de crecimiento fibroblástico	59
C. Factor de crecimiento endotelial y su receptor (Tie)	59
D. Factor "scatter" (SF) o factor de crecimiento hepatocítico	61
V. OTROS FACTORES PRONÓSTICOS IMPLICADOS EN EL CÁNCER DE MAMA	62
1. Tamaño tumoral	62
2. Estatus axilar	65

Índice

3. Crecimiento tumoral	68
4. Receptores hormonales	72
5. Expresión de oncogenes y anormalidades cromosómicas	77
6. Catepsina D, p53 y Ps2	80
VI. OBJETIVOS	85
<i>PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</i>	87
I. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE CLÍNICA	87
II. DATOS HISTOLÓGICOS EVALUADOS	96
1. Estudio anatomopatológico definitivo de la pieza quirúrgica	96
2. Determinación de la densidad vascular intratumoral	104
A. Proceso de inmunotinción	105
B. Recuento de microvasos	107
III. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	111
1. Obtención de la fracción soluble del citoplasma de las células tumorales: citosol tumoral	111
A. Obtención del tejido tumoral	111
B. Preparación del citosol	111
2. Cuantificación de los receptores de estrógenos y progesterona	113
3. Cuantificación de pS2	116
4. Cuantificación de catepsina D	118
5. Cuantificación del activador del plasminógeno tipo urokinasa mediante inmunoanálisis por luminiscencia	120

IV. MÉTODO ESTADÍSTICO	123
RESULTADOS	125
I. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA SERIE CLÍNICA	125
1. Edad	125
2. Estadio clínico de la enfermedad	127
3. Status hormonal y estadio clínico	130
II. RESULTADOS HISTOLÓGICOS	132
1. Estudio macroscópico del tumor	132
A. Tamaño	132
B. Localización	133
C. Alteraciones de piel y pezón	133
D. Bordes de resección de la pieza quirúrgica	135
2. Estudio microscópico del tumor	136
A. Distribución por tipos histológicos	136
B. Grado histológico	137
C. Necrosis intratumoral	140
D. Calcificación intratumoral	143
E. Invasión vascular y perineural	144
F. Componente de carcinoma in situ	146
G. Ganglios axilares aislados e infiltrados	147
H. Densidad vascular intratumoral	149
III. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DETERMINADOS EN EL EXTRACTO PROTEICO DE CÉLULAS TUMORALES: RECEPTORES	

HORMONALES, pS2, CATEPSINA D Y UROKINASA	151
1. Receptores hormonales: RE y RP	151
2. Proteína estrógeno dependiente pS2	165
3. Catepsina D	178
4. Activador del plasminógeno tipo urokinasa	189
DISCUSIÓN	199
Angiogénesis y neovascularización	205
Marcadores de hormonodependencia	210
Diseminación tumoral	214
Índices pronósticos en el cáncer de mama	219
CONCLUSIONES	223
BIBLIOGRAFÍA	227

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

I. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres occidentales (McPherson, 1994), y por tanto, una de las principales causas de muerte entre la población femenina de edad media en los países desarrollados. Esta neoplasia está convirtiéndose en una enfermedad de importancia creciente en todo el mundo, hecho que lo convierte en uno de los problemas prioritarios de salud pública, tanto desde el punto de vista preventivo como terapéutico.

Se estima que a nivel mundial se diagnosticaron en 1975 más de 500.000 nuevos casos, y que para el año 2000 se calcula una incidencia mundial que podría superar el millón de casos nuevos por año.

Las cifras mundiales más elevadas corresponden a la población blanca de Estados Unidos (Parkin, 1992; Borrás, 1994) con unos valores que oscilan entre 71,3 y 85,3 por 100.000 mujeres (tasas ajustadas), seguidos muy de cerca por la población de Suiza (61,6-76,1). El resto de los países occidentales se encuentran entre 50 y 60. En el extremo opuesto se encuentran las cifras más bajas de Japón (15,5- 22,7) y de China (19,6), aunque no están demasiado lejos de los países europeos con menor mortalidad por cáncer de mama. En Europa se observan cifras bajas en Hungría (20,6-29,2) y Polonia (17,7-36,5) (Borrás, 1994).

En nuestro país, el cáncer de mama causó la muerte a 1.015 mujeres durante el año 1990 en Cataluña, con una tasa de mortalidad bruta de 33,06 por 100.000 mujeres, similar a la presentada por Murcia y Navarra, y superada por Tarragona. El registro de cáncer de Granada ha servido para determinar que la

iridencia de este tipo de neoplasia parece ser de gran importancia en las regiones del sureste peninsular. Así por ejemplo, la incidencia de cáncer de mama en el periodo de 1988-1990 se situó en torno al 47%, con una mortalidad del 22%, lo cual significa que aun sin ser tan frecuente como en otras regiones el cáncer de mama representa el 19% del total de casos diagnosticados de cáncer, y el 17% de las muertes por cáncer en la mujer. (Datos del registro de tumores de Granada).

El hecho de que la incidencia anual del cáncer de mama sea cada vez mayor y de que los remedios terapéuticos no progresen de la forma esperada, conlleva la búsqueda infatigable de nuevos factores pronósticos que sean de utilidad para poder identificar los grupos de mayor riesgo de recidiva y muerte, susceptibles de tratamientos más agresivos, instaurados de forma temprana.

Asimismo, es importante identificar y controlar los posibles factores de riesgo que inciden en la aparición de esta neoplasia. Estos factores pueden ser de tipo genético, ambiental, dietético y hormonal, entre otros, y afectan al desarrollo del cáncer de mama controlando las diversas fases que componen el proceso de carcinogénesis. El establecimiento de estos factores de riesgo puede ayudar a aumentar la eficacia en la detección precoz del cáncer de mama, permitiendo la instauración del tratamiento en fases tempranas de la enfermedad y contribuyendo, por tanto, a aumentar las cifras de supervivencia, así como la calidad de vida de las pacientes.

En lo que respecta a la edad de presentación de la enfermedad, se ha definido un patrón bifásico en relación a la incidencia, de tal forma que existe un incremento paulatino de los casos alcanzándose un máximo a los 45-50 años, con un descenso a partir de dicha edad y un ascenso posterior pasados aproximadamente 10 años, dando lugar a un segundo máximo en torno a los 60

años (Parkin, 1994).

Es igualmente conocida la variable distribución geográfica del cáncer de mama. Las mujeres que habitan en países menos industrializados presentan índices de mortalidad e incidencia menores que las que residen en países desarrollados, aunque Japón y otros países asiáticos representan una evidente excepción a esta regla. Sin embargo, se ha observado que las mujeres japonesas residentes en EE.UU. muestran un índice de incidencia de cáncer de mama similar al país de adopción.

Con respecto a la raza, no existen grandes diferencias en la incidencia de esta neoplasia entre la población blanca y la población negra de Norteamérica (Bonadonna, 1997), si bien hay algunos autores que describen una mayor agresividad en la presentación de este cáncer en la población negra, con menor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (Elías, 1994).

Desde hace años se conoce que los antecedentes familiares de cáncer de mama constituyen un factor importante de riesgo. El término de cáncer mamario familiar se emplea para describir la aparición de dos o más personas afectas dentro de los familiares de primer grado. La agrupación familiar podría ser debida al azar, al ambiente común o bien a factores genéticos primarios. Estos últimos dan lugar a la aparición del llamado cáncer de mama hereditario, que constituye entre un 5-10% de los casos de cáncer de mama, y puede atribuirse a la herencia autosómica dominante de un gen de susceptibilidad de alto riesgo. El gen BRCA1 es el causante del 45% de los casos de dicha neoplasia de inicio temprano, y de la mayor parte de los casos de afectación de mama y ovario. Otro gen que confiere un riesgo incrementado de cáncer es el BRCA2, localizado en el brazo largo del cromosoma 13 (Radford, 1996).

La teoría dominante en la actualidad sostiene que todas las neoplasias son genéticas a nivel celular, en cuanto a que son resultado de la acumulación de anomalías genéticas que producen inestabilidad de genoma y pérdida de la regulación del crecimiento normal en la célula tumoral. Las pruebas epidemiológicas sugieren que es necesario la acumulación de tres a seis mutaciones para la aparición de tumores sólidos esporádicos. Se han identificado diversas clases de genes que han experimentado mutaciones: protooncogenes, genes supresores tumorales y genes de reparación desiguales. Diversos protooncogenes manifiestan una expresión incrementada tanto en el cáncer mamario invasivo como en el in situ, tales como c-erbB2(Her-2/neu), c-myc e int-2 (Radford, 1996).

Los periodos prolongados de exposición a las hormonas estrogénicas son un conocido factor de riesgo para el cáncer de mama. En 1968, Shapiro (Shapiro, 1968) comprobó que aquellas mujeres con actividad menstrual prolongada, caracterizada por una menarquia antes de los 12 años y una menopausia tardía después de los 50 años, presentaban un riesgo 1,3 veces mayor de padecer esta neoplasia. Otros autores demostraron que aquellas mujeres que han tenido algún hijo tienen un riesgo más reducido de cáncer que las nulíparas, y este efecto aumenta con el número de hijos (Korzeniowski, 1994). Esta observación es tan sólo válida para una paridad temprana, pero si el primer embarazo ocurre por encima de los 35 años el riesgo se hace mayor que en las nulíparas. Este hecho se ha querido explicar sugiriendo que por encima de esta edad hay más posibilidades de que exista alguna lesión precancerosa en el tejido mamario, y el elevado nivel hormonal provocado por la gestación actuaría como un estímulo para su crecimiento (Tres, 1993).

La asociación entre la ingesta de anticonceptivos orales y cáncer de mama está sujeta a una gran controversia. Si bien durante años atrás se ha afirmado

que su uso estaba relacionado con el aumento de número de casos de carcinoma de mama, en la actualidad existen numerosos trabajos que cuestionan esta aseveración. Un metaanálisis que representa el 90 % de los resultados obtenidos en numerosos estudios muestra un pequeño incremento del riesgo relativo de padecer cáncer de mama en mujeres que han tomado anticonceptivos durante periodos prolongados de más de 10 años (Helzlsouer, 1995; Seifert, 1998). De igual modo, la terapia hormonal sustitutiva en la postmenopausia que ha sido estudiada como factor de riesgo para el padecimiento de cáncer de mama, no supone un riesgo incrementado en la aparición de esta neoplasia, y es sobradamente conocido el efecto beneficioso de este tratamiento (Helzlsouer, 1995).

En relación a los antecedentes de enfermedad benigna de la mama, Page y Dupont en 1985 propusieron que una serie de lesiones precancerosas presentaban un riesgo definido de evolución a cáncer de mama (Page y Dupont, 1985):

I) Hiperplasia epitelial atípica que multiplica el riesgo por 1,5-2 (riesgo leve).

II) Hiperplasia lobulillar atípica e hiperplasia ductal atípica que multiplica el riesgo de padecer cáncer de mama por 4-5 (riesgo moderado).

III) Carcinoma lobulillar in situ y el carcinoma ductal in situ con un riesgo elevado (multiplica el riesgo por 10).

Posteriormente se han publicado numerosos estudios que corroboran este hecho; sin embargo, actualmente se acepta que el riesgo de transformación maligna sólo ocurre en aquellas lesiones con un importante componente proliferativo (Vendrell, 1994).

Otro de los elementos de riesgo señalados es la existencia de factores

dietéticos que al parecer pueden constituir la base de las diferencias halladas en la incidencia de cáncer de mama a nivel internacional, así como de las diferencias dentro de una misma población cuando ésta varía su hábitat y sus condiciones de vida. Diversos autores coinciden en la hipótesis de que el excesivo consumo de grasas y, en definitiva, la obesidad contribuyen a aumentar el riesgo de esta neoplasia en las mujeres. Byers afirma en este sentido que la obesidad está relacionada con el cáncer de mama dentro de una compleja vía que afecta al sistema hormonal y que influye además, en el crecimiento tumoral y la formación de metástasis (Byers, 1994). Asimismo, numerosos estudios sugieren un mayor riesgo de cáncer de mama en aquellas mujeres que consumen alcohol, aun en pequeñas cantidades (Byers, 1994). De otra parte, se ha establecido un efector protector en el consumo de frutas y vegetales. Estos nutrientes contienen un alto nivel de fitoestrógenos, de tal forma que una dieta básicamente vegetariana, como ocurre en numerosos países asiáticos, puede explicar la menor incidencia de cáncer de mama en estos países (Adlercreutz, 1995). El mecanismo de acción de los fitoestrógenos no es bien conocido. Hay autores que afirman que los estrógenos de la dieta pueden interferir el metabolismo de los estrógenos naturales (Whitten PL, 1991). Estudios realizados "in vitro" han mostrado que algunos fitoestrógenos a bajas dosis son agonistas estrogénicos (estimulan la proliferación de las células tumorales de mama en cultivo) y a altas dosis antagonizan los efectos de los estrógenos naturales (Dees, 1997).

Estudios recientes confirman la existencia en tejidos humanos de compuestos químicos que mimetizan el efecto sistémico de los estrógenos naturales, y cuyo origen y estructura química es muy variada. A estos compuestos se les conoce con el nombre de xenobióticos estrogénicos o xenoestrógenos. Su uso práctico es muy variado; en unos casos se han utilizado como plaguicidas en el cultivo agrícola, en otros se trata de monómeros de síntesis de nuevos plásticos o agentes tensoactivos utilizados en detergentes y

tratamiento de superficies (Soto, 1995; Olea, 1997). Los efectos sistémicos provocados por la contaminación de xenoestrógenos consisten en alteraciones en la reproducción y en la inducción de tumores en órganos dependientes de las hormonas sexuales. En este sentido, hay autores que establecen una asociación entre los niveles sistémicos de pesticidas órganoclorados (DDT) y la presencia de cáncer de mama (Wolff, 1993), aunque tal asociación no está definitivamente probada (Fernández, 1998). En nuestro medio, la exposición a xenobióticos estrogénicos alcanza niveles muy significativos debido a que las prácticas agrícolas propias de la región están basadas en el empleo de pesticidas y productos químicos de reconocida actividad hormonal (Olea, 1997). Tal es el caso del pesticida endosulfán, de uso habitual en los cultivos intensivos de invernadero y que presenta actividad estrogénica en los tests biológicos apropiados.

Finalmente, también se ha considerado el efecto carcinogénico de las radiaciones ionizantes. Este hecho se ha confirmado fundamentalmente en estudios de seguimiento de las supervivientes de las explosiones atómicas de Japón (Hoel, 1983) y en mujeres que fueron sometidas a altas dosis de radiación ionizante para el tratamiento de las mastitis y tuberculosis (Howe, 1984). Actualmente, se considera que el riesgo de cáncer de mama atribuido a la exposición a radiaciones ionizantes es mínimo cuando se evalúa el uso de la mamografía, y se compara con los enormes beneficios que aporta esta prueba en la detección del cáncer de mama (Mant, 1993).

II. BIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.

1. Evolución histórica del concepto de cáncer de mama.

Durante casi 100 años, la aproximación metodológica al tratamiento del cáncer de mama se fundamentaba en los principios de la hipótesis "halstediana" enunciada ya en el siglo XIX. Esta hipótesis de carácter mecanicista postulaba que el cáncer se diseminaba en forma ordenada y centrífuga desde la mama hacia los ganglios linfáticos regionales y de allí a localizaciones más distantes; por tanto, el cáncer de mama era local en el momento de su aparición y los ganglios linfáticos regionales actuaban como barreras para la diseminación local. Se planteaba la idea de que el cáncer podía estar confinado durante determinado tiempo en los ganglios linfáticos, y por tanto, la resección adecuada de la mama junto a una disección en bloque de los ganglios linfáticos regionales, podía asociarse con una curación del cáncer de mama. La diseminación directa hematológica no se estimaba significativa, de modo que el tratamiento no incluía ninguna terapéutica sistémica complementaria al acto quirúrgico (Frykberg, 1993).

Esta hipótesis fue cuestionada por MacDonald en 1951, quien sugirió que el cáncer de mama humano se encontraba biológicamente predeterminado desde su inicio. Planteó que no había detectado ningún hallazgo que le permitiese suponer que el diagnóstico temprano, el tamaño del tumor o el tipo de intervención quirúrgica empleada influyeran en modo alguno sobre la evolución final del cáncer de mama.

En la década de los años 70, Fisher planteó una hipótesis alternativa a la teoría halstediana en base a estudios experimentales con animales, que destacaba la importancia de la *diseminación hematológica* del cáncer de mama, llegando a postular que el cáncer de mama ya presentaba extensión sistémica en el momento de su aparición y que los ganglios linfáticos regionales no eran

barreras efectivas para contener la diseminación sistémica, sino que más bien se comportaban como indicadores de la biología tumoral (Fisher, 1992). Por tanto, Fisher sostenía que la resección ganglionar y el tipo de terapéutica locorregional influían escasamente en la supervivencia global. De esta forma, postuló que el único factor que podía influir en la supervivencia de las pacientes era el empleo terapéutico de la quimioterapia sistémica y favoreció la aplicación de procedimientos quirúrgicos menos agresivos, con radioterapia o sin ella, así como el empleo de terapia coadyuvante, quimioterapia y endocrinoterapia (Frykberg, 1993).

Ante estos postulados contrarios a la teoría halstediana y la aparente discordia entre las distintas teorías, Osborne en 1986, sugirió que "de ninguna manera puede afirmarse que exista una hipótesis unificada capaz de explicar la biología del cáncer de mama, el cual representa una enfermedad compleja y heterogénea", opinión que ha sido comúnmente aceptada por la comunidad científica.

Actualmente, se tiende a considerar el cáncer de mama como una enfermedad sistémica desde el inicio, siguiendo la teoría de Fisher. Este hecho está sustentado por la demostración de la existencia de micrometástasis tras la invasión sanguínea y linfática de las células tumorales, cuya detección clínica va a depender de la compleja interacción paracrina entre las células tumorales y los tejidos huésped. Sin embargo, es importante enfatizar en que un tratamiento local apropiado puede reducir el índice de recurrencias locorregionales y, en consecuencia, los índices de enfermedad sistémica.

Estudios de supervivencia publicados, han avalado este hecho y han sugerido que pueden existir diferencias significativas no solo con los distintos tipos de intervención quirúrgica sino también en los resultados de un mismo procedimiento quirúrgico según se haya aplicado una técnica correcta o

deficiente. Por tanto, no debe abandonarse el principio del tratamiento locorregional en aras de un enfoque sistémico (Frykberg, 1993).

2. Crecimiento natural del cáncer de mama.

Es bien conocido el hecho de que las pacientes con cáncer de mama presentan un mayor riesgo de muerte cuando ha ocurrido la propagación metastásica en el torrente sanguíneo. El intervalo existente entre el diagnóstico del tumor primario y la detección de las metástasis a distancia presenta grandes diferencias individuales. Este intervalo varía desde cero (la metástasis ya está presente en el momento del diagnóstico primario), hasta más de treinta años. Además, se observan grandes variaciones en el tiempo en que la metástasis presenta un tamaño clínicamente detectable. Se cree que este proceso está directamente relacionado con el tamaño del tumor primario. En relación a éste, es interesante señalar que su ritmo de crecimiento puede variar a lo largo de su historia clínica, y que dicho ritmo parece estar directamente relacionado con el poder metastatizante de cada tumor.

El implante de las metástasis diseminadas a partir del tumor primario puede ocurrir tanto en un estadio temprano como tardío de su evolución. Es posible que la tasa de implante metastásico esté directamente relacionada con la capacidad de crecimiento del tumor primario. En este sentido, Henderson y Canellos demostraron en una comparación histórica que la tasa de supervivencia para pacientes portadoras de tumores grandes y no tratadas, en las que se pudo hacer un seguimiento durante un período de 20 años, entre 1885 y 1933 en el hospital de Middlesex, no fue significativamente diferente al de otro grupo similar de mujeres que habían recibido cirugía radical en el Hospital Johns Hopkins entre

1889 y 1931 (Henderson y Canellos, 1980).

Los estudios realizados por Koscielny entre 1954 y 1972 que incluían una serie de 2.648 pacientes portadoras de cáncer de mama, mostraron una relación directa entre tamaño tumoral y presencia de metástasis aparecidas en un periodo de 10 a 25 años (Koscielny, 1984). Estas observaciones nos permiten asumir que a pequeños volúmenes tumorales se corresponden volúmenes metastásicos más pequeños, y por lo tanto, mayor supervivencia. De la confirmación de estas observaciones, se podría plantear la siguiente pregunta: ¿existe un mínimo de tamaño tumoral por debajo del cual las células que se diseminan no forman metástasis?

Puede demostrarse teóricamente que el tumor emplea casi 3/4 partes de su vida biológica para alcanzar un tamaño que pueda ser detectado clínicamente; esto significa que lo que llamamos diagnóstico temprano o precoz, realmente corresponde a una fase tardía del crecimiento del tumor. Las metástasis pueden haber ocurrido en un estadio clínico más temprano. Duncan y Kerr, en 1976 demostraron que las mujeres con pequeños tumores de hasta 1 cm mueren de enfermedad metastásica aun 20 años después. Además, entre las pacientes sin afectación ganglionar axilar en el momento del diagnóstico (ganglios negativos), casi 1/3 desarrollará en forma subsiguiente metástasis a distancia (Sigurdsson, 1990). Este hecho puede plantear que las micrometástasis o lesiones indetectables por los medios habituales de diagnóstico ya estaban establecidas en el momento de instaurarse el tratamiento del tumor primario.

Uno de los mayores desafíos, por lo tanto, reside en definir factores de orden biológico o una combinación de éstos que, estando asociados con las

propiedades del propio tumor, permitan identificar las pacientes ganglio-negativas que han establecido micrometástasis en el momento del diagnóstico, dado que éstas serían las beneficiarias de un enfoque terapéutico intensivo.

A pesar de los muchos años de investigación experimental en relación a los hechos moleculares y celulares que ocurren en la patogenia del crecimiento y de la diseminación tumoral, no se han alcanzado progresos significativos en el tratamiento de la enfermedad metastásica. Nos encontramos ante una enfermedad en la que se han identificado una gran variedad de marcadores de orden biológico, como los receptores hormonales, los oncogenes, los factores de crecimiento y los receptores de los factores de crecimiento, pero con una dudosa utilidad en la decisión clínica (Osborne, 1992; Bland 1992). Más aún, hay tumores mamarios que individualmente están conformados por subpoblaciones heterogéneas de células malignas, de tal forma que clones de células aisladas de un tumor primario poseen diferentes cariotipos, distintos niveles de secreción de enzimas proteolíticas, receptores hormonales, sensibilidad ante la quimioterapia y potenciales invasores o metastásicos, lo que añade aún más dificultad a la caracterización biológica del conjunto tumoral (Fournier, 1995). Esta última característica podría ser la causa de la diferente respuesta de los clones celulares que continúan proliferando hasta producir la muerte de las pacientes.

El análisis del proceso de diseminación de las células tumorales necesita tener en consideración la influencia de las células normales del huésped y del medio ambiente del tumor, así como del fenotipo de las células tumorales. Para metastatizar en órganos a distancia las células tumorales deben superar una secuencia de pasos, cada uno de los cuales debe considerarse como limitador del proceso. En principio, los eventos necesarios para la diseminación con éxito

son los mismos para todos los tumores sólidos. Son iniciados por un crecimiento hacia fuera de las células del tumor primario hasta lograr la penetración en los vasos sanguíneos o linfáticos. Las células neoplásicas liberadas a sangre o a linfa pueden diseminarse por todo el cuerpo como células individuales o como émbolos. El crecimiento continuo de un tumor de un tamaño de 1-2 mm³ se hace posible gracias al proceso de neovascularización, favorecida por factores angiogénicos liberados por las células tumorales y los componentes del estroma (Folkman, 1987), productores de un aporte sanguíneo suficiente para conformar el crecimiento continuo de las células tumorales.

Se piensa que un numeroso grupo de factores hormonales y pequeños polipéptidos influye tanto en el crecimiento de las células mamarias epiteliales normales como en el de las neoplásicas (Dickson, 1987; Cullen, 1992). El control autocrino del crecimiento del cáncer humano por medio de la inducción endógena o estrógeno-regulada de algunos de estos factores de crecimiento ha sido evidenciado por estudios "in vitro" (Dickson, 1987).

Los medios acondicionados de cultivo de fibroblastos obtenidos de tejido normales o cancerosos (Ryan, 1993) o de glándulas mamarias de ratón (Price, 1992) pueden promover el crecimiento de células de cáncer de mama "in vitro". El crecimiento de células tumorales humanas y de ratón se potencia cuando estas células se inyectan en el tejido celuloadiposo mamario del animal, comparando con la inyección de células en forma subcutánea (Price, 1990). Estos estudios proporcionan información sobre la importancia de las condiciones microambientales y del compartimento estromal en el crecimiento del cáncer de mama. Asimismo, las células neoplásicas mamarias pueden expresar factores capaces de estimular el crecimiento de células mezenquimatosas (Cullen 1992), mecanismo que proporciona una generación continua de estroma en el

tumor.

Un requisito imprescindible para el crecimiento progresivo tumoral es *la neovascularización*. La densidad vascular en el cáncer de mama en estadio precoz se ha descrito como marcador pronóstico, de tal forma que las pacientes cuyos tumores están muy vascularizados tienen alta probabilidad de desarrollar metástasis y menores tasas de supervivencia global (Zugmaier, 1992).

Existen factores derivados de las células tumorales, TGF- α y el factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), que promueven la proliferación de las células endoteliales y permiten su migración para formar nuevos capilares que proveerán el soporte vascular necesario para la continuación del crecimiento tumoral (Folkman, 1987). En este sentido, se piensa que el antiestrógeno tamoxifeno es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerosas estrógeno-dependientes restringiendo la producción de TGF. De esta forma, el tamoxifeno, uno de los agentes más efectivos para el cáncer hormono-dependiente, podría modular el proceso angiogénico requerido para el crecimiento del cáncer de mama.

3. Proceso de invasión tumoral.

Los carcinomas surgen del epitelio de los ductos mamarios. Si todavía se encuentran confinados en los ductos o en los acinos de la glándula en el momento de su detección, la lesión es clasificada como carcinoma "in situ"

(Bland, 1992). Algunos carcinomas "in situ" se transforman en tumores infiltrantes con células que invaden el estroma circundante, compuesto mayoritariamente por colágenos tipo I y IV. Este último es el más importante componente de la membrana basal que es necesario romper para la progresión tumoral (Wooley, 1984).

Las células neoplásicas de mama producen enzimas proteolíticas que pueden intervenir en la destrucción del tejido conectivo. Los niveles de expresión de metaloproteinasas (MMPPs), que degradan la membrana basal, se han correlacionado con la capacidad invasora y metastatizante de las células neoplásicas, tanto en roedores (Thompson, 1992) como en humanos (Davies, 1993). Así mismo, se han hallado niveles altos de colagenasa tipo IV y del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA) en pacientes con cáncer de mama en estadios avanzados (Janicke, 1993; Foucre, 1991). Más aún, la combinación de niveles elevados de uPA y de su inhibidor PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1) se ha señalado como un factor de riesgo importante de recidiva de cáncer mamario (Foucre, 1991). Este hecho está confirmado por otros estudios, que además indican también una elevada expresión de uPA, PAI-1 y catepsina D en tumores mamarios malignos en comparación con lesiones benignas (Ravdin, 1993). Las posibles acciones descritas en relación al papel de la catepsina D son dos, de una parte como factor mitogénico que interactúa con el receptor de crecimiento-insulina II y de otra como factor proteolítico actuando sobre la membrana basal, favoreciendo así el proceso de invasión (Basset, 1993).

Las células del sistema inmune infiltradas en el tejido tumoral pueden ser fuente adicional de enzimas de degradación que potencian la capacidad invasora de las células tumorales. Hay trabajos que constatan este hecho y demuestran

como los mastocitos derivados de carcinomas mamarios de ratas, así como los macrófagos y linfocitos asociados al tumor, segregan factores que estimulan la actividad colagenolítica de los fibroblastos del estroma. Las células inmunes asociadas al tumor pueden estar presentes en un número considerable. De hecho, la reacción linfocítica puede estar relacionada con el estado de diferenciación (Waldman, 1991), aunque no existe una relación claramente demostrada entre infiltrado linfocítico y pronóstico, a excepción del carcinoma inflamatorio de mama que a menudo tiene muy mal pronóstico y se caracteriza por un intenso infiltrado de host-cells (Price, 1995).

El crecimiento expansivo del cáncer de mama conduce también a la invasión de pequeños vasos linfáticos por células tumorales. La presencia de émbolos tumorales en los linfáticos intramamarios está asociado a un riesgo importante de desarrollar metástasis a distancia y recidivas a corto plazo. Estos émbolos de células tumorales suelen detenerse en el primer nivel de ganglios linfáticos a nivel axilar.

No obstante, han sido descritas las llamadas "skip" metástasis ganglionares, que son aquellas que pueden afectar al 2º y 3º nivel axilar sin haber comprometido los ganglios del primer nivel. Sin embargo, existe un número sustancial de pacientes con carcinoma de mama sin compromiso axilar que desarrollan metástasis a distancia. Los sistemas sanguíneo y linfático están dotados de numerosas conexiones, de tal forma que las células metastatizantes pueden alcanzar el torrente sanguíneo de forma directa o bien pasando a través de los canales linfáticos y ganglios axilares, para luego diseminarse hasta llegar a huesos, pulmones, hígado y cerebro. El flujo arterial puede ser rápido, y ejercer su presión sobre las células en tránsito que, finalmente, se detienen en los estrechos vasos capilares de los órganos.

Estudios en células de melanoma de ratón han evidenciado que mientras circulan estas células tumorales de forma aislada, están expuestas al ataque de linfocitos y células asesinas (NK) (Honn, 1992). No obstante, la posibilidad de formar conglomerados con linfocitos o plaquetas aumenta la probabilidad de formar metástasis con éxito, ya que los émbolos celulares formados se detienen en los lechos capilares (Price, 1992).

El establecimiento de metástasis de cáncer es un proceso altamente selectivo que depende de la interacción entre las células tumorales y los factores derivados del huésped.

Los pasos del proceso metastásico incluyen:

a) Crecimiento del tumor primario, que está en relación directa con el proceso de neovascularización. De esta forma, se puede establecer que los tumores más angiogénicos son más agresivos y metastásicos. Interfiriendo, por tanto, el proceso de angiogénesis mediante la inhibición de los factores implicados, se podría impedir la progresión del cáncer de mama.

b) Invasión local del tejido conectivo y penetración en los vasos sanguíneos y linfáticos.

c) Supervivencia de las células y émbolos tumorales liberados dentro de la circulación tras la interacción con el sistema de defensa inmune del huésped.

d) Detención de las células tumorales en los capilares y su adhesión a las células endoteliales y a la matriz extracelular.

e) Extravasación dentro del parénquima de órganos.

f) Crecimiento en las vecindades del órgano, posiblemente respondiendo a los factores de crecimiento provenientes de los tejidos.

g) Continuidad del crecimiento tumoral y posible desarrollo de clones de células resistentes a la terapia.

Un aspecto muy característico de la progresión maligna tumoral es la capacidad de las células neoplásicas de generar diversas subpoblaciones. Esta heterogeneidad celular y el sobrecrecimiento de los tumores por clones celulares dominantes parece estar dirigida por eventos genéticos y modulada por las interacciones celulares y el microambiente tisular.

El crecimiento continuo de las células cancerosas no parece ser resultado exclusivamente de la autonomía del crecimiento maligno. Este proceso parece estar además modulado por la interacción de factores dependientes del huésped que se producen en respuesta al estímulo neoplásico, y que pueden actuar promoviendo o retardando la diseminación tumoral.

III. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA.

Desde hace algunas décadas, el cáncer de mama es considerado como una neoplasia formada por diferentes clones celulares que presentan diversos grados de crecimiento y por tanto diferente potencial metastásico (Fournier, 1995). Esta parece ser una de las razones determinantes de que exista diferente comportamiento clínico entre pacientes con el mismo estadiaje tumoral (Gasparini, 1993).

El aumento del número de casos de tumores diagnosticados en estadios precoces de la enfermedad obliga a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con objeto de obtener mejores resultados que con las terapias convencionales. En primer lugar, se hace necesario el uso de nuevos marcadores pronósticos para identificar aquellas pacientes con alto riesgo. En segundo lugar, se pretende desarrollar marcadores predictivos de la respuesta al tratamiento quimioterápico y hormonal. Sin embargo, no existen actualmente indicadores específicos de la respuesta ante estos tratamientos ni marcadores de alto riesgo de recidiva y/o metástasis que aseguren la identificación completa de las poblaciones de mayor o menor riesgo (Gasparini, 1993).

Otro dato importante a considerar es el hecho de que cada vez sea mayor el número de mujeres con cáncer de mama que mueren por año debido a su enfermedad metastásica. Por tanto, está sobradamente justificada la necesidad de buscar marcadores pronósticos que nos aproximen a nuevas terapéuticas (Lippman, 1993). En relación a esto han aparecido nuevas líneas de investigación basadas en el entorno que rodea a las células tumorales. En este

sentido, el estudio de la angiogénesis tumoral representa un campo de investigación que puede tener una importante aplicación clínica. Investigaciones previas han demostrado que el grado de vascularización intratumoral es un factor con valor pronóstico significativo e independiente para la recurrencia de la enfermedad y la supervivencia global (Weidner, 1992; Toi, 1993).

Además, en lo referente a las innovaciones terapéuticas, se han descubierto inhibidores específicos de la angiogénesis, de tal forma que la modulación de este proceso podría constituir una vía terapéutica aplicable en el cáncer de mama, así como en otros tumores sólidos.

1. Concepto de angiogénesis o neovascularización.

El crecimiento de los tumores más allá de unos pocos milímetros depende del desarrollo de un aporte sanguíneo apropiado. El examen histológico de los cánceres revela que las células tumorales a menudo rodean a vasos sanguíneos con una configuración cilíndrica cuyo radio no supera una distancia aproximada de 160-200 μm , que constituye la distancia crítica para la difusión del oxígeno. Estos datos llevaron Folkman a postular que "una vez implantado el tumor, todo incremento ulterior de la población de células tumorales debe ser precedido de un incremento de nuevos capilares que converjan hacia el tumor" (Folkman, 1993).

Los tumores sólidos están formados por dos compartimentos relacionados

entre sí: el parénquima (células tumorales), y el estroma (células de soporte y tejido conectivo). Este último proporciona el aporte vascular necesario para que las células tumorales puedan disponer de los nutrientes y el oxígeno indispensables para su proliferación (Dvorak, 1991).

Las células tumorales producen péptidos con capacidad angiogénica (Craft, 1994). Además, las células endoteliales también secretan factores de crecimiento y citokinas que, a su vez, estimulan a células inflamatorias y tumorales (Rak, 1994).

El proceso de neovascularización es necesario tanto al principio como durante el proceso de diseminación tumoral (Fidler, 1994). La identificación de áreas de neovascularización podría usarse para identificar tejidos en los que el aumento del ritmo proliferativo o la pérdida del balance producción-muerte celular se ha iniciado y conduce hacia la transformación maligna. Son muchos los estudios que se han realizado en esta dirección. Jensen y col., por ejemplo compararon la actividad angiogénica en lóbulos histológicamente normales de mamas con carcinoma ductal invasivo con la de tejidos mamarios sanos, y observaron que en éstos últimos el nivel de vascularización era menor, hecho que se interpretó como un indicador del proceso de generación vascular tumoral (Constantini, 1995).

Se ha relacionado el riesgo de progresión de carcinoma in situ a carcinoma invasor con una elevada densidad de microvasos (Guidi, 1994). En otras investigaciones realizadas en grupos de pacientes con enfermedad fibroquística mamaria que posteriormente desarrollaron carcinoma invasivo de mama, Guinebretiere ha observado que el riesgo de desarrollar cáncer está

relacionado de forma significativa con la densidad vascular intralesional (Guinebretiere, 1994).

Han sido descritos dos modelos de distribución de los microvasos en el estroma. El primero, de presentación más frecuente, consiste en un patrón difuso de vascularización, que corresponde a lesiones con predominio de componente comedo en las que existe una marcada desmoplasia estromal. Estas lesiones se asocian a otros factores de agresividad tumoral, como la expresión de c-erB-2 y la alta proliferación de células tumorales. En el segundo patrón de distribución de la vascularización los microvasos se disponen en las proximidades de la membrana basal (Guidi, 1994).

Actualmente, es un hecho comúnmente aceptado que el proceso de angiogénesis desempeña un papel crucial en el desarrollo de cáncer de mama, así como en otros muchos tipos de tumores sólidos. Este proceso consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento celular (Folkman, 1992). La angiogénesis o neovascularización juega un papel crucial en la reproducción (desarrollo embrionario, ovulación y menstruación), en la reparación de heridas, en la úlcera péptica, en las fracturas (Wagner, 1980).

El primer paso en el proceso de angiogénesis consiste en la degradación de la membrana basal que integra la pared de los vasos que componen la matriz extracelular. Las membranas basales y los tejidos conectivos contienen principalmente cuatro grupos de componentes: colágeno, elastina, glucoproteínas y proteoglicanos. Los principales sitios de adherencia de las células tumorales con la consecuente destrucción de la membrana basal son el

colágeno, las glucoproteínas y los proteoglicanos, si bien predomina la unión con el colágeno tipo IV. La disolución de la pared vascular provoca el estímulo adecuado para la proliferación de nuevas células endoteliales y consecuentemente la producción de nuevos vasos. De esta forma, la degradación de la membrana basal de las células constituyentes del estroma facilita el proceso de invasión linfática y vascular.

El activador del plasminógeno tipo urokinasa y otras proteinasas están involucradas en este proceso. Son liberadas por células tumorales y endoteliales. Asimismo, se ha descrito la interacción entre las células tumorales y los macrófagos asociados al tumor en el proceso de angiogénesis, de tal forma que estos macrófagos tienen la capacidad de liberar citocinas con actividad proteolítica (Hildenbrand, 1995). Son muchas las sustancias descritas como proteinasas que ejercen este efecto (aspartasas, cisteinasas, serinas y matriz metaloproteinasa).

La aspártico proteinasa catépsina D es una enzima lisosomal cuya secreción está aumentada en el cáncer de mama. Ha sido considerada por algunos autores como la proteinasa más involucrada en la degradación de la membrana basal (Briozzo, 1988). Aunque más recientemente, hay algunos trabajos publicados que cuestionan el rol de esta enzima lisosomal bajo condiciones fisiológicas debido al hecho de que su activación se produce a pH ácido (Johnson, 1993).

Las cisteína proteinasas, también llamadas catépsina B, L y H, constituyen otro grupo de enzimas lisosomales con alta expresión en el cáncer de mama (Gabrijelcic, 1992). Se ha descrito su actuación tanto a pH neutro como a pH

ácido (Buck, 1992) y su capacidad invasiva en líneas celulares de ratones. Asimismo se ha observado su participación en la progresión maligna del cáncer colorrectal y del melanoma (Rozhin, 1994).

Las serina proteinasas y las MMPPs presentan una actividad óptima a pH neutro. Su papel en la invasión y formación de metástasis también ha sido descrito. Asimismo, hay autores (Stonelake, 1997) que han observado en líneas celulares de cáncer de mama que la activación de estas MMPPs depende a su vez de la activación de uPA/plasmina.

Las MMPPs pertenecen a la familia de las zinc endopeptidasas (Yu, 1997) y ejercen un papel crucial en los procesos de remodelación tisular, tanto fisiológicos como patológicos. En condiciones normales, existe un balance adecuado entre la síntesis y la destrucción de los componentes del estroma. Este balance está alterado en procesos inflamatorios como la artritis, en los que existe un aumento en la destrucción de cartílago, así como en las neoplasias, donde se favorece el proceso de invasión de las células tumorales. Pues bien, las MMPPs han sido involucradas en este desbalance.

En definitiva, la progresión del cáncer de mama se produce por la conjunción de múltiples procesos, donde la angiogénesis es un fenómeno necesario pero no suficiente para el desarrollo y la diseminación tumoral, puesto que existen otros factores endocrinos, autocrinos y genéticos también implicados en este proceso.

2. Métodos para determinar la actividad angiogénica.

A. Métodos inmunohistoquímicos.

A inicios de 1970, Brem propuso un sistema de medición basado en tres parámetros morfológicos de regeneración endotelial (Brem, 1972). En este momento, no existía aún un marcador específico de células endoteliales, por lo que la identificación de los microvasos sanguíneos constituía un problema no resuelto. Utilizando este método, Brem estudió la distribución de la vascularización en diferentes cánceres, mostrando la presencia de una gran heterogeneidad en la densidad de microvasos dentro de un mismo tumor.

Srivastava midió por primera vez la vascularización tumoral usando métodos histoquímicos en muestras de melanomas primarios (Srivastava, 1988). Posteriormente, en 1991, Weidner empleó el factor VIII-RA como marcador de células endoteliales utilizando la técnica estándar de la inmunoperoxidasa en una serie de 49 carcinomas de mama. Demostró que existía una relación importante entre el recuento de microvasos intratumor y el potencial de diseminación del tumor (presencia de invasión linfática a nivel axilar y metástasis a distancia). Este hallazgo fue confirmado en posteriores estudios (Weidner, 1992; Toi, 1993).

Otras investigaciones han establecido que los anticuerpos monoclonales CD-31 y JC-70, frente a moléculas de adhesión de plaquetas y células endoteliales, pueden marcar un mayor número de vasos sanguíneos, particularmente los de calibre más pequeño (Toi, 1993; Horak, 1992).

En la actualidad, el anticuerpo monoclonal CD-31, aún cuando reacciona ligeramente con fibroblastos y algunas células del tumor, y fuertemente con células del plasma, se considera que es el marcador más sensible para las células endoteliales. Hay varios estudios publicados sobre el uso de este marcador en el cáncer de mama, que muestran una correlación significativa con el pronóstico (Toi, 1993; Gasparini, 1994).

Otros autores han desarrollado anticuerpos específicos frente antígenos de la célula endotelial que están aún bajo experimentación (Wang, 1993). Por consiguiente, es de gran interés analizar si estudios clínicos futuros basados en el uso de E-9 o TEC-11 proporcionarán más información que CD-31 o vIII-RA en relación al pronóstico de pacientes con cáncer de mama en fase temprana.

A continuación se exponen las recomendaciones metodológicas propuestas por Gasparini para evaluar la densidad vascular intratumoral basadas en ensayos inmunohistoquímicos (Gasparini, 1995). Uno de los datos de mayor importancia consiste en perfeccionar la calidad del marcaje de vasos. De forma general, las principales ventajas de las técnicas de inmunohistoquímica son su simplicidad, rapidez, y el bajo costo. Normalmente, el recuento de microvasos se realiza en las áreas de mayor vascularización del tumor, de forma simultánea por dos observadores, y en caso de discrepancia se consulta con otro observador.

El esquema a seguir en el recuento es el siguiente:

Utilización de los marcadores más sensibles y específicos de células endoteliales de los microvasos (vénuclas y capilares): anticuerpos monoclonales VIII-RA, CD-31 y CD34.



Seleccionar las secciones más representativas del tumor para fijarlas con hematoxilina-eosina.



Identificar al microscopio con objetivo 40x y 100x las áreas de más intensa vascularización, evitando las zonas de necrosis.



Realizar el recuento en un área suficientemente extensa (0,74 a 1 mm²).



Efectuar el contaje de microvasos por dos observadores de forma simultánea.

Otros dos métodos de determinación de la vascularización tumoral, aún en fase de evaluación, son el uso de la retícula de Chalkley (Fox, 1994) y el análisis de imagen computerizada. Este último ha sido desestimado recientemente, argumentando su escasa sensibilidad para la determinación del flujo en pequeños capilares (Delorme, 1998).

De forma alternativa a los métodos inmunohistoquímicos, la actividad angiogénica puede ser determinada mediante el análisis intratumoral de la expresión de péptidos angiogénicos, como el FGF (Nanus, 1993), o la presencia de sustancias como la trombospondina-1 (Gomm, 1991; Albo, 1997) que a través de la activación del factor de crecimiento transformador beta1 (TGF β 1) regula el sistema plasminógeno/ plasmina. Sin embargo, hasta el momento actual, no se ha correlacionado el patrón de expresión de estos péptidos con el pronóstico del cáncer de mama.

De otra parte, la expresión de algunas enzimas proteolíticas en el estroma del tumor, como el activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA) y su inhibidor (PAI-I), pueden reflejar la actividad angiogénica. En este sentido, hay autores que han determinado el nivel de expresión de estas sustancias proteolíticas en series de pacientes con carcinoma invasivo de mama, carcinoma "in situ", y lesiones benignas de mama (Bianchi, 1994; Grondahl-Hansen, 1993). Existe, según estos estudios, una mayor expresión de u-PA y de su inhibidor en macrófagos y células endoteliales en los carcinomas de mama invasivos, no así en el resto de las lesiones; este hecho sugiere la existencia de complejas interacciones paracrinas entre las células tumorales y el estroma (Bianchi, 1994).

