

# **EXPRESIÓN DE METALOPROTEASAS Y SU IMPLICACIÓN EN LA PROGRESIÓN Y PRONOSTICO DEL CÁNCER DE MAMA**

---



**ANGELA XIMENA ARGOTE CAMACHO**

**Directores del Doctorado: Dra. María Isabel Núñez Torres**

**Dr. Pablo Torné Poyatos**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SALUD PÚBLICA**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**2022**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Ángela Ximena Argote Camacho  
ISBN: 978-84-1117-264-6  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/73984>



# *AGRADECIMIENTOS*

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su colaboración han hecho posible la realización de este proyecto, mencionando especialmente a los directores de esta tesis Dra. María Isabel Nuñez Torres y Dr. Pablo Torné Poyatos.

A la Dra. Maria Isabel Nuñez Torres, mi admiración y gratitud por su incondicional y constante apoyo, por brindarme la oportunidad de participar en su proyecto de investigación del que nace esta tesis doctoral.

Al Dr. Pablo Torné Poyatos, por invitarme a formar parte de este gran equipo, por guiarme durante varios años en el ámbito profesional y por ser un ejemplo a seguir como persona y cirujano.

A mis amigos, Agata, Lucia y Tato, por creer en mí, por su ayuda y sus consejos; a Mafe, aunque la distancia nos separe siempre puedo contar contigo, y a Miriam mi comadre, por tenderme una mano cuando más lo necesito.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Clínico San Cecilio, por su apoyo durante los años de mi residencia y de nuevo ahora como adjunta. También, gracias a mis colegas y amigos de la Unidad de Coloproctología, todos han sido y son un verdadero estímulo para el trabajo diario.

Y, gracias a todas aquellas personas que han contribuido a que esta tesis doctoral llegue a buen fin.

*A mis padres, Jaime y Elvia, ellos son el motor de mi vida.*

*A mis Albertos...*

*Por ser mi apoyo incondicional, la alegría y mis ganas de vivir.*

*“La ciencia es un esfuerzo de colaboración. Los resultados combinados de varias personas que trabajan juntas es a menudo mucho más eficaz de lo que podría ser el de un científico que trabaja solo”.*

*John Bardeen*

*“Para comprender una ciencia es necesario conocer su historia”*

*Auguste Comte*

# *INDICE*

<b>RESUMEN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. HISTORIA.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1. Incidencia.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2. Prevalencia y Supervivencia.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3. Mortalidad.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3. ETIOPATOGENIA.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.1. Progresión Tumoral.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.2. Metaloproteasas.....</b>	<b>31</b>
<b>1.3.3. Papel de las Metaloproteasas en la progresión tumoral.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3.4. Inhibidores terapéuticos de las Metaloproteasas.....</b>	<b>37</b>
<b>1.3.5. Perspectivas de futuro.....</b>	<b>41</b>
<b>1.4. FACTORES DE RIESGO.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.1. Sexo.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.2. Edad.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.3. Antecedentes familiares.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.4. Antecedentes personales de cáncer.....</b>	<b>43</b>
<b>1.4.5. Antecedentes de enfermedades proliferativas de la Mama... </b>	<b>44</b>

1.4.6.	Menarquia precoz y menopausia tardía.....	45
1.4.7.	Paridad y edad del primer embarazo.....	46
1.4.8.	Exposición a radiación ionizante.....	46
1.4.9.	Otros factores de riesgo.....	46
<b>1.5</b>	<b>FACTORES PRONOSTICOS Y ESTADIFICACION DEL</b>	
	<b>CANCER DE MAMA. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL</b>	
	<b>CANCER DE MAMA Y PLATAFORMAS</b>	
	<b>GENÓMICAS.....</b>	<b>47</b>
1.5.1.	Factores dependientes del paciente.....	47
1.5.2	Factores dependientes de las características	
	histológicas del tumor.....	48
1.5.3	Factores dependientes de las características	
	biológicas y moleculares del tumor.....	50
1.5.4	Indices pronósticos.....	53
1.5.5	Estadificación del cáncer de mama.....	54
1.5.6	Clasificación molecular del cáncer de mama.....	57
1.5.7.	Plataformas genómicas y su utilidad como herramienta	
	pronostica y predictora.....	60
<b>1.6</b>	<b>PRUEBAS DIAGNOSTICAS.....</b>	<b>61</b>
1.6.1.	Autoexploración.....	60
1.6.2.	Exploración mamaria por un clínico experto.....	61
1.6.3.	Ecografía mamaria.....	61
1.6.4.	Mamografía.....	62

1.6.5.	Resonancia Magnética de la mama.....	63
2.	HIPOTESIS.....	64
3.	OBJETIVOS.....	66
4.	METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.....	68
4.1.	Diseño del estudio.....	69
4.2.	Selección de casos.....	69
4.3.	Variable dependiente.....	70
4.4	Variables independientes.....	71
4.4.1.	Edad .....	71
4.4.2.	Factores de riesgo.....	71
4.4.3.	Menopausia al diagnóstico.....	72
4.4.4	Mama afecta.....	72
4.4.5	Localización del tumor.....	72
4.4.6.	Tipo histológico.....	72
4.4.7	Estadios tumorales .....	72
4.4.8.	Receptores hormonales.....	73
4.4.9.	Otros receptores hormonales.....	73
4.4.10.	Tratamiento médico al diagnóstico.....	73
4.4.11	Afectación ganglionar.....	73
4.4.12.	Recidiva tumoral.....	73
4.4.13	Metástasis a otros órganos.....	73

4.4.14	<b>Mortalidad de las pacientes por cáncer de mama a junio</b>	
2020.....		73
4.5.	<b>Análisis estadístico de los datos.....</b>	74
5.	<b>RESULTADOS.....</b>	75
5.1	<b>Análisis Descriptivo de la población.....</b>	76
5.1.1.	<b>Análisis epidemiológico.....</b>	76
5.1.1.1.	<b>Edad.....</b>	76
5.1.1.2.	<b>Fecha de diagnóstico.....</b>	76
5.1.1.3.	<b>Factores de riesgo.....</b>	77
5.1.1.4.	<b>Menopausia al diagnóstico.....</b>	78
5.1.2.	<b>Análisis diagnóstico y características tumorales.....</b>	78
5.1.2.1.	<b>Mama afecta.....</b>	78
5.1.2.2.	<b>Localización del tumor.....</b>	79
5.1.2.3.	<b>Tipo histológico.....</b>	79
5.1.2.4.	<b>Afectación ganglionar al diagnóstico.....</b>	80
5.1.2.5.	<b>Estadios Tumorales.....</b>	81
5.1.2.6.	<b>Receptores hormonales.....</b>	81
5.1.2.7.	<b>Otros receptores hormonales.....</b>	82
5.1.3.	<b>Análisis del tratamiento y evolución.....</b>	83
5.1.3.1.	<b>Tratamiento médico al diagnóstico.....</b>	83
5.1.3.2.	<b>Recidiva tumoral.....</b>	83

5.1.3.3.	Metástasis a otros órganos.....	84
5.1.3.4.	Mortalidad de las pacientes por cáncer de mama a junio 2020.....	84
5.2.	Análisis Bivariante.....	85
5.2.1.	Metaloproteasa 1(MMP1).....	85
5.2.1.1.	MMP1 Porcentaje. Grupo casos y controles.....	85
5.2.1.2.	MMP1 Intensidad. Grupo casos y controles.....	86
5.2.1.3.	MMP1 Cantidad de estroma. Grupo casos y controles.....	87
5.2.2.	Metaloproteasa 2(MMP2).....	88
5.2.2.1.	MMP2 Porcentaje. Grupo casos y controles.....	88
5.2.2.2.	MMP2 Intensidad. Grupo casos y controles.....	89
5.2.2.3.	MMP2 Cantidad de estroma. Grupo casos y controles.....	90
5.2.3.	Metaloproteasa 3(MMP3).....	90
5.2.3.1.	MMP3 Porcentaje. Grupo casos y controles.....	90
5.2.3.2.	MMP3 Intensidad. Grupo casos y controles.....	92
5.2.3.3.	MMP3 Cantidad de estroma. Grupo casos y controles.....	93
5.2.4.	Metaloproteasa 9(MMP9).....	93
5.2.4.1.	MMP9 Porcentaje. Grupo casos y controles.....	94
5.2.4.2.	MMP9 Intensidad. Grupo casos y controles.....	94

5.2.4.3.	<b>MMP9 Cantidad de estroma. Grupo casos y controles.....</b>	<b>95</b>
6.	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>101</b>
7.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
8.	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>115</b>

## *RESUMEN*

Este estudio de cohorte retrospectivo muestra los niveles de expresión inmunohistoquímica de MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en 154 mujeres con cáncer de mama y 42 mujeres sin enfermedad tumoral. Los resultados sugieren que la expresión de MMP-1 y MMP-3 en las muestras de tejido tumoral, puede estar relacionada con el desarrollo de cáncer de mama.

Las metaloproteasas (MMPs) funcionan principalmente como enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular y desempeñan funciones importantes en la mayoría de las etapas de la carcinogénesis en el cáncer de mama. Este estudio de cohorte retrospectivo muestra los niveles de expresión inmunohistoquímica de MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en 154 mujeres con cáncer de mama y 42 mujeres sin enfermedad tumoral. Las muestras de tejido mamario se evaluaron utilizando varias matrices de tejido (TMA). Se consideran los porcentajes de tinción ( $\leq 50\%$   $\rightarrow$   $50\%$ ) y los niveles de intensidad de tinción (débil, moderada o intensa). La expresión inmunohistoquímica del MMP-1 intensidad ( $p = 0.043$ ) y el porcentaje de MMP-3 ( $p = 0.018$ ) y la intensidad ( $p = 0.025$ ) presentaron asociaciones estadísticamente significativas con la variable grupo (control-caso); por lo tanto, la expresión en las muestras de tejido tumoral de estas MMPs puede estar relacionada con el desarrollo de cáncer de mama. Estos resultados sugieren el uso de MMP-1 y MMP-3 como posibles biomarcadores en el diagnóstico de cáncer de mama.

# ***1. INTRODUCCIÓN***

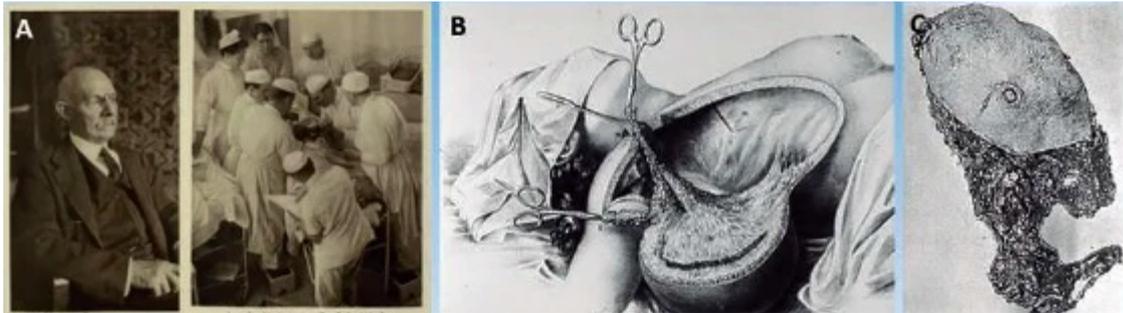
## 1. INTRODUCCION

### 1.1 HISTORIA

El cáncer de mama es una enfermedad tan antigua como la humanidad. La primera descripción del cáncer mamario aparece en el *"Papiro de Edwin Smith"* entre el año 3000 y el 2500 a.C.; en este se describen 8 casos de tumores que fueron tratados con cauterización, con una herramienta llamada "la orquilla de fuego". El escrito dice sobre la enfermedad: *«No existe tratamiento cuando el tumor es sangrante, duro e infiltrante.* En el papiro de Nínive (2250 a. C.) hace referencia a la mastectomía, y más tarde, en 1500 a. C., en el Papiro de Ebers se describe por primera vez el cáncer de mama con metástasis axilar, tratándolo con extirpación o la simple cauterización<sup>1</sup>.

Durante siglos, los médicos han descrito casos similares y los primeros avances en esta patología se consiguen solo en los siglos XVII y XVIII, cuando la ciencia médica alcanzo un mayor entendimiento del sistema circulatorio y se logró superar las tres barreras que impedían las cirugías: el dolor, la infección y el sangrado. En el siglo XIX la Medicina y la Cirugía se integran en un mismo cuerpo de conocimientos y enseñanzas, con importantes avances en el conocimiento del cáncer de mama; durante este periodo se consiguió determinar la relación entre el cáncer de mama y los nódulos linfáticos axilares, el cirujano francés Jean Louis Petit (1674-1750) y posteriormente el cirujano Benjamín Bell (1749-1806) fueron los primeros en extirpar los nódulos linfáticos, el tejido mamario y los músculos pectorales, abriendo el camino a la mastectomía moderna. Bell es el autor de la obra más importante en esta materia de su época, denominada: *"Tratado de las enfermedades del seno y de la región mamaria"*. Su senda de comprensión y avance fue seguida por William Stewart Halsted que inventó la operación conocida como *"mastectomía radical de Halsted"* (Figura 1), procedimiento que fue popular hasta finales de los años setenta, cuando una nueva comprensión de la metástasis del cáncer, llevó a percibir al cáncer de mama como una enfermedad sistémica desde su comienzo, que podía extenderse tanto por vía linfática como hemática, y en la que los ganglios linfáticos regionales tienen más importancia biológica que anatómica, estando interrelacionadas las dos rutas de diseminación, por lo que el crecimiento tumoral va a depender de múltiples factores, biológicos,

inmunológicos e incluso de relación huésped-tumor. Así fue como en el siglo XX, se incorporaron los tratamientos de radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia, que llegaron para complementar el abordaje quirúrgico de esta patología; pero lo que más influyó en este cambio fue el rápido desarrollo del estudio anatomopatológico y la incorporación de técnicas de biología molecular a la práctica clínica, proporcionando un giro al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes con cáncer de mama.



**Figura 1.** **A.** *William Stewart Halsted, cirujano del siglo XIX, en 1984 publicó su proceso para tratar quirúrgicamente el cáncer de mama.* **B.** *Mastectomía radical: Halsted realizó este procedimiento en 50 mujeres, y solo 3 de ellas sufrieron recaídas del cáncer.* **C.** *Pieza quirúrgica donde se ha extirpado la glándula mamaria, el músculo pectoral y los ganglios linfáticos axilares.* Fuente: *Hitos en la historia del cáncer.* [www.encolombia.com](http://www.encolombia.com)

Actualmente se realizan determinaciones de sustancias producidas por algunos tipos de tumores, o por las células del huésped, las cuales pueden ser medidas en sangre o en tejidos corporales; estas sustancias son conocidas como marcadores tumorales. Sin embargo, la mayoría de estos marcadores no son específicos de ningún tumor, por lo que la investigación de este tipo de sustancias abre una nueva etapa en la investigación.

La invasión tumoral está mediada por diversas enzimas, en particular las proteasas, que degradan la matriz extracelular y cuyos productos facilitan la progresión tumoral, destacándose entre ellas las metaloproteasas (MMPs), que, al jugar un papel importante en la biología del cáncer, son blanco potencial para ser utilizadas en la terapia contra esta enfermedad. Por ello, inhibidores sintéticos de las metaloproteasas, ya han sido desarrollados, que, si bien han presentado actividad antitumoral al usarse en varios modelos animales, en estudios clínicos realizados en pacientes con cánceres avanzados no se ha logrado, hasta ahora, obtener una respuesta terapéutica efectiva (referencias).

Dada la importancia y significado biológico y clínico de estas investigaciones, este trabajo pretende explicar el papel que desempeñan algunas metaloproteasas como marcadores predictores de mal pronóstico, y la implicación directa en la progresión del tumor en pacientes con cáncer de mama.

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA**

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbimortalidad del mundo. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimó que en el año 2018 se diagnosticaron unos 18,1 millones de cánceres en el mundo (excluyendo el cáncer de piel no melanoma). La misma agencia ha estimado que en el año 2020 se diagnosticaron aproximadamente 19,3 millones de casos nuevos en el mundo (proyecto GLOBOCAN)<sup>2</sup>. Sin embargo, sabemos que la pandemia de la COVID-19 ha afectado el número de diagnósticos de cáncer en muchos países, se ha informado el impacto general en las muertes por cáncer debido a retrasos en el diagnóstico<sup>3,4</sup>. Las estimaciones a nivel mundial indican también que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas a 30,2 millones de casos nuevos al año en 2040<sup>5</sup>. Este aumento en la incidencia parece ser debido no sólo al aumento de la población a nivel mundial, sino al envejecimiento de la misma (aumento y acumulación de factores de riesgo y descenso de los mecanismos de reparación celular) y fundamentalmente al avance en las técnicas de detección precoz (“*screening*”), que son capaces de detectar la enfermedad en estadios iniciales.

### **1.2.1 Incidencia**

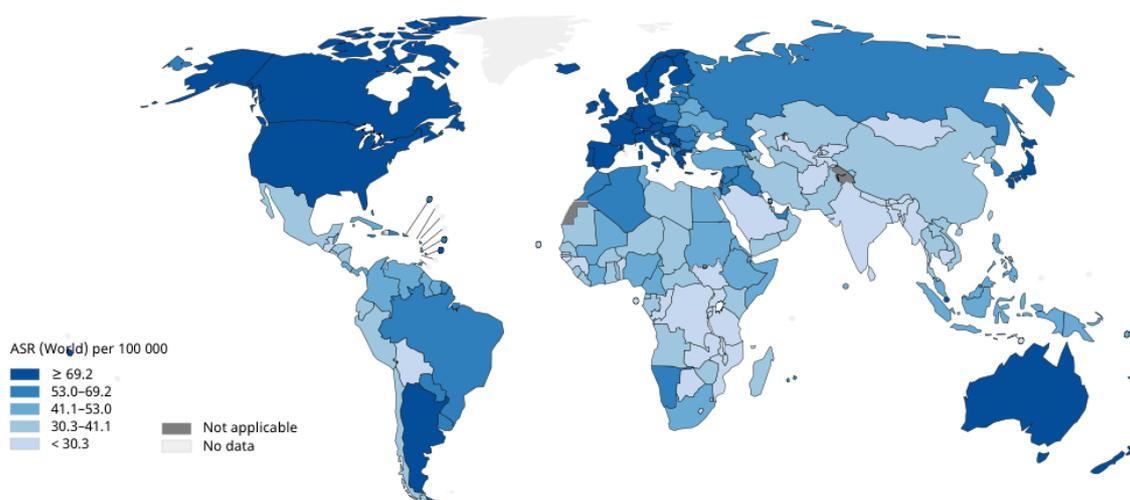
En España, el cáncer es también una de las principales causas de morbimortalidad. El número de cánceres diagnosticados en España en el año 2019 fue de 277.234, y para el 2021 se estima que alcanzará los 276.239 casos, de los que 158.867 son en hombres y 117.372 en mujeres; un número muy similar al de años anteriores. Sin embargo, igual que a nivel mundial, la realidad puede ser ligeramente

diferente ya que esta estimación no incluye el posible efecto de la pandemia de la COVID-19.

Los cánceres más frecuentemente diagnosticados en España en 2021 (excluyendo los cánceres de piel-no melanoma) han sido los de colon y recto (43.581 nuevos casos), próstata (35.764), mama (33.375), pulmón (29.549) y vejiga urinaria (20.613); seguidos en menor frecuencia de linfomas no hodgkinianos (9.055), y los cánceres de cavidad oral y faringe (8.188), páncreas (8.697), estómago (7.313), riñón (7.180), cuerpo uterino (6.923) e hígado (6.590)<sup>5</sup>.

Sin embargo, si fragmentamos la incidencia de los distintos tumores por sexo, los cánceres más frecuentemente diagnosticados en mujeres en España en 2021 han sido los de mama (33.375), colon y recto (17.903 pulmón (7.971), cuerpo uterino (6.923), tiroides (4.277), vejiga urinaria (4.035), linfomas no hodgkinianos (4.158) y cáncer de páncreas (4.126)<sup>5</sup>.

El cáncer de mama femenino ha superado al cáncer de pulmón como la principal causa de incidencia mundial de cáncer en 2020, con 2,3 millones de casos nuevos, lo que representa el 11,7% de todos los casos de cánceres. Las tasas de incidencia del cáncer de mama varían en las regiones del mundo, observado tasas de incidencia más altas en América del norte, Australia, Países Nórdicos y Europa occidental (Figura 2).



**Figura 2.** *Tasas de incidencia de cáncer de mama estandarizadas por edad en el mundo. Casos/100.000 mujeres-año. Fuente: Base de datos GLOBOCAN 2020.*

En cuanto a la tasa de incidencia, se estiman 132 casos por cada 100.000 habitantes. La probabilidad estimada de desarrollar cáncer de mama siendo mujer es de 1 de cada 8. Este tipo de tumor suele aparecer entre los 35 y los 80 años, aunque la franja de los 45-65 es la de mayor incidencia, al ser el momento en el que se producen los cambios hormonales en los períodos de peri y post menopausia, una curva de incidencia que continúa aumentando a medida que la mujer envejece. Se debe tener en cuenta que, en los últimos años, se está detectando un aumento en la incidencia del cáncer de mama entre las mujeres menores de 45 años. Los investigadores achacan este dato al hecho de que las mujeres retrasan la edad a la que deciden tener su primer hijo. Esto, sumado al descenso del número de hijos por mujer 2,8 en 1976 a 1,27 en 2013 y a la disminución de la edad de la menarquia, parece la explicación más plausible para el continuo incremento en la incidencia de cáncer de mama en las mujeres más jóvenes.

### **1.2.2 Prevalencia y Supervivencia**

La prevalencia se encuentra determinada por la supervivencia, es decir la prevalencia es más elevada en los cánceres con mayor supervivencia, como es el caso del cáncer de mama. En el 2020 se diagnosticaron 32.953 mujeres con cáncer de mama, mientras que su mortalidad fue muy inferior, por lo que su prevalencia a los 5 años fue de 144.233 en 2020<sup>5</sup>.