B. Métodos bioquímicos.

Se dispone de métodos bioquímicos que detectan los niveles del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) en sangre y orina (Watanabe, 1991), y que han permitido conocer que en pacientes con cáncer renal se hallan niveles elevados de bFGF en sangre (Fujimoto, 1991). Así mismo, se ha comprobado una

asociación entre los niveles elevados de FGF en orina y el cáncer de vejiga. Más recientemente, Folkman y sus colaboradores han hallado niveles elevados de FGF en la orina de una serie de 950 pacientes con varios carcinomas, entre los que se incluye el cáncer de mama (Nguyen, 1994).

La puesta a punto de técnicas de cuantificación de FGF asociado con otros marcadores de la biología tumoral han demostrado el valor pronóstico en el cáncer de mama del FGF. Así, se ha determinado el nivel de FGF en suero de 231 pacientes con cáncer de mama y en 56 pacientes normales donantes de sangre (Gasparini, 1995). El suero de las pacientes con cáncer presentaba niveles significativamente más elevados de FGF que el de los sujetos normales. Las pacientes con cifras de FGF más elevadas tenían un riesgo de mortalidad cuatro veces mayor que aquellas que tenían cifras bajas de FGF. Nguyen ha publicado los resultados obtenidos tras una revisión de una serie de pacientes con un espectro variado de tumores, en el que se incluían 143 pacientes con cáncer de mama. En 35 de las 40 pacientes en las que se halló unos valores elevados de FGF en sangre y orina, había metástasis a distancia (Nguyen, 1994)

Otras publicaciones destacan una importante función angiogénica para el factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Ferrara, 1994).

En definitiva, estas determinaciones bioquímicas pueden ser útiles para valorar la actividad angiogénica tumoral y, por tanto, el pronóstico en el cáncer de mama. Sin embargo, es necesario un estudio más exhaustivo de estos resultados antes de definir el papel de estos marcadores en la práctica clínica habitual.

C. Otros métodos.

Existen diversas técnicas para evaluar la angiogénesis tumoral, pero se necesitan procedimientos que puedan aplicarse de forma rutinaria y con adecuada sencillez y reproducibilidad a la práctica clínica. A este respecto, se relacionan a continuación algunas técnicas de posible uso, aunque por el momento estén restringidas al campo experimental.

Mediante espectroscopia magnética se puede medir la actividad energética del tumor. Bajo este planteamiento se ha postulado el efecto terapéutico antiangiogénico que existiría disminuyendo la adenosina trifosfato (ATP) y aumentando el fosfato inorgánico en los tumores (Philip, 1993). Este método podría servir para evaluar el efecto biológico de nuevos agentes antiangiogénicos en la terapia del cáncer de mama.

El estudio de muestras tumorales mediante doppler color puede ser de utilidad para reflejar un aumento en el flujo de sangre en muchos tipos de tumores, y para evaluar vasos de mayor tamaño, ya que es posible que sean diferentes los mecanismos que regulan el flujo de sangre en los vasos más grandes (Wu CC, 1994).

Otros autores han desarrollado nuevos métodos para medir la presión parcial de oxígeno tanto a nivel vascular como intersticial. Este hecho permite un seguimiento de PO_2 durante un determinado período de tiempo para de esta forma relacionar el flujo de sangre local con la arquitectura vascular de los tumores (Ficho, 1994).

La proliferación endotelial puede ser determinada in vivo tras el estímulo de líneas celulares de tumores con bromodeoxiuridina. Esto ha mostrado un marcado aumento del crecimiento de células endoteliales en el carcinoma de mama (Fox, 1994).

3. Valor pronóstico de la angiogénesis en el cáncer de mama.

La primera aplicación clínica del valor de la angiogénesis como marcador pronóstico en cáncer tuvo lugar en el melanoma. Srivastava en 1988, observó que la vascularización era mayor en aquellos tumores que presentaban metástasis (Srivastava, 1988). Posteriormente, Weidner aplicó este concepto a otros tumores sólidos, como el de mama, pulmón y próstata, entre otros (Weidner, 1991). Asimismo, fue este autor el primero en cuantificar la angiogénesis en el cáncer de mama y relacionarla con la supervivencia. Su estudio inmunohistoquímico fue realizado utilizando factor VIII, y efectuando recuento vascular de aquellas áreas con mayor vascularización.

La serie estudiada por Weidner incluía a 49 mujeres con cáncer de mama. Este autor observó un menor número en el recuento de microvasos en 19 de las pacientes. Este subgrupo presentaba una particularidad que las diferenciaba del resto, que consistía en la ausencia de metástasis ganglionares axilares. A partir de estos argumentos y basándose en el concepto de angiogénesis como proceso favorecedor de la diseminación tumoral, estableció la hipótesis del papel de la angiogénesis como factor pronóstico independiente en el estadio temprano del cáncer de mama. Posteriormente, este mismo autor completó el estudio con un

total de 165 mujeres con cáncer de mama, demostrando que el recuento de microvasos intratumor es un factor pronóstico independiente en estadios precoces (Weidner, 1992).

Más recientemente, Gasparini en colaboración con Weidner, examinó la expresión de p53, el tamaño tumoral y la invasión linfática, además del recuento vascular, en una serie amplia de 254 mujeres con ganglios negativos, con un seguimiento de 62 meses. Estos autores observaron que todos estos factores se comportaban como marcadores pronósticos de la supervivencia en el cáncer de mama (Gasparini, 1994).

Existen múltiples publicaciones adicionales que refuerzan las observaciones de Weidner y Gasparini (Toi, 1993; Obermair, 1994). Asimismo, han aparecido trabajos que no sustentan esta hipótesis y que analizan críticamente las observaciones iniciales. Éstos se basan en la gran variabilidad en el periodo de seguimiento de las pacientes, así como en la técnica inmunohistoquímica de tinción y el recuento de microvasos (Hall, 1992). Además, hay autores que defienden la gran heterogeneidad en la histología dentro del propio tumor, que determina igualmente una gran heterogeneidad en la distribución de la vascularización (densidad vascular variable) (Axelsson, 1995). No obstante, es necesario comentar que en la actualidad se han unificado los criterios de recuento de microvasos, y nuevas publicaciones mantienen el interés de las observaciones iniciales (Gasparini, 1998).

La revisión sistemática de la literatura científica permite identificar numerosos estudios que han correlacionado la densidad vascular tumoral con el pronóstico en el cáncer de mama en estadio temprano de la enfermedad

tumoral (Gasparini, 1995).

Entre ellos destacan los que se muestran como ejemplo en la siguiente tabla.

	Marcador	Nº pacientes	Estadio tumoral	Nº ganglios +	RFS	OS	Seguimiento (años)
I	fVIII-RA	165	I-II	82	<0.001	<0.001	4
II	CD-31	254	I	0	<0.0001	<0.001	5.1
III	fVIII-RA	328	I-II	192	<0.001	-	4.6

Abreviaciones:

I: Weidner et al. II: Gasparini et al. III: Toi et al.

RFS: Supervivencia libre enfermedad. OS: Supervivencia global.

La mayoría de estos estudios presentan series de pacientes tanto con ganglios axilares positivos como con ganglios negativos. El marcador vascular más empleado ha sido el factor VIII-RA. Generalmente, se trata de series no demasiado amplias, con menos de 100 pacientes, donde se ha correlacionado la angiogénesis con el pronóstico, tanto en lo relativo a supervivencia libre de enfermedad como en supervivencia global. Es frecuente que se describa una asociación significativa entre el grado de vascularización en el tumor y la presencia de metástasis en nódulos linfáticos axilares y metástasis a distancia. En definitiva, la mayoría de estos trabajos publicados confirman que la actividad angiogénica tumoral en el cáncer de mama se correlaciona con la diseminación tumoral a distancia, confirmando las observaciones iniciales de Weidner en 1991. Esta asociación también se ha establecido en otros tumores sólidos (Craft,

1994).

Siguiendo la misma línea de trabajo, se han publicado otros trabajos en los que el valor pronóstico de la angiogénesis tumoral ha sido comparado con la expresión de la oncoproteína p53. Gasparini demostró en un análisis multivariante de una serie de 165 pacientes con un seguimiento de 5 años, que la angiogénesis es un factor pronóstico independiente de la supervivencia libre de enfermedad, cuando además se compara con otro factor pronóstico como es la p53 (Gasparini, 1994). Además, encontró una relación significativa entre el alto nivel de vascularización y los tumores de alto grado histológico en mujeres premenopáusicas. No ha encontrado, sin embargo, relación con otros marcadores biológicos, incluyendo los receptores hormonales.

Se trata pues, del primer estudio que correlaciona de forma significativa el alto nivel de vascularización tumoral y la expresión de p53 con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos. Esta observación ha sido ratificada posteriormente con dos estudios recientes. El primero de ellos muestra que las mutaciones de p53 favorecen el fenómeno de neovascularización debido a un incremento en la producción de proteinkinasa C en líneas celulares tumorales (Kieser, 1994). En el segundo se observa que la oncoproteína p53 favorece el desarrollo del fenotipo angiogénico en fibroblastos de pacientes con cáncer de mama como consecuencia de la estimulación de la trombospondina-1 (Dameron, 1994).

Otros autores, entre ellos Toi y col , han determinado además del índice vascular, la expresión de algunos péptidos angiogénicos y los rasgos clinicopatológicos convencionales del cáncer de mama (Toi, 1993). El análisis

univariante de estas observaciones demostró una asociación significativa entre la expresión del factor de crecimiento endotelial y el recuento de microvasos con la supervivencia libre de enfermedad. Tras un análisis multivariante posterior se demostró que el recuento vascular, el tamaño tumoral y la invasión ganglionar son variables pronósticas independientes en el cáncer de mama.

En definitiva, todos estos estudios confirman el valor pronóstico de la determinación de la angiogénesis tumoral y sugieren la posibilidad de que este marcador pueda ser predictivo de la sensibilidad a la respuesta de la terapia adyuvante. Sin embargo, son necesarios estudios clínicos controlados para valorar la validez del valor pronóstico real de la densidad vascular intratumoral antes de que pueda ser considerado para la práctica clínica rutinaria como un factor de alto riesgo y que sea utilizado para seleccionar a aquellas pacientes en fase temprana de cáncer de mama que pudieran beneficiarse de una terapia adyuvante antiangiogénica (Gasparini, 1993).

IV. FACTORES DE NEOVASCULARIZACIÓN EN EL CÁNCER DE MAMA.

1. Activador del plasminógeno tipo urokinasa y cáncer de mama.

A. El sistema fibrinolítico en las neoplasias.

Recuerdo histórico.

La primera descripción en humanos del sistema fibrinolítico fue hecha por Hipócrates, en el año 400 a. de C, tras observar que la sangre coagulada de cadáveres sufría una licuefacción varias horas después. Estas observaciones fueron confirmadas 2.000 años después por el anatomista Malpighi, en 1687, y posteriormente por el patólogo Morgagni en 1761. Fue Dastre, en 1893, quien acuñó el nombre de fibrinólisis tras concluir que el fenómeno era resultado de la digestión enzimática del compuesto llamado fibrina (citados por Bell, 1996).

La identificación de los principales componentes de este sistema ocurrió entre los años 1930 y 1940, y la primera utilización terapéutica fue realizada por Tillet y Garner en 1933, tras observar que extractos de estreptococo β -hemolítico producían la lisis de coágulos en sangre y plasma de humanos. Milstone en 1941 demostró que este extracto de estreptococo era insuficiente para inducir la fibrinólisis, y que, por tanto debía existir otro "factor lítico" implicado en este proceso (citados por Bell, 1996).

Posteriormente, otros autores, Christensen y MacLeon en 1945, acuñaron el nombre de "estreptoquinasa" para referirse al extracto de estreptococo β -hemolítico, y "plasmina" para el factor lítico de Milstone (Christensen, 1945). Gracias a los estudios exhaustivos que realizaron Sherry y Johnson, la estreptoquinasa fue aplicada para el tratamiento clínico de la enfermedad tromboembólica venosa (Johnson, 1959).

La búsqueda de otros componentes del sistema fibrinolítico condujo al descubrimiento de numerosas sustancias capaces de activar al plasminógeno humano. En 1885, Sahli descubrió la existencia en orina de sustancias con actividad proteolítica, y en 1952 Sobel designó a una de estas enzimas, con capacidad para activar de forma directa al plasminógeno, el nombre de "urokinasa" (Sobel, 1952). Posteriormente, Astrup y Permin reconocieron un segundo activador del plasminógeno al que denominaron "activador tisular del plasminógeno" (citados por Bell, 1996).

Componentes del sistema fibrinolítico.

- Plasminógeno y plasmina.

El plasminógeno es sintetizado en los hepatocitos y su concentración en plasma es aproximadamente de 2 mg/ml. El gen humano responsable de su síntesis ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 6 (Swisshelm, 1985).

La estructura molecular corresponde a una glicoproteína que contiene alrededor de 2% de carbohidratos (Wiman, 1975). Existen dos formas de plasminógeno que difieren en la secuencia de aminoácidos: una forma nativa que contiene glutamina en posición amino-terminal (Glu-plasminógeno), y otra forma modificada que contiene lisina en dicha posición (Lys-plasminógeno). Esta última forma es producto de la degradación parcial del Glu-plasminógeno. Ambas formas son proenzimas inactivas (Kwaan, 1991).

La conversión de plasminógeno en plasmina por los activadores endógenos del plasminógeno se produce tras la rotura de la unión simple entre Arg560 y Val561 de la molécula de plasminógeno dando lugar a dos cadenas de polipéptidos conectadas por puentes disulfuro.

El lys-plasminógeno posee una mayor afinidad por la fibrina que el glu-plasminógeno. Además, la activación del lys-plasminógeno por u-PA es de 10-13 veces superior que la del glu-plasminógeno. De otra parte, la presencia de fibrina acelera la activación del plasminógeno por el activador tisular del plasminógeno (t-PA) (Kwaan, 1991).

- Activadores del plasminógeno: u-PA y t-PA.

Existen dos activadores enzimáticos del plasminógeno que ejercen un papel crucial en este sistema: el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA).

El t-PA es secretado predominantemente por las células endoteliales. Ha sido también hallado en múltiples fluidos humanos tales como la leche materna, saliva, semen, lágrima y bilis. El gen humano responsable de su síntesis reside en el cromosoma 8. Su molécula está formada por una cadena glucoproteica simple que contiene 527 aminoácidos, con un peso molecular de 68 KD (Mullins, 1983). Esta cadena simple es convertida en doble cadena por varios compuestos, como la kalicreína y el factor Xa, y en la superficie de los trombos por la plasmina (Bachmann, 1984), tras producirse la ruptura molecular a nivel de la unión Arg275-Ile276. Finalmente, tiene lugar la aparición de dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro: una cadena A y una cadena B, con un peso molecular de 36KD y 32KD, respectivamente. La cadena A presenta cierta homología con la porción terminal del activador del plasminógeno tipo urokinasa y con el factor de crecimiento epidérmico. La cadena B contiene la zona de activación de la molécula, que es similar a la de otras proteasas séricas.

Una importante propiedad in vitro del t-PA es el incremento de su actividad enzimática en presencia de fibrina. En ausencia de fibrina, su afinidad por el plasminógeno es muy pobre.

La concentración en plasma de t-PA es aproximadamente de 5 a 7 ng/ml con una vida media en plasma de 2,5 a 5 minutos (Rijken, 1983; Baughman, 1987).

El t-PA es almacenado en "pools" de reserva en el endotelio vascular y su liberación se hace en respuesta a numerosos estímulos fisiológicos que incluyen el éstasis venoso y varias sustancias como la vasopresina (AVP), la desamino-8-D-arginina vasopresina (DDAVP), las catecolaminas, histamina y bradikinina

(Bachmann, 1984).

Otro grupo de activadores del plasminógeno lo constituyen los *activadores del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA)*. Se trata de una glucoproteína producida mayoritariamente por las células del parénquima renal y excretada en pequeñas cantidades por orina. Su concentración en plasma no está claramente establecida, presentando un rango que oscila entre 2 y 20 ng/ml con una vida media de 10-15 minutos (Darras, 1986). La concentración en orina es de 2,25 µg/ml. El gen humano de u-PA reside en el cromosoma 10 (Darras, 1986).

La u-PA es inicialmente sintetizada en forma de precursor, prourokinasa (scu-PA), formada por una cadena simple que contiene 411 aminoácidos y un peso molecular de 54 KD. Sustancias como la plasmina, kaliceína y el factor XII pueden convertir esta molécula precursora a su forma activa, de alto peso molecular, tras producirse la ruptura a nivel de la unión Lys158-Ile159. La molécula activa de urokinasa está compuesta por dos cadenas, A y B, unidas por puentes disulfuro. La cadena A contiene 159 aminoácidos, y presenta zonas homólogas con el factor de crecimiento epidérmico y con la cadena A del t-PA. La cadena B está compuesta por 252 aminoácidos y presenta la zona de activación de la molécula.

Aunque la síntesis de u-PA ocurre mayoritariamente en el riñón, existen numerosas células capaces también de producir esta sustancia (fibroblastos, células epiteliales, neumocitos) (Larsson, 1984). Se ha descrito la secreción de u-PA por células malignas de tumores de páncreas, pulmón y tejido mamario. Así mismo, se han hallado receptores para la scu-PA y la u-PA en una gran variedad de tejidos. Esto es debido a que la u-PA juega un importante papel en la

remodelación tisular, en los procesos de inflamación, invasión tumoral, fertilización y embriogénesis (Dano, 1985).

El receptor de u-PA es una proteína de superficie de membrana celular que presenta especificidad de unión con la u-PA. Su molécula está constituida por una cadena simple formada por 313 aminoácidos (Schmitt, 1992). El número de receptores de u-PA varía de unas células a otras, si bien este número está aumentado en las células neoplásicas. Así mismo, se ha comprobado la estimulación de este receptor por el factor de crecimiento epitelial (EFG) (Picone, 1989).

- Inhibidores del plasminógeno: PAI-1, PAI-2, PAI-3.

PAI-1

El gen que controla la síntesis de este inhibidor está localizado en el cromosoma 7. Es secretado por las células endoteliales y por los hepatocitos, y su concentración en plasma es aproximadamente de 0,05 mg/l. También es almacenado en las plaquetas (Kruithof, 1986). Una vez liberado por estas células, está presente en las proximidades de la sustancia extracelular (Levin, 1987). Actúa sobre ambas cadenas, simple y doble, del t-PA y sobre la doble cadena de la u-PA. El efecto inhibidor se ejerce gracias a la alta afinidad por estos compuestos que conlleva la formación de una unión covalente irreversible que ocasiona la ruptura a nivel de la unión Arg346-Met347 de los activadores del

plasminógeno.

Estudios bioquímicos muestran que el activador del plasminógeno tipo urokinasa está involucrado en la degradación de la matriz extracelular y por tanto en el proceso de neovascularización. De otra parte, los niveles de PAI-1 constituyen una medida de la extensión de la vascularización en el carcinoma invasivo. Hay autores que afirman que los niveles de PAI-1 obtenidos en citosoles de células tumorales están asociados a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

Grondahl-Hansen en un estudio realizado en 1993, analizaron los niveles de PAI-1 en una serie de 191 pacientes con cáncer de mama que recibieron terapia adyuvante. La mayoría presentaban ganglios axilares positivos, y se realizó un seguimiento durante 8,5 años. Los niveles de PAI-1 fueron asociados de forma significativa con una pobre diferenciación histológica, presentando a su vez una relación inversa con los receptores hormonales. Finalmente, estos niveles se asociaban a una supervivencia global más corta tanto en pacientes premenopáusicas como en postmenopáusicas (Grondahl-Hansen, 1993). Posteriormente, Foekens llegó a la misma conclusión tras el estudio de una serie de 657 tumores de mama (Foekens, 1995). En definitiva, múltiples estudios aseveran que el PAI-1 es un indicador pronóstico independiente en el cáncer de mama.

PAI-2

Su síntesis está codificada en las secuencias de DNA contenidas en el

cromosoma 18. Su estructura molecular consiste en una cadena simple formada por 415 aminoácidos. Es secretado en forma glicosilada por las células placentarias y por los monocitos. Inhibe la doble cadena de la u-PA y del t-PA. Su efecto inhibitor es 10 veces mayor sobre la u-PA en comparación con el t-PA, y mínimo sobre la cadena simple de éste último. Recientes estudios sugieren que este inhibidor actúa de forma importante en los mecanismos de regulación de los activadores del plasminógeno, fundamentalmente en los procesos neoplásicos (Kruithof, 1995).

PAI-3

Este inhibidor ha sido aislado en orina y, así mismo, ha sido identificado como inhibidor de la activación de la proteína C. Es sintetizado por los fibroblastos, los miocitos cardíacos y por las células epiteliales renales. Su mecanismo de acción es menos conocido, si bien parece ser que forma una estructura terciaria al unirse con la fibrina y el t-PA, favoreciendo la extravasación de éste último al espacio extravascular (Silverstein, 1986).

En los últimos años ha habido numerosos estudios que tratan de identificar los mecanismos de migración de las células tumorales. En la formación de todos los tejidos es esencial una adecuada motilidad celular que permita la invasión de la matriz extracelular, y de esta forma el crecimiento celular. Esta capacidad de movimiento celular está facilitada por la degradación de este tejido extracelular por numerosas enzimas proteolíticas (elastina, vitronectina, laminina, colagenasas, etc.). En los procesos tumorales existe, además, un aumento de la expresión celular de u-PAR, u-PA y t-PA. Este hecho favorece el crecimiento tumoral y por tanto, la diseminación tumoral.

Una vez iniciada la activación del plasminógeno, se forma la plasmina que presenta "per se" capacidad proteolítica debido a la presencia en su estructura molecular del complejo aminoácido arginina-lisina. Además, la plasmina tiene capacidad para activar directamente a otras proteasas (metaloproteinasas, colagenasas y stromelysina). Con todo ello tiene lugar la degradación de la matriz extracelular. Este fenómeno está regulado en función de la concentración de inhibidores del plasminógeno en las inmediaciones de la matriz extracelular. Así mismo, la progresión de estas células tumorales está controlada por otras poblaciones celulares, que incluyen el sistema inmune asociado a macrófagos (Melzer, 1981), células Natural Killer (NK), linfoquinasa activada por NK (Rosenstein, 1984), linfocitos que infiltran el tejido tumoral (Rosenbert, 1986). Este hecho ha sido constatado en una gran variedad de tumores humanos (Bell, 1996).

B. Funciones del sistema fibrinolítico no asociado a neoplasias.

El sistema plasminógeno-plasmina es un componente vital de los procesos bioquímicos del cuerpo humano. Además de su función esencial en la resolución de la patología tromboembólica, este sistema ejerce otra serie de funciones cruciales. El plasminógeno interviene en la regulación de la fisiología de la reproducción. La expresión de la acción de los activadores e inhibidores del sistema fibrinolítico está regulado secuencialmente por la liberación de gonadotropinas durante el proceso de ovulación. La acción proteolítica de la plasmina es necesaria para la degradación de la pared folicular que tiene como resultado la liberación del folículo de Graaf.

Recientes observaciones han establecido que las gonadotropinas estimulan la secreción de t-PA a través de la expresión del m-RNA en las células de la granulosa y en las células de la teca momentos antes de la ovulación (Galway, 1989; Ohlsson, 1991).

Una vez fecundado el óvulo, la u-PA interviene en el proceso de invasión e implantación del huevo en el endometrio, y en su posterior proliferación. Así mismo, tanto la u-PA como T-PA tienen un efecto importante en el desarrollo embrionario, puesto que favorecen la formación de la cresta neural y del tejido hematopoyético (Valinsky, 1981).

El sistema fibrinolítico interviene además en situaciones de traumatismos tisulares, de tal forma que la u-PA ejerce un efecto quimiotáctico sobre gran número de células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos e histiocitos). También en el proceso de reparación tisular, una vez iniciada la reepitelización por los queratinocitos, la u-PA favorece el infiltrado de fibroblastos y células endoteliales para continuar este proceso. De igual forma, en las lesiones vasculares de arterias y venas existe una mayor expresión de t-PA y u-PA, predominantemente de u-PA, en las células endoteliales y en las de la musculatura lisa (Clowes, 1990).

En los traumatismos pulmonares, las células alveolares también muestran una mayor expresión de u-PA durante la fase de reparación tisular (Gross, 1990; Marshall, 1990).

C. El sistema fibrinolítico asociado a neoplasias.

Las células neoplásicas tienen una gran capacidad potencial para producir una importante variedad de sustancias, y para expresar en sus membranas celulares múltiples receptores (Heimbürger, 1992). Se ha demostrado desde hace algunos años, que las células neoplásicas son capaces de sintetizar compuestos que producen la activación del sistema plasminógeno-plasmina, y por tanto del sistema de la fibrinólisis. También, estas células tumorales pueden sintetizar y liberar proteasas que presentan "per se" efecto fibrinolítico sin necesidad de activación del sistema plasminógeno-plasmina.

La producción local de estas sustancias (proteasas- catepsina B y L-, metaloproteinasas- colagenasas, gelatinasas, stromelysina-, aspartato proteasas - catepsina D-, u-PA, t-PA) con capacidad lítica facilita los procesos de invasión y migración celular a localizaciones a distancia del lugar de origen tumoral. De igual modo, cuando la célula tumoral llega a estas nuevas localizaciones, el sistema fibrinolítico favorece los mecanismos de implantación y proliferación celular (William, 1996).

En el proceso neoplásico podemos diferenciar dos compartimentos bien definidos: las células neoplásicas y el tejido estromal circundante. Este último aporta las condiciones óptimas necesarias para el crecimiento y la migración tumoral.

El crecimiento de las células neoplásicas está influenciado por la hipoxia tisular y los factores de permeabilidad vascular que permiten la extravasación de

proteínas plasmáticas incluyendo el fibrinógeno, al espacio extravascular. El fibrinógeno es convertido en fibrina por células neoplásicas con actividad procoagulante. La fibrina ejerce un doble rol en el crecimiento tumoral, favoreciendo la migración celular y en segundo lugar formando una barrera rígida de diseminación que limita el efecto de las células inflamatorias y la acción de sus productos de secreción, interfiriendo de esta forma los mecanismos de defensa del huésped.

El sistema de macrófagos activados, y especialmente el sistema de macrófagos asociados al tumor, presenta una importante capacidad potencial fibrinolítica. Estos macrófagos pueden inducir la unión del Lys-plasminógeno a receptores de superficie con la consiguiente transformación de plasmina. Además, los macrófagos secretan elastasa que actúa como enzima proteolítica con capacidad destructiva de las barreras tisulares, favoreciendo de esta forma la diseminación tumoral. El sistema de macrófagos activados y asociados al tumor secreta, así mismo, sustancias vasoactivas que aumentan la permeabilidad capilar y permiten la extravasación de fibrinógeno al espacio extravascular (Berse, 1992).

Recientemente se ha descrito el papel de algunos oncogenes (ras, jun, myc, fos, rel) (Zacharski, 1992; Blasi, 1993) como promotores de la actividad incrementada del sistema proteolítico plasminógeno-plasmina. Estos oncogenes tienen capacidad para inducir un aumento de la expresión de receptores en la superficie de las membranas de las células neoplásicas.

Hay publicaciones que afirman la existencia de diferencias entre las células neoplásicas y las células normales en relación a la síntesis y localización

de las proteinasas. Las proteinasas de células neoplásicas están asociadas con la actividad de la superficie celular y no son secretadas. Estos componentes de la superficie de la membrana celular de las células neoplásicas que son esenciales para la supervivencia local y la migración a distancia de estas células son: u-PA, t-PA, receptor de u-PA, y los inhibidores del plasminógeno (PAI-1, PAI-2, PAI-3) (William, 1996).

Uno de los primeros estudios en relación al papel que ejerce el sistema fibrinolítico en las neoplasias, fue realizado por Janicke en 1990. Este autor demostró que una mayor expresión de u-PA en las células neoplásicas se asociaba a un mayor riesgo de recidiva y a una supervivencia más corta (Janicke, 1990). Estas observaciones han sido confirmadas posteriormente, y todos los autores coinciden en que los niveles elevados de u-PA en los tumores de mama constituye un factor de mal pronóstico (Duffy, 1994; Duggan, 1995). Además, la u-PA ha sido considerada como un marcador predictor más específico en el cáncer de mama, tanto en pacientes premenopáusicas como postmenopáusicas, que el tamaño tumoral, el grado histológico, los ganglios linfáticos y los receptores hormonales (Janicke, 1991; Duffy, 1990; Schmitt, 1991).

La concentración de PAI-1 en sangre y en tumor también está elevada; sin embargo, no ejerce un efecto inhibitor del sistema fibrinolítico como en condiciones fisiológicas, sino que presenta una respuesta funcional inadecuada (Duffy, 1990; Reilly, 1992).

D. Expresión de u-PA, u-PAR y PAI-1 en las diferentes lesiones mamarias.

Un estudio realizado por Constantini muestra la expresión de u-PA, uPAR, PAI-1 en las diferentes lesiones mamarias, así como en tejido normal de mama (Constantini, 1996). El objetivo de este estudio ha sido relacionar el modelo de coexpresión del uPAR, el UPA y su inhibidor (PAI-1) en la misma muestra de tejido mamario con el fin de establecer in vivo el rol que ejerce la activación del sistema de fibrinólisis en los diferentes pasos del proceso de invasión del cáncer de mama.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

HISTOLOGÍA	uPAR	uPA	PAI-1	t-PA
Mama normal	0.66 ± 0.5	1.18 ± 0.8	0.85 ± 0.85	0.71 ± 0.3
Mama benigna	0.79 ± 0.5	2.22 ± 0.8	0.97 ± 0.4	1.53 ± 0.7
Ca in situ	0.82 ± 0.4	1.36 ± 0.7	1.28 ± 0.5	1.14 ± 0.6
Ca invasivo	1.44 ± 0.6	2.15 ± 0.5	1.68 ± 0.7	1.5 ± 1.0

Scores (Media ± Desviación Típica) calculados midiendo la intensidad y porcentaje de células con tinción inmunohistoquímica positiva.

uPAR: Receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa.

uPA: Activador del plasminógeno tipo urokinasa.

PAI-1: Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno.

t-PA: Activador tisular del plasminógeno.

Tejido mamario normal.

La gran mayoría (80-100%) de las células epiteliales de los ductos normales expresaron una tinción débil para el uPAR. La expresión de u-PA fue observada en el 60-100% de las células epiteliales ductales normales. Además, la positividad para la u-PA fue demostrada en el 80-100% de las células fibroblásticas del estroma. La expresión de u-PA fue más intensa en la membrana celular, aunque también fue observada en el citoplasma. En relación a PAI-1, estos autores observaron una positividad variable tanto en las células epiteliales como en el estroma.

Lesiones mamarias benignas.

La expresión de uPAR en las lesiones mamarias benignas varió entre un 30 y un 100% tanto en los ductos como en el estroma. Sin embargo, se demostró una positividad difusa para u-PA en las células epiteliales y en el estroma. Además, esta expresión fue más intensa en la enfermedad fibroquística de la mama con respecto a los adenomas. Así mismo, la expresión de PAI-1 fue variable, y no hubo diferencias entre los distintos tipos de lesiones benignas.

Carcinoma ductal in situ.

La expresión de uPAR fue mayor, y varió entre 70-100%. Además, el modelo de positividad para uPAR era heterogéneo dentro del mismo tejido. La expresión de uPA y PAI-1 se observó en todas las muestras de carcinoma in

situ, y su positividad fue elevada, con un porcentaje que osciló entre 60-100% en las células epiteliales tumorales. En el estroma la positividad fue difusa para PAI-1.

Carcinoma ductal invasivo.

Todas las células epiteliales mostraron positividad para u-PAR en los carcinomas infiltrantes. Su expresión fue observada tanto a nivel de membrana celular como en el citoplasma, y a nivel del estroma su positividad varió entre 30-100%. Sin embargo, las células epiteliales mostraron una intensa positividad de forma difusa para u-PA en todos los tumores estudiados. Este hecho fue también observado en las células estromales, aunque en menor intensidad. Así mismo, también hubo positividad difusa para PAI-1 en las células epiteliales en los tumores invasivos.

En definitiva, Constantini y col. demostraron que la expresión de u-PAR en las células epiteliales es un hecho constante en el cáncer de mama invasivo. Un análisis cuantitativo efectuado en relación a la expresión de este receptor en células epiteliales, ha mostrado que existen diferencias significativas entre el carcinoma invasor y el resto de las lesiones mamarias. Estas diferencias no se han hallado en la expresión de u-PAR en las células estromales. Este hecho confirma la hipótesis de la sobreexpresión constante de u-PAR en las células epiteliales tumorales en los carcinomas invasivos de mama. La expresión de u-PAR en el estroma no es constante y depende a su vez del efecto biológico de la interacción de otros factores (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento) con las células estromales, macrófagos y fibroblastos. Estos resultados confirman la observación de Del Vecchio (Del Vecchio, 1993). Este modelo de

reactividad celular para u-PAR también ha sido demostrado recientemente en el melanoma (De Vries, 1994).

Asimismo, Constantini y col. han confirmado que existe una mayor expresión de u-PA y PAI-1 en el carcinoma invasor en relación al tejido mamario normal. En las lesiones benignas mamarias también observaron una elevada expresión de estos factores.

Otro hecho importante fue el hallazgo de una expresión difusa de u-PA en el estroma. Sin embargo, este estudio no puede excluir la posibilidad de que uPA se sintetice en los macrófagos del estroma del tejido mamario normal y de los tejidos mamaros malignos, y posteriormente se produzca la unión específica a uPAR de las células epiteliales por un mecanismo paracrino, similar al fenómeno demostrado por hibridación en el carcinoma "in situ" en el cáncer de colon humano (Pyke, 1991). Además, hay datos recientes preliminares en relación a estudios de hibridación sobre el carcinoma ductal invasivo que sugieren que el mRNA para uPA puede estar presente en las células del estroma.

Otro hallazgo a destacar es la presencia de niveles elevados de u-PA en las células epiteliales y en el estroma de las lesiones mamarias benignas, que puede explicarse en relación a la respuesta de estas células a estímulos hormonales o inflamatorios (Ossowski, 1979). Esta observación acerca de los niveles altos de uPA en lesiones benignas de mama puede contradecir la hipótesis sobre el papel que ejerce la activación del sistema fibrinolítico en el crecimiento de los tumores de mama, en los que ya es conocida la existencia de una sobreexpresión de uPA tanto en células epiteliales como en estroma.

Sin embargo, se ha observado un patrón diferente entre las lesiones de mama malignas y benignas, de tal forma que sugieren que los niveles de uPAR constituyen el paso limitante en la activación del sistema fibrinolítico. La relación uPA/uPAR equilibrada hallada en los tejidos de mama normales parece ser debida a una producción baja de uPAR y uPA. Este hecho es diferente en las lesiones benignas de mama en las que existe unos niveles bajos de uPAR y elevados de uPA, y en las lesiones malignas en las que ambos valores están considerablemente elevados. Esta observación pone de manifiesto el papel crucial que juega uPAR en la regulación del sistema fibrinolítico, favoreciendo la activación de uPA y reduciendo el efecto de sus inhibidores (Blasi, 1993).

Además, el carcinoma invasor de mama muestra un aumento de forma difusa de PAI-1 tanto en las células epiteliales tumorales como a nivel del estroma. Este patrón de distribución también ha sido demostrado por otros autores (Jankun, 1993). Diversos autores confirman la relación existente entre los elevados niveles de uPA y PAI-1 en los tejidos de mama malignos y el mayor riesgo de recidiva.

En definitiva, la presencia de uPAR tanto en tejido normal de mama como en lesiones benignas conduce a la idea de que la transformación maligna de las células mamarias se acompaña de una pérdida de la regulación de la síntesis de este receptor, y como consecuencia un aumento en la transcripción del gen uPAR que se halla silente en las células epiteliales ductales normales. La asociación entre ambos fenómenos, expresión de uPAR y transformación neoplásica, debe ser estudiada en profundidad con objeto de establecer la relación de causalidad existente entre ambos eventos.

D. Efecto de los activadores- inhibidores del plasminógeno en diferentes tipos de neoplasias.

Carcinoma de pulmón.

Numerosos estudios basados en el análisis de muestras de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas, han mostrado que existe una asociación importante entre el aumento de expresión de u-PA y u-PAR y la disminución significativa del tiempo de supervivencia global. Esta asociación es mayor en el carcinoma de células escamosas (Nagayama, 1994; Liu, 1995).

Asimismo, para esta misma localización tumoral la combinación de niveles aumentados de u-PAR, u-PA y t-PA y concentraciones bajas de PAI-1 y PAI-2 está directamente relacionado con la presencia de infiltración linfática y diseminación a distancia (Pedersen, 1994; Pappot, 1995).

Carcinoma de colon y recto.

En diferentes estudios sobre líneas celulares de neoplasias colorrectales humanas se ha comprobado una relación estadísticamente significativa entre los niveles de u-PA y el grado de diferenciación histológica de los tejidos neoplásicos. Las células neoplásicas colorrectales tienen la capacidad de estimular la producción de u-PA y u-PAR por el tejido estromal circundante (Eriksen, 1991).

Otras investigaciones han revelado también un aumento de la expresión de receptores de u-PA en la membrana de las células tumorales (Hollas, 1991). Asimismo, se ha observado en líneas celulares tanto "in vitro" como "in vivo", que las células neoplásicas con capacidad invasiva presentan un incremento de u-PA y u-PAR de 30 a 50 veces más que aquellas células tumorales no invasivas. En aquellos pacientes con niveles muy elevados de PAI-1 y PAI-2 las metástasis linfáticas fueron significativamente menores que en aquellos otros pacientes con concentraciones mínimas o ausentes de estos inhibidores (Sata, 1995).

Carcinoma gástrico.

Existe una uniformidad de criterios en la interpretación de las observaciones referidas al cáncer gástrico, en relación al aumento significativo en las células neoplásicas de u-PAR, u-PA y t-PA con respecto a las células gástricas normales.

Otros estudios confirman que la actividad incrementada de PAI-1 en estas neoplasias es un indicativo de peor pronóstico, de una supervivencia libre de enfermedad más corta, de una mayor frecuencia de metástasis, y de una peor respuesta al tratamiento quimioterápico adyuvante (Nekarda, 1994; Heiss, 1995).

Otras neoplasias.

En los tumores de próstata existe un incremento de u-PA en relación a otras lesiones benignas como la hiperplasia prostática (Plesner, 1994). En todos

los estudios referentes a esta neoplasia se ha hallado una asociación significativa entre el grado de invasión tumoral y los niveles de u-PA y su receptor (Kwaan, 1991; Hoosein, 1991).

En el cáncer de endometrio el incremento de u-PA, u-PAR, junto con el factor de crecimiento epidérmico, está asociado a una supervivencia más corta debido a la progresión tumoral favorecida por la degradación proteolítica de la matriz extracelular. Este hecho no se ha constatado en las lesiones ginecológicas benignas (Wilhelm, 1995).

En relación al osteosarcoma, hay estudios que constatan que puede haber una asociación entre la parathormona y los activadores del plasminógeno para favorecer el crecimiento tumoral (Campbell, 1994).

Por último, la expresión del t-PA está aumentada en las neoplasias pancreáticas, a diferencia del activador del plasminógeno tipo urokinasa que presenta una menor expresión. Este hecho no está claramente establecido, si bien es cierto que el aumento de actividad del sistema fibrinolítico en estos tumores está asociado a una supervivencia más corta (Kuramoto, 1995).

2. Otros factores de neovascularización implicados en el cáncer de mama.

Como ya se ha comentado anteriormente, las células tumorales secretan numerosas proteasas implicadas en la degradación de la membrana basal, y por tanto, en el proceso de neovascularización. Asimismo, el tumor produce y libera uPA cuyo papel en este proceso es crucial, no solo por su potente acción angiogénica directa sino también por su capacidad para la liberación de otros factores de neovascularización por las células endoteliales y otros componentes del estroma como son el heparán sulfato, TGF alfa (factor de crecimiento transformador alfa y beta), EGF (factor de crecimiento epidérmico), bFGF (factor de crecimiento fibroblástico), Tie (receptor del factor de crecimiento endotelial), SF (factor "scatter" o factor de crecimiento hepatocítico).

A. Factor de crecimiento transformador (alfa y beta) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).

El factor de crecimiento transformador alfa ($TGF\alpha$) ha sido identificado en numerosos tejidos humanos con actividad proliferativa, ya sean normales o malignos. Numerosos estudios sugieren que las células del cáncer de mama producirían $TGF\alpha$, considerándole como un indicador de carga tumoral o de riesgo de progresión de la enfermedad.

Además, en los cultivos de células epiteliales mamarias normales de rápida proliferación se ha demostrado la secreción de grandes cantidades de $TGF\alpha$, sugiriéndose que este factor podría participar en el control de los

procesos de crecimiento "in vivo" de los tejidos mamarios normales y de los tejidos malignos. El TGF α también desempeña funciones en la reparación de heridas epiteliales y en el proceso de angiogénesis tumoral (Dickson, 1993).

Publicaciones recientes resaltan la influencia del factor de crecimiento transformador β en el cáncer de mama, atribuyéndole un importante papel en el crecimiento de las células tumorales, a través de la estimulación en la producción de u-PA por los miofibroblastos del estroma (Albo 1997; Sieuwerts, 1998).

También se han publicado numerosos datos que demuestran que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) posee una actividad promotora tumoral. Su receptor ha sido identificado en estirpes celulares malignas de tumores mamarios en seres humanos y en roedores. Además, se ha demostrado que el EGF induce la síntesis de su propio receptor. La sobreexpresión de este receptor se ha asociado estrechamente con un pronóstico desfavorable del cáncer de mama (Basu, 1987) y con una mayor velocidad de crecimiento tumoral en estudios experimentales que establecen la posible influencia del EGF en la activación y modulación del proceso de proteólisis del estroma a través de la activación de u-PA y colagenasas tipo IV(92 kDa) (Watabe, 1998). Asimismo, la sobreexpresión de este receptor puede ser importante en la génesis de una respuesta inmunológica tumoral, dado que se han detectado varios antígenos tumorales específicos en la estructura de hidrato de carbono del receptor EGF (Dickson, 1993).

B. Factor de crecimiento fibroblástico.

Los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) fueron inicialmente clasificados como factores de "competencia" que actuarían en una fase temprana de la fase G1 del ciclo celular para estimular el crecimiento de las células mesenquimatosas. Los miembros de esta familia incluyen los FGF ácido y básico (aFGF y bFGF) (Relf, 1997).

Posteriormente, se ha observado que los FGF participan en el control del crecimiento normal y maligno del epitelio mamario. Además, se conoce que este factor es una sustancia angiogénica potente (Dirix, 1997).

Nguyen ha demostrado la existencia de una correlación significativa entre los niveles detectados en orina de bFGF y la capacidad invasiva del tumor (Nguyen, 1994).

C. Factor de crecimiento endotelial y su receptor (Tie).

Se ha publicado una importante función angiogénica para el factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Ferrara, 1994).

El receptor del factor de crecimiento endotelial (Tie) pertenece a la familia de las tirosina quinasa y se ha relacionado recientemente con el grado de vascularización intratumoral del cáncer de mama (Relf, 1997; Mandriota, 1997).

Los receptores tirosina quinasa juegan un papel crucial en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Van der Geer, 1994). El patrón de distribución del mRNA Tie en las células endoteliales embrionarias y en algunos tumores sólidos sugiere que este receptor está implicado en el desarrollo de la vascularización embrionaria y posiblemente en el proceso de neovascularización tumoral. El mRNA Tie está sobreexpresado en las células endoteliales durante el desarrollo angiogénico embrionario (Korhonen, 1995).

Un estudio realizado por Salven y col. sobre la expresión de Tie en diferentes lesiones mamarias y en tejido mamario normal, ha revelado una sobreexpresión de este receptor en las células endoteliales del cáncer de mama en relación al fibroadenoma y al tejido mamario normal, con significación estadística (Salven, 1996). Según Salven, la expresión de Tie en tumores mamarios es un indicador de la angiogénesis tumoral, y actuaría como factor pronóstico en esta neoplasia. Por tanto, la inhibición de la función de este receptor, bloqueando su unión específica con el ligando o bien bloqueando la transducción de su señal, puede constituir una potencial arma terapéutica antiangiogénica.