La supervivencia de los pacientes con cáncer a nivel poblacional es uno de los indicadores de mayor interés para la vigilancia y el control del cáncer. Este indicador refleja en qué medida, los casos son diagnosticados en un estadio potencialmente curable y el grado de eficacia de los procedimientos terapéuticos. Aún queda un camino por recorrer, ya que los estudios también indican que el 30% de las mujeres diagnosticadas en un estadio precoz de la enfermedad experimentará una recaída de la misma con metástasis a distancia, lo que incidirá en una disminución de la supervivencia.

La supervivencia por cáncer de mama ha mejorado notablemente en los últimos 20 años, siguiendo una evolución ascendente en el tiempo (anualmente se incrementa la supervivencia por este tumor un 1,4%). Si la supervivencia relativa a 5

años estandarizada por edad era de alrededor del 70% para las pacientes diagnosticadas a finales de los años 80, en las pacientes del periodo 2000- 2007 fue de 85.1% y en las del periodo 2008-2013 se incrementó en un 87,3%<sup>5</sup>.

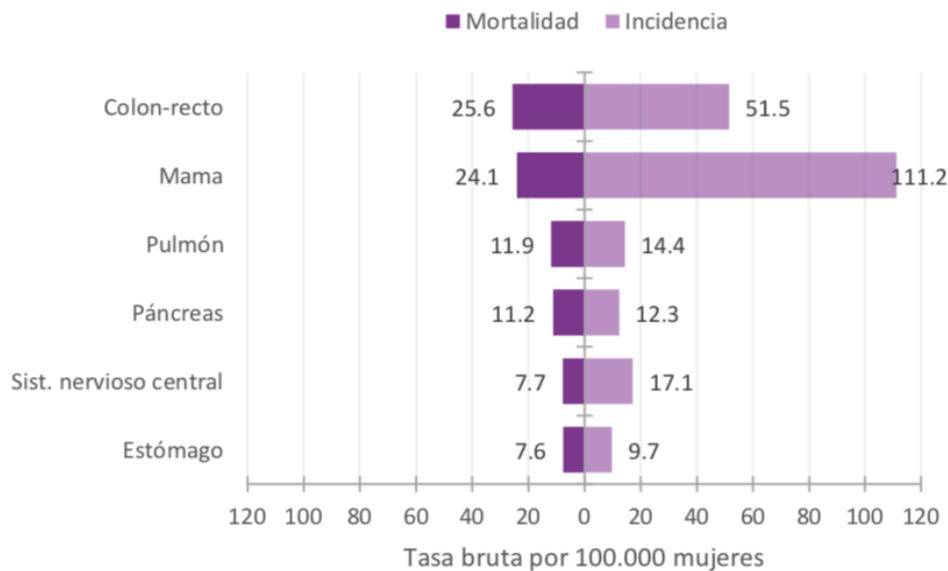
### **1.2.3 Mortalidad**

A nivel mundial, el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de mortalidad del mundo, con aproximadamente 9,9 millones de muertes relacionadas con cáncer en el año 2020, de acuerdo con los datos proporcionados por IARC. Los cánceres responsables del mayor número de fallecimientos a nivel mundial fueron el cáncer de pulmón (18,0% del total de muertes por cáncer), el cáncer colorrectal (9,4%), el cáncer hepático (8,3%), el cáncer de estómago (7,7%) y el cáncer de mama (6,9%). Al igual que con la incidencia, se espera un incremento de la mortalidad en los próximos años, estimándose la mortalidad en más de 16 millones en 2040. En España, la mortalidad por cáncer se incrementaría de 113.000 casos en 2020 a más de 160.000 en 2040.

En España el cáncer fue causante de 113.054 fallecimientos en 2020 en ambos sexos (21% de las defunciones en 2020), por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio (24%) y de las enfermedades infecciosas (22%); los tipos de tumores responsables de una mayor mortalidad son el cáncer de pulmón (22.930; 20,3%), el colorrectal (16.470; 14,6%), y los cánceres de páncreas (7.568; 6,7%), mama (6.606; 5,8%) y próstata (5.798; 5,1%). El cáncer de mama es la cuarta causa de muerte por cáncer en España en ambos sexos, y por primera vez en muchos años, fue la segunda causa de muerte en mujeres en España en 2020 por cáncer, por detrás del cáncer colorrectal. La tasa de mortalidad de esta patología es menor que la incidencia, debido a su alta prevalencia; de las 32.953 pacientes diagnosticados con cáncer de mama en el año 2020 en España, solo un 5.8% fallecieron (6.606). La tasa de mortalidad por cada 100.000 habitantes en nuestro país es de 22.7<sup>5</sup>.

En el periodo 2014-2016 en la provincia de Granada el número total de defunciones por cáncer de mama fue de 335 casos (2.269 fallecimientos registrados por

cáncer en mujeres durante este periodo según el INE)<sup>6</sup>. Si comparamos de nuevo la razón Mortalidad/Incidencia, esta será un reflejo de la supervivencia del cáncer, es decir para cánceres de baja supervivencia, como el de páncreas o de pulmón, la razón entre el número de fallecidos y el número de casos incidentes será próxima a 1; para otros cánceres con supervivencia más elevada, como el de mama, esta razón se aproximará a 1/4 (Figura 3).



**Figura 3.** Tasas de mortalidad e incidencia de cáncer en mujeres. Provincia de Granada, 2014-2016.  
Fuente: Registro de cáncer de Granada.

Así es como la tasa de mortalidad por cáncer de mama en España es de las más bajas, es de unos 22.7 fallecimientos por cada 100.000 habitantes. El número de muertes se ha estabilizado en nuestro país, y las tasas de mortalidad descienden debido, sobre todo, a un mejor resultado de los tratamientos y a la detección precoz de esta neoplasia.

### 1.3 ETIOPATOGENIA

Son numerosas las facetas desconocidas de este tumor; sabemos que existen una serie de factores que pueden favorecer su génesis y desarrollo (menarquía precoz, menopausia tardía, número de embarazos, edad del primer parto, etc.) y que en su

desarrollo subyace una base hormonal; sin embargo, las lagunas al respecto son abundantes y, en los últimos años, se ha sugerido la íntima relación de hormonas esteroideas y factores de crecimiento como algo esencial en su desarrollo. También se sabe, tras el estudio de los cánceres de mama en familias, que existe una susceptibilidad autosómica dominante en un grupo, genes de baja penetrancia en unos y factores ambientales en el resto<sup>6</sup>. Un aspecto interesante, basado en los datos epidemiológicos y en los factores de riesgo, es el concerniente al posible papel de la proliferación celular en la iniciación del cáncer de mama y el de la diferenciación como un potente inhibidor de este proceso<sup>7</sup>.

El estudio anatomopatológico del cáncer mamario ha sido de gran utilidad en el reconocimiento de características morfológicas que han permitido evaluar su comportamiento biológico. Entre el 25 y el 30% de los carcinomas mamarios muestran características histológicas que permiten subclasificarlos como lesiones de buen pronóstico, siempre que dichas características estén presentes al menos en el 75% del mismo, es decir, en aquellas ocasiones en las que las mismas constituyen la característica predominante del tumor<sup>8</sup>.

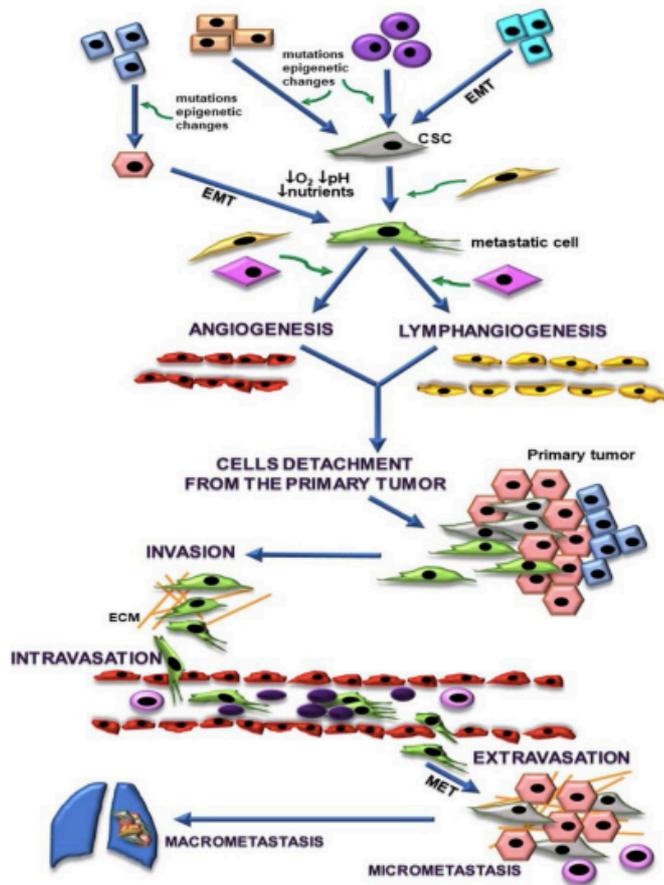
### **1.3.1 Progresión tumoral**

En su proceso de crecimiento y proliferación celular, la célula privada de regulación hacia el desarrollo tumoral va adquiriendo nuevas características funcionales y morfológicas distintas a las que caracterizaba la célula de la que derivaba, dando lugar a un clon celular con capacidad de crecer de forma desorganizada, carente de control y progresivamente con mayor grado de displasia celular hasta que finalmente, puede desencadenar el desarrollo del proceso canceroso<sup>9</sup>.

La invasión es una característica común a casi todos los tumores malignos, y microscópicamente resulta evidente cuando se observa la composición del tejido vecino a un cáncer, constituido por células neoplásicas y no neoplásicas. En algunos tumores, las células malignas se mezclan con las normales o las sustituyen, pero permanecen confinadas en el plano en que se originaron. Estos tumores se denominan carcinomas *in situ*, pero los mismos, con el tiempo y al no diagnosticarse y tratarse, rompen la

membrana basal y crecen en el estroma que los rodea, transformándose en carcinomas infiltrantes, cuyo patrón de invasión puede haberse desarrollado en una fase muy precoz de la progresión tumoral. La invasión del tejido adyacente al tumor primario y la migración de las células malignas a órganos distantes, fenómeno denominado metástasis, son las características más funestas del cáncer. Si esta propiedad de invadir no existiera, la extirpación quirúrgica bastaría para controlar la mayor parte de los tumores malignos, y ello no constituiría el mayor problema al que se enfrentan los pacientes con cáncer. Las células malignas, al ser capaces de invadir y producir metástasis, a lo cual hay que sumar la resistencia que pueden desarrollar ante las drogas antitumorales, hacen que los tratamientos usados para controlar la enfermedad no sean efectivos para todos los pacientes con cáncer<sup>10</sup>.

La capacidad de metastatizar es un fenómeno complejo (figura 4), que requiere al menos cinco pasos: a) invasión por las células tumorales de las estructuras adyacentes; b) paso hacia la sangre o los vasos linfáticos con liberación de células tumorales hacia la circulación, fenómeno denominado *intravasación*; c) supervivencia de las células tumorales en la sangre circulante y superación de la vigilancia inmunológica; d) escape de la circulación, fenómeno conocido como *extravasación*; e) implantación en un tejido diferente al de su origen, con formación de un nuevo foco tumoral<sup>11</sup>.



**Figura 4.** Pasos en la migración de una célula maligna. Las células neoplásicas podrían originarse de células somáticas, células madre o de cualquier tipo de célula. Una vez que cambian las condiciones del microambiente del tumor primario (TME) ( $\downarrow$  O<sub>2</sub>,  $\downarrow$  pH,  $\downarrow$  nutrientes), las células neoplásicas adquieren características de células mesenquimales a través del proceso EMT. Estas características incluyen la inducción de angiogénesis y linfangiogénesis. Las células metastásicas se desprenden del tumor primario y migran (invasión) hasta llegar a un vaso sanguíneo o linfático, penetran a través de la pared del mismo (intravasación), viajan por el torrente sanguíneo y se detienen en un lecho capilar en un órgano distante, salen de la circulación (extravasación) e invaden el tejido nuevo. En el nuevo nicho metastásico, las células neoplásicas pueden ser destruidas por el sistema inmunológico, entrar en letargo o adaptarse al nuevo microambiente. En el último caso, podrían proliferar y establecer una micrometástasis clínicamente indetectable que, al cabo de un tiempo y en condiciones adecuadas, pueden crecer y desarrollar una macrometástasis. CSC (célula madre cancerosa), EMT (transición epitelio-mesénquimal), ECM (matriz extracelular), MET (transición mesenquima-epitelial). Fuente: Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 138, June 2019. Pages 172.

En el momento de efectuarse la detección de un cáncer, aproximadamente la mitad de los pacientes tienen evidencias de focos metastásicos, siendo factible que muchos más tengan metástasis ocultas, por lo que algunos oncólogos clínicos piensan que siempre debe considerarse que, al momento del diagnóstico, ya hay células

diseminadas, aun cuando las mismas no hayan sido detectadas, por ello se piensa que en el tratamiento siempre debería considerarse esta posibilidad<sup>12</sup>.

Las metástasis pueden ser detectadas cuando el tumor primario es muy pequeño, menos de 0,5 cm de diámetro, pero en general, con la mayoría de los tipos de cáncer, el incremento de tamaño del tumor primario se correlaciona con el aumento de la posibilidad de metástasis, lo cual no es verdad cuando se hacen comparaciones entre diferentes tipos de cáncer, ya que, si bien ellos pueden ser de similar tamaño, pueden tener, en tiempo, velocidades variables de metástasis. Todo esto nos indica que la diseminación tumoral es un fenómeno complejo y de difícil solución, ya que, pese a los grandes avances alcanzados en el tratamiento convencional del cáncer por el perfeccionamiento de los tratamientos con radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y las nuevas técnicas quirúrgicas, la mayoría de las defunciones por cáncer siguen siendo el resultado del no control de la diseminación tumoral.

Como se ha comentado anteriormente, para metastatizar, las células malignas de un tumor primario deben invadir a través de las células de los tejidos del huésped y la matriz extracelular (MEC), entrar a la circulación, llegar a un lecho vascular distante, extravasarse y penetrar la MEC para pasar a los intersticios de un órgano blanco, proliferar como una nueva colonia e inducir la formación de nuevos vasos que hagan posible mantener su crecimiento<sup>13</sup>. Para que la mayoría de estos pasos ocurran se requiere de la liberación de enzimas proteolíticas, por lo cual el potencial invasivo y metastásico de las células malignas ha sido correlacionado con la acción de varias proteasas, actividad que no solo es característica del cáncer, sino que también lo tienen las células normales involucradas en un significativo número de procesos naturales. La reparación de los tejidos normales, remodelación de los tejidos durante el desarrollo, remodelación mamaria después de la lactancia, implantación del blastocito, crecimiento de la placenta, la angiogénesis y muchos más procesos ocurren gracias al concurso y acción de las enzimas proteolíticas. Esta realidad tiene una importancia muy particular, ya que demuestra que la producción de altos niveles de actividad proteolítica extracelular no es exclusiva de estados neoplásicos, sino que también representa la expresión de funciones celulares normales. Si bien en el cáncer esta actividad es

inapropiada y lesiva para el organismo, la característica común de estos fenómenos fisiológicos en los procesos normales y patológicos es que los mismos mecanismos están involucrados en la rotura de barreras histológicas, como lo son la lámina basal y el estroma intersticial, lo cual causa cambios pasajeros o permanentes en la arquitectura de los tejidos<sup>14</sup>. En el caso de la remodelación normal, contrapuesto a lo que ocurre con los tumores malignos, las proteasas tienen en contrapartida inhibidores, lo cual significa la existencia de mecanismos de regulación que mantienen un balance delicadamente controlado mediante dispositivos que involucran, por ejemplo, la liberación local de factores de crecimiento, mecanismos de retroalimentación, etc. Así, en los procesos de remodelación normales, como los ya señalados, hay un componente regulador efectivo que controla la liberación de las proteasas, inhibiéndolas, una vez que ellas han concluido su trabajo. Todo lo contrario ocurre con los tumores metastásicos, los cuales han perdido o no responden a estos mecanismos de control<sup>15</sup>.

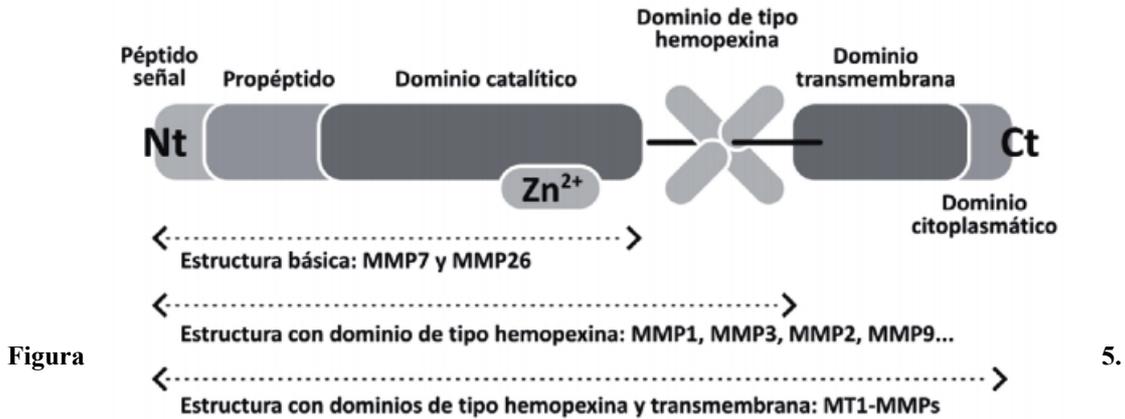
Los primeros indicios de que las proteasas estaban involucradas en el proceso de invasión en el cáncer se remontan a los estudios iniciales realizados con cultivos de tejidos a principios del siglo XX, ya que, en ese tiempo se usaba preferentemente el coágulo de plasma como sustrato para el crecimiento de los tejidos. Con esta técnica se observó que los tejidos provenientes de tumores malignos tenían la capacidad de disolver los coágulos de plasma, mientras que los tejidos normales no poseían esa capacidad, por lo que Fischer, en 1925, propuso que este fenómeno podría estar relacionado con la degradación de la fibrina, y que a su vez ello estaba asociado al crecimiento invasivo de tumores, sugiriendo que un agente lítico producido por las células malignas era el responsable de la degradación del coágulo de fibrina<sup>16</sup>. Investigaciones posteriores confirmaron la observación inicial de Fisher, y hoy ya sabemos que las proteasas juegan un papel fundamental en la progresión del cáncer, siendo utilizadas en los diferentes eslabones fundamentales que constituyen la cadena de eventos que llevan a la invasión tumoral mediante la infiltración y la metástasis.

De las proteasas existentes, dos de ellas destacan en los procesos de degradación proteolítica observada en el cáncer, categorizadas de acuerdo a si estas requieren  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o no, llamadas así *metalo*proteasas, que incluyen, por ejemplo, las colagenasas

Tipo I y IV. El mejor ejemplo de una de las no metaloproteasas es el plasminógeno, que tiene un residuo de serina en el sitio activo, y por tanto pertenece a la clase de las serinoproteasas.

### **1.3.2 Metaloproteasas**

Las metaloproteasas fueron inicialmente caracterizadas por su propiedad de degradar la matriz extracelular, requiriendo el ion  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  en su sitio activo, siendo inhibidas por agentes quelantes de zinc y calcio. Son secretadas en forma latente y requiere activación para llevar a cabo su actividad proteolítica, siendo reguladas de forma negativa por los inhibidores tejidos-específicos de metaloproteasas (TIMPs)<sup>16</sup>. La familia de las MMPs está constituida por al menos 24 endopeptidasas que comparten homología entre ellas del 30-50%, y están constituidas por tres dominios: a) el “pre”-dominio necesario para su desplazamiento intracelular hasta la superficie celular, el cual es eliminado rápidamente después de la secreción, y está ausente en la forma enzimática madura; b) el “pro”-dominio, que mantiene la actividad enzimática bajo forma latente, y está constituido de una secuencia peptídica que comprende un residuo de cisteína que interactúa con el sitio catalítico y finalmente, c) el dominio catalítico propiamente dicho, que contiene un átomo de zinc sostenido por tres residuos de histidina. Es necesario señalar que el residuo de cisteína del “pro”-dominio actúa como un cuarto ligando del ion metálico, donde el clivaje proteolítico libera el átomo de zinc del residuo de cisteína provocando la activación del sitio catalítico que ahora se puede unir a su sustrato por la penetración de una molécula de  $H_2O$ . También se debe considerar que la mayor parte de las metaloproteasas posee un cuarto dominio en la posición carboxilo terminal. Esta cadena polipeptídica es homóloga de la vitronectina o de la hemopexina que intervienen en el reconocimiento de los sustratos de las MMPs (Figura 5)<sup>17,18</sup>.



*Estructura básica de las metaloproteasas. Fuente: Role of metalloproteinases and their inhibitors in tumors. Coronato S.; Laguens G.; , Di Girolamo V. Medicina (B. Aires). 2012; 72: 495-502.*

De acuerdo con sus diferencias estructurales las metaloproteasas pueden ser clasificadas en seis grupos.

- *Matrilisinas.*

Las metaloproteasas matrilisina-1 (MMP-7) y matrilisina-2 (MMP-26) son estructuralmente las más simples, ya que no contienen dominio homólogo de la hemopexina, y son expresadas específicamente por células tumorales de origen epitelial, cuyos espectros proteolíticos son divergentes, pero incluyen la fibronectina y la gelatina<sup>19</sup>.

- *Colagenasas intersticiales*

MMP-1, MMP-8, MMP-13-MMP-18, forman un segundo grupo de metaloproteasas que intervienen en la degradación del colágeno fibrilar que incluye los colágenos tipo I, II, III y VII. El clivaje proteolítico de estos colágenos conduce a la formación de colágenos desnaturalizados o gelatinas, que a su vez es degradado por las gelatinasas. La MMP-13 o colagenasa 13 está caracterizada por un espectro enzimático más amplio, y es esencialmente expresado en zonas donde se requiera remodelación rápida de la matriz extracelular, tal como el tejido óseo fetal en desarrollo o en lugares de inflamación crónica<sup>20</sup>. Algunos carcinomas y sarcomas están asociados a una hiperactividad de la MMP-13<sup>19</sup>.