En la siguiente tabla se muestra un análisis estadístico de la expresión del receptor Tie en las células endoteliales de las diferentes lesiones mamarias y en tejido normal, en relación al nivel de vascularización de cada una de ellas, usando anticuerpos anti-Tie de 8 y anticuerpos CD31. Se puede observar un aumento en la expresión de este receptor en el carcinoma de mama con respecto al tejido normal, paralelamente a un aumento en la cuantificación de microvasos (Salven, 1996).

Anticuerpo	Tejido Normal	Fibroadenoma	Carcinoma	Kruskal-Wallis
<u>7 e 8</u>				
Rango	3-15	5-18	3-27	
Media	7	10	14	<0.0006
<u>CD31</u>				
Rango	8-30	18-28	18-40	
Media	15	21	30	<0.0001

Análisis estadístico del recuento de microvasos utilizando anti-tie 7 e 8 y el anticuerpo anti-CD31, en tejido mamario normal, en fibroadenoma y en carcinoma invasivo (Salven, 1996).

D. Factor "scatter" (SF) o factor de crecimiento hepatocítico.

Recientemente, se ha implicado al denominado factor "scatter" (SF) también conocido como factor de crecimiento hepatocítico, en la neovascularización de los tumores mamarios (Lamszus, 1997). Según Lamszus este factor favorece la motilidad y el proceso de invasión de las células tumorales. Su receptor es una tirosina quinasa codificada por el protooncogen c-met. Este autor ha demostrado que la sobreexpresión de SF en líneas celulares de cáncer de mama produce un incremento significativo de la masa tumoral en comparación con líneas celulares que no expresan este factor. Además ha observado una mayor actividad quimiotáctica para células endoteliales de la microvasculatura en los clones SF+ en comparación con los clones SF-.

V. OTROS FACTORES PRONÓSTICOS IMPLICADOS EN EL CÁNCER DE MAMA.

La tendencia actual en la terapéutica quirúrgica del cáncer de mama es conseguir un porcentaje cada vez más elevado de tratamiento conservador. Es, por consiguiente, muy importante poder saber en el momento de instauración del tratamiento qué carcinomas presentan mayor probabilidad de recidiva mediante indicadores que permitan instaurar una terapéutica preventiva complementaria, y en cuáles el tratamiento debe incluir medidas más agresivas no exentas de morbilidad. Cuatro factores consideró Maas en 1990 como condicionantes del riesgo de recidiva local: edad menor de 40 años, presencia de carcinoma ductal in situ alrededor del tumor, hallazgo de linfangitis carcinomatosa, y márgenes de la pieza operatoria comprometidos. Van Fournier agregó posteriormente otro factor: el grado de componente intraductal en el tumor primario (Gardioli, 1995).

Los diversos factores pronósticos recogen aspectos muy diferentes de las características de la paciente y de la biología de su enfermedad, haciendo referencia tanto al carcinoma en sí, al tiempo en que se ha hecho la detección, la extensión locorregional y la agresividad o potencial de crecimiento, la relación tumor-huésped y su capacidad de reacción inmunológica y el estado general.

La interacción de estos factores pronósticos debe ser dinámica para que su asociación permita obtener ventajas para un seguimiento adecuado de estas pacientes (Levine, 1991).

Con respecto a la utilidad y reconocimiento de estos factores pronósticos,

la conferencia de consenso del NIH sobre tratamiento del cáncer de mama en estadio precoz (NIH, 1991) expone las siguientes condiciones: validez predictiva significativa e independiente confirmada en pruebas clínicas; medición o determinación factible, reproducible y de asequible realización con los adecuados controles de calidad; y, facilidad para su interpretación clínica, e implicación terapéutica.

1. Tamaño tumoral.

El *tamaño* tumoral es uno de los factores más evaluados en el pronóstico del cáncer de mama. Inicialmente, se definió el cáncer mínimo como un carcinoma in situ lobulillar, un carcinoma invasor intraductal de menos de 0,5 cm de diámetro máximo (Fisher, 1969). Posteriormente, otros autores han ampliado este concepto incluyendo tumores de hasta 1 cm. Actualmente, la mayoría de los autores coinciden en que los llamados cánceres mínimos (menores de 1 cm) presentan una supervivencia a los 10 años alrededor del 95%, mientras que los tumores de hasta 5 cm de diámetro presentan metástasis ganglionares axilares en el momento de la consulta en el 75% de las pacientes. Hay que añadir, sin embargo, que existen excepciones, de forma tal que un 13 % de los tumores menores de 1 cm tienen metástasis en el momento del diagnóstico y un 5 % de tumores mayores de 5 cm no las presentan (Potel, 1994). También es un hecho aceptado que los tumores mayores de 6 cm tienen 10 veces más probabilidad de metastatizar en el nivel III axilar en comparación con los tumores más pequeños.

Fisher en 1969 ya demostró una correlación inversa entre el tamaño tumoral y el índice de supervivencia. Este hecho fue corroborado asimismo por Koscielny en un estudio que abarcaba un periodo de 20 años (años 50-70) (Koscielny, 1984). Más recientemente, hay autores que han relacionado el tamaño tumoral no sólo con la supervivencia global, sino también con la recurrencia o supervivencia libre de enfermedad (Gasparini, 1994). En este estudio se realizó un seguimiento de una serie amplia de 254 pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos durante un periodo de 62 meses, estudiando varias variables, entre ellas el tamaño tumoral. Los resultados obtenidos muestran mediante un análisis multivariante que la densidad vascular intratumoral, la expresión de p53, el tamaño tumoral y la invasión linfática son factores pronósticos independientes, con significación estadística, para la supervivencia libre de enfermedad. De todas las variables estudiadas, tan solo el tamaño tumoral fue hallado como predictor independiente de la supervivencia global.

Con anterioridad, Neville había publicado la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años en relación al tamaño tumoral: 88% en tumores menores de 1 cm, 84% para tumores de 1 cm, 69% para tumores entre 1.1 y 2 cm, 60% para tumores de 2.1 a 3 cm, y 61% para tumores entre 3,1 y 5 cm de diámetro (Neville, 1992).

No existen dudas de que el tamaño del tumor es un factor importante del pronóstico y por tanto, debe utilizarse el tamaño anatomopatológico y no el clínico. Así lo indica un trabajo reciente realizado por Abner en el que se expone la frecuente discrepancia entre tamaño tumoral macroscópico y microscópico. Este autor ha estudiado una serie amplia de 118 pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos, con el objetivo de determinar el valor predictivo de

diseminación a distancia del tamaño tumoral. Este autor concluye que el tamaño microscópico es mejor predictor del riesgo de enfermedad a distancia que el tamaño macroscópico, y afirma que aquellos tumores con un componente invasivo microscópico mayor o igual a 1,1 cm presentan un riesgo sustancial de diseminación a distancia en comparación con aquellos otros menores de 1 cm, en los que el pronóstico es excelente (Abner, 1998).

2. Estatus axilar.

En relación al *estatus axilar*, Hutter enfatizó la importancia, como factor predictivo de la evolución clínica, de la presencia o ausencia de ganglios metastatizados en la axila, haciendo referencia al número de ganglios afectados, los niveles comprometidos, a la presencia de micro o macrometástasis y a la integridad o ruptura de la cápsula de estos ganglios (Hutter, 1980). A mitad de este siglo, se demostró que la cantidad de ganglios linfáticos axilares afectados era inversamente proporcional a la supervivencia de la paciente. Por tanto, cuanto mayor fuera la cantidad de ganglios afectados peor sería el pronóstico. Carbone observó que, cuando se encontraban comprometidos de uno a tres ganglios linfáticos, el índice de supervivencia a los 10 años oscilaba entre el 38 y 54 %, y este índice disminuía a un 13 % cuando la enfermedad afectaba a 4 o más ganglios linfáticos.

No solamente es importante el número de ganglios afectados, sino también el nivel de las metástasis ganglionares. En este sentido, Adair ha publicado las tasas de supervivencia a los cinco años en relación a los niveles

de progresión de invasión ganglionar, de tal forma que para el nivel I se prevee un 65%, para el nivel II un 45%, y la invasión en el nivel III se aproxima a un 28% (Gardiol, 1995).

Berg observó la siguiente distribución de los ganglios linfáticos axilares desde el nivel más bajo hasta el nivel más alto: 45%, 35% y 20%, respectivamente (Berg, 1995). En un análisis del compromiso ganglionar linfático total en relación al nivel de metástasis, se observó que la supervivencia parecía estar relacionada más estrechamente con el número total de ganglios linfáticos metastáticos que con los niveles afectados. En relación a estos argumentos se estima que la supervivencia a los 10 años presenta un descenso lineal, de tal forma que de 1 a 3 ganglios es del 60%, si están afectados de 4 a 10 disminuye hasta un 45%, y por último, con más de 10 desciende dramáticamente hasta un 15% (Harris, 1992).

También se observó que el pronóstico era mucho mejor si la invasión de los ganglios linfáticos era microscópica en lugar de macroscópica. Según Huvos y col., las micrometástasis eran consideradas como focos menores de 2mm y las macrometástasis como focos mayores de 2mm y, por lo general visibles macroscópicamente (Huvos, 1971).

Finalmente, se han realizado estudios en los que se muestra la posible asociación entre la extensión del tumor a través de la cápsula de los ganglios linfáticos con la probabilidad de recidiva tumoral, de tal manera que en caso de existir extensión extracapsular el índice de recurrencia puede llegar al 47% a los 22 meses, en comparación con un índice del 30% en el caso de metástasis confinadas dentro de la cápsula ganglionar (Donegan, 1993).

En la siguiente tabla se expone la supervivencia libre de enfermedad a los 18 años en una amplia serie de 474 enfermas de cáncer de mama con ganglios axilares negativos (T1N0M0) distribuidas en grupos en función de determinadas características anatomopatológicas (Ronsen, 1990).

Características anatomo-patológicas	Supervivencia 18 años
TAMAÑO DEL TUMOR	
> 1 cm	74%
< 1 cm	88%
TIPO DE TUMOR	
Ductal o lobular	77%
"Otro"	94%
INFILTRADO LINFÁTICO	
Presente	62%
Ausente	78%
INVASIÓN VASCULAR	
Presente	65%
Ausente	79%
GRADO NUCLEAR	
Indiferenciado	71%
Diferenciado	83%
GRADO HISTOLÓGICO	
Indiferenciado	70%
Diferenciado	90%

Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con ganglios negativos. Seguimiento de 18 años (Ronsen, 1990).

3. Crecimiento tumoral.

El *crecimiento tumoral* está representado por los siguientes parámetros: tipo de invasión (diferenciando los carcinomas "in situ" de los invasores), el tipo y el grado histológico, el grado nuclear, la invasión linfático-vascular del tumor, la presencia de necrosis intratumoral y la proporción de elastosis en el estroma.

Fueron Carter y col. los primeros autores en observar que la *necrosis tumoral* se asociaba a un índice creciente de metástasis axilares y mortalidad, de tal forma, que los tumores con necrosis tumoral y un borde infiltrante eran clínicamente más agresivos (Carter, 1979). Las pacientes que presentaban cánceres con bordes infiltrantes y necrosis se asociaban a un índice de metástasis axilares del 75 % y un índice de supervivencia a los 10 años del 29 %, mientras que en las pacientes con cánceres de borde regular y sin necrosis esos índices fueron del 30 % y del 61 %, respectivamente.

Se han descrito dos tipos de necrosis. La necrosis más frecuente, que afecta al componente intraductal del cáncer, fue denominada de tipo comedón. Este tipo de necrosis parece ser ominosa en comparación al tipo menos frecuente de necrosis, similar a la observada en un infarto, que afecta al componente estromal y representa áreas de invasión. El grado de necrosis (leve, moderada, severa) es un factor significativo en la valoración del potencial de agresividad tumoral, y tiene valor pronóstico sobre la supervivencia en el cáncer de mama (Ackerman, 1995).

Asimismo se ha demostrado que tanto la *invasión linfática* como la *invasión*

perineural representaban un hallazgo patológico desfavorable en relación con la supervivencia del paciente (Beck, 1985).

En relación a la *elastosis*, algunos estudios han sugerido que podría indicar un pronóstico más favorable en relación a la supervivencia a los 5 años, puesto que posiblemente se trate de un signo de crecimiento lento del tumor (Ravdin, 1997).

El grado histológico de Bloom y Richardson, viene definido por el grado de formación de túbulos, el grado nuclear y el índice mitótico. Es un marcador de la actividad proliferativa del tumor, y numerosos estudios han confirmado su valor pronóstico en relación a la supervivencia (Elston, 1991; Ravdin, 1997). Se acepta generalmente, que los tumores de grado I, bien diferenciados, se correlacionan con una mayor edad de presentación, la ausencia de infiltración ganglionar y un tipo histológico asociado a buen pronóstico, así como a un menor tamaño tumoral. Por el contrario, los tumores grado III se han asociado a tamaño tumoral mayor de 2 cm, tipo histológico invasivo, invasión vascular, ganglios linfáticos infiltrados, receptores estrogénicos negativos y estado premenopáusico de las pacientes, todos ellos factores de mal pronóstico (Neville, 1992; Menard, 1994).

En relación al tipo histológico, el carcinoma *in situ*, el carcinoma tubular, papilar, medular o coloide, tienen mejor pronóstico. El carcinoma ductal infiltrante implica un 75 % de los tumores invasores, y se caracteriza por la ausencia de un patrón histológico concreto, aunque puede mostrar determinadas áreas con algunos de los subtipos comentados anteriormente (Harris, 1992). Sólo un 10% de los tumores invasores presenta un patrón histológico específico, y en general éstos presentan mejor pronóstico que el ductal infiltrante, a excepción de la

variedad "atípica" del carcinoma medular (Harris, 1992).

El carcinoma lobulillar infiltrante constituye un 5-10% de los tumores invasores. Se caracteriza por su multicentricidad, responsable de una mayor tasa de recidivas y una discreta menor supervivencia que el carcinoma ductal infiltrante (Harris, 1992; Berg, 1995).

Por último, el carcinoma inflamatorio de mama está siendo considerado como una entidad clínico patológica particularmente diferente de otros tumores, con gran extensión y tendencia a metastatizar. Presenta una alta mortalidad a corto plazo, aunque existen estudios que describen supervivencias a cinco años del 30-66% con tratamiento adecuado (Culine, 1993).

Un estudio realizado por Berg sobre una amplia serie de pacientes con cáncer de mama, ha mostrado que la supervivencia en el carcinoma "in situ", independientemente del tipo histológico, es de casi el 100% a los 5 años. Según este estudio, el tipo histológico no es un factor pronóstico determinante para ser incluido en un protocolo de tratamiento. Sin embargo, de forma individualizada si puede ser útil en aquellas pacientes que desean conservar la mama, si se tiene en cuenta la tendencia a la multifocalidad o el riesgo de bilateralidad de alguno de los subtipos (Berg, 1995).

La evaluación del grado de actividad proliferativa, a nivel histopatológico, de las neoplasias mamarias se realiza mediante diversas metodologías. El clásico índice mitótico, aplicado desde hace décadas, es un parámetro directo de esta actividad. Se refiere a porcentajes, en relación con las células que no se

encuentran en división, por tanto, difiere del contaje mitótico que hace referencia a una determinada superficie sin tener en cuenta el número de células que ocupa el campo, por lo que tumores de baja celularidad pueden ser erróneamente evaluados como de bajo número de mitosis. La determinación de la síntesis de ADN también ha sido establecida como marcador de la actividad metabólica proliferativa, aunque su uso ha sido restringido en la práctica clínica por su dificultad técnica (Radvin, 1997). No obstante, en aquellos casos en que ha podido ser utilizada de forma experimental ha proporcionado información muy apreciable sobre la cinética de proliferación celular. La bromodesoxiuridina es un análogo a la pirimidina que es incorporado al ADN durante su síntesis. Debe suministrarse in vivo o incubarse in vitro con tejido fresco, para posteriormente ser analizada por métodos inmunohistoquímicos o por citometría de flujo tras haber sido biopsiado el tumor.

En las últimas décadas han hecho su aparición los antígenos de proliferación celular que actúan en determinadas fases del ciclo celular. El más utilizado y conocido es el Ki 67. Es un antígeno que se expresa en la fase M y en la parte final de la fase G2 y puede ser determinado con un anticuerpo monoclonal. Su aplicación ha sido estudiada extensamente por Brown y Gatter (Brown, 1990). Se correlaciona con el índice mitótico, tiene relación inversa con la positividad de RE, y se asocia a recurrencias tempranas.

El PCNA o antígeno nuclear de proliferación celular, fue descubierto accidentalmente al comparar dos patrones de electroforesis bidimensional en pacientes con lupus eritematoso. Reemplaza perfectamente al Ki 67 como marcador de células que se hallan en el ciclo proliferativo.

Las denominadas regiones de organización nuclear (NOR) son segmentos cromosómicos que codifican la síntesis de ADN ribosomal. El aumento en el número contable de Ag NORs puede deberse a distintas circunstancias, todas relacionadas con el grado de proliferación celular o la atipia nuclear. Existe una correlación directa entre el número contable de Ag NORs y la expresión del Ki 67, y el PCNA.

Por último, la citometría de flujo proporciona una excelente información acerca del contenido de ADN, la ploidía y la fracción de fase S en que se encuentra la actividad proliferativa del tumor. Pacientes con aneuploidia tienen peor pronóstico que aquellas con diploidía, con algunas controversias. Sin embargo, el conocimiento de la fase S da el patrón citológico, de tal forma que pacientes con una fracción proliferativa baja tienen mejor sobrevida libre de enfermedad que aquellas portadoras de una alta fase S. Asimismo se ha asociado una elevada fase S con una superexpresión del oncogen HER-2/Neu y con una pérdida del oncogen supresor p53 (Radvin, 1997)

4. Receptores hormonales.

En el conjunto de los nuevos indicadores de actividad biológica del carcinoma de mama, ocupan un lugar destacado el estado de los *receptores hormonales* para las dos hormonas esteroideas femeninas: estrógenos y progestágenos. El papel de los estrógenos en el cáncer de mama es bien conocido desde hace unas décadas y su conocimiento surgió del beneficio que proporcionó la castración quirúrgica en la evaluación de los cánceres avanzados.

La observación de que la exposición a los estrógenos se asocia con el desarrollo de cáncer de mama en modelos experimentales fue llevada a cabo por primera vez por Bittner (Henderson, 1980). Este autor postuló que las hormonas podían incrementar directamente la incidencia de neoplasia, es decir, actuar como carcinógenos.

Una considerable cantidad de datos epidemiológicos actuales sugieren que la duración de la exposición de la glándula mamaria al estrógeno, juntamente con otros factores dietéticos, genéticos y ambientales, es directamente proporcional al riesgo de cáncer de mama. Otra hipótesis postula que la exposición prolongada a los estrógenos endógenos (menarquia temprana y menopausia tardía) parecería incrementar el riesgo de cáncer de mama. Además, la exposición a los estrógenos se ha asociado con el desarrollo de adenocarcinoma vaginal, cáncer de endometrio y tumores del hígado.

Una hipótesis alternativa al papel de los estrógenos como "promotores" del proceso de carcinogénesis hormonal sugiere que los estrógenos también actuarían de forma directa para provocar lesiones celulares. Esta hipótesis se ha basado en los conocidos efectos carcinogénicos del dietilestilbestrol en las hijas de mujeres que tomaron esta sustancia. Se considera, pues, que los estrógenos esteroides actuarían como carcinógenos mediante diferentes transformaciones metabólicas. Tanto el ADN como las proteínas podrían ser los sustratos de estas lesiones. El estrógeno induce la síntesis de gran cantidad de enzimas que participan en la síntesis de ácidos nucleicos, entre ellas destaca la DNA polimerasa y el protooncogen c-myc. El receptor para la progesterona también es inducido por el estrógeno, a nivel del RNAm. Además, tanto los estrógenos como los antiestrógenos pueden alterar la síntesis y/o la secreción de diversas proteínas, entre ellas destaca los activadores del plasminógeno y otras

proteasas, que contribuirían a la progresión y al crecimiento tumoral, a través del proceso de degradación de la membrana basal. También es probable que estas proteasas ejerzan otras funciones adicionales, tales como facilitar la liberación de otros factores de crecimiento (Radvin, 1997).

Actualmente la determinación de los receptores de estrógenos y progesterona constituye un marcador de diferenciación importante. Corresponden a macromoléculas proteicas con capacidad específica de interacción química con las hormonas esteroideas, estrógenos y progesterona. Se trata de proteínas lábiles, potencialmente degradables por diversas proteasas, pero característicamente resistentes a las nucleasas (Sánchez, 1995).

Las hormonas esteroideas presentan un peso molecular relativamente bajo, y se considera que pueden penetrar en el citoplasma celular por simple difusión. Su función primordial consiste en inducir una transformación química de las proteínas receptoras, convirtiéndolas en funcionalmente activas para desencadenar una actividad biológica controlada y específica. El punto clave para la iniciación de esta actividad biológica se sitúa en zonas receptoras del ADN, que bajo la influencia del complejo hormona-receptor presenta reduplicación y determina un incremento de la síntesis de ARN-mensajero, el cual modula la síntesis de diversas proteínas específicas. Entre éstas destacan las proteínas que constituyen el receptor estrogénico y el de progesterona. La presencia de ésta última se ha considerado como indicador de la actividad funcional de los receptores estrogénicos. Otras proteínas también reguladas por la actividad de los receptores estrogénicos son la pS2 y la catepsina D (Sánchez, 1995).

La localización del complejo hormona-receptor es inicialmente citoplasmática con posterior translocación a nivel nuclear, para ejercer su acción sobre el ADN. Sin embargo, aunque se acepta que la síntesis de la proteína receptora ocurre en el citoplasma, numerosos estudios actuales sitúan la localización de este complejo en el núcleo.

Característicamente, los receptores de estrógenos y progesterona presentan sus células diana en células epiteliales de vagina, cérvix uterino, endometrio y trompas de Falopio, así como en el estroma específico del tracto genital femenino. Especialmente, en el endometrio su contenido cambia en relación con la fase del ciclo menstrual. En los tejidos de la glándula mamaria normal, las cantidades existentes de estos receptores son insignificantes. En principio se acepta que no estarían presentes en las células mioepiteliales y del estroma. En procesos no neoplásicos mamarios, y concretamente en aquellos en los que se desarrolla proliferación a nivel ductal o lobular, aumenta la presencia de receptores, en relación con el grado de proliferación epitelial, aunque en general no alcanza los niveles observados en los carcinomas mamarios. En las hiperplasias mamarias, pueden detectarse con una distribución relativamente homogénea.

Los carcinomas de mama pueden expresar estos receptores con gran variabilidad. No ha sido posible establecer una relación constante entre la positividad o negatividad y los parámetros más aceptados en la valoración de los carcinomas de mama, como la edad de presentación, el estado hormonal pre o postmenopáusico, el tamaño tumoral, el tipo y el grado histológicos, y el estado de los ganglios linfáticos axilares.

Se acepta que la positividad aumenta más en relación con la edad que con el estado pre o postmenopáusico. El tamaño tumoral y el tipo histológico aparecen en principio como dos parámetros independientes, aunque se admite que la negatividad parece aumentar con el tamaño y se ha descrito mayor positividad en los carcinomas lobulillares infiltrantes. Además, los grados histológicos más altos se correlacionan con mayor incidencia de negatividad, y no parece haber ningún tipo de correlación entre la presencia o ausencia de metástasis en ganglios linfáticos axilares y el estado de los receptores hormonales. Sin embargo, un dato interesante a tener en cuenta es la frecuente distribución homogénea de estos receptores dentro del mismo proceso neoplásico. En la práctica, hay dificultades para establecer la absoluta negatividad en un caso determinado, y cuando se detecta positividad no siempre es posible asegurar que es la máxima existente.

Inicialmente se planteó la posibilidad de que la determinación de receptores hormonales presentara su mayor significado en la predicción de la respuesta neoplásica a la terapéutica adyuvante antiestrogénica. Actualmente, se plantea la posibilidad de que puedan tener significado pronóstico en el cáncer de mama. Es necesario tener en cuenta que estos carcinomas presentan distintos patrones de positividad o negatividad de receptores de estrógenos y de progesterona. Aproximadamente un 41% de los casos son RE+RP+, un 17% RE+RP-, un 38% RE-RP-, y un 4% RE-RP+. Si a esto se añade que la positividad es variable en intensidad en los distintos casos, es difícil establecer qué patrón de receptores alcanza un mayor valor pronóstico.

Independientemente de las consideraciones expuestas, numerosas experiencias publicadas establecen que la positividad de estos receptores en el carcinoma de mama se asocia a un mayor intervalo libre de enfermedad y

posiblemente a una mayor supervivencia global (Hupperets, 1997). Además, aunque la positividad o negatividad parece carecer de relación con la existencia o no de metástasis en ganglios linfáticos axilares, se ha señalado que los casos positivos desarrollan con alta frecuencia metástasis en hueso y partes blandas, y los negativos a nivel visceral (Sánchez, 1995).

Dado que el estado de los receptores guarda escasa relación con otros indicadores pronósticos, se ha considerado la posibilidad de que tuvieran el valor de indicadores independientes. Incluso se han aportado datos que consideran la posibilidad de considerar la positividad para receptores de progesterona como un indicador pronóstico independiente, con mayor valor que los receptores estrogénicos a la hora de establecer predicciones sobre el intervalo libre de enfermedad (Bernoux, 1998).

5. Expresión de oncogenes.

Además de los factores hormonales existen componentes ambientales y genéticos relacionados con el cáncer de mama. Los oncogenes fueron originalmente identificados como genes que confieren un potencial transformador a virus tumorales de RNA (retrovirus). Posteriormente, se determinó que estos elementos representaban mutaciones de genes (protooncogenes) que habían sido transformados del ADN de las células huésped. Se piensa que los protooncogenes participan del control del crecimiento y desarrollo normal y que contribuyen al proceso de carcinogénesis cuando sufren una alteración de su función y/o su estructura, dando lugar a los oncogenes (3,30,41,49,50,99). Los

protooncogenes tienen importantes funciones en la mitosis, diferenciación y funcionamiento de las células normales, codificando la síntesis de numerosas proteínas que actúan como factores de crecimiento, receptores de hormonas, etc. (Valladares, 1992).

En las células glandulares mamarias funcionan los siguientes protooncogenes: c-abl., c-bcl, c-erbB-3, c-fms, c-fos, c-hst, c-int-2, c-int-3, c-lck, c-mos, c-myc, c-neu (c-erbB-2/HER-2), c-raf-1, c-Ha-ras-1, c-Ki-ras-2, c-sis. C-src, wnt-1 y Wnt-2. También se encuentran los genes supresores p53, Rbl, nm23-H1 y nm23-H2 (Valladares, 1992).

Los principales oncogenes implicados en la carcinogénesis mamaria son c-int-2, c-neu (c-erbB-2/HER-2), c-myc, c-Ha-ras, y el gen supresor Rb-1. A estos oncogenes se deben añadir int-1, irp y c-int-3, y los genes supresores p53, nm23-H1 y nm23-H2 (Ernberg, 1990).

Koester y col. estudiaron 60 muestras de cáncer de mama humano en relación con 25 proto-oncogenes. Estos autores hallaron una expresión aumentada de alguno de los oncogenes c-erbB, c-src, c-raf-1, c-lck, c-Ha-ras y c-neu en el 25-30% de los tumores analizados (Koester, 1991). De esta forma, se ha correlacionado la progresión tumoral en el cáncer de mama con la amplificación de estos oncogenes (Valladares, 1992).

A. Oncogenes c-myc.

Uno de los protooncogenes más ampliamente estudiados, de localización nuclear, es conocido como *c-myc*. Su expresión parece ser necesaria en el ciclo celular, de tal forma que es inducido por el tratamiento de fibroblastos latentes con factor de crecimiento inmediatamente antes del comienzo de la fase S, siendo considerado un complejo de replicación del DNA. Se ha demostrado que en el cáncer de mama el *c-myc* a menudo está reordenado y/o amplificado, y su RNA está sobreexpresado en tejidos tumorales cuando se les compara con lesiones hiperplásicas y tejidos normales de control. La amplificación de *c-myc* corresponde a los carcinomas mamarios con peor pronóstico clínico, ya que revela una mayor posibilidad de diseminación a distancia, mayor número de recurrencias y una menor supervivencia global, incluso en pacientes con ganglios axilares negativos (Guerin, 1988; Valladares, 1992).

B. Oncogenes c-ras.

La familia de oncogenes ras (V-ras-H, c-H-ras) parece estar implicada en incrementar la capacidad metastásica del tumor, a través de un aumento en la secreción de factor de crecimiento y en la capacidad de mutación genética. Mediante estudios con líneas celulares estrógeno-dependientes se ha demostrado que una sobreexpresión de estos oncogenes produce un aumento en la capacidad de invasión de la membrana basal, así como un aumento en la secreción de factores de crecimiento polipeptídicos, dando lugar a la transformación maligna experimental de las células mamarias (Chang, 1982, Valladares, 1992).

C. Oncogen c-neu.

C-Neu, que ha sido conocido anteriormente como c-erbB-2 y HER-2, codifica la proteína p155 c-neu (Padhy, 1982). El gen c-neu se localiza en la región cromosómica 17q11-q22, muy próximo al gen R-EGF(receptor del factor de crecimiento epidérmico). El EGF se encuentra sobreexpresado en tumores con receptores estrogénicos negativos, con alto grado de invasión. Actúa como receptor para el factor de crecimiento transformador α . Ha sido descrito como factor de sensibilidad hormonal del tumor, determinante de la respuesta a la terapia endocrina. El c-erb-B2 (neu o HER2) es estructuralmente similar al receptor para EGF (Bargmann, 1986).

Hay estudios que han demostrado que la amplificación del oncogen c-neu se correlaciona significativamente con la cantidad de ganglios linfáticos invadidos, y con la aparición de resistencia al tratamiento adyuvante (Radvin, 1997; Sjogren, 1998). No obstante, son necesarios nuevos estudios de validación de estos protooncogenes como factores pronósticos en el cáncer de mama.

6. Catepsina D, p53 y pS2.

A. Catepsina D.

La catepsina D es una enzima presente en todas las células eucariotas

(Ravdin, 1993). Se transforma en forma activa en los lisosomas, y presenta un pH óptimo ácido. Es sintetizada bajo forma de precursor de 52 kD. Dentro de la cascada de activación de las diferentes proteasas, la procatepsina es la única capaz de producir su activación dando lugar a las proteínas de 48, 34 y 14 kD que representan las formas activas de esta enzima.

En las células normales y las células cancerosas hormono-sensibles, la síntesis de catepsina D está regulada por los estrógenos (Fulco, 1998). Por contra, esta proteasa está producida en exceso de forma constante en los cánceres hormono-independientes.

Hay numerosas experiencias clínicas que relacionan la catepsina D con el fenómeno metastásico. La catepsina D y su proenzima presentan una actividad mitógena autocrina, de tal forma que pueden participar en la maduración de factores de crecimiento localizados en la superficie celular o bien en la matriz extracelular. Además, la actividad proteolítica de la catepsina D sobre los constituyentes de la matriz extracelular podría facilitar el proceso de invasión (Kute, 1998).

La primera hipótesis concerniente a la catepsina D y sus implicaciones clínicas, basada sobre el principio de hormono-inducción, implicaba a esta proteasa como posible marcador sérico de la hormono-dependencia de los cánceres de mama. Actualmente, se conoce el papel de esta enzima a nivel tisular, y se rechaza la hipótesis de marcador sérico. Se han descrito tasas elevadas de catepsina D en cáncer de mama en relación a tumores benignos (Foucre, 1991) y tejido mamario normal. Estas diferencias son igualmente halladas para las tasas de procatepsina D. Hay evidencias experimentales que

afirman que los niveles de catepsina D son independientes de la edad y del estado hormonal. Asimismo, se ha descrito una ausencia de relación con el tamaño tumoral y con el grado tumoral (Winstanley, 1993). En la actualidad, la asociación de los niveles de catepsina D con los receptores hormonales y con la invasión ganglionar es objeto de controversia. Los primeros estudios piloto realizados mostraron que la catepsina D era un marcador pronóstico para la mayoría de los cánceres de mama, aún más efectivo que la procatepsina D. Los resultados obtenidos indicaban que los niveles elevados de catepsina D se asocian a una supervivencia global más corta.

Hay autores que han observado una relación con significación estadística entre los niveles elevados de catepsina D y la resistencia al tratamiento adyuvante con quimioterapia en pacientes con ganglios positivos (Namer, 1991). En definitiva, son numerosos los estudios que afirman que los niveles altos de catepsina D constituyen un marcador de peor pronóstico con carácter independiente en el cáncer de mama (Fulco, 1998; Foeckens, 1999).

B. Oncoproteína p53.

La p53 es una fosfoproteína nuclear vinculada a la transformación de antígenos T en cultivos inducidos por virus. En condiciones normales, se comporta como un gen de supresión tumoral (antioncogen). Las mutaciones de este gen codifican una proteína p53 alterada, con significación pronóstica en el cáncer de mama. Numerosos estudios recientes muestran que las mutaciones génicas de p53 constituyen un marcador pronóstico independiente de recidiva temprana local en pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos

(Falette, 1998; Degeorges, 1998). Recientemente, Degeorges ha demostrado, tras un estudio que incluía a 282 pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos, una importante asociación significativa entre la p53 alterada con el grado histológico y el carcinoma ductal infiltrante. Sin embargo, no ha hallado relación entre las alteraciones génicas de p53 y otras variables como la edad, el tamaño tumoral y los receptores hormonales.

Otros autores (González-Palacios, 1997) han demostrado la existencia de una correlación inversa entre la expresión de p53 y la densidad vascular intratumoral, sugiriendo que en el carcinoma de mama invasivo la sobreexpresión del fenotipo p53 interviene en la modulación del proceso de neovascularización.

C. Proteína pS2.

La pS2 es una proteína específica de tipo celular cuya expresión está regulada por los estrógenos a través de los receptores estrogénicos. La expresión de pS2 en el carcinoma de mama es utilizada como indicador de la respuesta adyuvante con tamoxifeno (Fulco, 1998; Thompson, 1998). Se ha demostrado su inhibición por antiestrógenos en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (Motomura, 1997).

Además, es considerada como un factor de predicción de la recurrencia tumoral, aunque no de la supervivencia global. La combinación del estatus ganglionar con la expresión de pS2 es un indicador pronóstico importante en el carcinoma de mama, de tal forma que según Thompson aquellas pacientes con ganglios positivos y pS2 negativa presentan una mortalidad del 41% a los 6 años

de seguimiento, en comparación con aquellas pacientes con ganglios negativos y pS2 positivos en las que la supervivencia a los 6 años de seguimiento está próxima al 100% (Thompson, 1998).

Otros autores (Ardavanis, 1997) han mostrado recientemente que la positividad de pS2 en cánceres de mama está asociada con la presencia de positividad para receptores de progesterona, y este hecho es un marcador del funcionamiento de los receptores estrogénicos.

VI. OBJETIVOS.

El análisis pormenorizado de los estudios discutidos en la sección de Introducción de la presente memoria nos ha permitido destacar el interés mostrado por la comunidad científica sobre el papel que la neovascularización o angiogénesis tumoral pudiera tener en la evolución clínica de diversos tipos de neoplasias. Es especialmente relevante la atención prestada al proceso de angiogénesis en el cáncer de mama. De hecho, no es aventurado afirmar que parece estar demostrado que el crecimiento y la capacidad invasiva de los tumores mamarios está estrechamente relacionado con el fenómeno de desarrollo vascular intratumoral y la densidad vascular puesta de manifiesto en los estudios histológicos de la pieza tumoral.

Destaca, también, en la literatura científica el interés por el estudio en los tumores mamarios de la expresión del activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA), que pertenece al sistema de activación plasminógeno-plasmina y es liberado por las células tumorales en respuesta a múltiples estímulos. Se ha propuesto su interés en la caracterización biológica de los tumores, y la utilidad como marcador bioquímico e histológico de la angiogénesis tumoral.

El objetivo fundamental del presente trabajo ha sido estudiar una serie de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, incluidas en la casuística del Hospital Torrecárdenas de Almería durante un periodo de dos años, analizando variables de orden histológico, bioquímico y clínico, tratando de encontrar asociaciones que permitan la caracterización de los tumores y la agrupación de las pacientes en grupos de riesgo de recidiva y/o metástasis similar.

De forma concreta los objetivos propuestos en este trabajo son:

1.- Analizar las características histológicas de la serie de tumores incluidos en el estudio, prestando especial atención a la densidad vascular intratumoral y tratando de definir patrones de distribución de los microvasos que permitan clasificar los tumores de acuerdo a esta característica.

2.- Determinar en el extracto proteico soluble del tejido tumoral -citosol- marcadores de hormonodependencia, de invasividad tumoral y de crecimiento vascular, que permitan tipificar los tumores y definir grupos de relativa homogeneidad. Especial atención se prestará a la expresión del activador del plasminógeno tipo urokinasa.

3.- Correlacionar los factores histológicos, los hallazgos bioquímicos y las características de presentación de la enfermedad -edad, estado hormonal, tamaño tumoral, grado de extensión....- en orden a definir asociaciones con posible utilidad para predecir el riesgo de recidiva y/o metástasis tumoral.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

De forma concreta los objetivos propuestos en este trabajo son:

1.- Analizar las características histológicas de la serie de tumores incluidos en el estudio, prestando especial atención a la densidad vascular intratumoral y tratando de definir patrones de distribución de los microvasos que permitan clasificar los tumores de acuerdo a esta característica.

2.- Determinar en el extracto proteico soluble del tejido tumoral -citosol- marcadores de hormonodependencia, de invasividad tumoral y de crecimiento vascular, que permitan tipificar los tumores y definir grupos de relativa homogeneidad. Especial atención se prestará a la expresión del activador del plasminógeno tipo urokinasa.

3.- Correlacionar los factores histológicos, los hallazgos bioquímicos y las características de presentación de la enfermedad -edad, estado hormonal, tamaño tumoral, grado de extensión....- en orden a definir asociaciones con posible utilidad para predecir el riesgo de recidiva y/o metástasis tumoral.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.

I. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE CLÍNICA.

El estudio realizado consta de un total de 52 mujeres diagnosticadas y tratadas de cáncer de mama en el Hospital Torrecárdenas de Almería durante el periodo comprendido entre abril de 1996 y abril de 1998. Esta serie clínica forma parte de otra de mayor tamaño, base de un estudio de factores etiológicos en cáncer de mama, en el que se analizan entre otros factores la importancia de la exposición humana a compuestos químicos con actividad hormonal y el riesgo de padecer cáncer de mama (Proyecto FIS 95/1959). La muestra no incluye las neoplasias de mama en mujeres de menos de 30 años por constituir éste un criterio de exclusión para el trabajo de la beca FIS, aunque esta anotación no es representativa debido al poco número de pacientes de esta edad con cáncer de mama en nuestro hospital durante este periodo (2 pacientes).

Los datos descriptivos de la serie clínica se representan en la tabla 1.

Tabla1. Serie clínica.

EDAD	<i>N</i>	<i>Rango</i>	<i>Media</i>
	52	30-71 años	55,98 años
STATUS HORMONAL	<i>N</i>	<i>Premenopáusica</i>	<i>Postmenopáusica</i>
	52	19	33
TRATAMIENTO QUIRÚRGICO	<i>N</i>	<i>MRM + VA</i>	<i>CONSERVADOR</i>
	52	34 Madden y 2 Patey	16

MRM: Mastectomía radical modificada.

VA: Vaciamiento axilar.

El tratamiento quirúrgico se ha realizado siguiendo el protocolo de tratamiento previamente definido y estandarizado en nuestro hospital. Este protocolo se expone a continuación.

1. Tratamiento locorregional.

A. Carcinomas infiltrantes.

Las opciones terapéuticas en estos tipos de carcinomas se basan en los factores que componen la clasificación TNM clínica, sistema adoptado tanto por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) como por The American Joint Committee on Cancer Staging:

- Tratamiento conservador.
- Mastectomía radical modificada.

Ambas se acompañan de vaciamiento axilar.

Tratamiento conservador.

Presenta las *indicaciones* siguientes :

Dependientes del tumor.

- Tamaño tumoral menor de 3 cm.
- Axila clínicamente negativa.
- Extensión no superior a 1/5 del tamaño de la mama.

Probablemente el mejor criterio consiste en la valoración de la relación tamaño tumoral/tamaño de la mama.

Dependientes de la paciente.

- Deseo de conservar la mama.
- Nivel de conciencia y social adecuado para acudir con periodicidad a las revisiones y continuar tratamiento coadyuvante.

Contraindicaciones del tratamiento conservador:

Absolutas:

- Tumor mayor de 3 cm, o menor que ocupa más de 1/5 del tamaño de la mama.
- Axilla con ganglios palpables y supuestamente afectados.
- Tumores retroareolares o centrales.
- Tumores multicéntricos.

Relativas:

- Tumores de alto grado histológico, alto componente intraductal o del tipo comedociano.
- Existencia de otras neoplasias (en fase de tratamiento).
- Antecedente personal o familiar (de importancia) de cáncer de mama.
- Otras enfermedades de interés de la paciente, que impidan una correcta radioterapia.
- Mamas displásicas: muy fibrosas, hiperplásicas o con adenosis.

-Mujer embarazada.

Pauta quirúrgica en el tratamiento conservador:

-Anestesia general.

-Tumorectomía / Cuadrantectomía. Extirpación completa del tumor con margen de seguridad entre 1 y 2 cm.

-Identificación de márgenes tumorales.

-Estudio Anatomopatológico de la pieza extirpada. Nos interesa confirmar el diagnóstico y valorar el tamaño del tumor, infiltración microscópica de los bordes de resección, grado histológico y componente intraductal, así como la estirpe histológica - lobulillar, ductal, "in situ".

-Linfadenectomía axilar completa. Exéresis del paquete axilar graso y de todas sus adenopatías (niveles de Berg). Identificamos los tres niveles ganglionares:

-Nivel I .- Grupo de ganglios linfáticos externo (axilar).

-Nivel II.- Grupo de ganglios linfáticos central.

-Nivel III.- Grupo de ganglios linfáticos apical (supraclavicular).

Consideramos que la extirpación es incompleta cuando el número de ganglios resecaados es inferior a 10.

-La radioterapia es obligada en todos los casos en los que se realiza este tratamiento.

Mastectomía radical modificada (MRM).

Se realiza cuando está contraindicado el tratamiento conservador :

- Tumor mayor de 3 cm.
- Tumor desproporcionado al tamaño de la mama, retroareolar o múltiple.
- Axila positiva (N1, N2)
- Tumor de crecimiento rápido, alto grado histológico o componente intraductal.
- Preferencia de la paciente.
- Contraindicaciones médicas.
- Calidad / accesibilidad de la radioterapia.
- Casos especiales: enfermedad de Paget, embarazo, mama inflamatoria, tratamiento conservador previo.

La mastectomía radical modificada presenta dos modalidades, tipo Madden o tipo Patey. Predomina la MRM tipo Madden frente al tipo Patey en nuestra serie clínica. (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamiento quirúrgico: MRM.

	N	Porcentaje
MRM Madden	34	94,4 %
MRM Patey	2	5,6 %

La mastectomía radical modificada consiste en la extirpación completa de la mama, de la piel suprayacente al tumor con un margen de seguridad de 3 a 5 cm, y de los linfáticos axilares. La disección Patey consiste

en una mastectomía radical modificada con resección del músculo pectoral menor, que permite un mejor acceso a los ganglios linfáticos del nivel III, a diferencia de la disección tipo Madden que conserva el músculo pectoral menor.

B. Casos especiales.

Estadio IIIA.

La actitud en estos casos será:

- Mastectomía radical modificada.
- Quimioterapia posterior

Carcinoma ductal in situ.

Tradicionalmente la mastectomía ha demostrado índices de curación del 99%. En la actualidad, la opción recomendable es el tratamiento conservador, considerando siempre la extensión del tumor, el subtipo histológico y una excisión adecuada.

Carcinoma lobulillar in situ.

El tratamiento estándar para estas pacientes es el seguimiento cuidadoso, mientras que la mastectomía total puede considerarse bajo circunstancias especiales.

Embarazo y cáncer de mama.

El tratamiento se realizará en función de las características clínicas del tumor, debiendo interrumpir el embarazo en caso de quimioterapia u hormonoterapia.

Enfermedad de Paget.

Distinguimos dos situaciones:

- Tumor no palpable: mastectomía simple.
- Tumor palpable: actitud según las características clínicas del tumor

Carcinoma inflamatorio.

Su diagnóstico precisa una biopsia de mama que incluya piel. El tratamiento inicial consiste en quimioterapia sistémica.

2. Tratamiento sistémico.

El protocolo de tratamiento adyuvante sistémico se expone a continuación.

Tabla 3. Pacientes con ganglios negativos.

RIESGO	PREMENOPÁUSICA	POSTMENOPÁUSICA
Bajo	No tratamiento	No tratamiento
Intermedio	Tamoxifeno	Tamoxifeno
Alto (receptores -)	Quimioterapia	Quimioterapia
Alto (receptores +)	QTP / TMX	TMX / QTP

QTP: Quimioterapia.

TMX: Tamoxifeno.

Riesgo bajo:

- Carcinoma in situ o microinfiltrante.
- Tumor menor de 1 cm.
- Tumores tubulares, coloides o papilares.

Riesgo intermedio:

- Tumor entre 1-2 cm con RE + y grado nuclear I-II.

Riesgo alto:

- Tumores mayores de 1 cm con RE -.
- Tumores de grado nuclear III.

Tabla 4. Pacientes con ganglios positivos.

	PREMENOPAUSIA	POSTMENOPAUSIA
RE- RP-	QTP	QTP + TMX
RE+RP+	QTP + TMX	TMX

QTP: Quimioterapia.

TMX: Tamoxifeno.

II. DATOS HISTOLÓGICOS EVALUADOS.

La pieza quirúrgica es derivada al servicio de Anatomía Patológica, donde se realiza el estudio anatomopatológico adecuado de acuerdo con el protocolo para cáncer de mama definido en nuestro hospital. Además, de forma extraordinaria se ha determinado la densidad vascular intratumoral de todos los carcinomas que componen la serie clínica estudiada, con objeto de responder a los objetivos planteados en este trabajo.

1. Estudio anatomopatológico definitivo de la pieza quirúrgica.

Como ya se ha comentado está basado en el protocolo del servicio de anatomía patológica para el cáncer de mama. Consta de los siguientes puntos:

1. Datos de filiación de la paciente.

2. Referencias de citologías previas o cualquier otro estudio anatomopatológico realizado previamente.

3. Referencia del estudio actual.

4. Estudio macroscópico:

4.1 *lateralidad*: derecha o izquierda.

4.2 *tamaño* de la pieza quirúrgica.

4.3 *alteraciones del pezón*: sin alteraciones, ulcerado, edematoso, retraído, eczematoso.

4.4 *alteraciones de la piel*: sin alteraciones, piel de naranja,

edema, ulceraciones.

4.5 tumor:

-localización: cuadrante, zona intercuadrantes, subareolar, cola axilar.

-tamaño.

-tipo: estrellado o circunscrito.

-multicentricidad: si o no.

4.6 *bordes quirúrgicos*: se especifica si están libres o infiltrados, y la distancia de tejido sano con respecto al tumor.

4.7 *otra patología macroscópica mamaria coexistente* con el tumor principal.

4.7 *Ganglios linfáticos*: si los diferentes niveles ganglionares son aislados quirúrgicamente, se especifica el número en cada nivel y su aspecto macroscópico tumoral o no. El nivel III se remite aislado e identificado.

5. Estudio microscópico:

5.1 *Tipo y subtipo de carcinoma*:

- carcinoma ductal in situ.
- carcinoma lobulillar in situ.
- carcinoma ductal infiltrante.
- carcinoma lobulillar o lobular infiltrante.

5.2 Grado histológico.

Se basa en la valoración de tres parámetros histológicos: formación de túbulos, atipia nuclear e índice mitótico, y el cómputo total de los mismos de la siguiente forma:

- formación de túbulos:

- más del 75% de túbulos en el tumor: *escore 1.*
- entre 50 y 75%: *escore 2.*
- menos del 50%: *escore 3.*

- grado nuclear:

- *escasa variación en el tamaño y forma de los núcleos: escore 1.*
- *presencia de pleomorfismo moderado: escore 2.*
- *marcada variación en el tamaño y forma de los núcleos: escore 3.*

- índice mitótico:

- *< de 10 mitosis por 10 campos de 40 aumentos: escore 1.*
- *entre 10 y 20 mitosis por 10 campos de 40 aumentos: escore 2.*
- *> de 20 mitosis por 10 campos de 40 aumentos: escore 3.*

El grado histológico resulta de la suma de los escores:

- GRADO I (*BIEN DIFERENCIADO*): suma de escore 3-5.
- GRADO II (*MODERADAMENTE DIFERENCIADO*): suma de escore 6-7.
- GRADO III (*POBREMENTE DIFERENCIADO*): suma de escore 8-9.

5.3 Otros aspectos microscópicos:

- necrosis tumoral: ausente, mínima, extensa.
- calcificación: ausente, mínima, extensa.
- invasión tumoral perineural y/o vascular: presente o ausente.
- componente in situ: se refiere al componente intraductal o intralobular que puede coexistir con el componente infiltrante del tumor. Se especifica la extensión que ocupa en el tumor, fundamentalmente si supone más o menos de 25% del mismo, el subtipo histológico, y la extensión que ocupa en el seno del tumor.
- lesiones asociadas o coexistentes en la mama no tumoral, pezón, piel o axila.

6. Estudio de los ganglios axilares:

6.1 *Número total de ganglios examinados.*

6.2 *Número de ganglios metastatizados.*

6.3 De los ganglios metastatizados *cuántos son micrometástasis (<2mm) y cuántos macrometástasis.*

6.4 *Reacción en los ganglios libres de metástasis: ninguna, histiocitosis sinusal, hiperplasia linfoide folicular, involución grasa.*

7. DIAGNOSTICO:

7.1 *Resumen de diagnóstico morfológico.*

7.2 *Resumen diagnóstico de los marcadores tumorales (referido a si la vía de crecimiento tumoral es hormonal o través de oncogenes, y si los resultados indican buen o mal pronóstico).*

7.3 *Estadaje TNM postquirúrgico: está basado en la valoración del tamaño tumoral (T), el estado de los ganglios linfáticos (N) y la existencia o no de metástasis a distancia (M). Se emplea la clasificación propuesta por la A.J.C. (American Joint Commitee, 1989), que clasifica cada caso en **cuatro estadios (I, II, III y IV).***

T. Tumor primario.

Tx El tumor no puede ser evaluado.

T0 No evidencia de tumor primario.

Tis Carcinoma in situ: intraductal, lobulillar o enfermedad de Paget del pezón sin tumor

Nota: La enfermedad de Paget con tumor es clasificada de acuerdo con el tamaño del tumor.

T1 Tumor de 2cm o menor en su mayor dimensión.

T1a 0,5 cm o menor en su mayor dimensión.

T1b Más de 0,5 cm pero menos de 1 cm de dimensión mayor.

T1c Más de 1 cm pero no más de 2 cm en su mayor dimensión.

T2 Tumor de más de 2 cm pero no más de 5 cm de dimensión mayor.

T3 Tumor de más de 5 cm de dimensión mayor.

T4 Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica o a piel.

T4a Extensión a pared torácica.

T4b Edema (incluyendo piel de naranja), o ulceración de la piel de la mama, o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama.

T4c T4a y T4b a la vez.

T4d Carcinoma inflamatorio.

N. Ganglios linfáticos regionales.

NX Los ganglios regionales no pueden ser valorados.

N0 No existencia de metástasis linfática regional.

N1 Metástasis a ganglio(s) axilar(es) ipsilateral(es) móvil(es).

N2 Metástasis a ganglio(s) axilar(es) ipsilateral(es) fijo(s) entre sí o a otras estructuras.

N3 Metástasis a ganglio(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es).

M. Metástasis a distancia.

MX La presencia de metástasis a distancia no puede ser evaluada.

M0 No metástasis a distancia.

M1 Metástasis a distancia (incluyendo metástasis a ganglios supraclaviculares).

GRUPOS DE ESTADIAJE.

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1.N2	M0
Estadio IIIB	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

GRUPOS DE ESTADIAJE.

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Estadio IIIB	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

2. Determinación de la densidad vascular intratumoral.

A. Proceso de inmunotinción de las muestras tumorales.

Tratamiento de las muestras.

Se ha realizado en la procesadora Autotechnicon Mono Mod 2A durante un periodo de 12 horas hasta conseguir la deshidratación de los tejidos. Este proceso consta de los siguientes pasos:

1º. Inclusión de la muestra en una solución de formol al 10% durante 2 horas.

2º. Deshidratación de la muestra tras la inclusión en tres soluciones crecientes de alcohol:

- alcohol de 70º durante 2 horas.
- alcohol de 96º durante 2 horas.
- alcohol absoluto durante 2 horas.

3º. Inclusión de la muestra en xilol durante 3 horas.

4º. Inmersión de la muestra en parafina líquida a 60º durante 2 horas.

Tras este procesado, la muestra se incluye en el dispensador de parafina líquida y posteriormente se realiza su montaje sobre un bloque de tissue-teck2.

A continuación se procede a efectuar secciones de la muestra tumoral en el microtomo Leica RM-2035, e inmediatamente se incluyen en una solución de agua con gelatina. Para conseguir la licuefacción de la gelatina se coloca la muestra en un porta y se introduce en una estufa a 70-80º durante un periodo de 15 minutos.

El paso siguiente consiste en la inmersión de la muestra en un tanque con xilol, para finalmente completar el proceso de hidratación con soluciones decrecientes de alcohol, de la siguiente forma:

- alcohol absoluto durante 10 minutos.
- alcohol 96° durante 10 minutos.
- alcohol de 80° durante 5 minutos.
- alcohol de 70° durante 5 minutos.

La hidratación de la muestra se completa finalmente tras su inmersión en agua.

Inmunotinción (Método de la estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina).

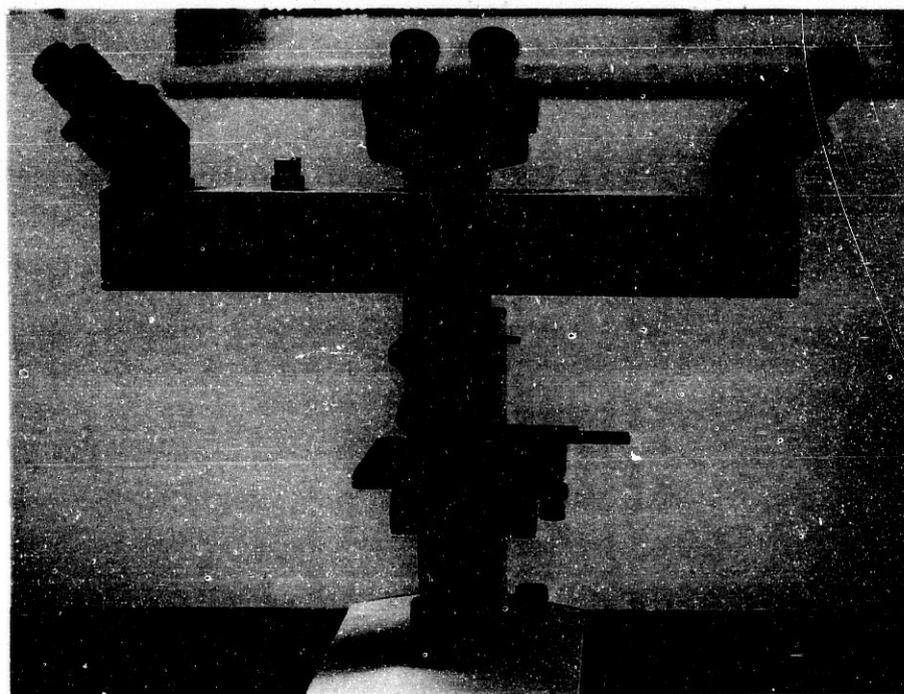
Una vez preparada la muestra, se procede a su tinción usando el anticuerpo policlonal factor VIII. Este anticuerpo se utiliza para la localización específica del antígeno relacionado con el factor VIII. Han sido identificados al menos tres componentes del factor VIII: factor VIII con actividad procoagulante, antígeno relacionado con el factor VIII y el componente de Von Willebrand (Grainick, 1977; Hoyer, 1981). El antígeno relacionado con el factor VIII es uno de los marcadores inmunohistoquímicos más utilizados para la identificación de las células endoteliales. Este antígeno también ha sido identificado en plaquetas y en megacariocitos (Hoyer, 1981).

El procedimiento general para la inmunotinción consta de los siguientes pasos:

1° Cubrir totalmente el corte con Ultrabloqueante (Reactivo A), e incubar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

B. Recuento de microvasos.

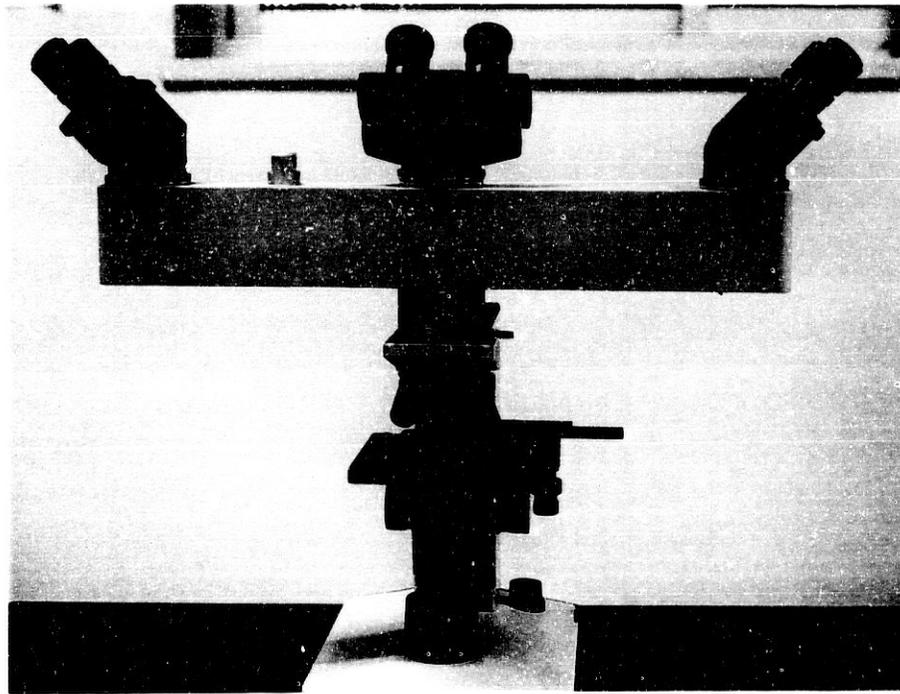
Una vez presentadas las muestras en una extensión de porta y teñidas con factor VIII, se procede al recuento de microvasos bajo el microscopio óptico con el objetivo de 40 aumentos (Microscopio Leitz Laborlux 11).



Microscopio Leitz Laborlux 11.

B. Recuento de microvasos.

Una vez presentadas las muestras en una extensión de porta y teñidas con factor VIII, se procede al recuento de microvasos bajo el microscopio óptico con el objetivo de 40 aumentos (Microscopio Leitz Laborlux 11).



Microscopio Leitz Laborlux 11.

El recuento vascular se ha realizado siguiendo las recomendaciones publicadas por Gasparini (Gasparini, 1995) sobre la medición de la densidad vascular intratumoral:

- Se ha usado un marcador endotelial adecuado (factor VIII).
- Se han elegido las áreas más vascularizadas a pequeño aumento, evitando las áreas de necrosis.
- Se ha considerado como vaso toda estructura teñida con el marcador, aunque no tenga luz (contabilizar como vasos los cordones sólidos).
- Se ha realizado el recuento en campos de 0,74mm² como mínimo. Se han medido 10 campos empleando un objetivo de 40 aumentos para seleccionar aquellas áreas donde la vascularización es más intensa, que suelen corresponder a los márgenes del carcinoma donde el componente estromal es mayor. Los microvasos aparecen teñidos de rojo intenso, formando cordones sólidos o bien presentan luz con hematíes en su interior.
- El recuento se ha realizado en todos los casos por dos investigadores de forma simultánea.

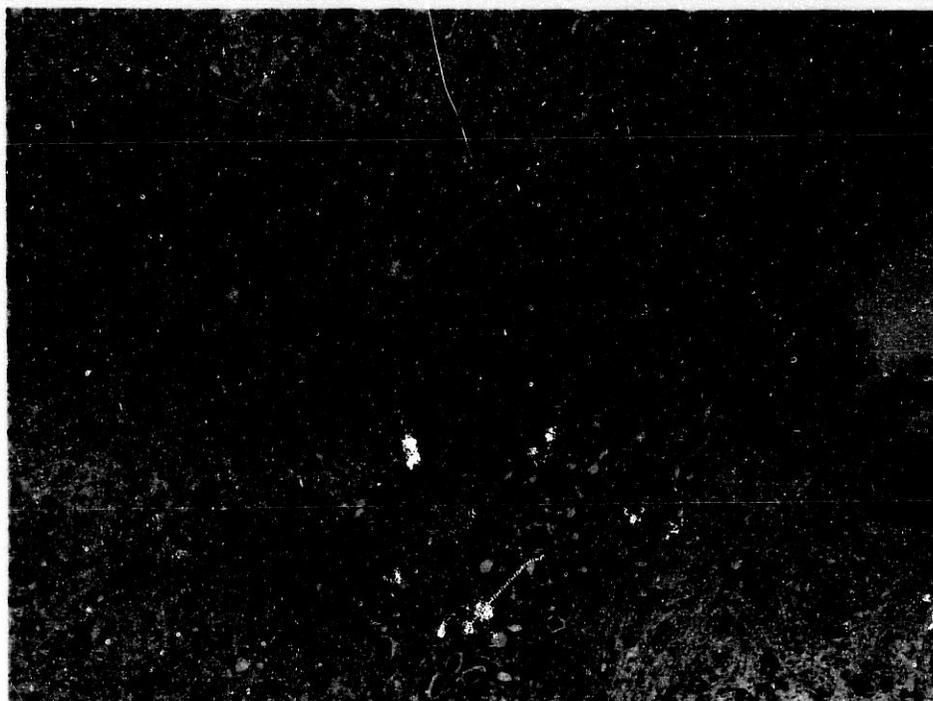


Foto 1. Área de mayor vascularización intratumoral a pequeño aumento (x20).

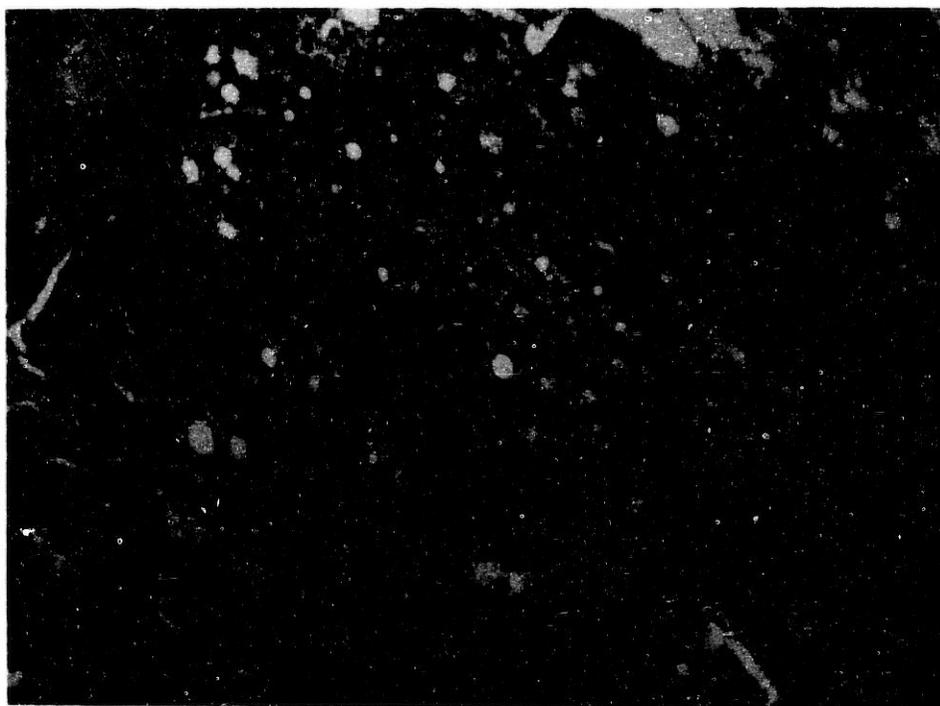


Foto 2. Área de necrosis estromal intratumoral.

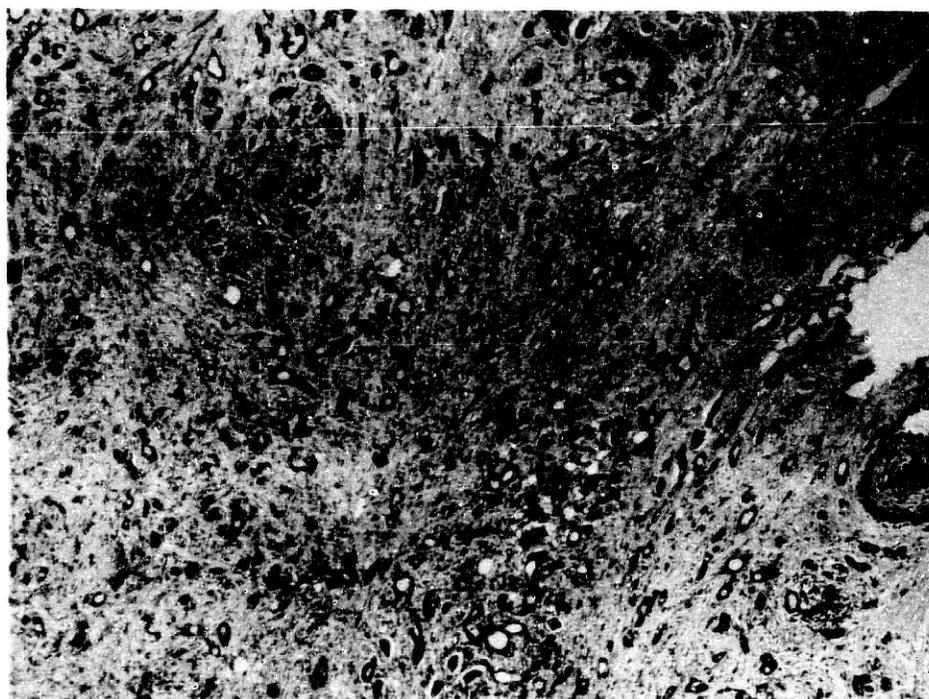


Foto 1. Área de mayor vascularización intratumoral a pequeño aumento (x20).

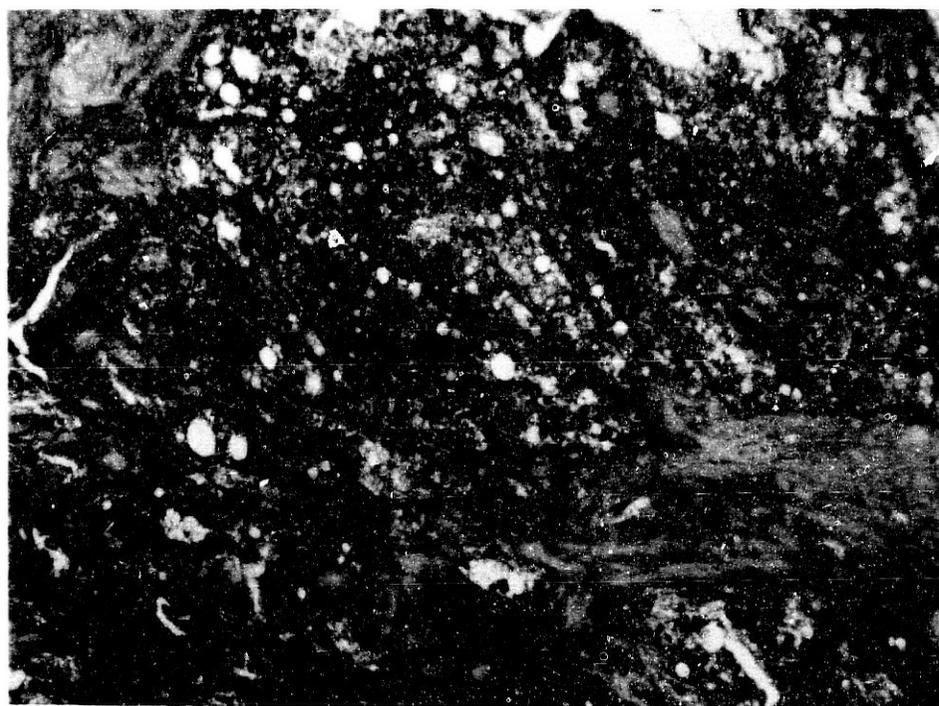


Foto 2. Área de necrosis estromal intratumoral.



Foto 3. Área de mayor vascularización a mayor aumento ($\times 40$).

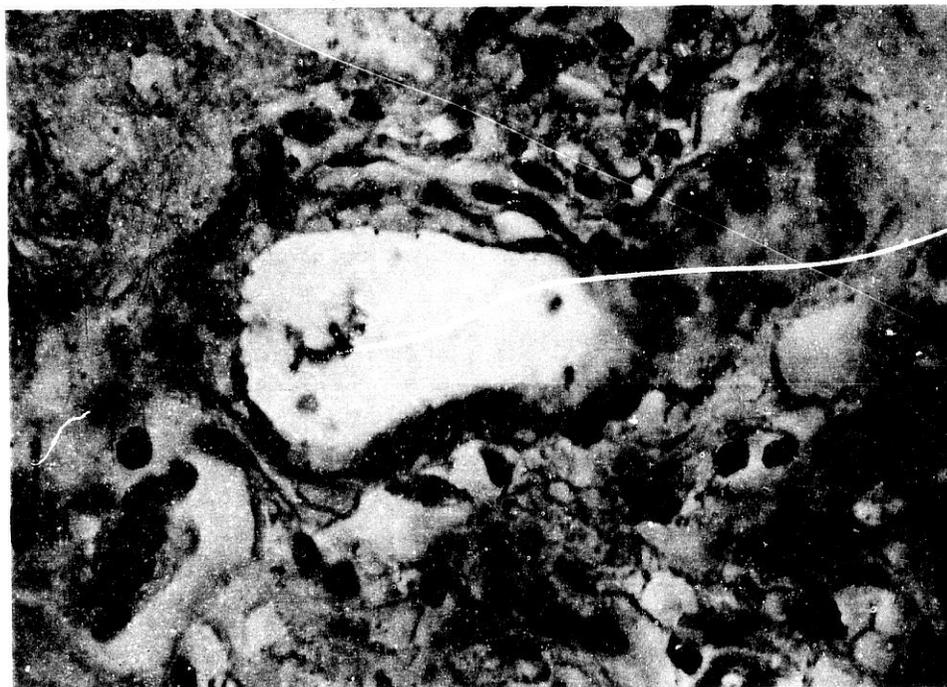


Foto 4. Imagen de un microvaso donde se pueden observar las células endoteliales, que componen la pared vascular, teñidas con factor VIII y hematíes en el interior de su luz.

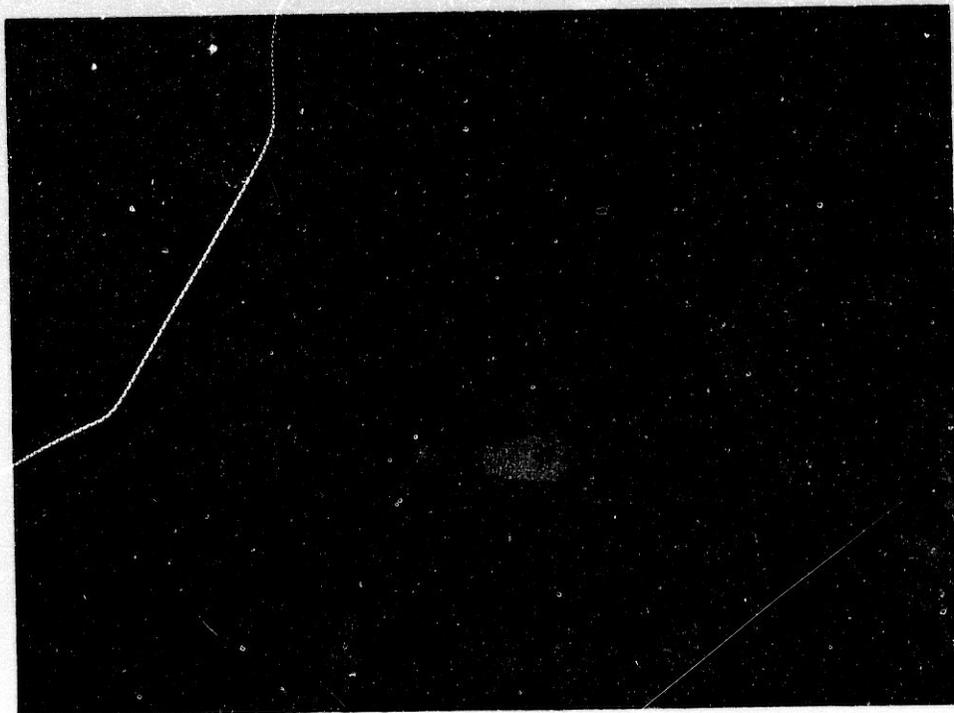


Foto 3. Área de mayor vascularización a mayor aumento ($\times 40$).



Foto 4. Imagen de un microvaso donde se pueden observar las células endoteliales, que componen la pared vascular, teñidas con factor VIII y hematíes en el interior de su luz.

III. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

1. Obtención de la fracción soluble del citoplasma de las células tumorales: citosol tumoral.

A. Obtención del tejido tumoral.

La pieza quirúrgica extirpada es enviada al servicio de anatomía patológica de nuestro hospital, donde el patólogo tras identificar el área tumoral extrae una muestra de aproximadamente 0,5×0,5 cm que inmediatamente se congela a -70°C. Posteriormente, estas muestras fueron enviadas al Departamento de Investigaciones Clínicas del hospital Clínico de Granada para su análisis bioquímico.

B. Preparación del citosol.

Para la obtención de la fracción soluble de proteínas citoplásmicas se procedió a la homogeneización de los tejidos mediante pulverizado tras su congelación en nitrógeno líquido. El proceso de homogeneización se llevó a cabo con la ayuda de un Potter de vidrio/teflón a un ritmo de 10 golpes de 300 rpm, en baño de hielo.

El homogeneizado se centrifugó posteriormente en una ultracentrífuga Beckman LS-70.000 a 105.000 g, 4 °C, durante 60 minutos en alto vacío, y la fracción sobrenadante se diluyó en la forma apropiada para obtener una concentración final de 2-3 mg/ml de proteína.

La cuantificación de proteínas se ha hecho siguiendo la metodología de

Bio-Rad Protein Assay (método Bradford modificado). Este método se expone a continuación.

Principio:

Es un método colorimétrico basado en las modificaciones que sufre el valor de la absorvancia máxima del Azul Coomassie Brillante (Sigrna) cuando tiene lugar su unión a proteínas. En tales casos existe un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorvancia que pasa de 465 a 595 nm.

Reactivos.

1.- Disolución concentrada del colorante: obtenida comercialmente de Bio-Rad. El colorante Azul Coomassie Brillante se suministra en disolución acuosa que contiene ácido fosfórico y metanol.

2.- Solución estándar de albúmina bovina: a partir de una solución inicial 1,4 mg/ml de albúmina bovina se construye una curva estándar de 5 puntos de concentración, comprendida entre 14 y 100 μ gr/ ml.

Modo operacional.

1.- Dilución 1/10 y filtración del reactivo Bio-Rad.

2.- Sobre alícuotas de 10, 15 y 50 μ l de citosol y sobre cada uno de los puntos de la curva estándar se añaden 5 ml de reactivo de Bio-Rad diluido. Las soluciones obtenidas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3.- Lectura espectro-fotométrica de estándares y muestras a 595 nm.

4.- Representación gráfica de los valores de absorvancia de la curva estándar frente a sus concentraciones. Por extrapolación (ley de Lamber-Beer), se obtienen valores de concentración proteica en mg/ml de las soluciones del problema.

2. Cuantificaciones de los receptores de estrógenos y progesterona.

A. Principio.

Se trata de un inmunoensayo enzimático de fase sólida basado en un principio de sandwich (ABBOTT ER-EIA y PgR-EIA Monoclonal). Dispone de unas esferas o bolitas de plástico sobre las que se ha fijado un anticuerpo monoclonal de rata frente al receptor hormonal. Además, se dispone de ese mismo anticuerpo no fijado en fase sólida sino unido a un sistema enzimático de peroxidasa capaz de actuar sobre un sustrato de peróxido de hidrógeno y fenilendiamina x 2 CLH.

B. Técnica.

Las esferas recubiertas con el anticuerpo monoclonal frente al receptor hormonal se incuban con el citosol durante 18 horas. El exceso de receptor no ligado se elimina mediante lavado. A continuación se añade nuevo anticuerpo anti-receptor ligado a peroxidasa de rábano picante que reconocerá al receptor retenido sobre el primer anticuerpo. Por último, se incuban las esferas con un sustrato enzimático con el que se desarrolla un color que es susceptible de ser medido en un colorímetro a 492 nm. La intensidad de color es proporcional a la

concentración del receptor hormonal.

C. Cálculo de los resultados.

Para el cálculo de los resultados, se construye de forma paralela una curva estándar con concentraciones conocidas de receptor hormonal, sobre la que se leen los valores de densidad óptica para su transformación en concentración de receptores.

Expresión de los resultados.

En todos los casos, la cuantificación de las tasas de receptores de estrógenos y progestágenos se ha expresado en fentomoles (10^{-15} moles) por mg de proteína del citosol.

Los límites de positividad que se han indicado en los informes rutinarios para los receptores de estrógenos y progesterona son de 15 fmol/mg de proteína citosólica.

Control de calidad.

Desde 1984, el Departamento de Investigaciones Médicas del Hospital Clínico de Granada participa regularmente en un programa de control de calidad para la cuantificación de receptores de estrógenos y progesterona. El programa está centralizado en la Universidad de Nimega en Holanda y corresponde al EORTC Receptor Study Group establecido en 1980 (Koenders, 1983).

Con periodicidad semestral se han recibido muestras conteniendo RE o RP recombinantes, citosoles liofilizados de tumores humanos o de tejido uterino de vaca que tienen una concentración desconocida de receptores hormonales y de proteína. Los ensayos habituales de receptores se realizan de forma rutinaria, y en un periodo de tiempo prefijado se remiten los datos analíticos al centro colector de Holanda.

Pasadas unas semanas, se recibe información sobre la posición de nuestros valores respecto a la media de valores del resto de las Instituciones y Laboratorios participantes. En función de la concentración proteínica estimada por cada laboratorio para cada muestra se aplica, por último, un factor de corrección pertinente.

3. Cuantificación de pS2.

A. Principio.

Para la determinación cuantitativa de pS2 se ha utilizado una técnica radioinmunológica (técnica "sandwich" sobre fase sólida) que emplea un anticuerpo frente a la proteína pS2 fijado en fase sólida a las paredes del tubo en el que se realiza el ensayo. Se emplea, además, otro segundo anticuerpo marcado con ^{125}I (utilizado como trazador), quedando la proteína atrapada entre los dos anticuerpos (ELSA-pS2, CIS bio international, Francia).

B. Técnica.

La medición se efectúa sobre la dilución de citosol (los citosoles se diluyen 1/40 antes del ensayo). Los citosoles se preparan según la técnica habitual utilizada para la determinación de los receptores de estrógenos y progesterona.

Se recomienda que la concentración de proteínas en el citosol oscile entre 1 y 2 mg/ml, antes de realizar el ensayo.

Todos los reactivos deben de estar al menos 30 minutos antes de su utilización a temperatura ambiente (18-25°C). Los estándares y los controles deben estar reconstituidos 15 minutos antes de su utilización. La dispensación de los reactivos sobre los tubos ELSA (tubos que contienen el otro anticuerpo frente a pS2 pegado sobre las paredes del tubo) debe efectuarse a temperatura ambiente (18-25°C).

Los ensayos se han realizado por triplicado para los estándares y por duplicado en cada muestra a cuantificar.

En la adición de los reactivos se ha seguido el siguiente orden:

1) Se dispensan 200 μ l de anticuerpo monoclonal anti-pS2 marcado con 125 I tubo de ELSA.

2) A continuación, se dispensan 200 μ l de los estándares de la curva patrón o de los citosoles a estudiar en cada tubo.

3) Se agita suavemente cada tubo en un agitador tipo Vortex.

4) Se procede a la incubación durante 1 hora +/- 5 minutos a temperatura ambiente (18-25° C), a la vez que se somete a agitación.

Posteriormente, se procede al lavado y aspiración de los tubos ELSA de la siguiente forma:

i) se aspira el contenido de cada tubo; ii) se añaden 3 ml de agua destilada en cada tubo; iii) a continuación se procede a su aspiración situando el dispositivo de aspiración en el fondo del tubo ELSA (esta operación se repite dos veces más).

Finalmente, se mide cada tubo en un contador gamma calibrado para la medición de 125 I durante 1 minuto.

C. Expresión de los resultados.

La lectura efectuada sobre la curva estándar permite el cálculo de la concentración de pS2 que se expresa en ng/mg de proteína citosólica.

4. Cuantificación de Catepsina D.

A. Principio.

El procedimiento de cuantificación de catepsina D utilizado es similar al descrito para pS2. Se trata de una técnica radioinmunológica (técnica "sandwich" sobre fase sólida) que emplea un anticuerpo frente a la proteína catepsina D fijada en fase sólida a las paredes del tubo en el que se realiza el ensayo. Además, se dispone de otro anticuerpo frente a catepsina D que está marcado con ^{125}I (utilizado como trazador). La catepsina queda atrapada entre ambos anticuerpos monoclonales (ELSA-CATH-D TM, CIS bio international, Francia).

B. Técnica.

La medición se efectúa sobre la dilución de citosol (los citosoles se diluyen entre 40 y 80 veces para el ensayo). Los citosoles se prepararon según la técnica descrita para la determinación de receptores de estrógenos y progesterona.

Se recomienda que la concentración de proteínas en el citosol oscile entre 1 y 2 mg/ml, antes de realizar el ensayo.

Todos los reactivos deben permanecer a temperatura ambiente (18-25 °C) al menos 30 minutos antes de su utilización. Los estándares y los controles deben estar reconstituidos 15 minutos antes de su utilización. La dispensación de los reactivos sobre los tubos ELSA (tubos que contienen el otro anticuerpo frente a catepsina D fijado sobre las paredes del tubo) debe efectuarse a temperatura ambiente (18-25 °C).

Los ensayos se han realizado por triplicado para los estándares y por duplicado en cada muestra a cuantificar.

En la adición de reactivos seguimos el siguiente orden:

1) Se dispensan 300 μ l de anticuerpo monoclonal anti-catepsina D marcado con 125 I en cada tubo ELSA.

2) A continuación, se dispensan 50 μ l de los estándares de la curva patrón o de los citosoles a testar en cada tubo.

3) Se agita suavemente cada tubo en un agitador tipo Vortex.

4) Se procede a la incubación durante 3 horas +/- 5 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) a la vez que se somete a agitación.

Posteriormente, se procede al lavado y aspiración de los tubos ELSA de la siguiente forma: i) se aspira el contenido de cada tubo; ii) a continuación se añaden 3 ml de solución de lavado en cada tubo y seguidamente procedemos a su aspiración situando el dispositivo de aspiración en el fondo del tubo ELSA (esta operación la repetimos dos veces más).

Finalmente, se mide cada tubo en un contador gamma calibrado para la medición de 125 I durante 1 minuto.

C. Expresión de los resultados.

La lectura efectuada sobre la curva estándar permite el cálculo de la concentración de catepsina D, que se expresa en pmol/mg de proteína citosólica.

5. Cuantificación del activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA) mediante inmunoanálisis por luminiscencia.

A. Principio.

La cuantificación de u-PA se ha llevado a cabo mediante una técnica enzimoimmunoluminiscente de fase sólida basada en el principio de "sandwich" (LIA-mat u-PA de Byk-Sangtec Diagnóstica) que permite el análisis cuantitativo de u-PA en el citosol tumoral. El anticuerpo monoclonal Pab 1801 se encuentra revistiendo las paredes de los tubos empleados en el ensayo, a los cuales se les adiciona la muestra citosólica a analizar así como el segundo anticuerpo monoclonal luminiscente D01, permaneciendo en incubación para permitir que se unan a epítopos distintos resistentes a la desnaturalización. El exceso de anticuerpo no ligado a la proteína se elimina por lavado. El complejo inmunológico formado y unido al tubo es detectado por la reacción luminiscente producida por la oxidación del isoluminol presente en el anticuerpo monoclonal luminiscente D01, debido a la inyección automática dentro de los tubos de una solución salina de peróxido de hidrógeno y de la solución catalítica, que en menos de 20 segundos produce la emisión de fotones. La luz (425 nm) producida por esta reacción se mide por el fotomultiplicador del luminómetro y se expresa en RLUs (Unidad Relativa Luz) que son directamente proporcionales a la cantidad de u-PA presente en los estándares de la curva patrón y en las muestras de las pacientes.

B. Técnica.

El proceso se lleva a cabo en un solo paso de incubación, añadiendo a los tubos de poliuretano recubiertos de anticuerpo monoclonal Pab 1801, 100 microlitros de la muestra de citosol o de la solución estándar de u-PA y 100 microlitros de la solución trazador (aminobutiletilluminol ABEI), unida

covalentemente al anticuerpo monoclonal D01. Tras incubación durante 16-22 horas a temperatura ambiente y en agitación (a una velocidad de 150 rpm y amplitud de 2 cm), se procede al lavado de cada tubo con el fin de eliminar uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo. El complejo trazador- u-PA unido a las paredes del tubo es detectado por una reacción luminosa provocada por la oxidación del isoluminol desencadenada por la inyección automática de una solución alcalina de peróxido de hidrógeno y de la solución catalítica. Finalmente, la emisión de fotones producida se mide en el fotomultiplicador del luminómetro.

C. Expresión de los resultados.

La lectura efectuada sobre la curva estándar permite el cálculo de la concentración de u-PA que se expresa en ng/mg de proteína citosólica.

Control de calidad.

Antes de la realización de un kit, se realiza el control de calidad del luminómetro así como de los reactivos de inducción de la luminiscencia (solución catalítica y/o solución alcalina de peróxido de hidrógeno). Este control (LIA-mat® Light-Check -Reactivo control de la luminiscencia-) constituye una verificación simultánea de los reactivos y del instrumento, con objeto de que no se pierdan resultados por la utilización de un instrumento defectuoso o de reactivos mal preparados, caducados o mal ubicados.

Antes del control de luminiscencia, los tubos e inyectores del aparato se lavan varias veces con agua destilada mediante un programa automático de lavado. A continuación, se coloca una gradilla con 10 tubos (5 tubos vacíos y 5 tubos con 100 microlitros cada uno de reactivo control de la luminiscencia-Reactivo Light-Check-) en la cinta de transporte frente a la entrada del luminómetro, se introduce automáticamente en éste, y se realiza la inyección

automática de los reactivos de inducción de la luminiscencia, para pasar a continuación a la medida de la misma.

Los valores medios de RLU y los coeficientes de variación (CV) se imprimen automáticamente. Los resultados obtenidos se comparan, por último, con los del informe de Control de Calidad presente en cada kit. Si los resultados obtenidos están dentro del rango recomendado, se puede concluir que tanto la instrumentación como los reactivos funcionan bien.

El siguiente control de calidad que se realiza consiste en determinar en tres kits sucesivos la variabilidad intraensayo e interensayo de las mediciones de u-PA. Para ello, se seleccionan tres citosoles mamarios, en los que la medición previa de u-PA había dado un valor alto, medio y bajo de la proteína. Con ellos se realizan cinco mediciones de cada uno de ellos en los tres ensayos consecutivos. Asimismo, se ha controlado en el primer ensayo realizando la fiabilidad de la medida en cinco diluciones sucesivas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) de una misma muestra. La muestra seleccionada contenía un valor alto de u-PA, para así hacer más evidentes las sucesivas diluciones.

IV. MÉTODO ESTADÍSTICO.

1. Archivo de datos.

Para la realización del fichero de datos se ha utilizado el programa FileMaker Pro 2.1, en el que se han recogido los datos de las diferentes variables que componen este estudio (serie clínica, determinaciones histológicas y determinaciones bioquímicas) y que han sido descritas en el apartado de material y métodos.

Para el análisis estadístico se ha utilizado el programa estadístico SPSS para Windows versión 7.5.2S (SPSS Inc., 1987-1997).

2. Método estadístico.

Se ha realizado un análisis descriptivo de cada una de las variables para establecer la relación entre ellas, a la vez que se ha aplicado un test de contraste de hipótesis según el tipo de variable (cualitativa o cuantitativa) para conocer la significación estadística de su relación. Hemos utilizados los siguientes tests estadísticos: Correlación de Pearson, ANOVA, Chi-Cuadrado. Los resultados numéricos de las relaciones entre las diversas variables estudiadas se representan mediante tablas de contingencia. Los resultados obtenidos vienen dados con un índice de confianza del 95%.

RESULTADOS

RESULTADOS.

I. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA SERIE CLÍNICA.