- *Estromalisinas*

Estas metaloproteasas comprenden la MMP-3 o estromalisina-1, la MMP-10 o estromalisina-2, y la MMP-11 o estromalisina-3. En relación con estas proteasas hay que señalar que los estudios con células transformadas por oncogenes, líneas celulares tumorales y modelos de tumores experimentales señalan que las células cancerosas son responsables de la producción de metaloproteasas en los tumores humanos. Sin embargo, en estudios llevado a cabo en cánceres de mama humanos, se ha reportado que los fibroblastos del estroma que rodeaban a las células tumorales, no las células tumorales mismas, son responsables de producir las estromalisinas<sup>21</sup>. Una posible explicación de la producción de MMPs por las células estromales del tumor fue el hallazgo de un inductor de metaloproteasas de la matriz extracelular o EMMPRIN (Extracellular Matrix Metaloproteinase Inducer) también llamado basigina o DDT/37<sup>22</sup>. El EMMPRIN es una glicoproteína de la membrana plasmática que es producida en grandes cantidades por las células tumorales, provocando la estimulación local de los fibroblastos para sintetizar MMP-1, MMP-2 y MMP-3. La interacción de las células tumorales con los fibroblastos vía EMMPRIN, conduce a la degradación local de la membrana basal y de componentes de la matriz extracelular, facilitando así la invasión por parte de las células tumorales, por lo que, de manera indirecta las células malignas facilitan su propia diseminación<sup>22-23</sup>. El EMMPRIN, además de inducir la producción de metaloproteasas, también induce la angiogénesis vía estimulación del VEGF, así como resistencia a multidroga mediante la sobreexpresión de ErbB2<sup>24</sup>.

- *Gelatinasas*

La actividad proteolítica de las MMP-2 y MMP-9 está dirigida a la degradación del colágeno intersticial desnaturalizado o gelatina, colágeno tipo IV y V de la membrana basal. Una característica estructural de las gelatinasas es la presencia en el seno de su dominio catalítico de tres secuencias peptídicas repetitivas análogos a los motivos de la fibronectina de tipo II. La MMP-2 o gelatinasa-A, es fisiológicamente expresada por las células del estroma de la mayoría de los tejidos, pero la expresión de la MMP-9 o gelatinasa-B es débil o

ausente en los tejidos normales, y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos. Sin embargo, su expresión puede ser inducida en caso de remodelación tisular como el desarrollo embrionario, cicatrización o invasión tumoral<sup>25-26</sup>.

- *Metaloproteasas asociadas a membrana*

Las MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25 también denominadas MT1-MMP a MT6-MMP, presentan la característica esencial de poderse unir a la membrana celular, bien sea por intermedio de un sitio hidrófobo de la membrana independiente del dominio hemopexina o por la vía del GPI o glicosilfosfatidilinositol. Es importante señalar que estas enzimas intervienen en la activación proteolítica de otras metaloproteasas<sup>27</sup>.

- *Grupo heterogéneo de metaloproteasas*

Una serie de metaloproteasas, las MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23/B, MMP-28, ha sido identificada sin que, hasta el momento se tenga claro el papel que desempeñan en el desarrollo del cáncer<sup>28-29</sup>. La MMP-12 cuyo sustrato principal es la elastina es secretada por los macrófagos, mientras que la MMP-20 o enamelisina, interviene en la formación del esmalte dentario<sup>30</sup>.

### **1.3.3. Papel de las metaloproteasas en la progresión tumoral**

Inicialmente, la importancia de las metaloproteasas fue atribuida a su capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular, favoreciendo así la invasión tumoral, pero actualmente se tiene claro que estas enzimas ejercen una actividad proteolítica dirigida contra proteínas no pertenecientes a la matriz extracelular, por lo que su papel en la progresión tumoral ha sido objeto de intensos estudios en los últimos veinte años. Así, independientemente de otras consideraciones, las metaloproteasas juegan un papel importante en las diferentes etapas de la progresión tumoral, como es considerado a continuación.

- *Proliferación*: Fenómeno inicialmente sospechado por la observación del efecto negativo de los inhibidores de las metaloproteasas sobre el crecimiento tumoral<sup>31</sup>. Los mecanismos para este efecto son múltiples y complejos e

involucran a los factores de crecimiento, citocinas y sus receptores. Algunas metaloproteasas como las estromalinas, digieren proteínas extracelulares que secuestran factores de crecimiento como es el caso de IGFBP-3 o *insulin-like growth factor binding protein 3*, que se une a IGF II o *insulin-like growth factor II*, también del perlecan que secuestra a su vez el bFGF o *basic fibroblast growth factor*<sup>32</sup>. Por otra parte, hay metaloproteasas que inducen un aumento de la actividad biológica de citocinas y de factores de crecimiento como fue demostrado para el caso de la interleukina-8, en la cual su actividad aumentó en un valor de 10 veces después de la digestión por la MMP-9. Algunas metaloproteasas tienen efecto antiproliferativo por su capacidad de solubilizar receptores de membrana de citocinas, y por lo tanto, disminuir su efecto biológico; ellas también actúan sobre la proliferación de las células tumorales por las modificaciones estructurales que inducen en las proteínas de la matriz extracelular, como la degradación del colágeno fibrilar que permiten, a células del melanoma, activar la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , disminuir la expresión de la proteína p27 para estimular, de esta manera, la proliferación celular<sup>33</sup>.

- *Invasión*: La invasión local es otra etapa de la progresión tumoral en la cual intervienen las proteasas. En particular, MMP-2 y MMP-9 presentan actividad proteolítica contra proteínas de la membrana basal tales como colágeno tipo IV y V<sup>34-35</sup>, las MMP-1 y la MT1-MMP contra el colágeno intersticial tipo I, II o III presente en el tejido conjuntivo que rodea las células tumorales invasoras. El papel que desempeñan las metaloproteasas en la invasión tumoral ha sido bien estudiado, se ha demostrado que las que se encuentran presentes a nivel del frente invasivo no son producidas por las mismas células tumorales, sino por las células estromales tales como fibroblastos, células endoteliales y macrófagos, que son estimulados por las células tumorales. Por otra parte, se han identificado en células malignas estructuras especializadas constituidas por una red de microfilamentos que se ha denominado invadopodias o podosomas, las cuales utilizan proteasas para degradar una variedad de sustratos que incluye fibronectina, laminina, colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. También se han identificado otras enzimas de membrana de diferentes clases

como componentes esenciales de estos elementos, y que incluyen serinoproteasas, seprase, dipeptil peptidasa IV, así como también MT-MMP. La membrana plasmática de los invadopodias vierte el contenido de vesículas que contienen MMP-9 y MMP-2 en la proteólisis direccional de la matriz extracelular durante la migración, especialmente durante la invasión por parte de las células cancerosas<sup>36</sup>.

- *Angiogénesis*: Numerosos estudios experimentales demuestran que la formación de nuevos vasos sanguíneos es un requerimiento vital para el crecimiento de un tumor maligno, demostrándose una correlación entre el incremento del número de vasos sanguíneos y el pronóstico del tumor. Se han identificado y caracterizados reguladores positivos de la angiogénesis, incluyendo factores de crecimiento tales como VEGF, alfa FGF, beta FGF, EGF, TGF-alfa, TGF-beta, TNF-alfa, angiopoyetina, angionina, interleuquina-8. También se han identificado receptores para factores angiogénicos, así como señales de traducción implicados en la angiogénesis. Es un proceso complejo que requiere:  
1.- degradación de la membrana basal y matriz extracelular que rodea vasos sanguíneos; 2.- quimiotaxis de las células endoteliales como respuesta a un estímulo angiogénico; 3.- proliferación de las células endoteliales; 4.- remodelación de la membrana basal del vaso sanguíneo neoformado. Esta remodelación se puede llevar a cabo como resultado de la actividad de las metaloproteasas, las cuales son producidas por las células endoteliales que secretan MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MT-MMP<sup>37</sup>. La función que desempeñan MMP-2 y MT-MMP ha sido mejor estudiada, y representan un papel crucial en este fenómeno. Las metaloproteasas también participan en ayudar a las células endoteliales a invadir y revascularizar tejidos ricos en fibrina tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta capacidad de invadir fue independiente del activador del plasminógeno y se asocia fundamentalmente con MT1-MMP, ya que en ausencia de esta metaloproteasa no hay actividad fibrinolítica siendo además las células incapaces de invadir el tejido rico en fibrina<sup>38</sup>. Las integrinas comprenden un grupo de moléculas de adhesión de superficie que se unen a componentes de la matriz extracelular, donde, por ejemplo, la integrina  $\alpha_v\beta_3$  se une directamente a

MMP-2 a través del dominio hemopexina de MMP-2. La angiogénesis depende de la adhesión mediada por la integrina  $\alpha_v\beta_3$ ; un fragmento de MMP-2 que comprende el dominio c-terminal (PEX) impide la unión de MMP-2  $\alpha_v\beta_3$ . por lo que el fragmento de PEX puede interrumpir la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Por ello, se ha propuesto como estrategia terapéutica, el empleo de PEX como inhibidor de la angiogénesis<sup>39</sup>.

- *Intravación, extravación y crecimiento de los tumores metastáticos:* Las metaloproteasas son activas en los procesos de intravación, efecto posible por la capacidad que tienen de destruir la membrana basal que rodea el vaso sanguíneo<sup>40</sup>. Inhibidores de las metaloproteasas reducen la formación de metástasis a partir de un tumor primario o la invasión de una membrana basal reconstituida *in vitro*. Por otra parte, el papel desempeñado en la extravación es menos evidente, pero, sin embargo, se ha demostrado que inhibidores de las metaloproteasas son incapaces de inhibir la colonización de los pulmones por células tumorales inyectadas en la circulación venosa<sup>41</sup>. Las metaloproteasas también podrían intervenir en el crecimiento de los tumores metastáticos, efecto complejo, ya que, implica una participación sobre la angiogénesis y la proliferación celular.

#### **1.3.4 Inhibidores terapéuticos de las metaloproteasas**

El papel de las metaloproteasas en la progresión tumoral representa un blanco terapéutico importante, principalmente si se considera que, en numerosos tumores, éstas son producidas por las células del estroma, más que por las células tumorales, lo que sugiere que la inhibición de las MMPs podría escapar a los mecanismos de resistencia que desarrollan las células cancerosas ante los agentes quimioterápicos debido a la inestabilidad genética<sup>42-43</sup>. Por ello, se están desarrollando diferentes estrategias para interferir tanto la expresión como la activación de las metaloproteasas, donde la metodología principal reside en la utilización de inhibidores sintéticos que interactúan directamente con el sitio catalítico de estas, bloqueando de manera reversible su actividad proteolítica<sup>44</sup>. Se han sintetizado gran cantidad de moléculas que poseen una alta afinidad por estas enzimas, clasificándose en dos categorías.