1. Edad de las pacientes.

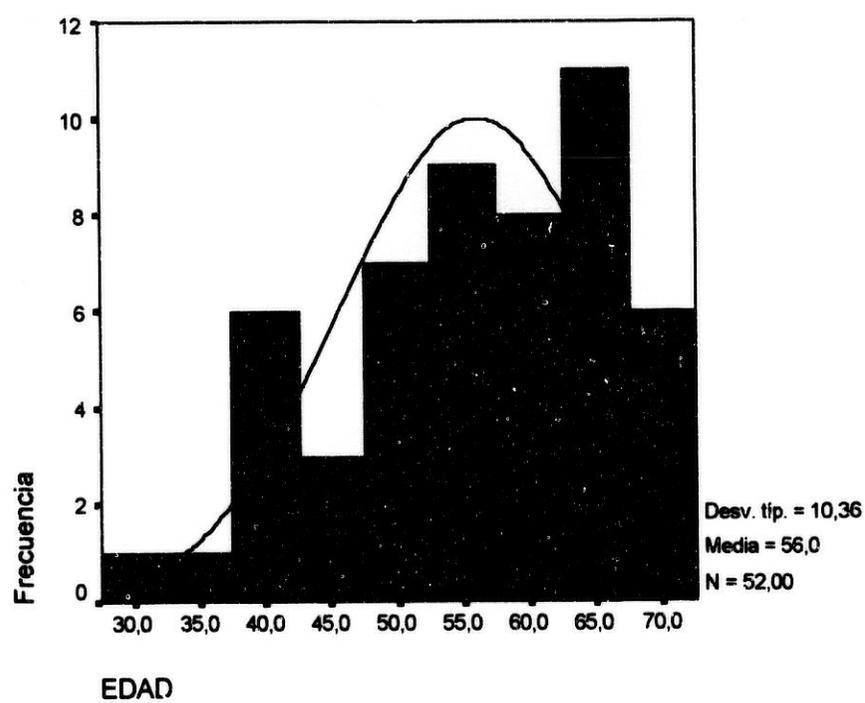
Las pacientes de la serie fueron diagnosticadas y tratadas de cáncer de mama en el hospital Torrecárdenas de Almería durante el período comprendido entre Abril de 1996 y Abril de 1998.

La edad media de las pacientes es de 55,98 años, con un rango que oscila entre 30 y 71 años. Los datos recogidos la tabla 1 se representan en la figura 1.

Aunque el valor medio de la edad de las pacientes es de 56 años, el análisis detallado de la figura sugiere que existen al menos dos máximos en la distribución del cáncer de mama en nuestra serie. El primero está situado en torno a los 40 años y corresponde a las pacientes premenopáusicas; el segundo, de presentación más tardía alrededor de 65 años, está relacionado con las pacientes postmenopáusicas.

TABLA 1: Frecuencia GRUPOS DE EDAD.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
30-40	6	11,5	11,5	11,5
41-50	9	17,1	17,1	28,6
51-60	14	26,7	26,7	55,3
61-70	22	42,8	42,8	98,1
71-80	1	1,9	1,9	100,0
Total	52	100,0	100,0	

Figura 1: Curva de edad.

2. Estadio clínico de la enfermedad.

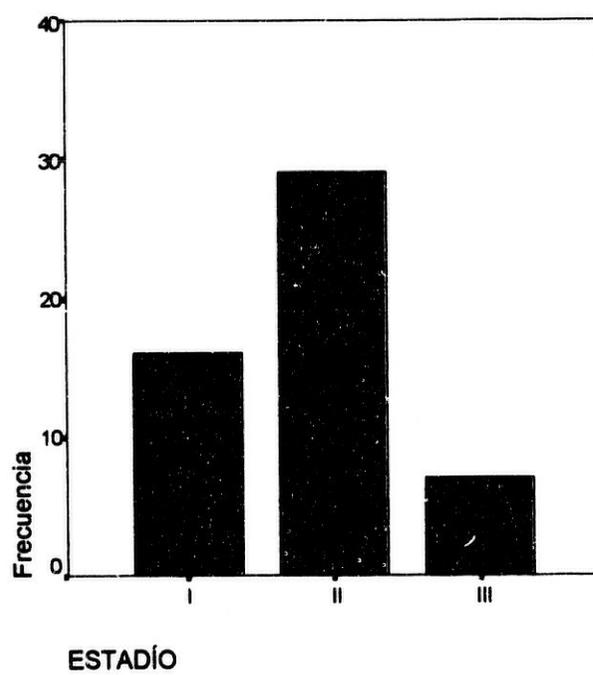
El estadio clínico según la clasificación TNM expuesta en el apartado de Material y Métodos ha mostrado la relevancia del estadio IIB seguido del estadio I. Cabe destacar 1 caso de estadio 0 correspondiente a un carcinoma in situ y 4 casos de estadio IIIB correspondientes a carcinomas inflamatorios en 2 de ellos. La serie estudiada no presenta pacientes en estadio IV.

TABLA 2. Estadio clínico pormenorizado.

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
Estadio 0	1	1,92	1,92	1,92
Estadio I	15	26,92	26,92	28,84
Estadio IIA	12	23,07	23,07	51,91
Estadio IIB	17	34,61	34,61	86,52
Estadio IIIA	3	5,76	5,76	92,28
Estadio IIIB	4	7,69	7,69	100
Estadio IV	0	0	0	

La figura 2 muestra la distribución de las pacientes por estadio clínico. considerando a éste de forma agrupada 0+ I y II+III. confirmándose que tan solo 1 de cada 9 pacientes es diagnosticada en estadio III de la enfermedad tumoral.

Figura 2. Frecuencia de estadio clínico.



La edad de los pacientes según el estadio clínico se expone a continuación.

TABLA 3: Media de Edad controlada por estadio.

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. Típ.</i>
<i>Estadio I</i>	16	57,12	10,32
<i>Estadio II</i>	29	56,10	9,49
<i>Estadio III</i>	7	52,71	14,44

N.S.

Se puede observar una distribución homogénea de las edades en los diferentes estadios clínicos. La diferencia entre las medias de edad no es significativa tras aplicar el test estadístico correspondiente (ANOVA).

3. Estatus hormonal y estadio clínico.

En relación al estatus hormonal, el 63,5 % (n=33) de las pacientes son postmenopáusicas y el 36,5 % (n=19) son premenopáusicas en el momento del diagnóstico. La distribución de las pacientes se muestra en la tabla 4 y en la figura 3. Tras aplicar el análisis estadístico correspondiente no se observan diferencias significativas entre el estadio clínico y el estatus hormonal de las pacientes.

TABLA 4.

Tabla de contingencia ESTADÍO * STATUS

Recuento

	STATUS		Total
	Pre	Post	
ESTADIO I	6	10	16
II	10	19	29
III	3	4	7
Total	19	33	52

Figura 3. Frecuencia de estadio vs estatus.

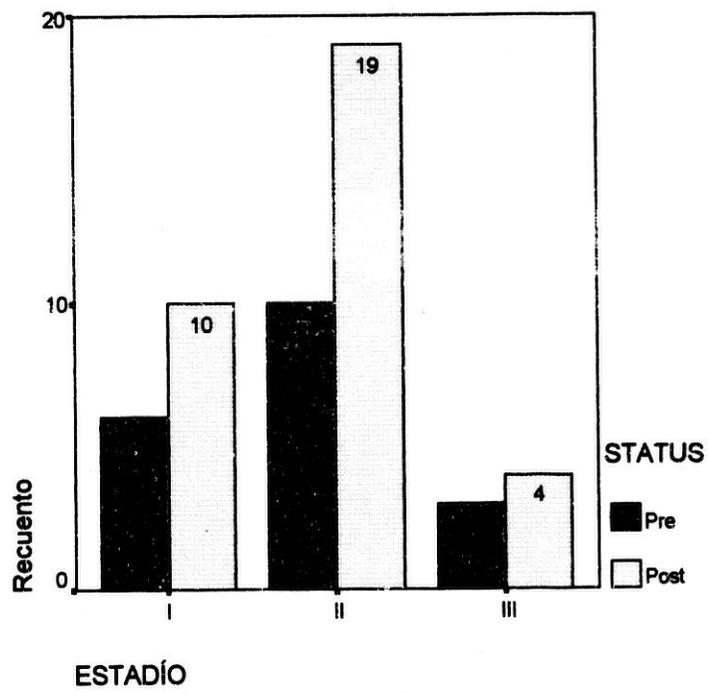
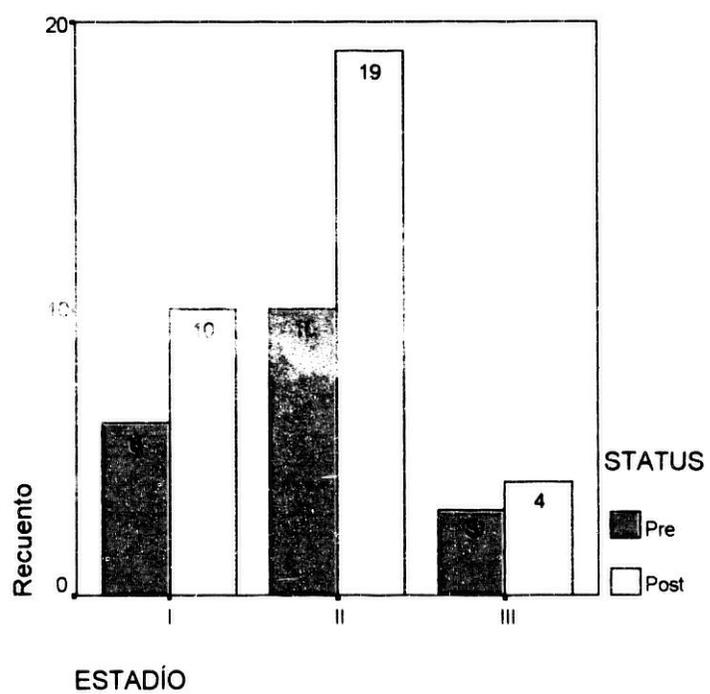


Figura 3. Frecuencia de estadio vs estatus.



II. RESULTADOS HISTOLÓGICOS.

1. Estudio macroscópico del tumor.

A. Tamaño tumoral.

El estudio del tamaño del tumor evaluado tras la resección quirúrgica indica que el valor medio es de 2,73 cm, con un mínimo de 0,5 cm y un máximo de 10 cm. Los resultados se expresan en la tabla 5.

TABLA 5. Frecuencia tamaño tumoral.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Típic.
Tamaño	52	0,50	10,00	2,73	1,78

En la búsqueda de posibles asociaciones entre el tamaño tumoral y otras variables descritas hasta el momento, es de destacar que existe una relación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral y la edad de las pacientes, de tal forma que a pacientes de mayor edad corresponden tumores más pequeños.

TABLA 6. Tamaño vs edad.

	Edad
Tamaño	- 0,287*

P<0,05

B. Localización del tumor.

La localización más frecuente ha sido la mama izquierda. Los resultados se exponen en la tabla 7.

TABLA 7. Frecuencia de localización del tumor.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Mama izquierda	35	67,3	67,3	67,3
Mama derecha	17	32,7	32,7	100,0
Total	52	100,0	100,0	

C. Alteraciones de piel y pezón.

No han sido frecuentes las alteraciones de la piel y el pezón en la serie estudiada. Las tablas 8 y 9 muestran estos datos.

TABLA 8. Frecuencia de alteraciones del pezón.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No alteraciones	45	86,5	86,5	86,5
Sí alteraciones	6	11,5	11,5	98,1
Paget	1	1,9	1,9	100,0
Total	52	100,0	100,0	

TABLA 9. Frecuencia de alteraciones en la piel.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No alteraciones	46	88,5	88,5	88,5
Sí alteraciones	6	11,5	11,5	11,5
Total	52	100,0	100,0	

D. Estudio de bordes de resección de la pieza quirúrgica.

El estudio macroscópico anatomopatológico de la pieza revela de una parte el predominio de pacientes con bordes de resección sin infiltración tumoral, y de otra parte la no existencia de multicentricidad del tumor en la pieza quirúrgica (Tablas 10 y 11).

TABLA 10. Frecuencia de bordes de resección.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Bordes No infiltrados	49	94,2	94,2	94,2
Bordes Si infiltrados	3	5,8	5,8	100,0
Total	52	100,0	100,0	

TABLA 11. Frecuencia de multicentricidad.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No	42	80,8	80,8	80,8
Si	10	19,2	19,2	100,0
Total	52	100,0	100,0	

2. Estudio microscópico del tumor.

A. Distribución por tipos histológicos.

El tipo histológico de carcinoma más frecuente en la serie estudiada ha sido el carcinoma ductal infiltrante (90%), presentándose tan solo un caso de carcinoma in situ, y dos casos de carcinomas inflamatorios.

TABLA 12. Frecuencia de tipo histológico de carcinoma.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Carcinoma ductal in situ	1	1,92	1,92	1,92
Carcinoma ductal infiltrante	47	90,38	90,38	92,3
Carcinoma mixto invasor	2	3,84	3,84	96,14
Carcinoma inflamatorio	2	3,84	3,84	100

B. Grado histológico.

La distribución de la serie según el grado histológico, siguiendo la clasificación de Bloom-Richardson se expone en la tabla 13. Como se puede observar, predominan los tumores de grado II (moderadamente diferenciados).

TABLA 13. Frecuencia de grado histológico.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Grado I	19	36,5	36,5	36,5
Grado II	24	46,2	46,2	82,7
Grado III	9	17,3	17,3	100,0
Total	52	100,0	100,0	

TABLA 14. Grado histológico vs tamaño tumoral.

	N	Tamaño medio (cm)	Desviación tip.
Grado I	19	2,15	1,46
Grado II	24	2,55	0,85
Grado III	9	4,43	3,05
Total	52	2,73	1,78

El análisis estadístico ha demostrado una relación significativa entre el grado de diferenciación histológica de Bloom y Richardson y el tamaño tumoral, de tal forma que los tumores más indiferenciados (grado III) presentan un tamaño medio mayor en torno a los 4 cm. Por otra parte, los tumores más pequeños con un diámetro medio de 2 cm, corresponden al grado histológico I. Esta asociación nos ha orientado hacia la búsqueda de posibles asociaciones entre el tamaño tumoral y otras variables de orden histológico y bioquímico, llegando a diferenciar los tumores en función de su tamaño: mayor o menor de 2 cm de diámetro.

TABLA 15.

Tabla de contingencia Grado_histológico * Tamaño

Recuento		Tamaño		Total
		≤2	>2	
Grado_histológico	1,00	12	7	19
	2,00	7	17	24
	3,00	1	8	9
Total		20	32	52

p<0,001

Grado 1= Grado I

Grado 2= Grado II

Grado 3= Grado III

Figura 4. Grado histológico vs tamaño tumoral.

Grado 1= Grado I
Grado 2= Grado II
Grado 3= Grado III

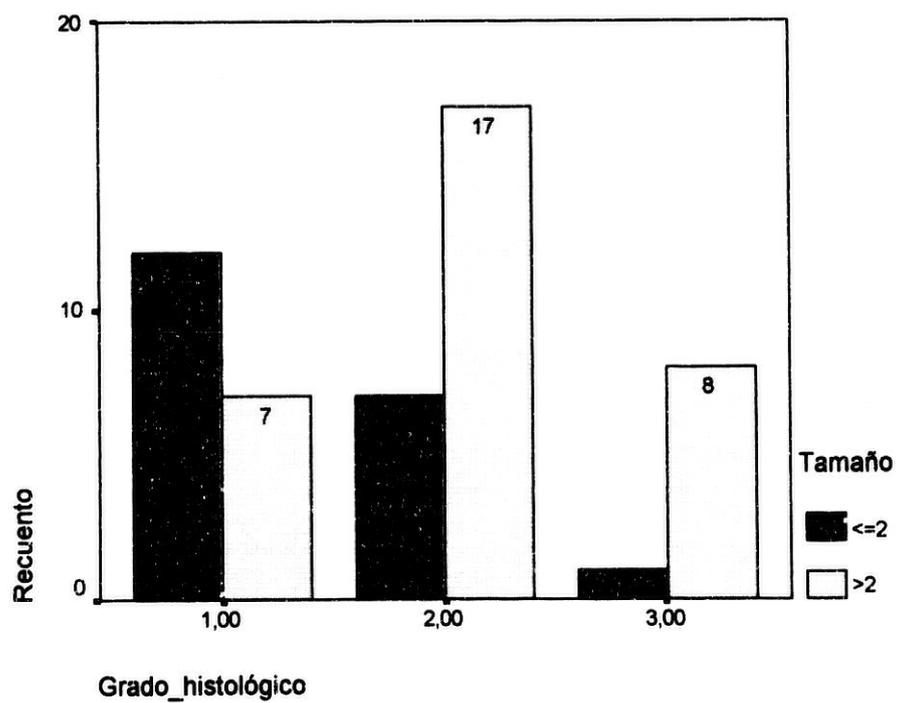
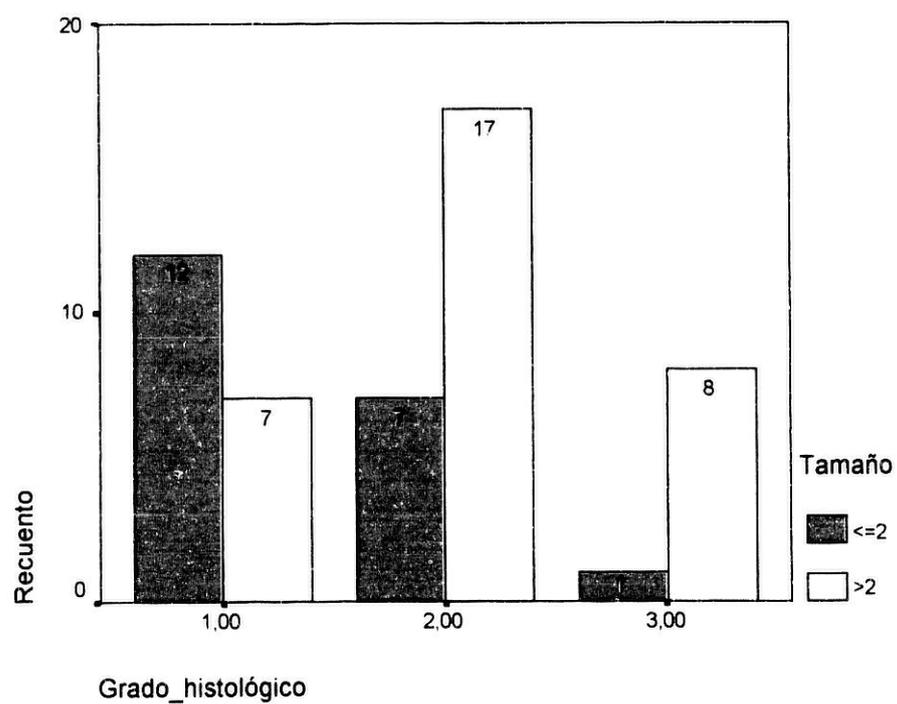


Figura 4. Grado histológico vs tamaño tumoral.

Grado 1= Grado I

Grado 2= Grado II

Grado 3= Grado III



Asimismo, se ha buscado la asociación entre la presentación de necrosis intratumoral y el estadio clínico. La tabla 18 expresa la relación entre el grado de necrosis intratumoral y el estadio clínico. Para el estudio estadístico hemos considerado dos grupos; el primer grupo incluye el estadio I y el segundo grupo está representado por los estadios II+III. De esta forma, se puede observar que la relación existente entre estas dos variables es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

TABLA 18.

Tabla de contingencia Estadio Recodificado * necrosis

		necrosis			Total
		NO	SI	EXTENSA	
Estadio Recodificado	I	Recuento 12	4		16
		% del total 23,1%	7,7%		30,8%
II+III	Recuento	16	14	6	36
	% del total	30,8%	26,9%	11,5%	69,2%
Total	Recuento	28	18	6	52
	% del total	53,8%	34,6%	11,5%	100,0%

La figura 5 permite apreciar la distribución característica de los tumores por estadios y la frecuencia de necrosis intratumoral, de tal forma que existe un predominio de tumores en los que no se ha objetivado necrosis en el estadio I. Asimismo, la necrosis intratumoral extensa está asociada en su totalidad a estadios más avanzados(II+III).

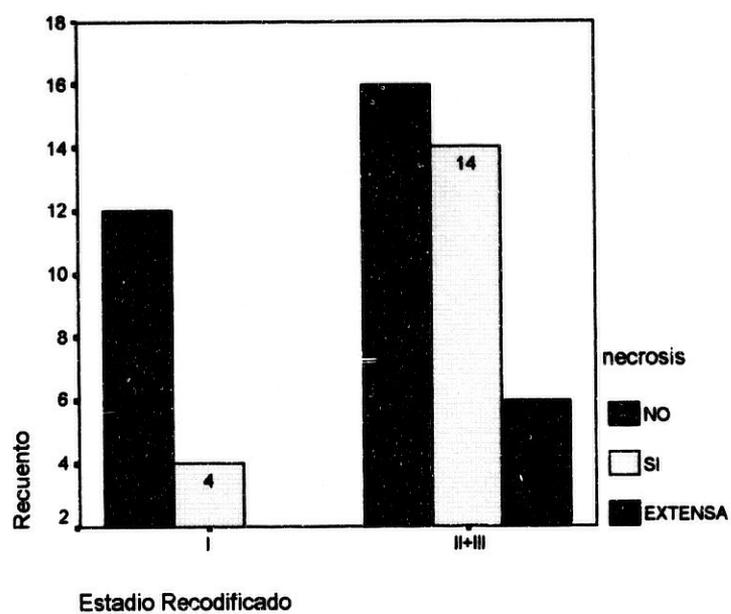
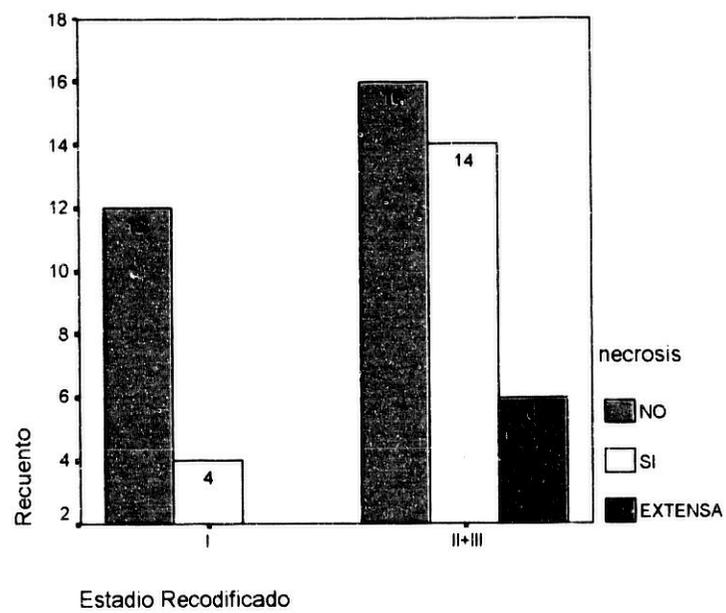
Figura 5. Necrosis intratumoral vs estadio.

Figura 5. Necrosis intratumoral vs estadio.

D. Calcificación intratumoral.

Existe en nuestra serie un discreto predominio de tumores con componente de calcificación, aunque ésta sea poco extensa. La tabla 19 muestra la frecuencia de este hallazgo histológico.

TABLA 19. Frecuencia de calcificación.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No	21	40,4	40,4	40,4
Calcificación mínima	28	53,8	53,8	94,2
Calcificación extensa	3	5,8	5,8	100,0
Total	52	100,0	100,0	

La asociación entre el componente de calcificación intratumoral y el tamaño tumoral es estadísticamente significativa.

TABLA 20. Calcificación intratumoral vs tamaño tumoral.

		N	Media	Desviación típica
Tamaño / Calcificación	No	21	2,43	1,81
	Mínima	28	3,03	1,78
	Extensa	3	2,00	1,41
	Total	52	2,73	1,78

 $P < 0,05$

E. Invasión vascular y perineural.

Entre las características histológicas también se ha estudiado la invasión vascular y perineural, hallando un discreto predominio de tumores en los que no se objetiva invasión vascular de células tumorales. Esta misma observación es aplicable a la invasión perineural por el tumor.

TABLA 21. Frecuencia de invasión vascular.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No	28	53,8	53,8	53,8
Si	24	46,2	46,2	100,0
Total	52	100,0	100,0	

N.S.

TABLA 22. Frecuencia de invasión perineural.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No	29	55,8	55,8	55,8
Si	23	44,2	44,2	100,0
Total	52	100,0	100,0	

N.S.

Tras aplicar el test estadístico correspondiente no se observan diferencias significativas entre la presencia microscópica de invasión vascular y el tamaño tumoral. Este resultado es similar en relación a la invasión perineural y el tamaño tumoral.

TABLA 23. Invasión vascular vs tamaño tumoral.

	N	Media	Desviación típica
Tamaño/Invasión vascular No	28	2,37	1,30
Si	24	3,15	2,17
Total	52	2,73	1,78

N.S.

TABLA 24. Invasión perineural vs tamaño tumoral.

	N	Media	Desviación típica
Tamaño/Invasión perineural No	29	2,27	1,29
Si	23	3,31	2,15
Total	52	2,73	1,78

N.S.

F. Componente de carcinoma in situ intratumoral.

Predominan los tumores que presentan menos del 25% de componente in situ. No se han hallado diferencias significativas en relación al tamaño tumoral.

TABLA 25. Componente in situ intratumoral.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No	12	23,1	23,1	23,1
<25%	29	55,8	55,8	78,8
>25%	11	21,2	21,2	100,0
Total	52	100,0	100,0	

TABLA 26. Componente de Ca. In situ vs tamaño tumoral.

		N	Media	Desviación típica
Tamaño / Ca. in situ	0 %	12	2,50	2,44
	< 25 %	29	2,81	1,58
	> 25 %	11	2,77	1,61
	Total	52	2,73	1,78

N.S.

G. Ganglios axilares aislados e infiltrados.

La media de ganglios linfáticos obtenidos tras la disección quirúrgica axilar ha sido aproximadamente 11 ganglios, con un mínimo de ganglios aislados de 3 y un máximo de 19. Este dato puede ser un indicativo de la eficacia de la técnica quirúrgica de disección axilar. El análisis histológico ha demostrado que el número de ganglios linfáticos invadidos por el tumor presenta un valor máximo de 15, con un valor medio que oscila entre 2 y 3 ganglios. Es interesante resaltar que hemos hallado 20 pacientes de nuestra serie con ganglios negativos, lo que supone un 38,4% del total. Si tenemos en cuenta que 16 pacientes están incluidas en el grupo de estadio 0+I, podremos concluir con claridad que 4 de las 20 pacientes ganglios negativos son estadio II NO.

TABLA 27. Ganglios linfáticos axilares.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Típic.
Ganglios aislados	52	3,00	19,00	11,11	4,17
Ganglios metastatizados	52	0	15	2,75	3,28

TABLA 28. Ganglios metastatizados vs estadio.

Estadio	Media	Desv. Típic.
I	0	0
II	3,34	2,99
III	6,0	4,20

La tabla 29 muestra que la relación entre los ganglios metastatizados y el tamaño del tumor, tras aplicar el test estadístico correspondiente (correlación de Pearson), ha resultado estadísticamente significativa.

TABLA 29. Ganglios metastatizados vs tamaño.

	Ganglios metastatizados
Tamaño	0,53*

P<0,05

No hemos hallado relación significativa tras aplicar el test estadístico, entre la presencia de ganglios positivos (metastatizados) y el resto de las variables histológicas mencionadas, necrosis intratumoral, calcificación intratumoral, invasión vascular y perineural, y porcentaje de componente intraductal in situ.

H. Densidad vascular intratumoral.

Como ya se ha expuesto en el apartado de *Material y Métodos*, la densidad vascular intratumoral ha sido determinada mediante la técnica de inmunotinción con factor VIII, expresándose los valores obtenidos como *nº de microvasos/10 campos (objetivo de 40)*. La tabla 30 muestra numéricamente la distribución media de recuento de microvasos, que ha resultado ser 29,86 -con un mínimo de 9 y un máximo de 95-.

TABLA 30. Recuento de microvasos intratumor.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Típic.
Densidad vascular	52	9,00	95,00	29,86	18,04

Para aplicar esta variable al estudio comparativo y de asociación con otras variables descritas se ha considerado que una densidad vascular baja corresponde a < 25 microvasos/10 campos y que por encima de este valor la densidad vascular es elevada.

Como se puede observar, los tumores con densidades vasculares intratumorales elevadas presentan un tamaño medio mayor en relación con aquellos otros tumores donde la densidad vascular se ha considerado como baja (3,2 cm frente a 2,2cm respectivamente) ($p < 0,05$).

TABLA 31.

Estadísticos del grupo

	Densidad vascular	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
Tamaño	Baja	27	2,2815	,8810	,1696
	Alta	25	3,2240	2,3356	,4671

$p < 0,05$

De igual modo, observamos un aumento en la densidad vascular intratumoral conforme avanzamos en el grado histológico del tumor, sin que este hallazgo presente significación estadística.

TABLA 32. Densidad vs grado histológico.

		N	Media	Desviación tip.
Densidad	Grado I	19	24,11	20,94
	Grado II	24	28,79	17,72
	Grado III	9	33,94	10,17
	Total	52	29,86	18,04

N.S.

III. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DETERMINADOS EN EL EXTRACTO PROTEICO DE CÉLULAS TUMORALES: RECEPTORES HORMONALES, pS2, CATEPSINA D Y UROKINASA.

1. Receptores hormonales: RE y RP.

El estudio de los receptores hormonales se realizó en el citosol tumoral en la totalidad de las pacientes de la serie, usando para su determinación el método de anticuerpo monoclonal como ya se ha expuesto en el apartado correspondiente de *Material y Métodos*.

Para los receptores de estrógenos (RE) se han obtenido valores que oscilan entre 0 y 350 fmol/mg, con un valor medio de 51,5 fmol/mg. Los receptores de progesterona (RP) han presentado valores entre 0,36 y 247 fmol/mg, con un valor medio de 36 fmol/mg. Los valores numéricos obtenidos se muestran en la tabla 33.

TABLA 33. Frecuencia de Receptores hormonales.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv.Tip.
RE	52	0	349,04	51,50	76,88
RP	52	0,36	246,61	35,66	52,86

Para el estudio estadístico se han considerado, tanto para los receptores de estrógenos como para los de progesterona, dos grupos de pacientes definidos por los fenotipos (-) y (+), y establecidos al situar el dintel de positividad a partir de 15 fmol/mg. De esta manera, la distribución de los fenotipos receptores hormonales para las pacientes incluidas en la serie se expone en la tabla 34.

TABLA 34.

Tabla de contingencia RE * RP

			RP		Total
			RP-	RP+	
RE	RE-	Recuento	25	5	30
		% del total	48,1%	9,6%	57,7%
	RE+	Recuento	6	16	22
		% del total	11,5%	30,8%	42,3%
Total		Recuento	31	21	52
		% del total	59,6%	40,4%	100,0%

Se ha relacionado el estatus hormonal con los diferentes fenotipos hormonales, no hallando significación estadística entre ambas variables, si bien se puede observar un predominio del fenotipo receptor positivo (+,+) en las pacientes postmenopáusicas.

TABLA 35.

Fenotipo Receptor hormonal/Status

		STATUS		Total
		Pre	Post	
Fenotipo (+,+)	Recuento	3	13	16
	% del total	5,8%	25,0%	30,8%
(-,-)	Recuento	10	15	25
	% del total	19,2%	28,8%	48,1%
(+,-)	Recuento	2	4	6
	% del total	3,8%	7,7%	11,5%
(-,+)	Recuento	4	1	5
	% del total	7,7%	1,9%	9,6%
Total	Recuento	19	33	52
	% del total	36,5%	63,5%	100,0%

N.S

Figura 6. Fenotipo vs estatus.

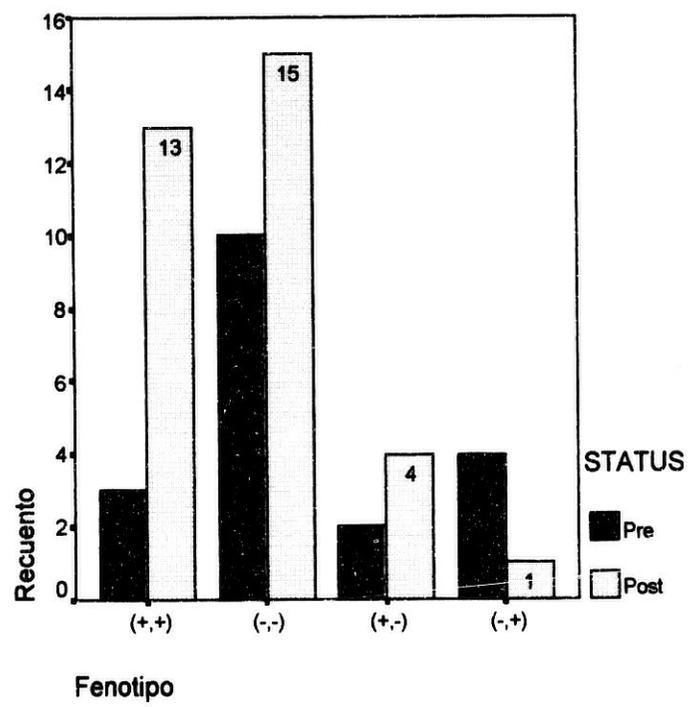
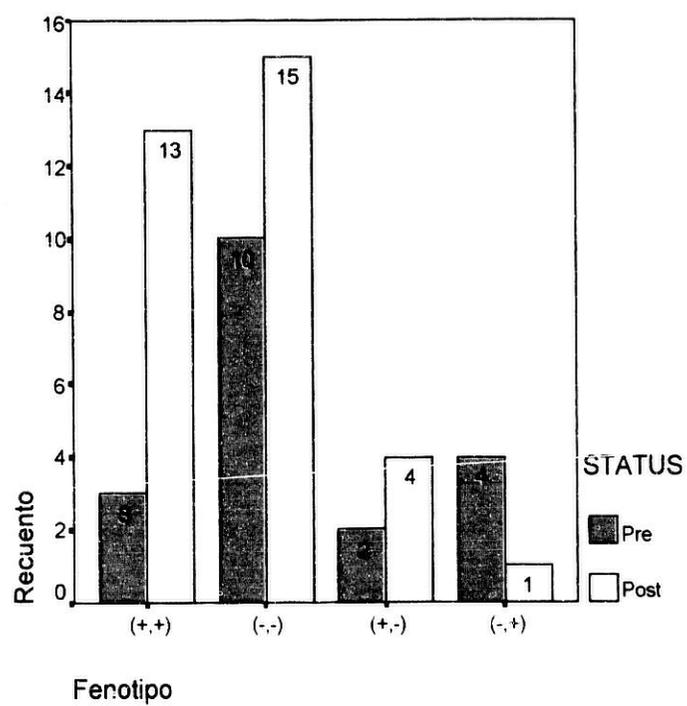


Figura 6. Fenotipo vs estatus.



Considerando el dintel de positividad para los receptores hormonales en 20 fmol/mg obtenemos significación estadística en la relación fenotipo vs status hormonal, de tal forma que existe un predominio significativo del fenotipo receptor positivo en las pacientes postmenopáusicas (Tabla 36 y figura 7).

TABLA 36.

Tabla de contingencia Fenotipo * STATUS

		STATUS		Total
		Pre	Post	
Fenotipo (+,+)	Recuento	2	12	14
	% del total	3,8%	23,1%	26,9%
(-,-)	Recuento	11	15	26
	% del total	21,2%	28,8%	50,0%
(+,-)	Recuento	2	5	7
	% del total	3,8%	9,6%	13,5%
(-,+)	Recuento	4	1	5
	% del total	7,7%	1,9%	9,6%
Total	Recuento	19	33	52
	% del total	36,5%	63,5%	100,0%

P<0,05

Figura 7. Fenotipo vs estatus.

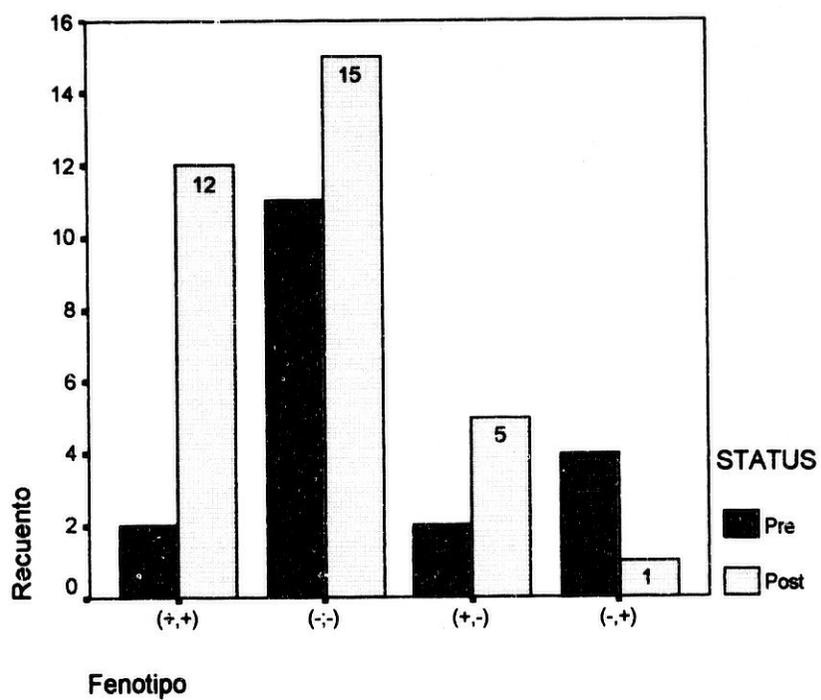


Figura 7. Fenotipo vs estatus.

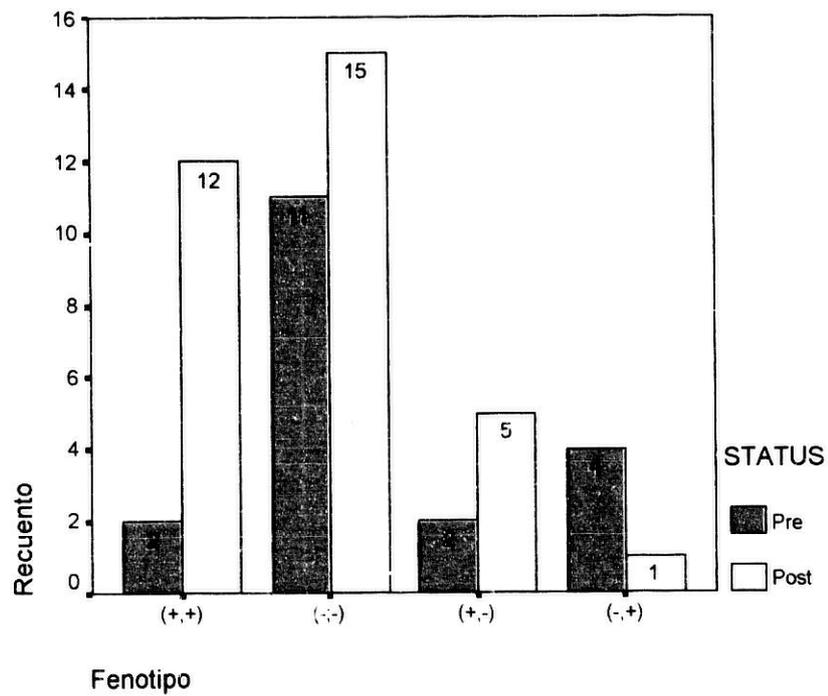


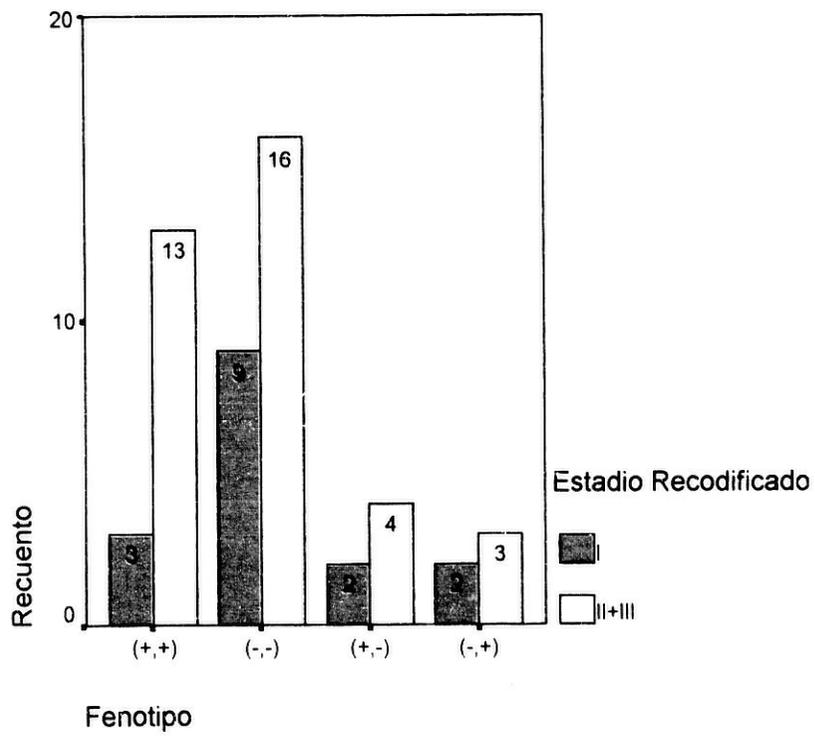
Figura 8. Fenotipo vs estadio.

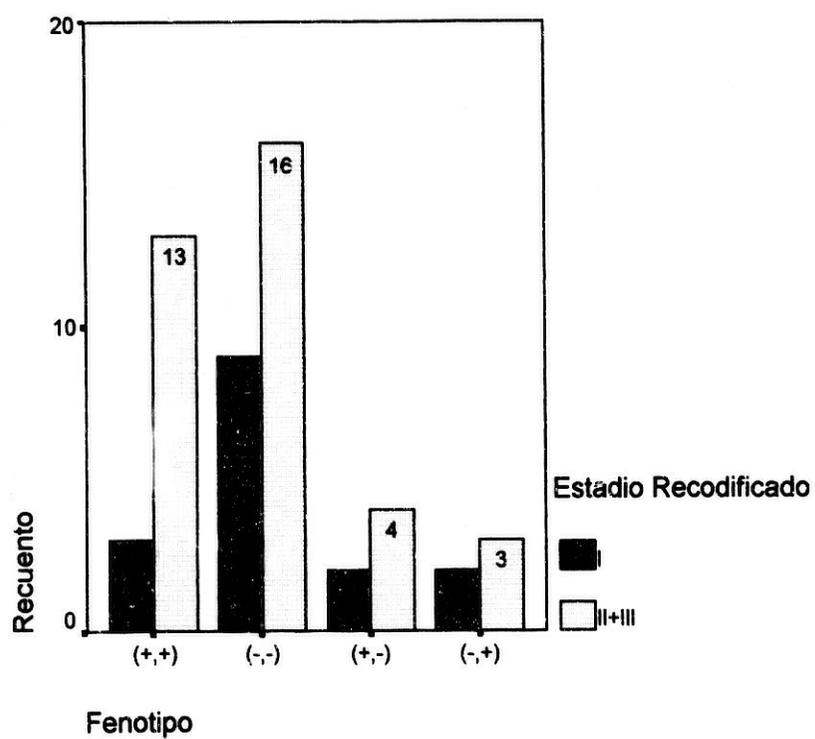
Figura 8. Fenotipo vs estadio.

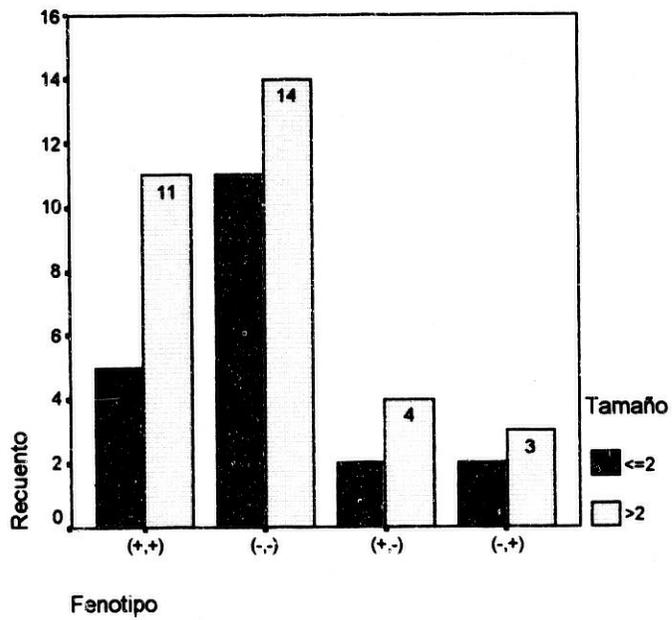
Figura 9. Fenotipo vs tamaño.

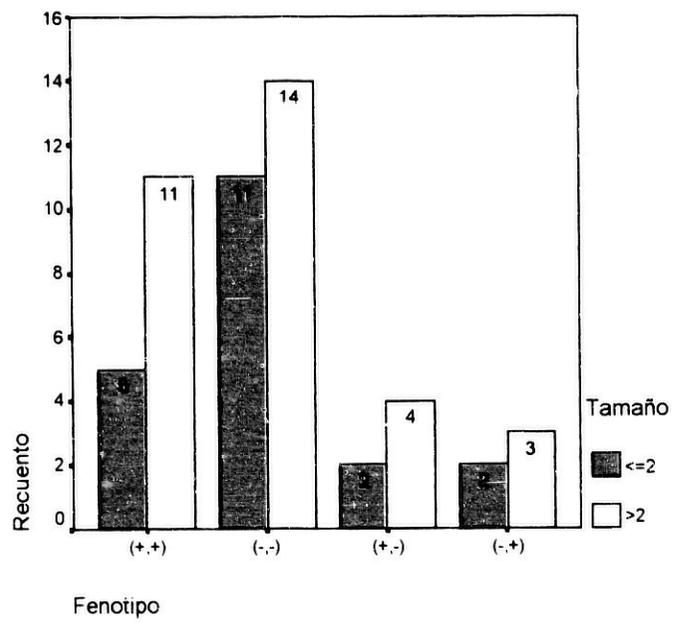
Figura 9. Fenotipo vs tamaño.

Figura 10. Fenotipo vs grado histológico.

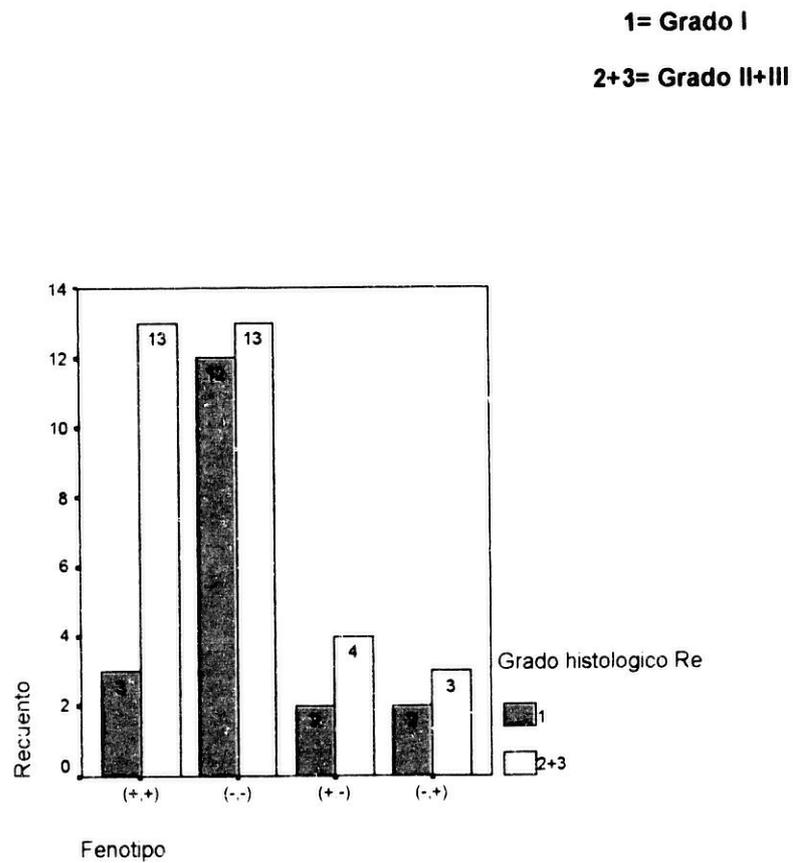
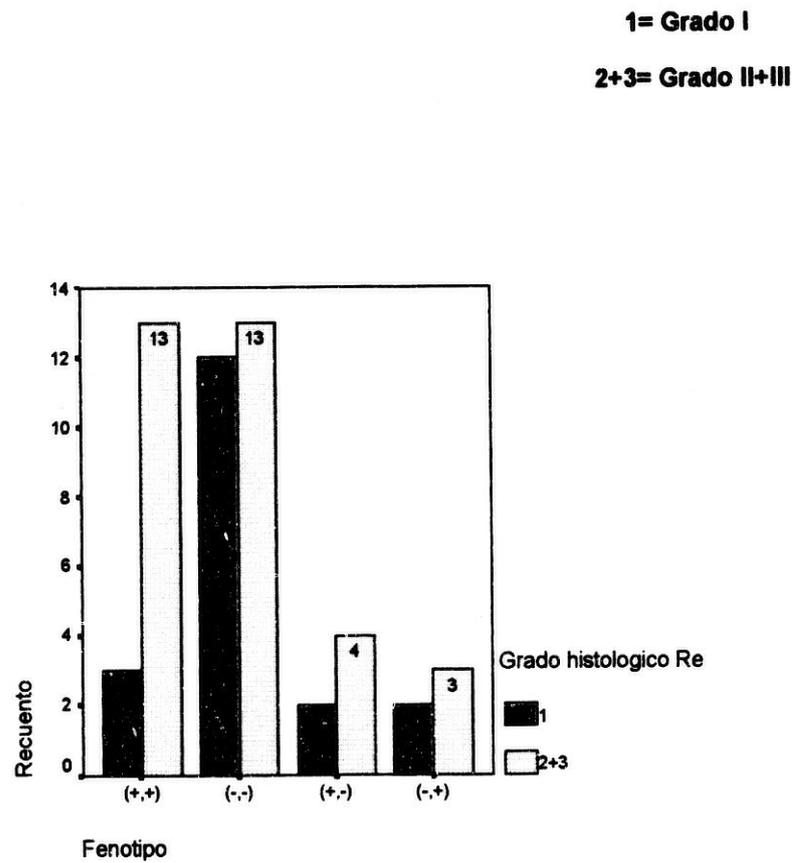


Figura 10. Fenotipo vs grado histológico.

También se ha estudiado la posible asociación entre la densidad vascular intratumoral y el fenotipo hormonal, tomando el valor de 25 microvasos/campo para diferenciar entre densidades bajas y altas.

El análisis estadístico no ha permitido establecer relaciones con carácter significativo entre ambas variables.

TABLA 40.

Tabla de contingencia Fenotipo * Densidad vascular

		Densidad vascular		Total
		Baja	Alta	
Fenotipo (+,+)	Recuento	9	7	16
	% del total	17,3%	13,5%	30,8%
(-,-)	Recuento	12	13	25
	% del total	23,1%	25,0%	48,1%
(+,-)	Recuento	3	3	6
	% del total	5,8%	5,8%	11,5%
(-,+)	Recuento	3	2	5
	% del total	5,8%	3,8%	9,6%
Total	Recuento	27	25	52
	% del total	51,9%	48,1%	100,0%

N.S.

Figura 11. Densidad vascular vs fenotipo.

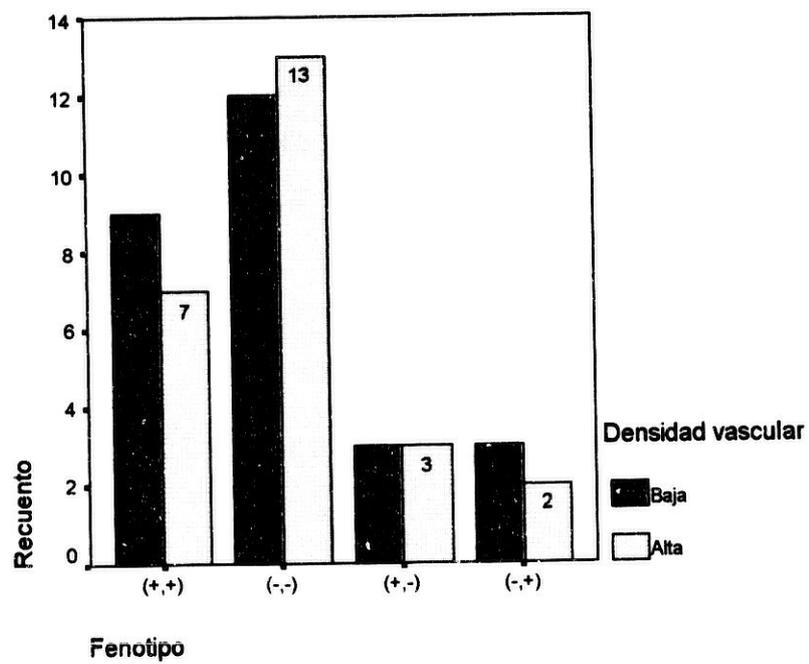


Figura 11. Densidad vascular vs fenotipo.

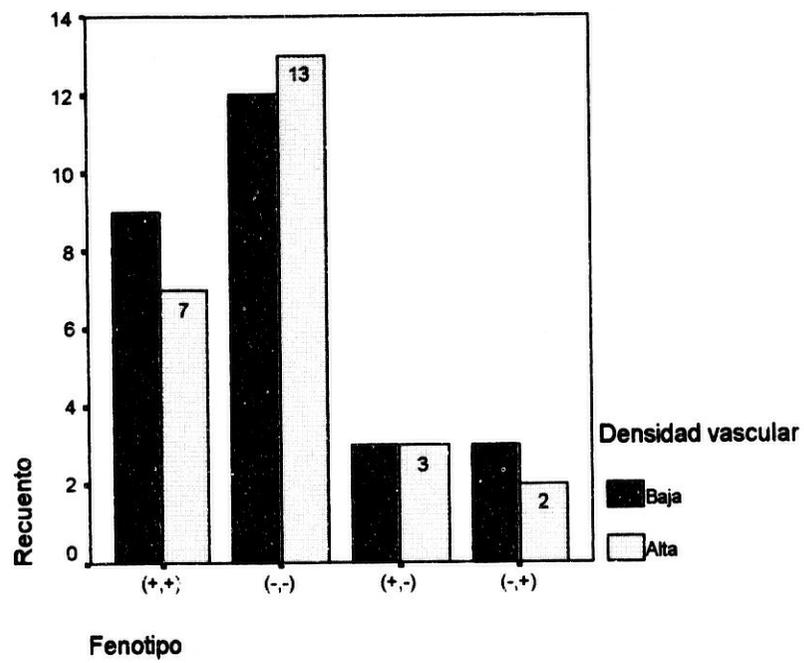
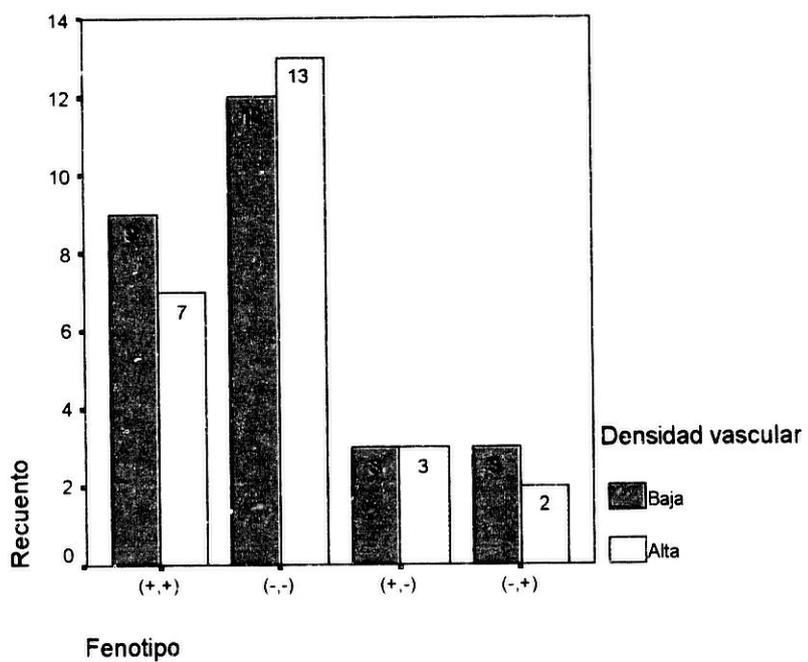


Figura 11. Densidad vascular vs fenotipo.



2. Proteína estrógeno dependiente pS2.

La determinación de pS2 en el citosol tumoral ha permitido establecer un valor medio de 10,91 ng/mg de proteína, con un rango que oscila entre 0,10 y 63,68. Tras su aplicación a la totalidad de las muestras tumorales incluidas en este estudio se ha considerado un valor positivo a partir de 11 ng/mg, de tal manera que el 30,76% (n=16) de los tumores han sido clasificados como pS2 positivo, frente al 69,24% clasificados como pS2 negativo.

En la búsqueda de asociaciones entre las diferentes variables estudiadas, es interesante resaltar que se ha hallado una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre la expresión de pS2 y el fenotipo hormonal. Los resultados se muestran en la tabla 41.

TABLA 41.

Tabla de contingencia fenotipo * pS2.

		pS2 Negativa	pS2 Positiva	Total
Fenotipo (+,+)	Recuento	7	9	16
	% del total	13,5%	17,3%	30,8%
(-, -)	Recuento	24	1	25
	% del total	46,2%	1,9%	48,1%
(+, -)	Recuento	3	3	6
	% del total	5,8%	5,8%	11,5%
(-, +)	Recuento	3	2	5
	% del total	5,85%	3,8%	9,6%
Total	Recuento	37	15	52
	% del total	71,2%	28,8%	100%

P<0,001.

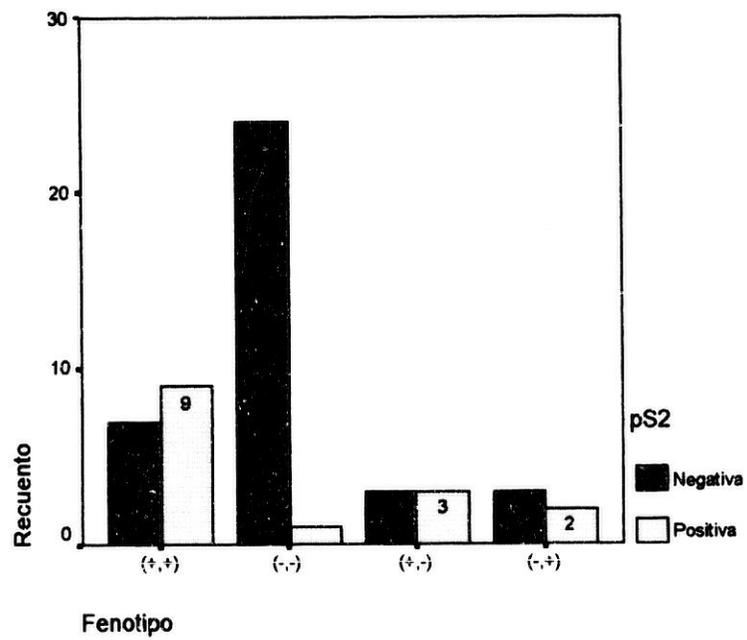
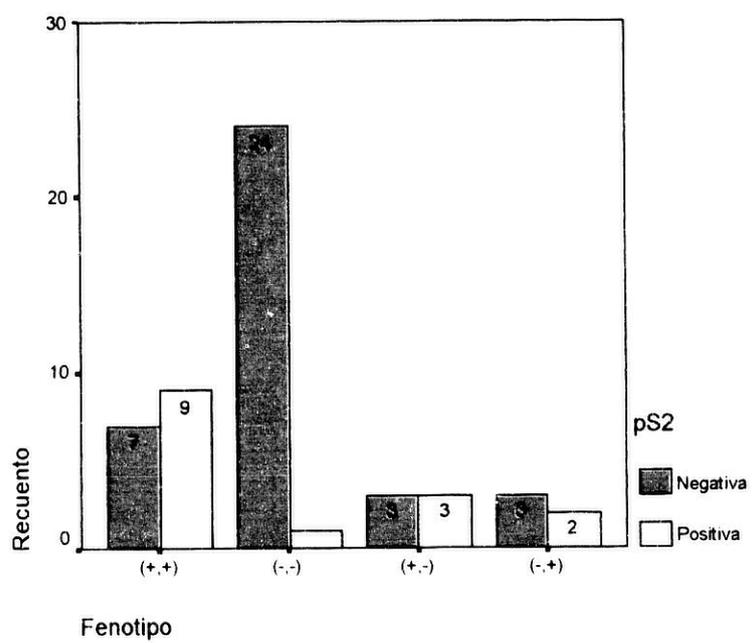
Figura 12. Fenotipo vs pS2.

Figura 12. Fenotipo vs pS2.

Por otra parte, el estudio de la relación entre pS2 y el estatus hormonal ha demostrado la independencia de ambas variables al no encontrarse una asociación significativa.

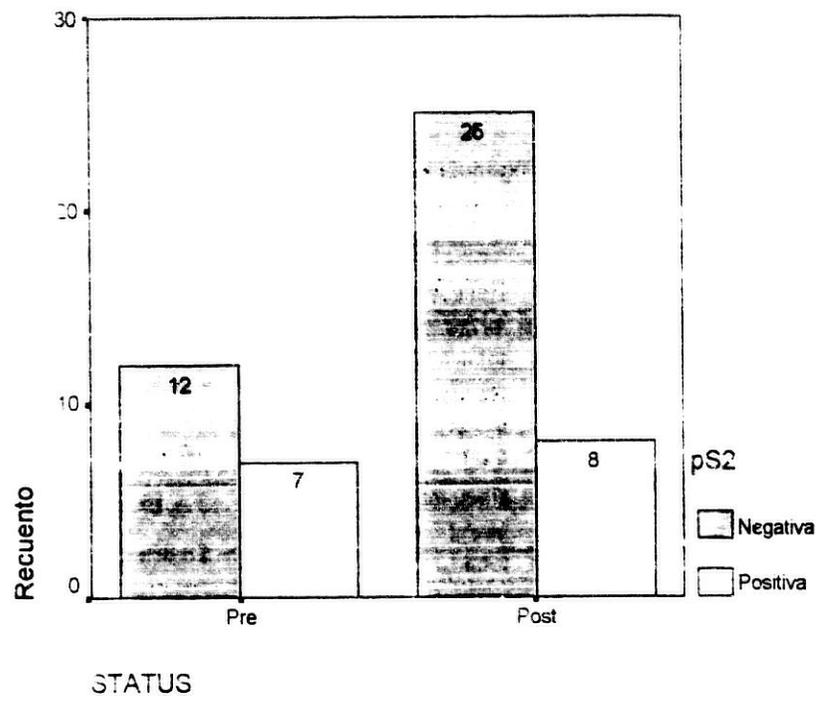
TABLA 42.

Tabla de contingencia STATUS * pS2

			pS2		Total
			Negativa	Positiva	
STATUS	Pre	Recuento	12	7	19
		% del total	23,1%	13,5%	36,5%
	Post	Recuento	25	8	33
		% del total	48,1%	15,4%	63,5%
Total		Recuento	37	15	52
		% del total	71,2%	28,8%	100,0%

N.S.

Figura 13. Status vs pS2.



Es interesante resaltar también que se ha hallado una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre estadio clínico y pS2. Así pues, se asocian los estadios más avanzados (II y III) de la enfermedad tumoral con la menor probabilidad de expresión de pS2 en los tumores. Los resultados se muestran a continuación.

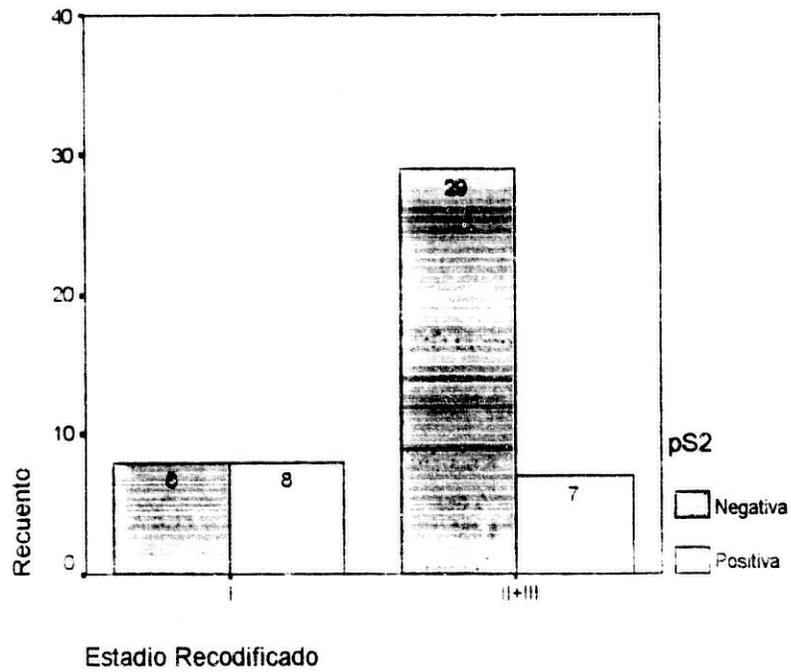
TABLA 43.

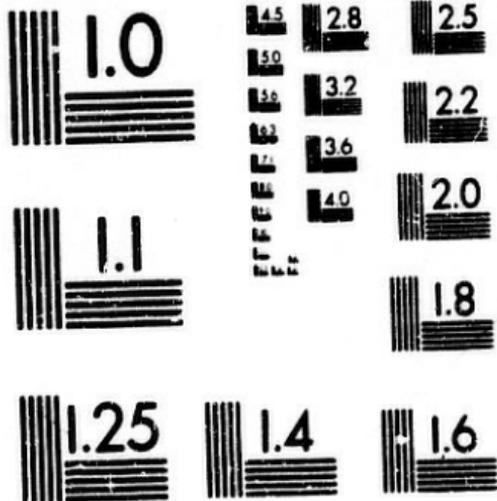
Tabla de contingencia Estadio Recodificado * pS2

		pS2		Total
		Negativa	Positiva	
Estadio Recodificado	I	Recuento 8	8	16
		% del total 15,4%	15,4%	30,8%
	II+III	Recuento 29	7	36
		% del total 55,8%	13,5%	69,2%
Total		Recuento 37	15	52
		% del total 71,2%	28,8%	100,0%

N.S.

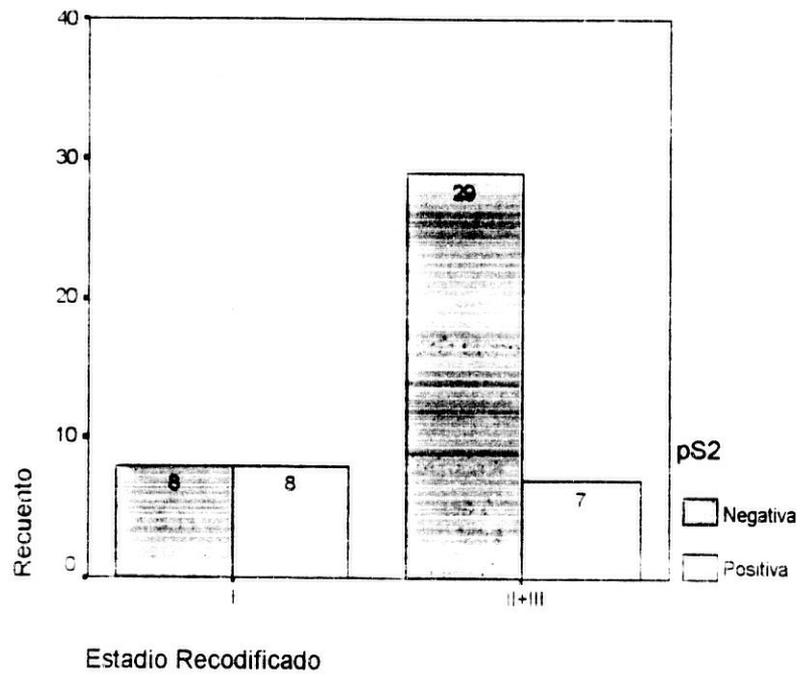
Figura 14. Estadio vs pS2.





MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
 NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
 STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
 (ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Figura 14. Estadio vs pS2.



Por último, se exponen a continuación los resultados del estudio de la relación entre pS2 y el grado histológico, el tamaño tumoral y la densidad vascular intratumoral. El análisis estadístico no ha encontrado una asociación significativa para ninguna de las variables consideradas. No obstante, parece observarse una tendencia ya demostrada en la relación entre la expresión de pS2 y estadio tumoral, consistente en que los tumores de mayor tamaño expresan valores menores, frecuentemente inferiores a 11 ng/mg de proteína de pS2.

TABLA 44.

1= Grado I

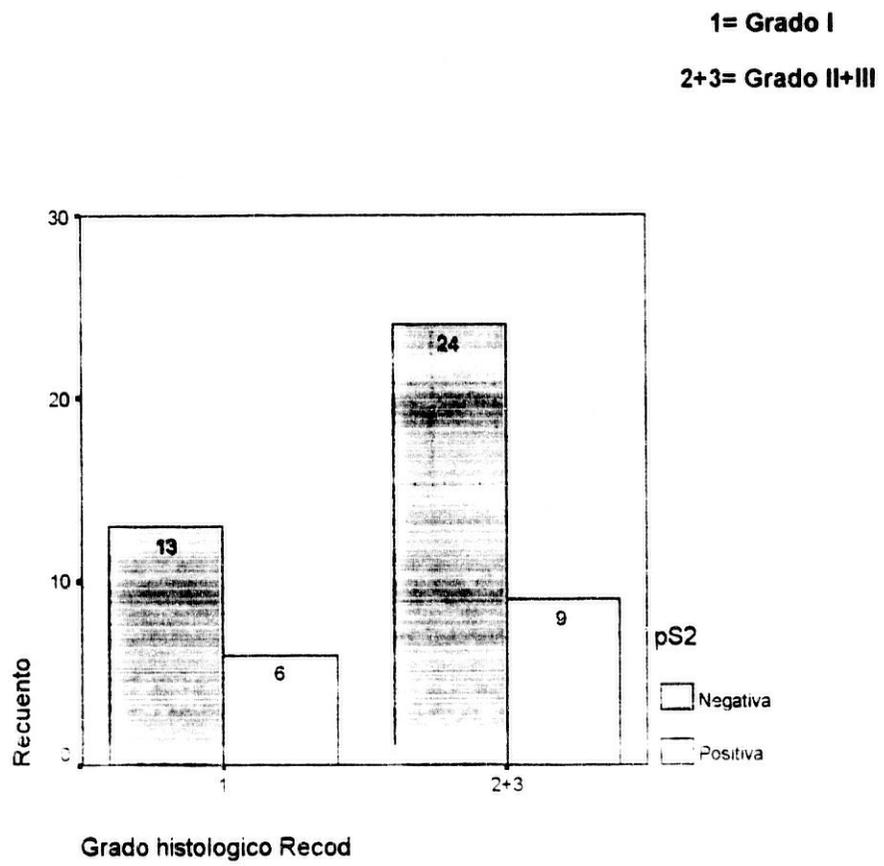
2+3= Grado II+III

Tabla de contingencia Grado histologico Recod * pS2

			pS2		Total
			Negativa	Positiva	
Grado histologico Recod	1	Recuento	13	6	19
		% del total	25.0%	11.5%	36.5%
	2+3	Recuento	24	9	33
		% del total	46.2%	17.3%	63.5%
Total		Recuento	37	15	52
		% del total	71.2%	28.8%	100.0%

N.S.

Figura 15. Grado histológico vs pS2.



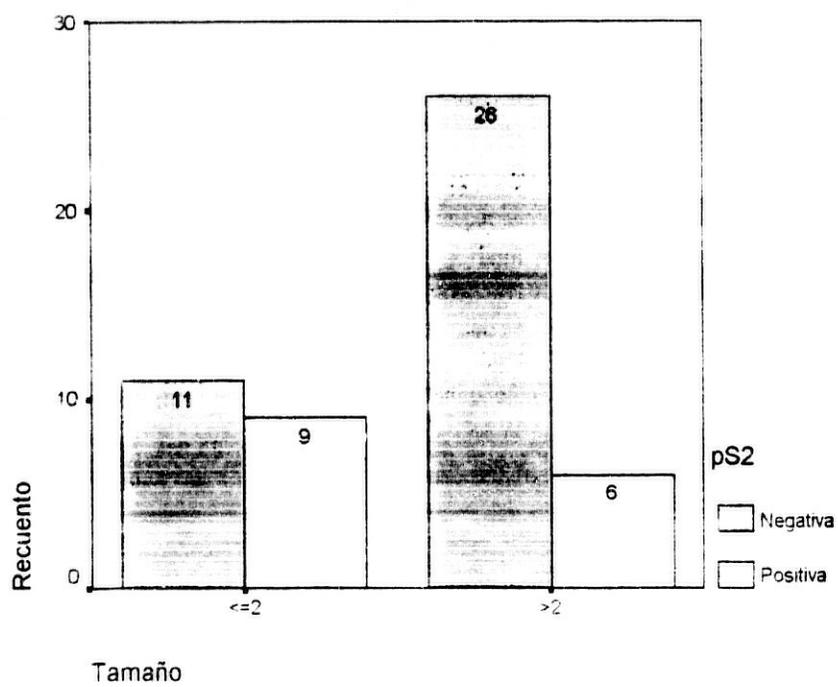
La tabla 45 muestra los datos numéricos correspondientes a la distribución de casos en función del tamaño tumoral y el fenotipo para pS2.

TABLA 45.

Tabla de contingencia Tamaño * pS2

		pS2		Total
		Negativa	Positiva	
Tamaño	<=2	Recuento 11	9	20
		% del total 21.2%	17.3%	38.5%
	>2	Recuento 26	6	32
		% del total 50.0%	11.5%	61.5%
Total		Recuento 37	15	52
		% del total 71.2%	28.8%	100.0%

N.S.

Figura 16. Tamaño vs pS2.

Por último, la tabla 46 expresa los datos numéricos correspondientes a la relación entre la densidad vascular establecida sobre los criterios previamente descritos y la positividad de pS2. El análisis de los datos ha permitido demostrar que entre ambas variables no hay asociación estadísticamente significativa.

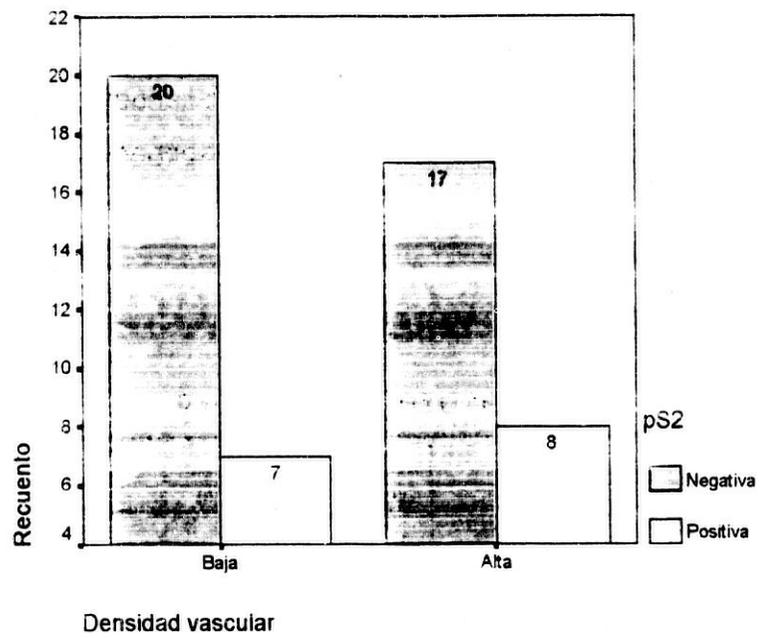
TABLA 46.

Tabla de contingencia Densidad vascular * pS2

			pS2		Total
			Negativa	Positiva	
Densidad vascular	Baja	Recuento	20	7	27
		% del total	38,5%	13,5%	51,9%
	Alta	Recuento	17	8	25
		% del total	32,7%	15,4%	48,1%
Total		Recuento	37	15	52
		% del total	71,2%	28,8%	100,0%

N.S.

Figura 17. Densidad vs pS2.



3. Catepsina D.

Los valores obtenidos para la catepsina D determinados en el citosol tumoral de la totalidad de las pacientes oscilan entre 7,48 y 285,56 pmol/mg de proteína citosólica, con un valor medio de 53,39. Se ha considerado un valor positivo a partir de 35 pmol/mg, estableciéndose éste como punto de corte para la positividad/negatividad del fenotipo catepsina D.

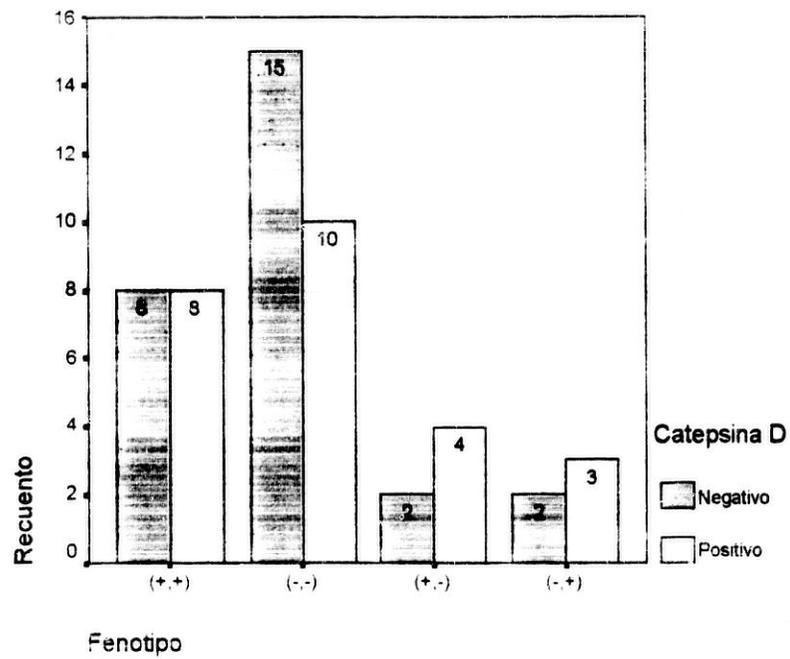
Se ha estudiado la relación entre catepsina D y las variables correspondientes a fenotipo hormonal, estatus hormonal, estadio clínico, grado histológico, tamaño tumoral y densidad vascular, no hallándose en ninguno de los casos asociación significativa. Los resultados se exponen a continuación.

TABLA 47.

Tabla de contingencia Fenotipo * Catepsina D

			Catepsina D		Total
			Negativo	Positivo	
Fenotipo (+,+)	Recuento	8	8	16	
	% del total	15.4%	15.4%	30.8%	
(-,-)	Recuento	15	10	25	
	% del total	28.8%	19.2%	48.1%	
(+,-)	Recuento	2	4	6	
	% del total	3.8%	7.7%	11.5%	
(-,+)	Recuento	2	3	5	
	% del total	3.8%	5.8%	9.5%	
Total	Recuento	27	25	52	
	% del total	51.9%	48.1%	100.0%	

N.S.

Figura 18. Fenotipo vs Catepsina D.

En la tabla 48 se representan los datos numéricos que aparecen tras el análisis estadístico de la relación entre catepsina D y el estatus hormonal. Estos resultados se representan en la figura 19.

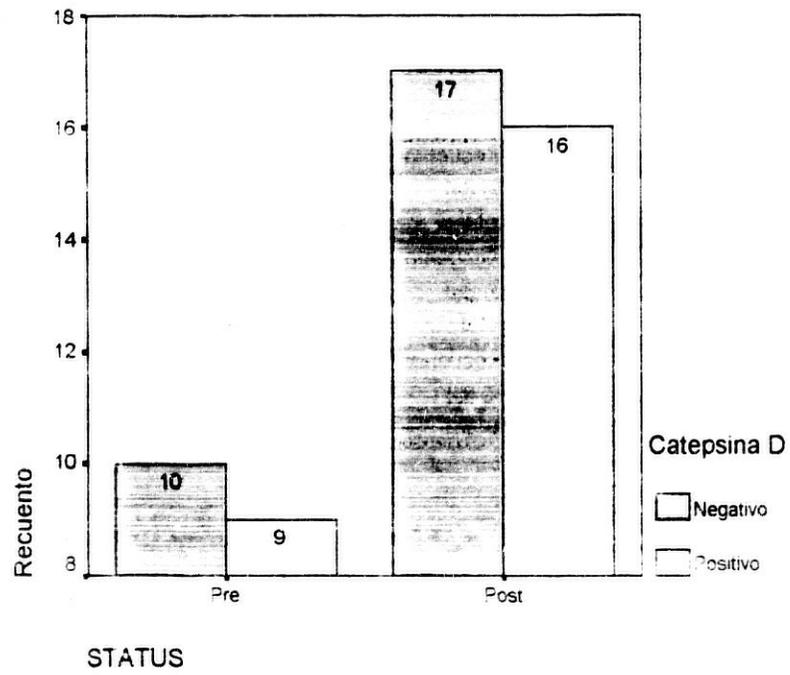
TABLA 48.

Tabla de contingencia STATUS * Catepsina D

			Catepsina D		Total
			Negativo	Positivo	
STATUS	Pre	Recuento	10	9	19
		% del total	19,2%	17,3%	36,5%
	Post	Recuento	17	16	33
		% del total	32,7%	30,8%	63,5%
Total		Recuento	27	25	52
		% del total	51,9%	48,1%	100,0%

N.S.

Figura 19. Status vs catepsina.



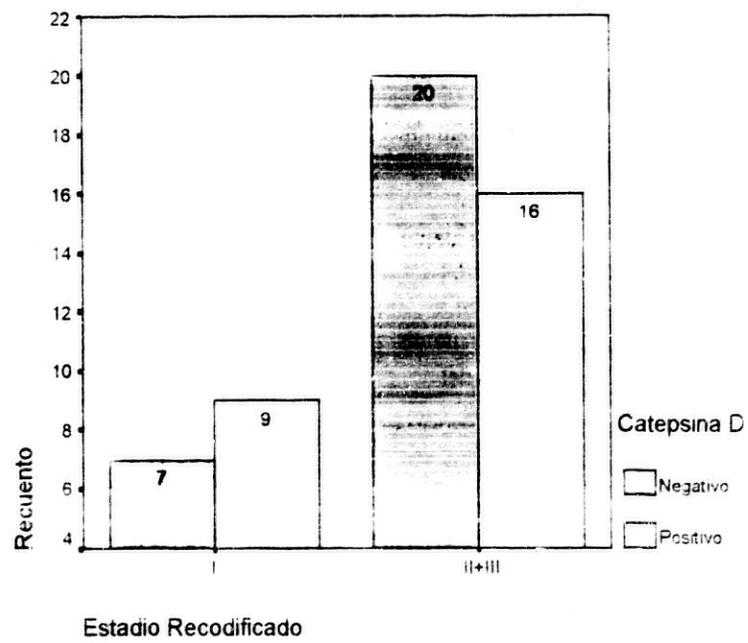
La tabla 49 y la figura 20 muestran los datos obtenidos de la relación entre catepsina D y el estadio clínico.

TABLA 49.

Tabla de contingencia Estadio Recodificado * Catepsina D

		Catepsina D		Total	
		Negativo	Positivo		
Estadio Recodificado	I	Recuento	7	9	16
		% del total	13,5%	17,3%	30,8%
	II+III	Recuento	20	16	36
		% del total	38,5%	30,8%	69,2%
Total		Recuento	27	25	52
		% del total	51,9%	48,1%	100,0%

N.S.

Figura 20. Estadio vs Catepsina D.

Sin alcanzar la significación estadística, la asociación entre catepsina D y el grado de diferenciación histológico merece un análisis más detallado, ya que se observa cierta tendencia a la expresión de la proteína enzimática en tumores de mayor grado (II y III), mientras que es menos frecuente encontrar un fenotipo catepsina D+ en tumores más diferenciados.

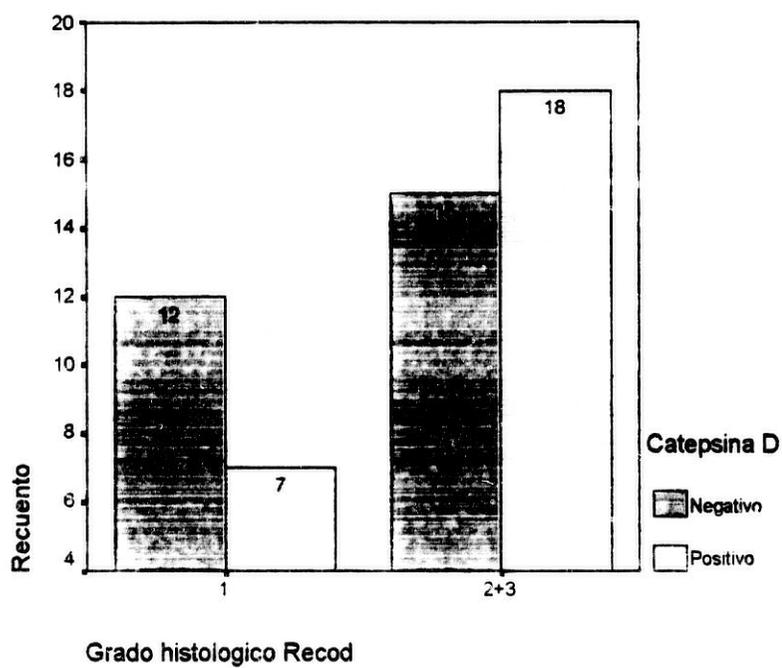
TABLA 50.

Tabla de contingencia Grado histológico Recod * Catepsina D

			Catepsina D		Total
			Negativo	Positivo	
Grado histológico Recod	1	Recuento	12	7	19
		% del total	23,1%	13,5%	36,5%
	2+3	Recuento	15	18	33
		% del total	28,8%	34,6%	63,5%
Total		Recuento	27	25	52
		% del total	51,9%	48,1%	100,0%

N.S.

Figura 21. Grado histológico vs Catepsina.



La tabla 51 representa los datos obtenidos de la asociación entre el tamaño tumoral y catepsina D.

TABLA 51.

Tabla de contingencia Tamaño * Catepsina D

		Catepsina D		Total	
		Negativo	Positivo		
Tamaño	<=2	Recuento	9	11	20
		% del total	17,3%	21,2%	38,5%
	>2	Recuento	18	14	32
		% del total	34,6%	26,9%	61,5%
Total		Recuento	27	25	52
		% del total	51,9%	48,1%	100,0%

N.S.

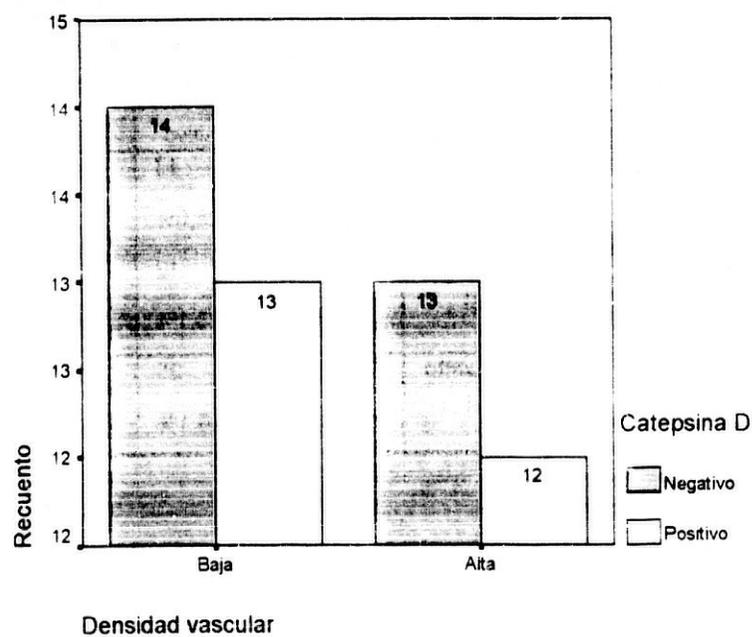
Por último, la tabla 52 muestra los datos numéricos correspondientes a la asociación entre la densidad vascular intratumoral y los niveles de catepsina D. El análisis estadístico ha demostrado la no asociación entre ambas variables.

TABLA 52.

Tabla de contingencia Densidad vascular * Catepsina D

			Catepsina D		Total
			Negativo	Positivo	
Densidad vascular	Baja	Recuento	14	13	27
		% del total	26,9%	25,0%	51,9%
	Alta	Recuento	13	12	25
		% del total	25,0%	23,1%	48,1%
Total		Recuento	27	25	52
		% del total	51,9%	48,1%	100,0%

N.S.