- *Inhibidores pseudopeptídicos*: Estos compuestos presentan una estructura que mimetizan el sitio de unión al sustrato, y tienen la particularidad de competir con el sustrato de las metaloproteasas, uniéndose al sitio catalítico por quelantes del átomo de Zn, y que actualmente son utilizados en el tratamiento de una amplia variedad de tumores<sup>45</sup>. La mayoría de los inhibidores estudiados tanto *in vitro* como *in vivo* de esta categoría son derivados de hidroxamatos, siendo los más conocidos el batimastato o BB94 y marimastato o BB2516, los cuales presentan un amplio espectro de acción. El segundo presenta una mejor biodisponibilidad oral que el primero, ha sido el primer inhibidor de metaloproteasas que se experimentó clínicamente, presentando toxicidad en la fase I. Los principales efectos secundarios reportados han sido dolores músculo-articulares de tipo inflamatorio que desaparecen al suspender el tratamiento. Los estudios realizados combinando el marimastato con drogas citotóxicas como la temozolomida, mostraron un efecto sinérgico, el cual mejoró el cuadro clínico de pacientes con glioblastoma multiforme<sup>46</sup>. Pacientes con cáncer avanzado de pulmón en fase I fueron tratados con la combinación de marimastato, carboplatino, paclitaxel a las dosis de 10 mg, 7 mg/m<sup>2</sup>, 175 mg/m<sup>2</sup> respectivamente; los pacientes toleraron las dosis suministradas, pero solamente presentaron una respuesta parcial.
- *Inhibidores no-peptídicos*: La limitada biodisponibilidad oral de los inhibidores pseudopeptídicos, a excepción del marimastato, más la falta de selectividad, han conducido a la síntesis de inhibidores no-peptídicos. La estructura de estos compuestos se fundamentó sobre el análisis tridimensional del sitio catalítico por radio-cristalografía, y el modo de acción inhibitorio es similar al de los agentes pseudo-peptídicos, pero con una mayor especificidad por el tipo de metaloproteasa a inhibir. Su espectro de acción es más selectivo, con una débil actividad frente a la metaloproteasa-1, pero con una fuerte actividad para las metaloproteasa-2 y 9. Entre las principales moléculas de esta categoría se encuentra el prinomastato que es un inhibidor selectivo para las metaloproteasas 2, 3, 9,13 y 14, que ha sido evaluado clínicamente por su capacidad de inhibir la

metástasis en pacientes con diferentes tipos de tumores sólidos. A dosis toleradas y con bajos niveles de citotoxicidad, se observó una buena respuesta durante los tres meses de tratamiento<sup>47</sup>. En el modelo ortotópico de cáncer de pulmón NCI-H460, que exhibe alto patrón metastásico y que expresa MMP-2, MT1-MMP (MMP-14), se estudió la actividad antitumoral del prinomastato como simple agente o en combinación con el carboplatino a bajas dosis; en ambos casos se observó un incremento en la supervivencia de ratones portadores de este tumor. Combinando el prinomastato con gemcitabina y cisplatino a las dosis de 15 mg, 1.250 mg/m<sup>2</sup>, 75 mg/m<sup>2</sup> respectivamente, se realizó un estudio en pacientes con cáncer de pulmón en fase III. Los resultados no mostraron mejoría, así como tampoco un aumento en la supervivencia<sup>48</sup>. El BMS-275291 es otro nuevo inhibidor de las metaloproteasas, que ha sido ensayado a dosis límite de 1200 mg/día en pacientes en cáncer colo-rectal avanzado y de pulmón metastásicos en fase II, observándose un incremento de la supervivencia, y que a dosis superiores provoca una alta citotoxicidad<sup>49</sup>. Un inhibidor oral de las metaloproteasas, el MMI270 (CGS27023A) reduce el crecimiento del tumor y la metástasis en ensayos preclínicos, pero provoca efectos tóxicos que son reversibles una vez que se detiene el tratamiento. Combinando el MMI270 con fluoruracilo y ácido folínico, se ha realizado un estudio en pacientes con cáncer colorectal avanzado utilizando dosis de 500mg de fluoruracilo, 200 mg de ácido folínico y 300 mg de MMI270; los pacientes toleraron el tratamiento sin efectos citotóxicos evidentes y con un aumento de supervivencia<sup>50</sup>. El BAY 12-9566 es otro inhibidor no peptídico que inhibe la angiogénesis y la metástasis, observándose experimentalmente efectos secundarios tales como elevaciones asintomáticas de las enzimas hepáticas y trombocitopenia. Sin embargo, en el modelo ortotópico MDA-MB-435 de un carcinoma mamario humano trasplantado en ratón, el BAY 12-9566 administrado diariamente a una dosis límite de 100 mg/kg/día inhibió el crecimiento del tumor, así como la metástasis sin producir efectos citotóxicos secundarios. Este inhibidor no ha sido, hasta ahora utilizado en la clínica, sin embargo, se presenta como una alternativa para ser empleado en el tratamiento de cáncer de mama adyuvante a la cirugía<sup>51</sup>.

- *Derivados de la tetraciclina:* Estos compuestos inhiben las colagenasas y gelatinasas y comprenden los antibióticos clásicos tales como la tetraciclina, doxiciclina, minociclina, y también nuevos compuestos análogos, tal como el metastato (col-3) que es una tetraciclina modificada para eliminar la actividad antimicrobiana y la toxicidad gastrointestinal. Entre los efectos secundarios de este inhibidor se encuentran la foto-toxicidad cutánea, anemia, náuseas, aumento de enzimas hepáticas, fiebre y neurotoxicidad. Estos derivados bloquean las actividades de las metaloproteasas por acción de agentes quelantes del átomo de Zn del sitio catalítico, interfiriendo con la activación proteolítica de las proenzimas, reduciendo a su vez la expresión de las metaloproteasas y disminuyendo su degradación<sup>52</sup>. Ensayos clínicos realizados con pacientes con diferentes tipos de tumores sólidos, que han recibido col-3 a dosis límite de 50 mg/m<sup>2</sup>/día han puesto de manifiesto una estabilización de la enfermedad con pocos efectos secundarios<sup>53</sup>.
- *Bifosfonatos:* Son moléculas capaces de inhibir las metaloproteasas, inicialmente utilizados en las alteraciones del equilibrio del calcio, y más tarde en el tratamiento paliativo de las metástasis óseas. Estas moléculas actúan disminuyendo la actividad proteolítica y reduciendo la secreción de MMP-2 y MT1-MMP (MMP-14). El clodronato, un bifosfonato, inhibe la actividad de MM1-MMP, reduciendo la capacidad invasiva y metastásica de las células del osteosarcoma MG-63<sup>54</sup>. Los estudios terapéuticos que utilizan estos inhibidores han sido realizados en pacientes que presentan cáncer en estadio avanzado, y las experiencias llevadas a cabo en modelos animales han mostrado claramente que la inhibición de las metaloproteasas es más eficaz en las etapas precoces de la progresión tumoral.

En pacientes con cáncer avanzado, los principales blancos para las MMPs, son la invasión tumoral, angiogénesis y la diseminación metastásica, no se han producido los resultados esperados, por lo que el efecto de estos inhibidores es insignificante a este nivel. Por tanto, ya que no se ha podido obtener un claro efecto benéfico del papel de

los inhibidores de las metaloproteasas en el tratamiento antitumoral de los pacientes con cáncer, hay necesidad de insistir en este tema dada la importancia crucial de los mecanismos involucrados. Lo deseable sería poder realizar con seguridad, estudios clínicos en pacientes con cáncer en estado precoz o en remisión, con el fin de lograr un tratamiento preventivo de la diseminación metastásica<sup>55</sup>. Adicionalmente, como previamente se ha sugerido, estos inhibidores podrían ser utilizados en la clínica en combinación con otros agentes antitumorales. Para lo cual, se requiere la disponibilidad de marcadores biológicos capaces de identificar, precoz y específicamente la actividad de los inhibidores de las MMPs, lo cual permitiría hacer la evaluación exhaustiva de estos estudios.

### **1.3.5 Perspectivas de futuro**

La participación activa de las metaloproteasas en las diferentes etapas de la progresión tumoral se apoyan sobre las diferentes observaciones clínicas de la expresión de estas enzimas en diferentes tipos de cánceres metastásicos humanos, así como también sobre las proteínas de la matriz que son modificadas por ellas, y su influencia tanto en el crecimiento como en la invasión tumoral, es lo que ha llevado como consecuencia a el desarrollo de inhibidores sintéticos de las MMPs.

Estudios preclínicos realizados en modelos animales utilizando estos inhibidores han demostrado inhibición de las MMPs en los tumores con resultados alentadores, por lo cual es necesario realizar más estudios e insistir en la posibilidad de su utilización en el tratamiento de pacientes con cáncer, a pesar de que los primeros ensayos no han aportado un claro beneficio terapéutico. No obstante, el estudio de la aplicación de estos inhibidores tanto en etapas precoces como avanzadas deben continuar desarrollándose para aprovechar el potencial inhibitorio de estas moléculas, siendo también muy importante el desarrollo de marcadores biológicos que permitan el seguimiento *in vivo* del efecto de estos inhibidores, así como el mecanismo de acción de estos compuestos.

Adicionalmente, es necesario identificar las señales que son responsables de la interacción molecular entre las células del estroma y las tumorales, requisito necesario para evaluar los posibles blancos de las MMPs que son producidas por las células del

estroma. La estabilidad genética de las células del estroma, comparada a las de las células tumorales, hacen del sistema un blanco atractivo para los tratamientos quimioterapéuticos, por lo que, es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que aclaren en toda su dimensión el papel que desempeñan las MMPs en la fisiopatología del cáncer.

Largos años de investigación han demostrado el papel fundamental que desempeñan las proteasas tanto en el desarrollo embrionario, como en la reparación y remodelación de tejidos, así como en los procesos de invasión por parte de las células malignas que llevan a la infiltración y metástasis, propiedades que signan la malignidad del cáncer. Entonces, ¿Por qué no insistir en controlarlas?

#### **1.4 FACTORES DE RIESGO**

El riesgo de padecer cáncer de mama está determinado por factores ambientales y de estilo de vida, algo que se ha identificado por la variación geográfica en la incidencia y mortalidad, tanto entre los diferentes países como entre las áreas urbanas y las rurales. En más de los 2/3 de los cánceres de mama no se encuentran factores de riesgo salvo el ser mujeres y envejecer. Esto nos indica que los factores de riesgo no son, en sí mismos, causantes del cáncer de mama, pero la exposición a estos si aumenta la posibilidad de padecerlo.

##### **1.4.1 Sexo**

El 99% de los cánceres de mama se presentan en mujeres, y solo 1% en hombres. Ser mujer es, por tanto, el factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de mama. Las células mamarias de la mujer crecen y cambian constantemente por la actividad de las hormonas femeninas, fundamentalmente estrógenos y progesterona. Esta actividad aumenta notablemente el riesgo de cáncer de mama.