Figura 22. Densidad vs Catepsina D.

4. Activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA).

La determinación cuantitativa de u-PA fue aplicada a la totalidad de los extractos tumorales incluidos en este estudio. Los valores obtenidos para urokinasa (u-PA) oscilan entre 15 y 2625 pg/mg de proteína citosólica, con un valor medio de 468,88 pg/mg. Para el estudio estadístico se ha considerado el dintel de positividad en 100 pg/ml.

Inicialmente, no hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre el activador del plasminógeno tipo urokinasa y el fenotipo hormonal. No obstante, como puede observarse en la tabla y figura correspondiente, existe una fuerte tendencia a la positividad en la determinación de urokinasa en aquellos tumores con fenotipo positivo para el receptor estrogénico y progestagénico, sea éste o no coincidente.

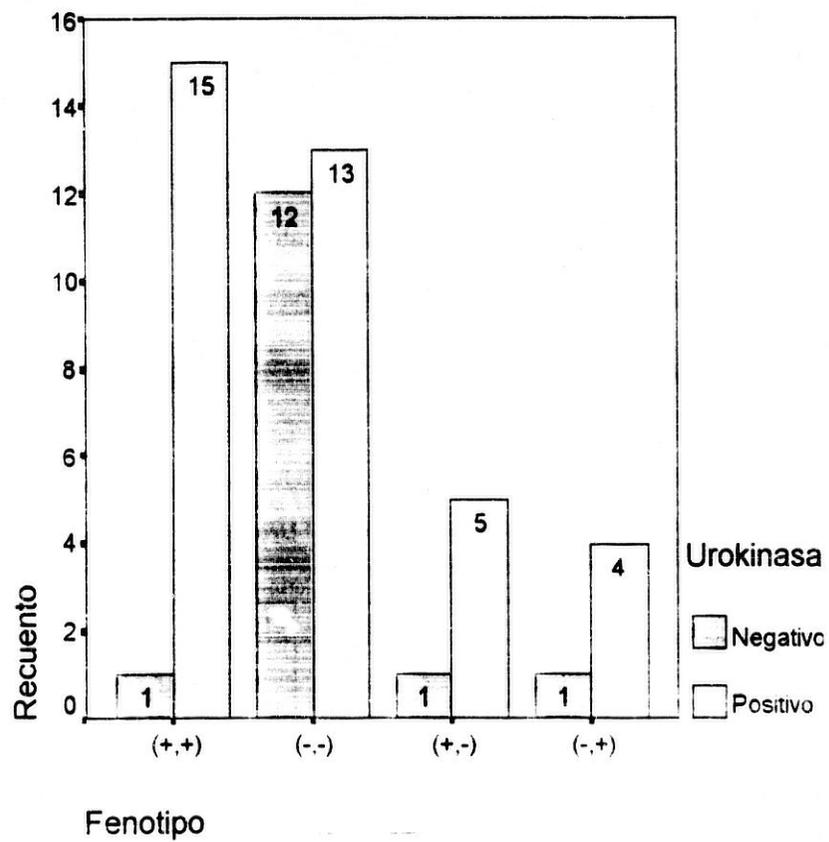
TABLA 53.

Tabla de contingencia Fenotipo * Urokinasa

		Urokinasa		Total
		Negativo	Positivo	
Fenotipo (+,+)	Recuento	1	15	16
	% del total	1,9%	28,8%	30,8%
(-,-)	Recuento	12	13	25
	% del total	23,1%	25,0%	48,1%
(+,-)	Recuento	1	5	6
	% del total	1,9%	9,6%	11,5%
(-,+)	Recuento	1	4	5
	% del total	1,9%	7,7%	9,6%
Total	Recuento	15	37	52
	% del total	28,8%	71,2%	100,0%

N.S.

Figura 23. Fenotipo vs urokinasa.



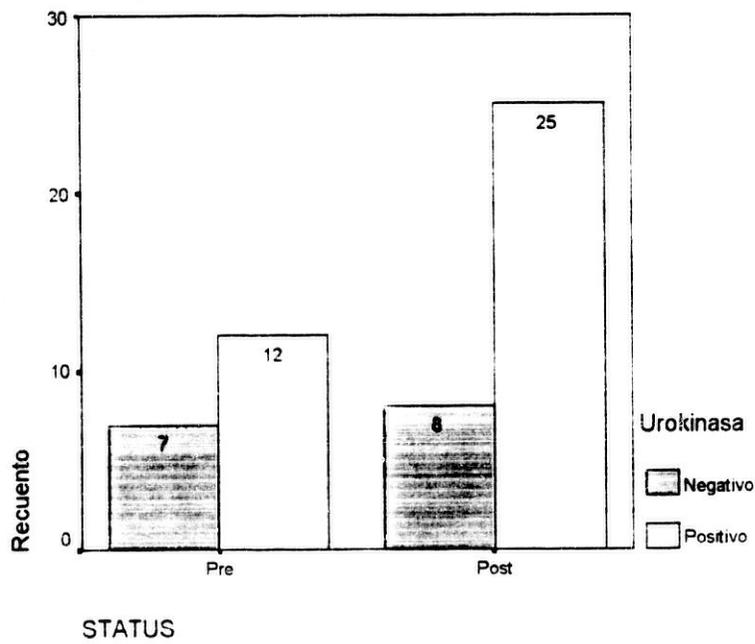
El estudio estadístico entre urokinasa y estatus hormonal no es significativo.

TABLA 54.

Tabla de contingencia STATUS * Urokinasa

			Urokinasa		Total
			Negativo	Positivo	
STATUS	Pre	Recuento	7	12	19
		% del total	13,5%	23,1%	36,5%
	Post	Recuento	8	25	33
		% del total	15,4%	48,1%	63,5%
Total		Recuento	15	37	52
		% del total	28,8%	71,2%	100,0%

N.S.

Figura 24. Status vs Urokinasa.

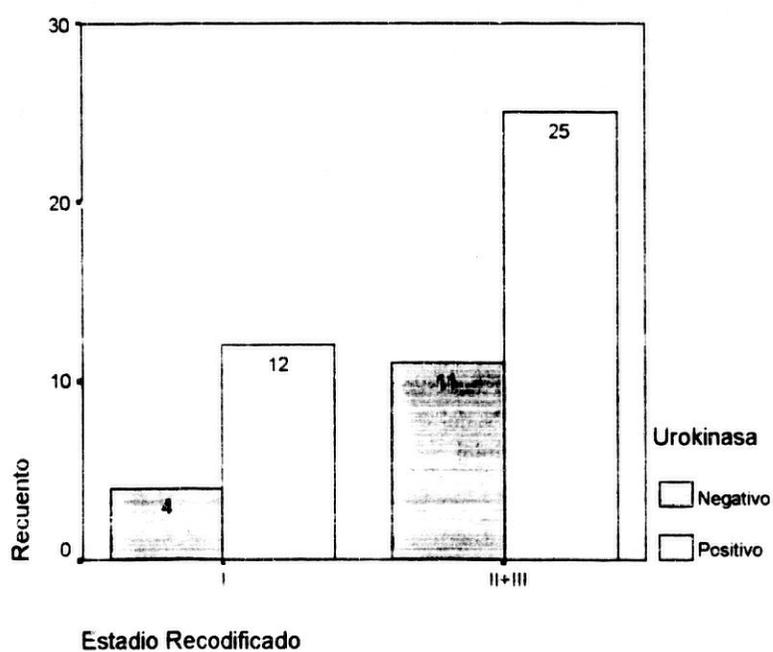
De igual forma, no se ha hallado asociación significativa entre urokinasa y el estadio clínico.

TABLA 55.

Tabla de contingencia Estadio Recodificado * Urokinasa

		Urokinasa		Total
		Negativo	Positivo	
Estadio Recodificado	I	Recuento 4	12	16
		% del total 7,7%	23,1%	30,8%
	II+III	Recuento 11	25	36
		% del total 21,2%	48,1%	69,2%
Total		Recuento 15	37	52
		% del total 28,8%	71,2%	100,0%

N.S.

Figura 25. Estadio vs Urokinasa.

El tamaño tumoral tampoco ha resultado estadísticamente significativo en relación al activador del plasminógeno tipo urokinasa, si bien existe un predominio de valores elevados de urokinasa en tamaños tumorales más grandes (>2 cm).

TABLA 56.

Estadísticos del grupo

	Tamaño	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
UPA_II	>= 2,00	37	513,8208	629,8651	103,5492
	< 2,00	15	358,0527	288,1103	74,3898

N.S

De nuevo, en la búsqueda de la posible asociación entre la expresión de u-PA y otras variables de orden histológico, es interesante resaltar que sin haber encontrado una asociación significativa desde el punto de vista estadístico, lo cierto es que la densidad vascular baja se presenta fundamentalmente en tumores que no expresan esta proteasa.

TABLA 57.

Tabla de contingencia densidad * Urokinasa

	Urokinasa		Total
	Negativo	Positivo	
Densidad Baja	22	5	27
Recuento %del total	42,3%	9,6%	51,9%
Densidad Alta	10	15	25
Recuento %del total	19,2%	28,8%	48,1%
Total	32	20	52
Recuento %del total	61,5%	38,4%	100%

N.S.

Finalmente, la tendencia observada en la asociación expresión de u-PA y densidad vascular se convierte en estadísticamente significativa ($p < 0,05$) cuando la correlación buscada enfrenta el fenotipo del enzima con la existencia de necrosis intratumoral: cuatro de cada cinco tumores que no presentan necrosis tampoco expresan u-PA, y a la inversa, por cada seis tumores con alto grado de necrosis tan solo uno es negativo para la expresión de u-PA.

TABLA 58.

Tabla de contingencia Necrosis intratumoral * Urokinasa

Necrosis	Urokinasa		Total
	Negativo	Positivo	
No	23	5	28
Recuento %del total	44,2%	9,6%	53,8%
Minima	9	9	18
Recuento %del total	17,3%	17,3%	34,6%
Extensa	1	5	6
Recuento %del total	1,9%	9,6%	11,5%
Total	33	19	52
Recuento %del total	63,4%	36,5%	100%

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

Se están realizando, en la actualidad, multitud de estudios con objeto de definir factores pronósticos en el cáncer de mama. La razón fundamental de estas investigaciones consiste en poder predecir "a priori" qué pacientes van a presentar mayor riesgo de recidiva tumoral tras el tratamiento quirúrgico y/o sistémico inicial, mediante indicadores que permitan instaurar una terapéutica preventiva.

Estos factores pronósticos pueden ser clasificados en diversas categorías (NIH, 1991). Aquellos factores que pueden ser considerados "a priori" factores indicativos del pronóstico y/o orientativos de una terapéutica concreta se incluyen en la categoría I, y pueden ser recomendados para su uso rutinario en la clínica. La categoría II engloba a aquellos factores pronósticos de uso potencial, pendientes de ser confirmados con estudios posteriores. Por último, a la categoría III pertenecerían aquellos factores para los que no existen aún suficientes estudios de validación.

No es de extrañar que este esfuerzo investigador haya conducido a la definición, con mayor o menor éxito, de múltiples factores en relación al pronóstico en el cáncer de mama, entre los que cabe destacar la expresión de oncogenes (sobre todo p53 y c-erB-2), los marcadores de proliferación celular (tanto inmunohistoquímicos como por citometría de flujo) y, de modo más reciente, la expresión cuantitativa de la neovascularización en el seno del tumor (Fernández, 1997).

El objetivo fundamental del presente trabajo se encuadra dentro de esta tendencia investigadora y ha consistido en la búsqueda de diferencias, a veces sutiles, entre las pacientes con cáncer de mama incluidas en el estudio, en relación a numerosas variables: características de la serie clínica, datos

histológicos del tumor, determinaciones bioquímicas en citosoles de células tumorales. Todo ello dirigido, como ya se ha comentado antes, a identificar determinados subgrupos de pacientes con características diferenciales, que puedan gozar del beneficio de nuevas terapéuticas o de tratamientos específicos. En este sentido, se ha realizado una especial atención al estudio de la angiogénesis intratumoral, tal y como se proponía en los objetivos.

Aunque en más de la mitad de los cánceres de mama se consiguen elevadas cifras de supervivencia utilizando los tratamientos disponibles (cirugía, quimioterapia y radioterapia), existen actualmente líneas de investigación que despiertan nuevas esperanzas y que auguran un aumento en los porcentajes de supervivencia. Entre estas nuevas modalidades terapéuticas se encuentra el estudio de fármacos antiangiogénicos.

La serie analizada en este trabajo incluye a 52 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y tratada quirúrgicamente en el Hospital Torrecárdenas durante un periodo de dos años (Abril 1996- Abril 1998). En principio, nuestro objetivo es realizar un estudio transversal de nuestra casuística de cáncer de mama, para poder sentar diferencias en torno a diversas variables tanto clínicas, como histológicas y bioquímicas, de los tumores mamarios. El seguimiento posterior de estas pacientes nos permitirá recoger nueva información de la evolución en el comportamiento tumoral, tras el tratamiento recibido y establecer el valor predictivo de las variables consideradas.

El tamaño muestral puede ser considerado inicialmente pequeño en relación a otras series estudiadas, aunque es preciso recordar que responde a nuestra casuística de cáncer de mama en el periodo estudiado, y que nuestra intención es continuar este estudio de forma prospectiva con el seguimiento de las pacientes que componen la serie clínica. De hecho, el protocolo diagnóstico y la caracterización tumoral establecida por este trabajo se continua aplicando

a pacientes reclutadas para un estudio de seguimiento que dará su fruto en unos años. Además, es interesante recordar, tal y como se exponía en la sección de *Material y Métodos*, que este estudio se encuadra en otro mayor, cooperativo, establecido en tres hospitales de Andalucía Oriental, que tiene por objeto el análisis de factores etiológicos en cáncer de mama. Es entendible que el seguimiento coordinado de más de 300 pacientes colectadas entre los tres hospitales y su ubicación bajo protocolos comunes permitirá contar en buena parte con la casuística apropiada para un estudio de mayor envergadura.

La media de edad de las pacientes es de 55,98 años, con un rango comprendido entre 30 y 71 años existiendo un predominio de las pacientes postmenopáusicas (63,46%), aunque la serie clínica presenta un modelo bifásico de presentación, fenómeno observado por otros autores (Nieto, 1998). De esta manera se han definido dos rangos de edad en cuanto a la presentación clínica de los tumores mamarios estudiados. El primer rango correspondería a edades tempranas, pacientes premenopáusicas y se sitúa en torno a los 40 años, mientras que el segundo máximo corresponde al periodo postmenopáusico que aparece en un periodo más tardío, entre los 55 y 65 años.

La mayoría de las pacientes han sido diagnosticadas en estadio II de la enfermedad tumoral, seguido del estadio I y cabe destacar un caso de carcinoma in situ. En este sentido, es interesante comentar que nuestras pacientes han sido diagnosticadas en su mayoría en estadios precoces de la enfermedad y que, por tanto, los índices de supervivencia a largo plazo han de ser superiores. Este hecho puede estar favorecido por la aplicación desde el año 1995 del sistema de screening o sistema de detección precoz del cáncer de mama en nuestra provincia. La eficacia de este sistema está ampliamente demostrado en la detección precoz de tumores de pequeño tamaño en mujeres mayores de 50 años (Séguret, 1995). La tasa de detección de tumores pequeños en edades comprendidas entre 40 y 49 años es menor. Este hecho se explica por la mayor

radiodensidad del parénquima mamario en las pacientes jóvenes (Brisson, 1992) y también por el mayor crecimiento tumoral en estas edades (Kuroishi, 1990). Nuestro estudio ha venido a corroborar estos hechos. El diagnóstico de la enfermedad en estadios precoces lleva implícito el descubrimiento de tumores de menor tamaño. En nuestra serie, el tamaño medio tumoral es de 2,7 cm, pero hemos hallado una relación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral y la edad de las pacientes, de tal forma que edades más avanzadas se correlacionan con tamaños tumorales más pequeños, en muchos casos inferiores a 2 cm.

No hemos hallado una relación significativa entre el estadio clínico de la enfermedad y el estatus hormonal. Del mismo modo, la edad de las pacientes no ha resultado estadísticamente significativa con respecto al estadio clínico, de tal manera que enfermas de cualquier edad pueden encuadrarse en cualquier estadio clínico, sin que haya una distribución preferente para una edad o un estatus hormonal determinado (pre o postmenopausia). Este hecho conlleva al planteamiento de que el desarrollo de la enfermedad tumoral mamaria pudiera estar dirigido por factores de orden biológico que permiten diferenciar tumores mamarios de diferente origen y/o evolución clínica.

Basándonos en estos fundamentos, podemos afirmar que la caracterización biológica de los tumores mamarios está íntimamente relacionada con la fisiología de la enferma portadora de la lesión tumoral. Por tanto, todas las variables biológica, clínicas, histológicas y bioquímicas, constituyen una entidad única que es reflejo del comportamiento de un tumor en concreto (Menard, 1994).

Es conocido el efecto de la edad en el pronóstico del cáncer de mama; así, las pacientes más jóvenes presentan peor pronóstico que aquellas de mayor edad (Vanlemmens, 1998). Por tanto los tumores en edades más tempranas son

más agresivos. Este hecho conocido estaría relacionado con un complejo sistema de homeostasis en el que interaccionan diversos factores, procedentes del propio tumor y del huésped en el que asientan. El concepto de agresividad tumoral o capacidad de crecimiento e invasividad responde a una secuencia de hechos, donde están implicadas numerosas variables, como los receptores hormonales, los oncogenes, los factores de crecimiento y sus receptores (Bland, 1992; Osborne, 1992). Todo ello se complica más aún, si pensamos que dentro del mismo tumor existen diversas subpoblaciones de células malignas que presentan características intrínsecas diferentes en relación a la capacidad de crecimiento y diseminación a distancia (Fidler, 1993), y que definen la característica "heterogeneidad tumoral" responsable de la resistencia a diferentes modalidades terapéuticas.

El grado histológico de Bloom Richardson del tumor se ha establecido en el presente estudio como variable estadísticamente significativa con respecto al tamaño tumoral, de forma que los tumores bien diferenciados (grado I) presentan un tamaño medio menor de 2 cm, a diferencia de los tumores con menor diferenciación (grados II y III) en los que se ha hallado un valor medio mayor de 2 cm (este valor aumenta con el grado de indiferenciación).

Basándonos en estos resultados, podemos afirmar que el tamaño del tumor se correlaciona inversamente con la edad de la paciente, y de forma paralela al grado de diferenciación histológica. Por tanto, a edades más avanzadas cabe esperar tamaños tumorales menores con un mayor grado de diferenciación y fenómenos que pudieran explicar la mayor supervivencia y mejor evolución de estas pacientes.

Otro dato a destacar es el predominio de pacientes sin alteraciones en la piel y el pezón, sin presencia de multicentricidad tumoral en la mama, y, con bordes de resección libres de tumor, todo ello compatible con la mayor frecuencia

de diagnósticos en estadios precoces de la enfermedad.

El tipo histológico predominante ha sido el carcinoma ductal infiltrante que corresponde al 90% de los tumores analizados. Este dato coincide con amplias series de tumores mamarios (Berg, 1995).

Aunque la distribución de la frecuencia de presencia de necrosis intratumoral (clasificada como ausente, mínima y extensa) es homogénea dentro de los tumores estudiados, existe una marcada relación significativa tras aplicar el test estadístico con el estadio clínico y, por tanto, con la afectación ganglionar axilar. Los resultados hallados revelan el predominio en el estadio I de tumores en los que no se ha objetivado la existencia de necrosis intratumoral -pacientes con ganglios negativos-, así como la totalidad de tumores con necrosis extensa en los estadios II y III -pacientes con ganglios positivos-. La asociación de la necrosis intratumoral con la velocidad de crecimiento tumoral y la diseminación linfática y hematógena, ha sido constatada por diversos autores (Carter, 1978; Leis, 1990; Ackerman, 1995).

Asimismo, el estudio histológico de las piezas tumorales ha mostrado que tanto la calcificación intratumoral como la invasión vascular y perineural, han sido un fenómeno de presentación poco frecuente. Además, tampoco hemos hallado una significación estadística entre estas variables histológicas con el tamaño del tumor y la presencia de ganglios positivos, a pesar de que la invasión vascular y perineural por las células malignas han sido consideradas como factores de agresividad tumoral (Leis, 1990).

De igual modo, han sido más frecuentes los tumores que han presentado menos del 25% de componente in situ, sin hallar relación significativa con el tamaño tumoral, ni con la presencia de ganglios axilares positivos.

Sin embargo, el análisis estadístico que relaciona la presencia de ganglios axilares positivos con el tamaño tumoral, ha sido significativo. Como ya afirman numerosos autores, el tamaño tumoral es considerado como un factor pronóstico independiente en el cáncer de mama, en tanto en cuanto, es un indicador de la probabilidad de metástasis ganglionares axilares (Leis, 1990; Horak, 1992; Gasparini, 1994) y de recurrencia de la enfermedad tras el tratamiento instaurado (Gasparini, 1994). Fisher, en 1969, estableció una relación inversa entre el tamaño del tumor y la supervivencia global, confirmándose posteriormente por otros autores (Horak, 1992).

Un dato a destacar en los resultados obtenidos es la relación hallada entre el tamaño tumoral histológico y la densidad vascular intratumoral. Hemos obtenido significación estadística al asociar estas dos variables, de forma tal que los tumores de mayor tamaño presentan cifras más elevadas de microvasos dentro del tumor. Sin embargo, el grado histológico no ha resultado significativo con respecto a la densidad vascular intratumoral, si bien se puede apreciar un aumento de ésta conforme avanzamos en el grado histológico

Angiogénesis y neovascularización.

El concepto de neovascularización o angiogénesis en el cáncer de mama ya ha sido descrito en el apartado de *Introducción* de este trabajo. La formación de neovasos a partir de vasos sanguíneos ya existentes en el seno del tumor, contribuye al crecimiento tumoral y a su diseminación. Por tanto, es de esperar que aquellos tumores con mayor densidad de microvasos presenten una mayor capacidad de crecimiento que se traducirá en un tamaño tumoral mayor. A este respecto, son numerosos los trabajos publicados que intentan establecer la asociación entre las observaciones histológicas y la supervivencia de las pacientes portadoras de estos tumores.

Gasparini y cols. en un estudio realizado sobre un total de 254 pacientes sugiere el valor predictivo de la densidad vascular intratumoral en lo referente a la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. Una de las conclusiones más importantes de este estudio ha consistido en demostrar que tanto el tamaño del tumor como la densidad vascular intratumoral son factores pronósticos independientes para la recurrencia de la enfermedad, y pueden ser utilizados en la selección de pacientes de alto riesgo que puedan beneficiarse de nuevas estrategias terapéuticas (Gasparini, 1994). Estas conclusiones han sido reafirmadas posteriormente por otros autores (Weidner, 1998).

Este planteamiento está dirigido fundamentalmente a aquellas pacientes diagnosticadas y tratadas de cáncer de mama que no presentan diseminación axilar (ganglios negativos). Se estima que aproximadamente entre el 20 y el 30 % de este grupo de pacientes desarrollarán recurrencia de la enfermedad a los 10 años del tratamiento inicial. Sin embargo, no todas las pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos son subsidiarias de nuevas terapéuticas adyuvantes, puesto que estaríamos sometiendo a un tratamiento innecesario al 70-80 % de pacientes que no van a desarrollar recidiva tumoral. Por este motivo, es necesario individualizar la necesidad de estos planteamientos terapéuticos, que suponen un considerable coste y morbilidad para la paciente, encaminando la líneas de investigación en la búsqueda nuevos factores pronósticos, predictivos de la recurrencia de la enfermedad en este subgrupo de pacientes con ganglios negativos. En este sentido, el estudio de la densidad vascular intratumoral en el cáncer de mama puede ser la clave para identificar a estas pacientes. De hecho, un 40 % de las pacientes incluidas en este estudio no presentaron diseminación axilar en el momento del diagnóstico. Esto supone que un grupo importante de nuevos diagnósticos corresponde a pacientes en las que la decisión terapéutica postquirúrgica no es fácil, o al menos, no está estandarizada con la firmeza que lo está en estadios más avanzados de la enfermedad tumoral. Cualquier esfuerzo de investigación en torno a la búsqueda

de factores que identifiquen mayor riesgo de recidiva sería bien recibido en nuestro medio.

En este sentido, parece ser que el estudio de la angiogénesis tumoral puede aportarnos una valiosa información acerca de la evolución clínica de los tumores, englobada dentro de la acepción "caracterización tumoral". Las primeras investigaciones acerca del valor del proceso de angiogénesis en los tumores fueron realizadas por Folkman en la década de los 70. Posteriormente, fue Weidner en 1991, el primer autor que demostró que el recuento del número de microvasos en el tumor de mama estaba asociado con el riesgo de metástasis, en un estudio realizado sobre 49 pacientes (Weidner, 1991). Este hallazgo fue confirmado por otras publicaciones, donde se reafirmaba el valor pronóstico de la densidad vascular en el cáncer de mama (Weidner, 1992; Visscher, 1993, Weidner, 1998, Gasparini, 1998).

Más recientemente, en un estudio sobre 100 pacientes con cáncer de mama se ha determinado el valor pronóstico de las siguientes variables: edad, tamaño tumoral, ganglios axilares, receptores de estrógenos, p53, C-erB2, fracción de fase S y densidad de microvasos. En general, los resultados de estos trabajos concluyen que el estado ganglionar axilar y la densidad vascular son factores pronósticos independientes para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. Además, de nuevo se incide en la importancia de la densidad de microvasos intratumor en el grupo de las pacientes con ganglios negativos (Narita, 1998).

A pesar de la utilidad en la implementación de estas técnicas se hace necesario el definir protocolos de aplicación y el unificar el método de tinción vascular, y la técnica de recuento vascular. Así, como marcador vascular se han usado el factor VIII, CD31 o CD34. El sistema de medición de microvasos tampoco es homogéneo, ya que hay autores que emplean campos de 200

aumentos, otros utilizan campos de 400 aumentos y otros que miden campos a pequeño aumento (Fernández, 1997). Todos estos problemas técnicos llevaron a Gasparini y Harris a definir los criterios que deben ser empleados para el recuento de microvasos (Gasparini, 1995), los cuales han sido aplicados rigurosamente en el presente trabajo.

Criterios de medición de vasos en el cáncer de mama.

Usar un marcador endotelial adecuado (factor VIII o CD31).

Elegir las áreas más vascularizadas a pequeño aumento (hotspot vascular).

Considerar como vaso toda estructura teñida con el marcador, aunque no tenga luz (contar como vasos los cordones sólidos).

Realizar el recuento en campos de 0,74 mm².

El recuento debe realizarse por dos investigadores de modo simultáneo.

Nuestro estudio cumple con los criterios enunciados, habiéndose elegido una opción determinada cuando el protocolo lo presente. Así por ejemplo, hemos utilizado como marcador el factor VIII en lugar del anticuerpo monoclonal CD31 que también destaca por su gran especificidad por las células endoteliales (Horak, 1992; Gasparini, 1994).

La aplicación del protocolo experimental y la revisión exhaustiva de las inclusiones histológicas nos ha servido para determinar con precisión las características de la distribución de la vascularización en cada espécimen tumoral. Un valor medio de 30 microvasos por cada diez campos de observación es una buena apreciación del nivel de vascularización estándar de los tumores. No obstante, la dispersión encontrada es amplia ya que cubre un rango entre 20 y 100 microvasos por unidad de medida. Esto nos ha llevado a establecer un valor arbitrario límite entre una vascularización pobre (<25 microvasos/10 campos) y una considerable densidad vascular (>25 microvasos/10 campos). Con

este criterio clasificatorio, algo más de la mitad de los casos se agrupan en "densidad vascular baja", y el resto en alta densidad vascular.

Cuando se ha intentado asociar el grado de densidad vascular con otras variables histológicas y características del tumor, nuestro estudio ha servido para identificar que este fenómeno de neoformación es mayor en tumores más grandes y de una mayor indiferenciación. A pesar de lo atractivo de tal observación y de las implicaciones en la biología tumoral, lo cierto es que cualquier interpretación podría caer en la especulación ya que no podríamos afirmar qué mecanismo es causa y cuál consecuencia en el proceso de crecimiento tumoral.

Existen numerosas argumentaciones en torno al proceso de angiogénesis como determinante en cierta medida de la agresividad tumoral en el cáncer de mama. En este sentido, el grado de actividad angiogénica del tumor, que se traduce en la densidad de microvasos neoformados, va a favorecer el crecimiento del tumor y la diseminación a distancia de clones celulares dotados, así mismo, de un determinado potencial angiogénico que les va a permitir la proliferación en estas localizaciones secundarias (Weidner, 1998).

Por tanto, y basándonos en este planteamiento, aquellos tumores con mayor capacidad para neoformar vasos (mayor densidad vascular) presentarán un tamaño tumoral más grande. Esta afirmación se corresponde con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, cabe una reflexión en relación a este tema. La angiogénesis es un factor necesario aunque no suficiente para la recurrencia de la enfermedad y/o su diseminación. Las células tumorales deben proliferar en el estroma, penetrar en los vasos sanguíneos, sobrevivir y escapar del sistema inmune, y crecer en los tejidos a distancia. Se trata, pues, de un proceso secuencial en el que concurren multitud de factores, y uno de ellos es la densidad vascular intratumoral.

Conviene recordar que el presente trabajo ha consistido en un estudio preliminar, descriptivo y transversal en el tiempo, de la casuística de cáncer de mama en nuestro hospital durante un periodo de dos años. Hemos tratado de esbozar estas líneas de investigación en relación a la angiogénesis, quedando como objetivo final el seguimiento de las pacientes incluidas con objeto de evaluar el peso de estos factores en la predicción de la evolución natural de la enfermedad y la respuesta a tratamientos particulares.

Otro aspecto muy interesante es el estudio de la enfermedad tumoral mamaria dentro del contexto de una afectación sistémica hormonal, entendida como un fracaso de la homeostasis hormonal que ocasiona el cuadro tumoral maligno. A este respecto, es conocido el diferente comportamiento clínico de los tumores hormonodependientes. Estudios recientes muestran que el comportamiento de los tumores RE negativo es similar al esperado por cualquier otro tipo de tumor no hormonodependiente desarrollado en cualquier órgano (Basso, 1998). Por el contrario, los tumores hormonodependientes presentan una serie de características que los hacen diferentes en su comportamiento biológico.

Marcadores de hormonodependencia.

En el conjunto de los indicadores de la actividad biológica del carcinoma de mama, ocupan un lugar destacado el estado de los receptores para las dos hormonas esteroideas femeninas: estrógenos y progesterona. Como ya conocemos, los receptores hormonales corresponden a macromoléculas proteicas con capacidad específica de interacción química con las hormonas esteroideas, estrógenos y progesterona. Los carcinomas de mama pueden

expresar estos receptores con gran variabilidad. Hasta el momento, no ha sido posible establecer una relación constante en la expresión de positividad o negatividad. Aproximadamente un 41% de los casos es RE+ RP+, un 38% RE- RP-, un 17% RE+ RP-, y un 4% RE- RP+ en las grandes series documentadas. A este dato se añade el hecho de que la positividad puede ser considerada como una variable cuantitativa en cada caso, con lo cual se hace aún más difícil establecer un patrón de receptores que pueda alcanzar valor pronóstico (Sánchez, 1995).

En nuestra serie, el fenotipo receptor hormonal presenta una distribución paralela a la anteriormente expuesta: 30,8% RE+ RP+, 48,1% RE- RP-, 11,5% RE+ RP- y 9,6% RE- RP+.

Es interesante comentar esta distribución de fenotipo receptor en relación con el estatus hormonal, ya que si bien el fenotipo negativo para ambos receptores, estrógenos y progesterona, parece presentar una distribución muy homogénea en la frecuencia de presentación en pacientes pre y postmenopáusicas no ocurre lo mismo cuando aparecen las combinaciones RE+ RP+, RE- RP+ y RE+ RP-. En principio hemos observado la elevada proporción de pacientes postmenopáusicas con tumores fenotipo RE+ RP+; en segundo lugar el fenotipo RE- RP+ es más frecuente en pacientes premenopáusicas en las que existen niveles considerables de estrógenos circulantes, lo cual impide que los receptores de estrógenos pueden ser cuantificados en el ensayo debido a su compartimentalización y atrapamiento a nivel nuclear. En esta situación hemos hallado un 7,7% de pacientes premenopáusicas frente a 1,9% de pacientes postmenopáusicas. La tercera situación, fenotipo RE+ RP-, se encuentra más frecuentemente en las enfermas postmenopáusicas, y es indicativo de la disponibilidad de receptor estrogénico, pero que ante la ausencia de hormona circulante es incapaz de provocar la síntesis del receptor de progesterona. Esta afirmación es antiguamente conocida y ha sido demostrada

en series amplias (Nieto, 1998).

De otra parte, el fenotipo receptor negativo prevalece en los estadios II y III (en pacientes con afectación ganglionar axilar), aunque tal asociación no ha encontrado apoyo estadístico. Similares resultados fueron publicados por el Centro de Patología de la Mama de Madrid en 1991, donde tras analizar 351 carcinomas de mama no hallaron correlación estadística entre el estado de los receptores hormonales y la presencia de metástasis ganglionares axilares (Sánchez, 1995).

Es posible profundizar algo más en el conocimiento de la hormonodependencia tumoral analizando los datos obtenidos al determinar la presencia y la concentración de la proteína pS2 en el citosol tumoral. La expresión de pS2 ha sido propuesta como una demostración de la continuidad de acontecimientos que se originan con la aparición del receptor estrogénico y su funcionalidad. La proteína pS2 es expresó en un 30,76% de las pacientes con valores por encima del límite considerado como normal. La positividad de los valores de pS2 fue independiente del estatus hormonal, el grado histológico, el tamaño tumoral y la densidad vascular intratumoral. No obstante, hemos hallado una importante correlación entre el fenotipo receptor hormonal negativo (RE- RP-) y pS2 menor de 11 ng/mg de proteína citosólica. Estos hallazgos son similares a los obtenidos recientemente por otros autores ($p < 0,001$) (Nieto, 1998) y vienen a confirmar la relación existente entre el complejo fenotipo hormonal y la expresión de pS2. No es por tanto casual que se haya asignado recientemente un importante valor biológico al conjunto fenotipo receptor/pS2, de tal manera que en la actualidad se puede hablar de tumores de bajo potencial de malignidad cuando se expresan los tres responsables de dependencia hormonal y de tumores de alto potencial de malignidad cuando RE, RP y pS2 son negativos (Ioakim-Lioszi, 1997).

También se ha encontrado una asociación significativa entre el grupo de estadios II+III (utilizado para el análisis estadístico) y la expresión negativa de pS2 (< 11 ng/mg de proteína citosólica). Esta relación se puede expresar también como la tendencia de pS2 hacia la negatividad en presencia de afectación ganglionar axilar, y finalmente en términos de recurrencia de la enfermedad y de supervivencia. En efecto, publicaciones recientes consolidan el valor pronóstico de la expresión de pS2 en la supervivencia global en el cáncer de mama y en la respuesta al tratamiento con tamoxifeno (Fulco, 1998). En un estudio efectuado por Thompson y col (Thompson, 1998) sobre un total de 90 pacientes tratadas de cáncer de mama con un seguimiento de 83 meses, se establece la combinación del estatus ganglionar axilar y la expresión de pS2 como factor predictivo de la supervivencia, de forma tal que aquellas pacientes ganglios negativos y pS2 positiva sobreviven en su totalidad a los 6 años del seguimiento, a diferencia de aquellas pacientes ganglios positivos y pS2 negativa en las que la mortalidad a los 6 años fue del 41%.

Con todo ello, se confirma el origen hormonal de ciertos tumores mamarios y su dependencia estrogénica en el crecimiento. En las células mamarias, la inducción de pS2 es debida específicamente a los estrógenos; por tanto, su positividad se asocia generalmente a la existencia de receptores de estrógenos, y permite distinguir un subgrupo de pacientes con receptores hormonales positivos que tienen un pronóstico significativamente mejor que los no productores de pS2. Además, estudios recientes defienden la hipótesis de que la positividad de pS2 está asociada a la positividad del receptor de progesterona, y puede ser un marcador de la funcionalidad de los receptores de estrógenos (Ardavanis, 1997). En definitiva, es posible que nos encontremos ante tumores en los que la secuencia de acontecimientos moleculares de dependencia hormonal está conservada, y, por tanto, que las pacientes portadoras de este tipo de tumores puedan beneficiarse de una terapia hormonal específica, además de ser portadoras de un mejor pronóstico.

Por último, la densidad vascular intratumoral no se ha relacionado estadísticamente con el fenotipo receptor hormonal, si bien hemos hallado una mayor correspondencia entre densidad baja y fenotipo positivo, y densidad alta y fenotipo negativo.

Diseminación tumoral.

Otro aspecto muy interesante de la discusión se centra en la determinación de posibles factores predictivos de la diseminación sistémica del cáncer de mama, siendo obligado destacar el rol de las diferentes proteasas que favorecen el crecimiento tumoral, entre las que destacan la catepsina y el activador del plasminógeno tipo urokinasa, que han sido objeto de nuestro estudio en la serie tumoral analizada.

El clásico concepto halstediano del cáncer de mama como enfermedad local limitada a la mama está actualmente en desuso, siendo sustituido por la teoría cada vez más arraigada de enfermedad sistémica, avalada a su vez, por el fracaso de la homeostasis hormonal de importancia capital en algunos casos, que ya hemos comentado anteriormente.

Bajo este concepto, la diseminación tumoral como una realidad potencial para cualquier enferma diagnosticada de cáncer de mama limita el control tumoral determinado por el tratamiento local, cuestionando el abordaje radical de la enfermedad en la mama. Por otro lado, obliga a pensar en la instauración de terapéuticas regionales y sistémicas, y finalmente, reclama la necesidad de definir marcadores de extensión que puedan conducir al clínico en su decisión (Fisher, 1993).

Recordamos nuevamente que tanto la catepsina D como la urokinasa son

proteasas involucradas en la diseminación linfática y vascular del cáncer de mama. Son producidas por las células tumorales en respuesta a múltiples estímulos hasta el momento no bien conocidos, y producen la degradación del tejido estromal circundante al tumor. Este proceso de invasión de la matriz extracelular lleva implícito la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes, fenómeno conocido con el nombre de angiogénesis o neovascularización, que ya ha sido comentado con anterioridad.

En nuestro estudio, la catepsina D, positiva en el 48% de los casos con un dintel de positividad establecido en 35 pmol/mg, no ha sido relacionada con ninguna de las variables clínicas, histológicas y bioquímicas analizadas. La ausencia de correlación entre catepsina D y el estatus hormonal (Isola, 1993), los receptores hormonales (Winstanley, 1993) y el tamaño tumoral (Pujol, 1993), ha sido descrita por varios autores.

Algunos estudios han señalado la posible relación entre la catepsina D y la presencia de receptores estrogénicos positivos (Duffy, 1992). Esto puede ser explicado debido a que, en las células normales y en los tumores hormonosensibles, la síntesis de esta proteasa está regulada por los estrógenos, a diferencia de los cánceres hormono-independientes en los que existe una producción no controlada (Leto, 1992). No obstante, tal asociación parece ser más evidente en cultivos celulares *in vitro* que en la realidad clínica tumoral.

Aunque está confirmado el papel de esta proteasa en la diseminación tumoral a través de la destrucción de la arquitectura tisular normal, su valor como factor pronóstico en el cáncer de mama ha sido recientemente cuestionado (Losch, 1998). A pesar de estos planteamientos, hay autores que mantienen que los niveles altos de catepsina D constituyen un factor predictor de la recurrencia en el cáncer de mama (Fulco, 1998), y más aun, podría ser utilizado como marcador de mal pronóstico en el grupo de pacientes ganglios negativos

(Gohring, 1996). La utilización de las tablas de datos incluidas en este trabajo permitirán evaluar tales posibilidades cuando el tiempo transcurrido permita hacer un estudio retrospectivo.

Está ampliamente constatada por la literatura científica la importancia de la angiogénesis en gran variedad de tumores sólidos, especialmente en el cáncer de mama, donde ha sido definido como factor pronóstico independiente (Weidner, 1998; Gasparini, 1998). De otra parte, también está sobradamente confirmada el papel del activador del plasminógeno tipo urokinasa, perteneciente al sistema de la fibrinólisis, como un potente factor de neovascularización (Rabbani, 1998).

Es muy sugerente el papel asignado al complejo activador del plasminógeno tipo urokinasa en las neoplasias mamarias. Recientemente, se ha identificado el efecto regulador que ejerce el sistema hormonal sobre la expresión de u-PA. Así lo demuestra un estudio realizado por Levenson, en el que se observa un efecto inhibitor del estradiol sobre la expresión y liberación de u-PA en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) (Levenson, 1998). Estos hallazgos pueden confirmar observaciones previas que sugieren una peor respuesta en las pacientes que reciben terapia con el antiestrógeno tamoxifeno cuando existen niveles elevados de u-PA y de su inhibidor PAI-1 (Foekens, 1995). Asimismo, hay autores que han hallado un aumento en el riesgo de recidiva del cáncer de mama cuando se asocian niveles altos de u-PA con el fenotipo receptor negativo (Ferno, 1996).

El rol más destacado del sistema fibrinolítico en el cáncer de mama está representado por el complejo activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA, u-PAR, PAI-1), conocido como un potente factor de angiogénesis o neovascularización. Este efecto es producido en virtud a su función como proteasa, que provoca la degradación de la matriz extracelular y de los

componentes del estroma circundante a las células tumorales. Como ya se ha comentado, el primer paso en el proceso de neovascularización consiste en la disolución de la pared de los vasos estromales, que produce el estímulo adecuado para la formación de neovasos. Pues bien, este importante efecto proteolítico es realizado por la urokinasa (Hildenbrand, 1995).

Siguiendo esta línea de pensamiento se puede hipotetizar la asociación de densidades vasculares intratumorales altas con cifras elevadas de u-PA en el citosol de células tumorales. La síntesis y liberación de u-PA no se atribuye exclusivamente a las células integrantes del tumor, de forma que han sido implicados otros grupos celulares en este proceso, entre los que destaca el sistema de macrófagos asociados al tumor. La importancia de los macrófagos en el proceso de angiogénesis ha sido explicado por varios hechos (Hildenbrand, 1995): su presencia es constante en todos los carcinomas de mama, en número superior a otros grupos celulares; su estado funcional es variable, de forma tal que pueden permanecer en estado quiescente o bien, activar su función angiogénica; y finalmente, presentan la capacidad de liberar citokinas que modulan el proceso de angiogénesis.

Todos estos argumentos cimentan la asociación hallada entre el recuento de macrófagos en el foco tumoral y el pronóstico del cáncer de mama. Leek ha demostrado una fuerte relación del incremento en el número de macrófagos asociados al tumor con supervivencias libres de enfermedad y supervivencias globales menores (Leek, 1996).

Nuestro estudio ha revelado la presencia de niveles más elevados de u-PA en tumores con densidades vasculares más altas, aunque este resultado no ha presentado significación estadística, hecho que podría ser atribuido al tamaño muestral. Sin embargo, no existen controversias en la literatura actual referentes al potente efecto angiogénico del activador del plasminógeno tipo urokinasa en

el cáncer de mama.

Tampoco hemos hallado una fuerte asociación entre los valores de u-PA y el tamaño tumoral, si bien los tumores más grandes (>2 cm) se corresponden con valores más elevados de u-PA. Basándonos en los argumentos expuestos hasta el momento, podríamos prever una asociación entre cifras elevadas de urokinasa y tamaños tumorales más grandes; sin embargo, este punto está sujeto a algunas controversias. Hace más de una década, Duffy demostró una correlación positiva entre los niveles altos de u-PA, el tamaño tumoral y el número de ganglios linfáticos infiltrados (Duffy, 1988). Más recientemente, hay autores que han hallado una relación significativa entre los valores altos de u-PA y el fenotipo receptor negativo, pero no con el estatus axilar ni con el tamaño tumoral (Ferno, 1996).

La presencia de necrosis histológica intratumoral se ha asociado de forma significativa a los niveles de u-PA, en nuestro estudio. Así pues, hemos hallado una fuerte correspondencia entre niveles altos de u-PA y la existencia de necrosis extensa en los tumores analizados, así como un predominio de niveles bajos de u-PA en aquellos cánceres en los que no se ha detectado necrosis. La presencia de necrosis intratumoral (no tipo comedo, es decir, no intraductal) ha sido asociada a una mayor incidencia de metástasis ganglionares y a una menor supervivencia global en el cáncer de mama, si bien suele estar directamente relacionada con tumores de alto grado histológico (Ackerman, 1995; Badve, 1998). Es, por tanto, lógica la deducción de que la asociación de u-PA y necrosis constituya un factor de agresividad y diseminación tumoral.