##### **1.4.2 Edad.**

Es el factor de riesgo más importante después del sexo, la incidencia del cáncer de mama va aumentando progresivamente con la edad, con una incidencia más alta después de los 35 años; en edades posteriores la frecuencia aumenta hasta alcanzar una meseta entre los 45-55 años, para finalmente aumentar de forma manifiesta. No

obstante, en mujeres con mayor carga genética, el cáncer tiende a ocurrir en edades más tempranas que en los casos esporádicos con el 83% de los casos en mujeres mayores de 50 años y sólo el 1.5% en mujeres con menos de 30 años<sup>56</sup>.

### **1.4.3 Antecedentes familiares.**

Las mujeres con familiares con cáncer de mama, sobre todo en primer grado y la afectación mamaria bilateral, tienen mayor riesgo de sufrir la enfermedad que el resto de la población general. En su mayor parte este aumento de riesgo es atribuible a factores ambientales compartidos. De acuerdo con estos antecedentes familiares los cánceres de mama los podríamos clasificar en:

- *Esporádicos*. Sin antecedentes en dos o más generaciones. Es el más frecuente (65-70%)
- *Familiar*. Varios miembros de la familia con parentesco de primer o segundo grado (hermanas, madre, tías, abuela) sufren la enfermedad. Se presenta en el 15-25% de los casos y se cree que se debe a factores ambientales, sociales, al azar o por factores genéticos desconocidos. Una historia familiar de cáncer de mama en 1<sup>er</sup> o 2<sup>o</sup> grado se asocia a un riesgo relativo de 2-3; cuando se da en hermana y madre y en edad joven el riesgo relativo se eleva a 5-10.
- *Hereditario*. En este tipo de cáncer de mama los factores genéticos primarios son el punto más importante en la etiología del tumor. Es el menos frecuente, siendo el 5-10% de todos los casos de cáncer de mama. La susceptibilidad al cáncer de mama generalmente se hereda de forma autosómica dominante, con penetrancia limitada; esto significa que puede transmitirse a través de ambos sexos y que algunos miembros de la familia pueden transmitir el gen anormal, pero no desarrollar el cáncer. Las mutaciones hereditarias relacionadas con el cáncer de mama aumentan el riesgo. Todavía no se sabe cuántos genes pueden estar relacionados con el cáncer de mama. Mujeres que llevan la mutación deletérea en cualquiera de los genes BRCA: BRCA1 o BRCA2 tienen un riesgo significativamente aumentado de cáncer de mama o de ovario. Con frecuencia,

los cánceres mamarios asociados a estas mutaciones afectan ambas mamas y se presentan en mujeres más jóvenes que los que no están asociados con ellas.

Otras mutaciones genéticas que pueden también producir cánceres de mama hereditarios, aunque se presentan con mucha menos frecuencia, son:

- ATM: ataxia-telangiectasia.

-TP53: síndrome de Li-Fraumeni. El gen TP53 provee instrucciones para producir una proteína llamada p53 que ayuda a detener el crecimiento de las células anormales.

-CHEK2: síndrome de Li-Fraumeni, que también puede ser causado por mutaciones hereditarias en el gen CHEK2.

-PTEN: síndrome de Cowden. El gen PTEN ayuda normalmente a regular el crecimiento celular.

-CDH1: cáncer gástrico difuso hereditario. Las mujeres con mutaciones en este gen también tienen un riesgo aumentado de padecer cáncer de mama lobulillar invasivo.

-STK11: síndrome de Peutz-Jeghers.

-PALB2: el gen PALB2 produce una proteína que interactúa con la proteína producida por el gen BRCA2. Aún no está claro si las mutaciones del gen PALB2 también aumentan el riesgo de cáncer de ovario y de cáncer de mama en hombres.

#### **1.4.4 Antecedentes personales de cáncer.**

Las mujeres con antecedentes personales de cáncer de mama en una mama tienen un riesgo 3 a 4 veces mayor de padecer un nuevo cáncer en otra parte de la misma mama o en la mama contralateral. Esto es diferente a la recurrencia del primer cáncer. Mujeres que han tenido un carcinoma ductal in situ o carcinoma lobulillar in situ, o antecedentes de enfermedad proliferativa benigna mamaria, tienen también aumento del riesgo de cáncer de mama<sup>57</sup>.

#### **1.4.5 Antecedentes de enfermedades proliferativas de la mama.**

- Los cambios histológicos producidos por el desarrollo e involución del tejido mamario (cambios fibroquísticos, fibroadenomas, quistes, fibrosis, etc.) no condicionan un aumento de riesgos de cáncer.
- El diagnóstico histológico de hiperplasia epitelial típica tiene un riesgo escaso de desarrollar cáncer (RR 1-2).
- El riesgo de cáncer se incrementa considerablemente cuando el diagnóstico es de hiperplasia epitelial atípica y que un mayor grado terminarían en un carcinoma in situ. El RR es de 4-5, este riesgo es para ambas mamas y no sólo para la zona operada<sup>58</sup>.
- Un tercio de las pacientes con carcinoma in situ no tratadas, desarrollarán un carcinoma invasivo en esa mama en los siguientes 10-18 años.

#### **1.4.6 Menarquia precoz (<12 años) y menopausia tardía (>50 años).**

Son dos claros factores de riesgo debido a que condicionan una mayor exposición temporal (>30 años) del tejido glandular mamario a los estrógenos ováricos. Una mujer con la menopausia natural antes de los 45 años tiene la mitad de riesgo que una de su misma edad con menopausia a los 55 años. También se explica que una ovariectomía antes de los 40 años reduce en alrededor del 75% el riesgo de padecer carcinoma de mama.

La importancia que la influencia estrogénica tiene como inductor de proliferación celular en la mama se observa al comprobar que aproximadamente 1/3 de las pacientes con cáncer de mama experimentaban una remisión del tumor cuando se las sometían a tratamientos que implicaban el descenso en los niveles de estrógenos circulantes en sangre periférica. Así mismo, en células en cultivo se ha observado que los estrógenos estimulan la secreción de factores de crecimiento mitogénicos (TGF- $\alpha$ , IGF-1, EGF) e inhiben la secreción de factores represores de la mitosis como el TGF- $\beta$ mediada como factores paracrinos a nivel del estroma mamario y favoreciendo la proliferación celular sobre la mama<sup>59</sup>.

#### **1.4.7 Paridad y edad del primer embarazo**

La nuliparidad también va asociada a un mayor riesgo, mientras que la esterilidad pudiera representar un factor protector. En cuanto al número de hijos, no está claro que sea un factor de protección, pero, de serlo, sería con más de 4-5 hijos.

La edad del primer embarazo a término (<25 años) tiene valor hasta en mayores de 75 años e incluso algunos autores consideran que tener el primer hijo antes de los 20 años supone disminución del riesgo en un 50% con relación a nulíparas. El tener el primer hijo después de los 35 años parece que aumenta el riesgo tres veces más. El embarazo actuaría mediante los múltiples cambios hormonales a una diferenciación y resistencia del tejido mamario a la transformación neoplásica.

#### **1.4.8 Exposición a radiación ionizante**

La exposición reiterada a radiaciones ionizantes, principalmente en etapas de la vida donde existe gran proliferación y recambio celular como ocurre con edades inferiores de 20 años, es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama debido al mayor peligro de daño sobre en ADN.

#### **1.4.9. Otros factores de riesgo:**

- *Dieta.* La ingesta elevada de productos derivados de grasa animales y el alcohol aumentan en riesgo de desarrollo de cáncer de mama, mientras que la ingesta de frutas, fibra, antioxidantes y fitoestrógenos son factores protectores; esto puede ser atribuido en parte a las propiedades antioxidantes de determinados alimentos, así como a la influencia de estos en la reparación del ADN<sup>60</sup>.
- *Obesidad.* Los estudios epidemiológicos no han ofrecido un resultado concluyente. Aunque no está suficientemente probada, parece que existe cierta relación entre el riesgo de padecer cáncer de mama y los hábitos dietéticos<sup>61</sup>.
- *Tratamientos hormonales:* Actualmente no está suficientemente establecido el riesgo asociado al uso de hormonas exógenas y el desarrollo de cáncer de mama, si bien parece que hay una mayor frecuencia de presentación de tumores de mama en mujeres que han utilizado terapia hormonal sustitutiva durante más de 5 años que entre las mujeres que no lo han hecho<sup>62</sup>. En cualquier caso, la terapia

hormonal sustitutiva, requiere de un análisis preciso de los beneficios y los riesgos que puedan derivarse de su prescripción.

## **1.5 FACTORES PRONÓSTICOS Y ESTADIFICACIÓN DEL CANCER DE MAMA. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CANCER DE MAMA Y PLATAFORMAS GENÓMICAS.**

Dado que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, con una historia natural diferente entre los distintos tipos de tumores y los pacientes que lo padecen, es necesario conocer factores objetivos que permitan predecir el pronóstico de la enfermedad. Se conocen como factores pronósticos aquellas características objetivas, del tumor o del paciente, que influyen directamente en su evolución natural y, por tanto, pueden predecir los resultados de su seguimiento. La estadificación de la enfermedad consiste en determinar su extensión anatómica en el momento del diagnóstico, y tratar de conocer la tendencia de su progresión en el tiempo, de forma que se pueda instaurar un tratamiento óptimo.

Por lo tanto, los factores pronósticos se pueden clasificar en tres categorías distintas que nos ayudan a planificar un tratamiento médico adecuado como se describe a continuación.

### **1.5.1 Factores dependientes del paciente**

- *Edad.* El cáncer de mama suele presentarse en mujeres a partir de los 50 años de edad, siendo poco frecuente su diagnóstico en mujeres de menos de 35 años<sup>63</sup>. Se ha visto que en mujeres jóvenes, menores de 35 años los tumores son de mayor agresividad, con perfiles de diferenciación e inmunohistoquímica que favorecen el aumento de recaídas y una menor supervivencia.
- *Obesidad.* La obesidad está considerada un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama y también afecta de manera negativa a la supervivencia en las mujeres que han sido diagnosticadas de cáncer de

mama, ya que presentan una mayor probabilidad de recaída. Entre los posibles mecanismos relacionados, destaca una actividad estrogénica elevada y la activación de vías relacionadas con diversos receptores de membrana.

- *Inmunocompetencia*. En los últimos años ha habido contribuciones para el entendimiento de los mecanismos inmunológicos en el cáncer de mama y sus posibles relaciones con el pronóstico, el tratamiento y sus implicaciones preventivas. La respuesta inmunológica frente al tejido neoplásico dependerá de la antigenidad tumoral y de la situación inmunológica del huésped. En la respuesta inmunológica se ha valorado la acumulación focal de células linfáticas alrededor del tumor, perivenosas o histiocitosis sinusoidal ganglionar. Son cada vez más numerosos, por ejemplo, los estudios que correlacionan la respuesta inmunitaria local a tratamiento neoadyuvante con un mejor pronóstico de las pacientes.

### **1.5.2 Factores dependientes de las características histológicas del tumor**

- *Estadio ganglionar (N)*. Es el factor más importante, tanto para la supervivencia global como para la supervivencia libre de enfermedad<sup>64</sup>. El diagnóstico de enfermedad ganglionar precisa de linfadenectomía o la biopsia selectiva del ganglio centinela ya que la valoración clínica o por métodos no invasivos de diagnóstico por imagen no presentan la suficiente sensibilidad ni especificidad. Se estima que el 70% de las pacientes con ganglios axilares positivos recidivarán a los 10 años mientras que, en los pacientes con ganglios axilares negativos, el porcentaje de recidivas se reduce a un 20-30%.