Con todos estos argumentos, podemos reafirmar la importancia del activador del plasminógeno tipo urokinasa en el crecimiento y capacidad de invasividad de las células tumorales en el cáncer de mama. Su valor, cada vez más constatado científicamente, como factor pronóstico no solo en el cáncer de

mama sino también en otros tumores sólidos (colon, estómago, etc), hace crecer el interés en relación a estas investigaciones. Debemos pensar, además, que la función proteolítica de u-PA está modulada a su vez por un numeroso sistema de inhibidores que añaden más complejidad a estos estudios.

Ha sido constatada por diversos autores la pérdida de la función inhibidora de PAI-1 en el cáncer de mama, llegando incluso a potenciar el proceso de invasión tumoral (Knoop, 1998). De esta manera, la función angiogénica del activador del plasminógeno tipo urokinasa es, al mismo tiempo, favorecida por su inhibidor PAI-1. Es de suponer, por tanto, que los niveles elevados de PAI-1 junto con los de u-PA van a ejercer una importante influencia en el pronóstico del cáncer de mama. Así lo afirman numerosos estudios de investigación que han demostrado que los niveles altos de estos componentes del sistema fibrinolítico están asociados con un mayor riesgo de recurrencias y una menor supervivencia global (Grondahl-Hansen, 1997; Knoop, 1998).

Indices pronósticos en el cáncer de mama.

Los denominados índices pronósticos, utilizados cada vez con más frecuencia para la evaluación del cáncer de mama, son variables que aportan una información estadísticamente significativa e independiente, en todos los niveles del análisis multivariante. Si una de éstas solo es relevante para un cierto nivel o grupo de pacientes, la variable no es aceptada (Collet, 1998).

Uno de los más conocidos índices pronósticos es el Índice Pronóstico de Nottingham o NPI, que define tres grupos de pacientes con bajo, medio y alto riesgo de muerte (Miller, 1994). Este índice está basado en la combinación de tres factores pronósticos: tamaño tumoral, infiltración ganglionar confirmada en el estudio anatomopatológico, y el grado histológico.

Las líneas de investigación actuales van dirigidas en su mayoría a la búsqueda de nuevos factores pronósticos que puedan definir subgrupos de pacientes. Uno de estos subgrupos, que presumiblemente podría obtener grandes ventajas, es el conformado por pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos. Como ya se ha expuesto, aproximadamente un 30 % de estas pacientes van a presentar recidiva de su enfermedad y riesgo de muerte. Es en estas pacientes donde la determinación de los valores de uPA puede ser útil como factor pronóstico predictivo del riesgo de recidiva. Así lo confirma Duffy en un estudio realizado recientemente, en el que demuestra, además, que ni el tamaño tumoral ni los receptores de estrógenos muestran significación pronóstica en este subgrupo de pacientes con ganglios negativos (Duffy, 1998).

En la actualidad, el tratamiento coadyuvante en el cáncer de mama tras la cirugía consiste en poliquimioterapia y en hormonoterapia. Los dos tratamientos probados con más amplitud consisten en el antiestrógeno tamoxifeno y en una combinación de fármacos citotóxicos.

La controversia en la aplicación de estos tratamientos coadyuvantes surge en aquellas pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos. En el protocolo de tratamiento aplicado en nuestro hospital, las pacientes con ganglios negativos son clasificadas en diferentes grados de riesgo (bajo, intermedio y alto) en función del tamaño tumoral, el grado histológico y los receptores hormonales. Las pacientes con ganglios negativos incluidas en los grados intermedio (tamaño tumoral entre 1 y 2 cm, RE +) y alto (tamaño >1 cm y RE-) reciben tratamiento adyuvante.

Pues bien, otro factor importante predictor de este riesgo podría ser el activador del plasminógeno tipo urokinasa a la vista de los argumentos científicos que lo confirman. Más aún, han aparecido investigaciones recientes en relación

a una posible terapia antiangiogénica, que no solo inhibiría la revascularización de las células tumorales en el tejido mamario, sino que también ejercería este efecto a distancia, impidiendo el crecimiento de micrometástasis.

Stonelake, ha demostrado una reducción considerable del proceso de angiogénesis en estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231), mediante inhibidores del activador del plasminógeno tipo urokinasa (aprotinina, amiloride, ácido tranexámico, ácido amino caproico, anticuerpos anti-uPA) e inhibidores de las matriz metaloproteinasas (BB94) (Stonelake, 1997). Más recientemente, Folkman, que fue el iniciador del estudio de la angiogénesis en los tumores hacia los años 70, ha realizado nuevas investigaciones y ha descubierto dos sustancias que inhiben este proceso: la angiostatina y la endostatina. La angiostatina es un componente del sistema fibrinolítico producido por las propias células tumorales que es capaz de provocar la regresión del tumor. La endostatina, un fragmento del C-terminal del colágeno producido por el hemangioendotelioma, también puede provocar la disminución del tamaño tumoral.

Las ventajas de estas nuevas terapias consistirían en la no afectación de las células sanas, impidiendo la generación de los efectos secundarios que producen las terapias tradicionales. Asimismo, se evitaría el riesgo de resistencia de las células tumorales a la acción de algunos quimioterápicos.

Estas nuevas terapias, aunque aún se encuentran en fase de experimentación, pueden aportar grandes beneficios a las pacientes con cáncer de mama, especialmente a determinados subgrupos como es el de ganglios negativos.

En definitiva, son numerosas las aportaciones de las investigaciones actuales en relación al futuro y potencial empleo del activador del plasminógeno

tipo urokinasa como factor pronóstico predictivo de recurrencias en las pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos. El uso en la clínica diaria podría acontecer en los próximos años.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

El análisis de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo y el estudio de los antecedentes bibliográficos que sobre el tema hemos tenido ocasión de realizar, nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1.- Aun siendo no muy extensa, la serie de pacientes de cáncer de mama estudiada es una representación típica de la expresión de la enfermedad en nuestro medio. Por ello, las conclusiones aquí presentadas pueden ser extrapoladas a la población general, comprobándose que predominan los diagnósticos en fases tempranas de la enfermedad tumoral. El estadio clínico más frecuente en el momento del diagnóstico ha sido el II, seguido del estadio I, comprendiendo entre ambos el 87% de los casos. Esta observación puede haber sido favorecida por la aplicación del sistema de "screening" o detección precoz del cáncer de mama en nuestra provincia.

2.- El estadio clínico establecido en el momento del diagnóstico no se ha correlacionado con la edad de la paciente ni con su estado hormonal (pre o postmenopáusicas), de tal forma que enfermas de cualquier edad pueden encuadrarse en cualquier estadio clínico sin que predomine uno sobre otro.

3.- Se ha puesto de manifiesto una asociación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral histológico y la edad de las pacientes, de tal manera que pacientes de mayor edad eran portadoras de tumores más pequeños, y tumores de diámetro mayor han correspondido a enfermas más jóvenes. Esta apreciación, aparentemente paradójica, descarta la idea preconcebida de un diagnóstico tardío, determinado por la larga evolución de la enfermedad o el abandono, en pacientes de mayor edad.

4.- Se han establecido criterios histológicos de clasificación tumoral en función de la arquitectura vascular intratumoral, observándose la gran variabilidad existente entre tumores. La densidad vascular intratumoral se ha correlacionado con el fenotipo receptor hormonal positivo, de forma tal que a densidades vasculares bajas corresponden fenotipos positivos para receptores hormonales.

5.- La densidad vascular intratumoral se ha asociado de forma significativa con el tamaño tumoral, de tal manera que tumores más grandes presentan más frecuentemente un mayor número de vasos por campo. Si el grado de actividad angiogénica del tumor que se ha traducido en una mayor densidad vascular intratumoral, favorece el crecimiento del tumor o se trata de una relación inversa, es un hecho que no puede demostrarse con los datos obtenidos.

6.- En relación al estado hormonal de las pacientes ha existido un predominio del fenotipo receptor positivo en las pacientes postmenopáusicas y se ha relacionado, asimismo, con tumores de menor tamaño. Aunque ambas observaciones no han alcanzado la significación estadística, la tendencia es importante y coincidente con el mejor pronóstico establecido en las pacientes postmenopáusicas.

7.- Por otra parte, el fenotipo receptor hormonal estrogénico y progestagénico negativo predomina en los estadios clínicos II y III de la enfermedad tumoral, es decir, en tumores de mayor tamaño y pacientes con enfermedad diseminada.

8.- Se ha confirmado la asociación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral y la presencia de ganglios axilares infiltrados por el tumor, el bajo grado de diferenciación y la presencia de enfermedad tumoral axilar, coincidente con observaciones previamente presentadas en la literatura científica.

9.- La distribución de los valores de pS2 ha resultado independiente del estado hormonal, el grado histológico, el tamaño tumoral y la densidad vascular intratumoral. Sin embargo, hemos hallado una fuerte correlación entre la expresión de pS2 y el fenotipo receptor hormonal. De esta manera, la expresión de pS2 se presenta como el marcador último de la hormonodependencia tumoral. La asociación RE+ RP+ y pS2+ permite identificar tumores en los que la dependencia hormonal del tejido mamario original está preservada, observación que conlleva interesantes connotaciones en lo referente a la influencia hormonal en la génesis de tales neoplasias y en la respuesta al tratamiento antihormonal.

10.- La expresión de la catepsina D no se ha podido relacionar con ninguna de las variables clínicas, histológicas y bioquímicas analizadas.

11.- Por último, hemos hallado una fuerte significación entre la expresión de u-PA y la necrosis intratumoral evidenciada en los estudios histológicos. Por el contrario, no se ha podido establecer una asociación significativa entre los valores citosólicos de u-PA y el tamaño tumoral, si bien la tendencia sugiere que los tumores de mayor tamaño se corresponden con valores más elevados de u-PA. Esta observación es coincidente con los hallazgos de densidad vascular intratumoral, que sugieren que los tumores que presentan niveles más elevados de u-PA son aquellos con una densidad vascular mayor.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

Abner A, Collins L, Peiro G, et al. Correlation of tumor size and axillary lymph node involvement with prognosis in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer*, 83: 2502-2508, 1998.

Ackerman's. Breast. En: *Surgical pathology*. Ed. Mosby, Missouri, pp 1565-1661, 1995.

Adlercreutz H. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect.*, 103: 103-112, 1995.

Albo D, Berger DH, Wang TN, et al: Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery*, 122:493-499, 1997.

Ardavanis A, Gerakini F, Amanatidou A, et al. Relationships between cathepsin-D, pS2 protein and hormonal receptors in breast cancer cytosols: inconsistency with their established prognostic significance. *Anticancer Res*, 17: 3665-3669, 1997.

Axelsson K, Ljung BE, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 87: 997-1008, 1995.

Bachmann F, EKO Kruihof: Tissue plasminogen activator: Chemical and physiological aspects. *Semin Thromb Hemostas*, 10:6-17, 1984.

Badve S, Hern RP, Ward AM, et al. Prediction of local recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast using five histological classifications: a comparative study with long follow-up. *Hum. Pathol.*, 29: 915-923, 1998.

Bargmann C, Hung M, Weinberg R, et al. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 319: 226-230, 1986.

Basset P, Wolf C, Chambon P. Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Res Treat*, 24:185-193, 1993.

Basso Ricci S, Coradini D, Di Franzo G, et al. Estrogen-receptor status of patients who underwent mastectomy for breast cancer with a disease-free interval of not less than 8 years. *Am. J. Clin. Oncol.*, 21(3): 250-252, 1998.

Basu A, Murthy A, Rodeck U, et al. Presence of tumor-associated antigens in epidermal growth factor receptors from different human carcinomas. *Cancer Res.*, 47:2531-2536, 1987.

Baughman RA: Pharmacokinetics of tissue plasminogen activator. In: Sobel BE, D Collen, EB Grossbard (Eds): *Tissue Plasminogen Activator in Thrombolytic Therapy*. Marcel Dekker, New York, pp 41-53, 1987.

Beck JS. Observer variability in reporting of breast lesions. *J. Clin. Pathol*, 38: 1358-1365, 1985.

Bell WR. The fibrinolytic system in neoplasia. *Semin Thromb Hemostas*, 22: 459-478, 1996.

Berg JW, Hutter RVP. Breast cancer. *Cancer*, 75(1): 257-269, 1995.

Berger U, Wilson P, McClelland AR, et al. Correlation of immunocytochemically demonstrated estrogen receptor distribution and histopathologic feature in primary breast cancer. *Hum. Pathol*,18: 1263-1267,1987.

Bernoux A, De Cremoux P, Laine-Bridon C, et al. Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer: pathological characteristics and clinical outcome. Institut Curie Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat*, 49:219-225, 1998.

Berse B, Brown LF, Van De Water L, Dvorak HF, Senger D. Vascular permeability factor gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumours. *Mol. Biol. Cell* 3:211,1992.

Bianchi E, Cohen RL, Thor AT, et al: The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue. *Cancer Res* 54:861-866,1994.

Bland HI, Frykberg ER. Selective management of in situ carcinoma of the breast. *Breast Diseases*, 3:11-22, 1992.

Blasi F: Molecular mechanisms of protease-mediated tumour invasiveness. *J Surg Oncol (Suppl)* 3:21-23,1993.

Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 15:105-111,1993.

Bonadonna G, Hortobagyi G, Gianni AM. Epidemiology and screening. En: *Breast Cancer. A clinical guide to therapy*. London, pp: 1-16, 1997.

Borrás JM, Ciurana R, Marzo M. Cribado del cáncer de mama. *Med. Clin.*, Sup. 1(102): 75-79, 1994.

Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, et al: Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Human Pathol*, 23:755-761, 1992.

Brem S, Cotran R, Folkman J: Tumor angiogenesis: A quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst*, 48:347-356, 1972.

Briozzo P, Morriset F, Capony F, et al: In vitro degradation of extracellular matrix with Mr52000 cathepsina D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res*, 48:3688-3692, 1988.

Brisson J, Morrison AS, Khalid N. Mammographic parenchimal features and breast cancer screening. *Cancer*, 69:1963-1967, 1992.

Brown LF, Dvorak AM, Dvorak HF. Leaky vessels fibrin deposition and fibrosis: a sequence of events common to solid tumours and to many other types of disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* 140:1104-1107, 1990.

Buck MR, Karustis DG, Day NA, et al: Degradation of extracellular matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 282:273-278, 1992.

Byers T. Nutritional risk factors for breast cancer. *Cancer*, 74: 288-295, 1994.

Campbell PG, Wines K, Yanosick TB: Binding and activation of plasminogen on the surface of osteosarcoma cells. *J Cell Physiol*, 159:1-10, 1994.

Carter D, Pipkin R, Shepard H, et al. Relationship of necrosis and tumor border to lymph node metastases and 10 year survival in carcinoma of the breast. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2: 39,1979.

Chang E, Furth M, Scolnick E, et al. Tumorigenic transformation of mamarian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey sarcoma virus. *Nature*, 297:484-497,1982.

Christensen LR, CM MacLeod: A proteolytic enzyme of serum: Characterization, activation and reaction with inhibitors. *J Gen Physiol* , 28:559-583,1945.

Clowes AW, Monika M, Clowes YPT: Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. *Cir Res*, 67:61-67,1990.

Collet K, Skjaerven R, Maehle BO. The prognostic contribution of estrogen and progesterone receptor status to modified version of the Nottingham Prognostic Index.. *Breast Cancer Research and Treatment*, 48:1-9, 1998.

Constantini V, Sidoni A, Devegilia R, et al: Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression. *Cancer*, 77:1079-1088,1996.

Craft PS, Harris AL: Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Ann Oncol* , 5: 305-311,1994.

Culine S, Extra JM, Espie M, et al. Resultats prometteurs d'une chimiotherapie bimensuelle avec cyclophosphamide et epirubicine a forte dose dans le traitement d'induction du cancer du sein inflamatoire. *Bull Cancer (Paris)*, 80 (11): 994-1000, 1993.

Cullen K, Allison A, Martire I, et al. Insulin-like growth factor expression in breast cancer epithelium and stroma. *Breast Cancer Res Treat*, 22: 21-29, 1992.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al: Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265:1582-1585, 1994.

Dano K: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res*, 44:139-266, 1985.

Darras V: Measurement of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies. *Thromb Haemostas*, 56:411-414, 1986.

Davies B, Miles DW, Happerfield LC, et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer*, 67: 1126-1131, 1993.

De Vries TJ, Quax PHA, Denijin M, et al: Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression. *Am J Pathol* 144:70-81, 1994.

Dees C, Foster JS, Ahamed S, et al. Dietary estrogens stimulate human breast cells to enter the cell cycle. *Environ Health Perspect.*, 105: 633-636, 1997.

Degeorges A, Roquancourt A, Extra JM, et al. Is p53 a protein that predicts the response to chemotherapy in node negative breast cancer?. *Breast Cancer Res Treat*, 47: 47-55, 1998.

Del Vecchio S, Stoppelli MP, Carriero MV, et al: Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumors by in vitro quantitative autoradiography: comparison with urokinase levels. *Cancer Res*, 53:3198-3206, 1993.

Delorme S. Evaluating tumor vascularization with doppler ultrasound. *Radiologe*, 38: 335-343, 1998.

Dickson R, Lippman M. Regulación del crecimiento del epitelio mamario normal y maligno. En: Bland KI and Coppeland III EM. *La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. Ed. Panamericana, Buenos Aires, pp 468-505, 1993.

Dickson RB, Lippman ME. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrine Rev*, 8: 29-43, 1987.

Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinski A, et al: Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br J Cancer*, 76:238-243, 1997.

Donegan WL, Stine SB, Samter TG. Implications of extracapsular nodal metastases for treatment and prognosis of breast cancer. *Cancer*, 72: 778-782, 1993.

Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, et al. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer*, 62: 531-533, 1988.

Duffy MJ, Reilly D, McDermott E: Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. *Cancer*, 774:2276-2280, 1994.

Duffy MJ, Reilly D, Sullivan SO: Urokinase plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res*, 50:6827-6829, 1990.

Duffy MJ, Duggan C, Mulcahy H, et al. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in breast cancer including patients with axillary node-negative disease. *Clin Chem*, 44: 1177-1183, 1998.

Duffy MJ, Reilly D, Brouillet JP, et al. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival. *Clin Chem*, 38: 2114-2116, 1992.

Duggan C, Maguire T, McDermott E: Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int J Cancer*, 61:597-600, 1995.

Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak AM: Structure of solid tumors and their vasculature: Implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells*, 3: 77-85, 1991.

Elias EG, Suter CM, Brown SD, et al. Survival differences between black and white women with breast cancer. *J Surg Oncol*, 55:37-41, 1994.

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

Eriksen J, Blasi F, Dano K: Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol*, 138: 1059-1067, 1991.

Ernberg i. Oncogenes and tumor growth factors in breast cancer. *Acta Oncol*, 29:331-334, 1990.

Falette N, Paperin MP, Treilleux I, et al. Prognostic value of p53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res*, 58: 1451-1455, 1998.

Fernández MJ, Galindo M, Aragoncillo P, et al. Factores pronósticos en el cáncer de mama. *Rev. Esp. Patol.*, 30 (4): 302-308, 1997.

Fernández MF, Pedraza V, Olea N. Estrogens un the environment: is there a breast cancer connection?. *Cancer J.*, 11: 11-17, 1998.

Ferno M, Bendahl PO, Borg A, et al. Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosol with a luminometric immunoassay. *Eur. J. Cancer*, 32: 793-801, 1996.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, et al: Molecular and biological perspectives of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Rev*, 13:18-32, 1994.

Fidler IJ, Nicolson GJ. Conceptos y mecanismos relacionados con las metástasis del cáncer de mama. En: Bland KI and Copeland III EM. La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. Ed. Panamericana, Buenos Aires, pp 506-520, 1993.

Fidler IJ, Ellis LM: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*, 79:185-188, 1994.

Filho IPT, Leuning M, Yuan F, et al: Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:2081-2085, 1994.

Fisher B, et al. Cancer of the breast. Size of neoplasm and prognosis. *Cancer*, 24:1071, 1969.

Fisher B. Justification for lumpectomy in the treatment of breast cancer: a commentary on the underutilization of that procedure. *J Am Med Womens Assoc.*, 47: 169-173, 1992.

Fisher B. Contributions to the understanding and management of breast cancer. Steiner award lecture 1992. *Int. J. Cancer*, 55: 179-180, 1993.

Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, et al. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer*, 79:300-307, 1999.

Foekens JA, Look MP, Peters HA, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* , 87: 751-756, 1995.

Folkman J: Introduction: Angiogenesis and cancer. *Semin Cancer Biol.* 3:47-48, 1992.

Folkman J: Tumor angiogenesis, in Holland J, Frei E III, Bast RC, et al (eds): *Cancer Medicine*. Melbourne PA, pp 153-170. 1993.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*, 235: 442-447, 1987.

Foucre D, Bouchet C, Hacene K, et al. Relationship between cathepsin D, urokinase, and plasminogen activator inhibitors in malignant vs benign breast tumours. *Br J cancer*, 64: 926-932, 1991.

Fournier D. Tasa de crecimiento natural del cáncer de mama primario y sus metástasis. En: *Mastología dinámica*. Ed. Díaz de Santos, Madrid, pp: 1-10, 1995.

Fox SB, Leek RD, Smith K, et al: Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas: Relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. *Breast cancer Res Treat*, 29:109-116, 1994.

Frykberg E, Bland K. Evolución de los principios quirúrgicos para el tratamiento del cáncer de mama. En: Bland KI and Copeland III EM. *La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. Ed. Panamericana, Buenos Aires , pp:583-590, 1993.

Fujimoto K, Ichimori Y, Kakizoe T, et al: Increased serum levels of basic fibroblastic growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Biochem biophys Commun*, 180:386-392,1991.

Fulco RA, Petix M, Salimbeni V, et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated proteins, cathepsin-D and pS2, in breast cancer. *Minerva Med*, 89: 5-10,1998.

Gabrijelcic D, Svetic B, Spaic D, et al: Cathepsins B, H and L in human breast cancer. *Eur J Clin chem Clin Biochem*, 30:69-74,1992.

Galway B, M Oikawa, T NY: Epidermal growth factor stimulates tissue plasminogen activator activity and messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells: Mediation by pathways independent of protein kinase A and C. *Endocrinology*, 125:126-135,1989.

Gardiol E, Gardiol A. Interacción de los factores pronósticos. En: *Mastología dinámica*. Ed. Díaz de Santos, Madrid, pp 49-59, 1995.

Gasparini G, Pozza F, Harris AL: Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 85:1206-1219,1993.

Gasparini G, Toi M, Verderio P. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol*, 12:1117-1125, 1998.

Gasparini G, Harris AL: Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new prognostic tool. *J Clin*

Oncol, 13:765-782,1995.

Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al: Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 12:454-466,1994.

Gohring UJ, Scharl A, Thelen U, et al. Comparative prognostic value of cathepsin D and urokinase plasminogen activator, detected by immunohistochemistry, in primary breast carcinoma. *Anticancer Res.*, 16: 1011-1018,1996.

Gomm JJ, Smith J, Ryall GK, et al: Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor B1 in the human mammary gland. *Cancer Res*, 51:4685-4692,1991.

González-Palacios F, Sancho M, Martínez JC, et al. Microvessel density, p53 overexpression, and apoptosis in invasive breast carcinoma. *Mol Pathol*, 50: 304-309, 1997.

Grondahl-Hansen J, Hilsenbeck S, Christensen I, et al. Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 43: 153-163, 1997.

Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rasenquist C, et al: High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosol extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res*, 53:2513-2521,1993.

Gross TJ, RH Simon, RG Sitrin: Expression of urokinase-type plasminogen activator by rat pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3:449-456, 1990.

Guerin M, Barrois M, Terrier M, et al. Overexpression of either c-myc or c-erbB-2/neu protooncogenes in breast carcinomas: correlation with poor prognosis. *Oncogene Res*, 3: 21-31, 1988.

Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, et al: Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast.. *J Natl Cancer Inst*, 86: 614-619, 1994.

Guinebretiere JM, Le Monique G, Gavaille A, et al: Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease. *J Natl Cancer Inst*. 86:635-636, 1994.

Hall NR, Fish DE, Hunt N, et al. Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real?. *Surg Oncol*, 1: 223-229, 1992.

Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, et al. Breast Cancer. Review article. *N. Engl. J. Med.*, 327 (6): 390-398, 1992.

Heimburger N, Paques EP, Romisch J: Coagulation and fibrinolysis in cancer. *Behring Inst Mitt*, 91: 169-182, 1992.

Heiss MM, Babic R, Allgayer H: Tumor-associated proteolysis and prognosis: New functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system. *J Clin Oncol*, 13:2084-2093, 1995.

Helzlsouer KJ, Couzi R. Hormonas and breast cancer. *Cancer*, 76:2059-2063, 1995.

Henderson IC, Canellos GP. Cancer of the breast: the past decade. *N Engl J Med*, 302: 17-79, 1980.

Hildenbrand R, Dilger I, Horlin A, et al: Urokinase and macrophages in tumour angiogenesis. *Br J Cancer*, 72:818-823,1995.

Hoel DG, Wakabayashi T, Pike MC. Secular trends in the distrution of the breast cancer risk factors-menarche, firstbirth, menopause and weight in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Am J Epidemiol*, 118:78-89, 1983.

Hollas W, Boyd D: Urokinase-dependent proteolysis in cultured colon cancer is directed by its receptors. *Semin Thromb hemostas* 17:225-230,1991.

Honn KV, Tang DG, Crissman JD. Platelets and cancer metastasis: A causal relationship? *Cancer Metastasis Rev*,11:325-351, 1992.

Hoosein NM, Boyd D, Hollas WJ: Involvement of urokinase and its receptor in the invasiveness of human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Commun*, 3:255-264,1991.

Horak ER, Leek R, Klenk N, et al: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metzstases and survival in breast cancer. *Lancet*, 340:1120-1124,1992.

Howe GR. Epidemiology of radiogenic breast cancer. *Prog Cancer Res Ther*, 26: 119-129, 1984.

Hupperets PS, Volovics L, Schouten L, et al. The prognostic significance of steroid receptor activity in tumor tissues of patients with primary breast cancer. *Am J Clin Oncol*, 20:546-551, 1997.

Hutter RVP: The influence of pathologic factors on breast cancer management. *Cancer*, 46:961-976, 1980.

Huvos AG, Hutter RV, Berg JW. Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. *Ann. Surg.*, 173: 44-46, 1971.

Ioakim-Lioffi A, Karakitsos P, Markopoulos C, et al. Expression of pS2 protein and estrogen and progesterone receptor status in breast cancer. *Acta Cytol.* 41(3): 713-716, 1997.

Isola J, Weitz S, Visakarpil T, et al. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 11: 36-43, 1993.

Janicke F, Schmitt M, Pache L, et al. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 24: 195-209, 1993.

Janicke F, Schmitt M, Hafer R: Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis*, 4: 69-78, 1990.

Janicke F, Schmitt M, Graeff H: Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type I inhibitor in breast cancer. *Semin Thromb Hemostas*, 17:303-313, 1991.

Jankun J, Merrick HW, Goldblatt PJ. Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and in breast cancers. *J Cell Biochem*, 53:135-144, 1993.

Johnson MD, Jeffrey AT, Lippman ME, et al: The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res*, 53:873-877, 1993.

Johnson AJ, WR McCarty: The lysis of artificially induced intravascular clots in man by intravenous infusions of streptokinase. *J Clin Invest*, 38:1627-1643, 1959.

Knoop A, Andreasen PA, Andersen JA, et al. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*, 77: 932-940, 1998.

Koester A, Landgraf S, Leipold A, et al. Expression of oncogenes in human breast cancer specimens. *Anticancer Res*, 11: 193-201, 1991.

Korhonen J, Lahtinen I, Halmekyto M, et al: Endothelial specific gene expression directed by the Tie gene promoter in vivo. *Blood*, 5:1828-1835, 1995.

Korzeniowski S, Dyba T. Reproductive history and prognosis in patients with operable breast cancer. *Cancer*, 74(5): 1591-1594, 1994.

Koscielny S, Tubiana N, Le MG, et al. Breast cancer: Relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer*, 49: 709-715, 1984.

Kruitof EKO, Tran-Thang C, Bachmann F: Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets. *Thromb Haemostas*, 55:201-205, 1986.

Kruitof EKO, Baker MS, Bunn CL: Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood*, 86:4007-4024, 1995.

Kuramoto M, Yamashita J, Ogawa M: Tissue-type plasminogen activator predicts endocrine responsiveness of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer*, 75:1263-1272, 1995.

Kuroishi T, Tominaga S, Morimoto T, et al. Tumor growth rate and prognosis of breast cancer mainly detected by mass screening. *Cancer Res*, 81: 454-462, 1990.

Kute TE, Grondahl-Hansen , Shao SM, et al. Low Cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of node negative breast cancer patients with low risk of recurrence. *Breast Cancer Res Treat*, 47:9-16, 1998.

Kwaan HC, Keer HN, Radosevich JA: Components of the plasminogen-plasmin system in human tumor cell lines. *Semin Thromb Hemostas*, 17:175-182, 1991.

Lamszus K, Jin L, Fuchs A, et al: Scatter factor stimulates tumor growth and tumor angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. *Lab Invest*, 76:339-353, 1997.

Larsson LI: Distribution of urokinase-type plasminogen activator immunoreactivity in the mouse. *J Cell Biol*, 98:894-903, 1984.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, 56: 4625-4629, 1996.

Leis HP. Pronóstico del cáncer de mama. En: Cirugía de la mama, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la mama. Ed. Salvat, Barcelona, pp 112-121, 1990.

Leto G, Gebbia N, Rausa L, et al. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (review). *Anticancer Res*, 12: 235-240, 1992.

Levenson AS, Kwaan HC, Svoboda KM, et al. Oestradiol regulation of the components of the plasminogen-plasmin system in MDA-MB-231 human breast cancer cells stably expressing the oestrogen receptor. *Br. J. Cancer*, 78: 88-95, 1998.

Levin EG, Santell L. Association of a plasminogen activator inhibitor with the growth substrata and membrane of human endothelial cells. *J Cell Biol*, 105: 2543-2549, 1987.

Levine MN. When is a prognostic factor useful? A guided for the perplexed. *J Clin Oncol*, 2:348-356. 1991.

Lippman ME: The development of biological therapies for breast cancer. *Science*, 259:631-632, 1993.

Liu G, Shuman MA, Cohen RL: Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer*, 60:501-506, 1995.

Losch A, Tempfer C, Kohlberger P, et al. Prognostic value of cathepsin D expression and association with histomorphological subtypes in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 78(2): 205-209, 1998.

Mandriota SJ, Pepper MS: Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci*, 110:2293-2302, 1997.

Mant D, Vessey MP. Epidemiología y prevención primaria del cáncer de mama. En: Bland KI and Coppeland III EM. *La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. Ed. Panamericana, Buenos Aires, pp 309-339, 1993.

Marshall BC, DS Sageser, NV Rao: Alveolar epithelial cell plasminogen activator. Characterization and regulation. *J Biol Chem*, 265:8198-8204, 1990.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer- Epidemiology, risk factors and genetics. *Br J Med*, 309: 1003-1006, 1994.

Melzer MS: Macrophage activation for tumor cytotoxicity characterization of primary and trigger signals during lymphokine activation. *J Immunol*, 127:179-183, 1981.

Menard S, Bufalino R, Rilke F, et al. Prognosis based of primary breast carcinoma instead of pathological nodal status. *Br. J. Cancer*, 70: 709-712, 1994.

Miller WR, Ellis C, Sainsbury J, et al. ABC of breast diseases. Prognostic factors. *Br. Med. J.*, 309: 1573-1576, 1994.

Motomura K, Koyama H, Noguchi S, et al. Effect of tamoxifen on pS2 expression in human breast cancers. *Oncology*, 54: 424-428, 1997.

Mullins DE, Rohrllich ST: The role of proteinases in cellular invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 695:177-214, 1983.

Nagayama M, Sato A, Hayakawa H: Plasminogen activators and their inhibitors in non-small cell lung cancer. Low content of type 2 plasminogen activator inhibitor associated with tumor dissemination. *Cancer*, 73:1398-1405, 1994.

Namer M, Ramaioli A, Fontana X, et al. Prognostic value of total cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 19:85-93, 1991.

Nanus DM, Schmitz-Drager BJ, Motzer RJ, et al: Expression of basic fibroblast growth factor in primary human renal tumors: Correlation with poor survival. *J Natl Inst*, 85:1597-1599, 1993.

Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg*, 175: 73-75, 1998.

Nekarda H, Schmitt M; Ulm K: Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res*, 54:2900-2907, 1994.

Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 10:696-705, 1992.

Nguyen M, Watanabe H, Budon AE, et al: Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst*, 86:356-361, 1994.

Nieto R. La oncoproteína p53 en el cáncer de mama. Valor pronóstico. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 1998.

NIH Consensus Conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA*, 265 (3):391-395, 1991.

Obermair A, Czervewenka K, Kunz C, et al. Influence of tumoral microvessel density on the recurrence-free survival in human breast cancer: preliminary results. *Oncology*, 17: 44-49, 1994.

Ohlsson M, XR Peng, YX Liu: Hormone regulation of tissue-type plasminogen activator gene expression and plasminogen activator mediated proteolysis. *Semin Thromb Hemostas*, 17:286-290, 1991.

Olea N. Contaminación estrogénica medioambiental. *Endocrinología*, 41: 39-40, 1997.

Osborne CK. Prognostic factors for breast cancer: Have they met their promise? *J Clin Oncol*, 10:679-682, 1992.

Ossowski L, Biegel D, Reich E. Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell*, 16: 929-940, 1979.

Padhy L, Shilh C, Cowing D, et al. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of neuroblastomas. *Cell*, 28: 865-871, 1982.

Page DL, Dupont WD. Atypical hyperplastic lesions of the female breast: a longterm follow-up study. *Cancer*, 55: 2698-2708, 1985.

Pappot H, Brunner N: The plasminogen activation system and its role in lung cancer. A review. *Lung Cancer*, 12:1-12, 1995.

Parkin DM, Chen VW, Ferlay J, et al. Comparability and quality control in Cancer Registration. IARC Technical Report., 1994.

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, et al. Cancer incidence in Five Continents. Vol. VI. IARC Scientific Publ. N° 120. Lyon: IARC, 1992.

Pedersen H, Brunner N, Francis D: Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res*, 54:4671-4675, 1994.

Philip PA, Thompson CH, Carmichel J, et al: A phase-I study of the left-shifting agent bw12c79 plus mitomycin-c and the effect on the skeletal-muscle metabolism using p-31 magnetic-resonance spectroscopy. *Cancer Res*, 53:5649-5653, 1993.

Picone R, Kajtaniak EL, Nielsen LS: Regulation of urokinase receptors in monocyte-like U937 cells by phorbol ester phorbol myristate acetate. *J cell Biol*, 108: 693-702, 1989.

Plesner T, Ralfkiaer E, Wittrup: Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue. *Am J Clin Pathol*, 102:835-841, 1994.

Potel Lesquereux J. Factores pronósticos actuales en el cáncer de mama. En: Tamames Escobar S y Martínez Ramos C (eds.), *Cirugía General y del Aparato Digestivo*. Tomo I. EMISA, Madrid, pp 190-199, 1994.

Price JE, Daugherty T. Influence of microenvironment on the growth of human breast cancer cell lines in nude mice. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 33: 93 -94, 1992.

Price JE, Polyzos A, Zhang RD, et al. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*, 50: 717-721, 1990.

Price JE, Fidler IJ. Interacción tumor-huésped en las metástasis de cáncer de mama. En: *Mastología Dinámica*. Ed. Díaz de Santos, Madrid, pp: 11-26, 1995.

Fulco RA, Petix M, Salimbeni V, et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated proteins, cathepsin-D and pS2, in breast cancer. *Minerva Med*, 89: 5-10, 1998.

Pujol P, Maudelonde T, Daures JP, et al. A prospective study of the prognosis value of cathepsin D levels in breast cancer cytosol. *Cancer*, 71: 2006-2012, 1993.

Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, et al: Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol*, 138: 111-117, 1991.

Rabbani SA. Metalloproteases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. *In Vivo*, 12: 135-142, 1998.

Radford DM, Zehnbauser BA. Cáncer mamario hereditario. *Clin Quir North Am*, 2:203-218, 1996.

Rak JW, Hegman E, Lu C, et al: Progressive loss of sensitivity to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. *J Cell Physiol*, 159:245-255, 1994.

Ravdin P. Prognostic factors in breast cancer. En: *Breast Cancer. A clinical guide to therapy*. Ed. Martin Dunitz, London, pp 36-63, 1997.

Ravdin PM. Evaluation of cathepsin D as a prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 24: 219-226, 1993.

Reilly D, Christensen L, Duch M: Type I plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer*, 50: 208-214, 1992.

Relf M, Lejeune S, Scott PA, et al: Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*, 57:963-969, 1997.

Rijken DC: Measurement of human tissue-type plasminogen activator by two-site immunoradiometric assay. *J Lab Clin Med*, 101:274-284, 1983.

Romain S, Spyrtos F, Goussard J, et al. Marqueurs Biologiques intratissulaires dans les cancers du sein: bilan actuel. *Arch. Anat. Cytol. Path.*, 42: 251-261, 1994.

Ronsen PP, Groshen S, Siago PE, et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T2N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol*, 7: 1239-1251, 1990.

Rosenbert SA, Spiess P, Lafrenier R: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor infiltrating lymphocytes. *Science*, 223:1318-1321, 1986.

Rosenstein M, Yoon I, Kaufman: Lymphokine activated killer cells: Lysis of fresh syngeneic NK-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin-2. *Cancer Res*, 44: 1946-1953, 1984.

Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, et al: Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res*, 54:6517-6525, 1994.

Ryan MC, Orr DJA, Horgan K. Fibroblast stimulation of breast cancer growth in a serum-free system. *Br J Cancer*, 67: 1268-1273, 1993.

Salven P, Joensuu H, Heikkilä P, et al: Endothelial Tie growth factor receptor provides antigenic marker for assessment of breast cancer angiogenesis. *Br J Cancer*, 74:69-72, 1996.

Sánchez J, Escobar L, Rabadán F, et al. Carcinoma de mama: Receptores hormonales. En: *Mastología Dinámica*. Ed Díaz de Santos, Madrid, pp: 71-88, 1995.

Sata T, Nishimura G, Yonemura Y: Association of immunohistochemical detection of urokinase-type plasminogen activator with metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Oncology*, 52: 347-352, 1995.

Schmitt M, Goretzki L, Janicke F: Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer. *Biomed biochim Acta*, 50:731-741, 1991.

Schmitt M, Janicke F, Moniwa N: Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator: Biological and clinical significance. *Biol Chem Hoppe seyler*, 373:611-622, 1992.

Séguret F, Daures JP, Guizard AV, et al. Hérault breast screening programme: results after 30 months of a mobile French schedule. *Eur J Cancer Prev*, 4:299-305, 1995.

Seifert M, Galid A. Oral contraceptives and breast cancer, a causal relationship?. *Gynakol GR*, 38:101-104, 1998.

Shapiro S, Strax P, Venet L, et al. The search for risk factors in breast cancer. *Am J Publ.*, 58: 820, 1968.

Sieuwerts AM, Klijn JG, Henzen-Logmand SC, et al. Urokinase-type-plasminogen-activator (u-PA) production by human breast (myo) fibroblast in vitro: influence of transforming growth factor-beta (1) compared with factor released by human epithelial-carcinoma cells. *Int J Cancer*, 76(6): 829-835, 1998.

Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 332: 1045-1053, 1990.

Silverstein RL, Leung LLK, Nachman RI: Thrombospondin: A versatile multifunctional glycoprotein. *Arteriosclerosis*, 6: 245-253, 1986.

Sjögren S, Inganas M, Lindgren A, et al. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol*, 16: 462-469, 1998.

Sobel GW: Urokinase: An activator of plasma profibrinolysis extracted from urine. *Am J Physiol*, 171:768-769, 1952.

Soto Am, Justicia H, Wray JW, et al. P-Nonyl-phenol: and strogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health. Perspect.*, 92: 167-173, 1995.

Srivastava A, Laidler P, Davies R, et al: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness skin melanoma. *Am J Pathol*, 133:419-423, 1988.

Stonelake P, Jones C, Neoptolemos J, et al. Proteinase inhibitors reduce basement membrane degradation by human breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 75: 951-959, 1997.

Swisselm K: Localization of the plasminogen gene (PLG) to the distal portion of the long arm of chromosome 6 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 40:756, 1985.

Thompson AM, Elton RA, Hawkins RA, et al. PS2 mRNA expression adds prognostic information to node status for 6-years survival in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 77(3): 492-496, 1998.

Thompson EW, Paik S, Brunner N, et al. Association of increased basement membrane-invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol*, 150: 534-544, 1992.

Toi M, Kashitani J, Tominaga T: Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer*, 55:371-374, 1993.

Tres A, Landa MC, Mayordomo MD, et al. Etiología y factores de riesgo en el cáncer de mama. En: Díaz Rubio E. *Cáncer de mama. Monografía*, Zaragoza, pp: 9-32, 1993.

Valinsky JE, E Reich, N LeDouarin: Plasminogen activator in the bursa of Fabricius: Correlations with morphogenetic remodeling and cell migrations. *Cell*, 25:471-476, 1981.

Valladares Y. Implicaciones de los oncogenes en el cáncer de mama. *Rev Cancer*, 6: 168-179, 1992.

Van Der Geer P, Hunter T, Lindberg RA: Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev Cell Biol*, 10:251-337, 1994.

Vendrell M, Prats Puig M, Llebaria C, et al. Degeneración de un fibroadenoma de mama a carcinoma metaplásico que cursa con desaparición de calcificaciones. *Rev. Senología y patol. mam.*, 7 (4): 181-186, 1994.

Visscher DW, Smilanetz S, Drozdowicz S, et al. Prognosis significance of image morphometric microvessel enumeration in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol*, 15: 88-92, 1993.

Wagner RC: Endothelial cell embryology and growth. *Adv Microcirc*, 9:45-75, 1980.

Waldman S, Toonkel LM, Davila E. Inflammatory breast cancer. En: Ragaz J, Ariel IM (eds.). *High risk breast cancer*. Berlin, Springer-Verlag, pp:319-333, 1991.

Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer*, 54:363-370, 1993.

Watabe T, Yoshida K, Shindoh M, et al. The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer*, 77:128-137, 1998.

Watanabe H, Hori A, Seno M, et al: A sensitive enzyme immunoassay for human basic fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 175:229-235, 1991.

Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol*, 184(2): 119-122, 1998.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis -correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 324: 1-8, 1991.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognosis indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 84: 1875-1887, 1992.

Whitten PL, Naftolin F. Dietary estrogens a biologically active background for estrogen action. En: Hochberg RB, Naftolin F (eds.). *New Biology of Steroid Hormones*. Raven Press, New York, pp: 155-167, 1991.

Wilhelm O, Schmitt M, Hohl S: Antisense inhibition of urokinase reduces spread of human ovarian cancer in mice. *Clin Exp Metastasis*, 13:296-302, 1995.

Wiman B, Wallen P: On the primary structure of human plasminogen and plasmin. Purification and characterization of cyanogen-bromide fragments. *Eur J Biochem*, 57:387-394, 1975.

Winstanley J, Leinster S, Cooke T, et al. Prognostic significance of cathepsin D in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 67: 767-772, 1993.

Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, et al. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 648-652, 1993.

Wooley DE. Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 3: 361-372, 1984.

Wu CC, Lee CN, Chen TM, et al: Incremental angiogenesis assessed by color doppler ultrasound in the tumorigenesis of ovarian neoplasms. *Cancer*, 73:1251-1256,1994.

Yu AE, Hewitt RE, Connor EW, et al: Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Int J cancer*, 11:229-244,1997.

Zacharski LR, Wojtukiewicz MZ, Costantini V: Pathways of coagulation/fibrinolysis activation in malignancy. *Semin Thromb Hemostas*, 18: 104-116,1992.

Zugmaier G, Lippman ME, Wellstein A. Inhibition of pentosan polysulfate (PPS) of heparin-binding growth factors released from tumor cells and blockage by PPS of tumor growth in animals. *J Natl Cancer Inst*, 84: 1716-1724, 1992.

Elisabet Vidaña Márquez

Licenciada en Medicina y cirugía por la Universidad de
Málaga

Departamento de Radiología y Medicina Física
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

“Angiogénesis y cáncer de mama. Implicación de Urokinasa como factor de
Neovascularización”.

Directores:

Prof. Dr. D. Nicolás Olea Serrano.
Dr. D. Miguel Lorenzo Campos.