Al analizar los ganglios extirpados en una disección ganglionar podemos hallar la presencia de focos microscópicos metastásicos que según su tamaño se definen como pN1 si su tamaño está comprometiendo entre 2 mm y 0.2 mm, y pN0 cuando éste es menor de 0.2 mm.

- *Tamaño tumoral (T)*. Es uno de los factores pronósticos más importantes junto con la afectación ganglionar. El tamaño tumoral se correlaciona con la presencia

y el número de ganglios linfáticos afectados, siendo además un factor pronóstico independiente que influye sobre el riesgo de desarrollar metástasis a distancia en proporción directa al tamaño tumoral<sup>65</sup>. Se ha descrito que pacientes con tumores de pequeño tamaño <0.5 cm no suelen presentar metástasis axilares. Así en pacientes con tumores menores de 1 cm la supervivencia global estimada a los 5 años es del 99% comparando con el 89% para tumores entre 1-3 cm y el 86% para tumores entre 3-5 cm.

- *Grado histológico (G)*. Es otro de los factores pronósticos utilizados en la clínica como criterio para considerar la indicación de tratamiento adyuvante en las pacientes con cáncer de mama. Su importancia como factor pronóstico independiente del tamaño tumoral y de la afectación ganglionar, ha sido evaluada en numerosos estudios tanto por la mayor frecuencia de aparición de metástasis a distancia como por la menor supervivencia global encontrada en aquellas pacientes que presentan tumores con mayor grado histológico<sup>66</sup>. La clasificación más usada es la de Scarff-Bloom-Richardson que incluye el análisis del índice mitótico, el grado de diferenciación y el pleomorfismo celular, asignando una puntuación de 1 a 3 a cada variable siendo la suma de estas la que definirá el grado histológico en:
  - *Grado 1*: (bien diferenciados): tumores con puntuación final entre 3 a 5 puntos
  - *Grado 2*: (moderadamente diferenciados): tumores con puntuación final comprendida entre 6 a 7 puntos
  - *Grado 3*: (pobrementemente diferenciados): tumores con puntuación final de 8 a 9 puntos.
- *Tipo histológico*. Por muchos años, esta ha sido la clasificación clásica del cáncer de mama. Se divide en *in situ* y enfermedad invasiva. El *in situ* se divide en ductal y lobular. Según la clasificación del Cáncer de Mama de la OMS<sup>19</sup>; existen más de 21 subtipos de enfermedad invasiva, siendo el carcinoma ductal infiltrante (tipo no especial) el más frecuente, 40-75% de los casos y el resto,

sería “tipo especial”, incluye lobular invasivo, tubular, mucinoso, metaplásico, medular , neuroendocrino, entre otros. El carcinoma ductal infiltrante es un diagnóstico de exclusión, ya que no cumple los criterios histológicos de un “tipo especial”. Se usa un sistema de clasificación histológica “Elston & Ellis” que va del 1 al 3, siendo el 1 más diferenciado y el 3 indiferenciado y usa de parámetros la formación tubular, el grado de pleomorfismo nuclear y el conteo de células con alto nivel de mitosis. Cada una de ellas con características moleculares distintas que le otorgan un comportamiento biológico y pronóstico variable de acuerdo con el tipo histológico<sup>67</sup>.

- *Invasión linfática o vascular:* En una cuarta parte de las pacientes con cáncer de mama se identifican células tumorales en los vasos linfáticos y sanguíneos. Su presencia está asociada a una mayor incidencia en recidivas locales y metástasis a distancia.
- *Afectación de bordes:* Márgenes positivos de la pieza extirpada postquirúrgicos.

### **1.5.3 Factores dependientes de las características biológicas y moleculares del tumor.**

- *Expresión de receptores hormonales (RH).* La determinación de receptores estrogénicos (RE) y receptores de progesterona (RP) por técnicas de inmunohistoquímica en el estudio anatomopatológico del cáncer de mama, se ha convertido en la actualidad en una práctica obligada por la repercusión tanto pronóstica como predictiva de respuesta a la administración de tratamiento hormonal, debido a que el carcinoma de mama es un tumor hormonodependiente sobre todo en mujeres posmenopáusicas<sup>68</sup>. Aproximadamente entre un 55% y un 65% de los carcinomas primarios de mama diagnosticados en la actualidad y entre un 45% a un 55% de las metástasis derivadas del tumor primario expresan receptores hormonales. Este hallazgo se ha correlacionado con un moderado factor pronóstico a la vez que un importante factor predictivo de respuesta al tratamiento hormonal tanto en adyuvancia como en pacientes con metástasis, por ayudar a predecir la probabilidad de recidiva y supervivencia de estas pacientes.

Por tal motivo se acepta que aquellas pacientes con ausencia de expresión de RE (-) y/o RE-/RP- tienen una supervivencia a los 5 años entre un 8% a un 35% más baja que aquellas pacientes con tumores RE(+)<sup>69</sup>.

- *Expresión de Her-2/neu (erb-2)*. Oncogén *cerb2*: El oncogén HER2/neu es un oncogén localizado en el cromosoma 17q21 que codifica una proteína de membrana de 185 kD denominada p185, perteneciente a la familia de los receptores tirosín quinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) involucrada en la transducción de señales relacionadas con procesos de proliferación y diferenciación celular. Consta de 4 miembros denominados HER1(EGFR), HER2, HER3 y HER4 y la proteína que forma el receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Se ha observado que, en el cáncer de mama, esta proteína se encuentra amplificada en alrededor del 20-30% de los casos, estableciéndose como un factor pronóstico independiente tanto para la supervivencia global como para el intervalo libre de enfermedad, especialmente si presentan ganglios linfáticos positivos. Además, también resulta un factor predictivo de la respuesta al tratamiento con un anticuerpo monoclonal dirigido específicamente frente a él (trastuzumab), y que ha mostrado su utilidad en el tratamiento de pacientes con enfermedad metastásica y en el tratamiento adyuvante. La sobreexpresión de HER2 está relacionada con mayor frecuencia con tumores RE (-), con pobre grado de diferenciación histológica y con una mayor proporción de pacientes con afectación axilar e invasión vascular, todo lo cual explica el menor intervalo libre de enfermedad y menor supervivencia global que caracteriza este grupo de pacientes<sup>70</sup>.

- *Proteína P53 (p53)*. El gen p53 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en la banda 17p. Es un gen supresor de tumores que interviene en la reparación del ADN por lo que se le ha denominado “*guardián del genoma*” actuando como regulador negativo del crecimiento celular. La mutación del gen p53 se ha descrito en el 20-50% de los cánceres de mama aumentando su

frecuencia en aquellos pacientes con antecedentes familiares. Se asocia con un factor de mal pronóstico por causar la pérdida de la función supresora y permitir el crecimiento celular ilimitado.

- *Ki-67(mib)*. Es una proteína nuclear de 349kD que se aísla en aquellas células que se encuentran en fases activas del ciclo celular como son la fase G1, S, G2 y M. Por lo tanto, su marcaje permite la identificación de la proporción de células de un tumor que se encuentran en fase de proliferación celular. Por esa razón se considera como factor pronóstico adverso de la enfermedad, puesto que a mayor proporción de Ki-67 aislado en una pieza tumoral, mayor índice mitótico y de proliferación celular tienen las células del tumor y, por tanto, se entiende que la mayor agresividad y peor pronóstico se asocia con la presencia de este marcador en niveles elevados mientras que un pronóstico más favorable podría asignarse a los tumores que expresan Ki-67 en baja proporción<sup>71</sup>.
- *Expresión de enzimas proteolíticas de la matriz extracelular*. Son enzimas que permiten la degradación de la matrix extracelular, posibilitan la movilidad celular, la invasión y ulterior migración celular, ensombreciendo el pronóstico. Aunque con resultados controvertidos y dependientes del método utilizado para su determinación y cuantificación, se ha relacionado con una disminución de la supervivencia global y libre de enfermedad. Destacando este tipo de enzimas se encuentran MMPs que muestran una expresión más fuerte en el cáncer de mama en comparación con el tejido mamario normal y, por lo tanto, su presencia podría estar asociada con el desarrollo del cáncer de mama como ya se ha descrito en apartados anteriores. Estas proteasas, concretamente la estromelina MMP-11 y la colagenasa MMP-13 se han relacionado con tumores malignos de mama con peor pronóstico. Concretamente, el aumento de MMP-11 es un factor pronóstico independiente con menor tasa de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama y ganglios positivos<sup>72</sup>.

Se ha visto también que los niveles de estas enzimas están relacionados directamente con el tamaño tumoral, el grado del tumor, con la presencia o no de

los receptores estrogénicos, y la afectación de los ganglios linfáticos. Diferentes MMPs, como la MMP-1, -7, -9, -10, -12 y -15 aumentan significativamente en tumores con RE-negativos. A su vez se ha observado que los niveles de MMP-1 se elevan en los tumores con tamaño > 2 cm. La expresión de la MMP-10 se incrementa en los cánceres de mama con ganglios linfáticos positivos en comparación con los carcinomas con ganglios negativos<sup>73</sup>.

Como ya hemos visto las MMPs están involucradas en la mediación de la progresión del cáncer de mama y pueden ser por lo tanto buenas dianas para el diseño de inhibidores específicos de MMPs en el tratamiento del cáncer de mama.

#### **1.5.4 Índices pronósticos**

Los índices pronósticos permiten la identificación de grupos de pacientes con diferentes pronósticos utilizando la combinación de variables pronosticas independientes. Existen diversos sistemas de puntuación, *scores* o índices, que permiten un mayor conocimiento de la posible evolución concreta e, incluso, plantear distintas indicaciones terapéuticas. El Índice Pronóstico de Nottingham (IPN) es un índice derivado de un estudio multivariante retrospectivo, capaz de predecir la supervivencia en pacientes con cáncer de mama invasor. El índice está basado en el tamaño del tumor, estadio de los ganglios linfáticos y grado histológico, y permite la estratificación de pacientes en tres grupos pronóstico distintos. Se calcula del siguiente modo:  $IPN = \text{tamaño (cm)} \times 0,2 + \text{grado (I-III)} + \text{puntuación de ganglios linfáticos (1-3 de acuerdo con estadio A-C)}$ , modificado después de muestreo de 4 ganglios axilares junto con muestreo de ganglios mamarios internos, solo para tumores localizados medialmente. Estadio A significa no afectación de ganglios regionales; estadio B, afectación de  $\leq 3$  ganglios axilares o afectación de los ganglios mamarios internos; estadio C,  $> 3$  ganglios axilares o afectación tanto de ganglios mamarios internos como axilares. Valoración: bueno ( $I \leq 3,4$ ), moderado ( $3,4 < I \leq 5,4$ ) y pobre ( $I > 5,4$ ). Una puntuación de IPN menor de 3,4 presenta un pronóstico significativamente bueno y no precisaría terapia adyuvante con quimioterapia. Su valor como herramienta pronostica en casos de

riesgo intermedio ha quedado relegado a un segundo plano como se verá más adelante, con la llegada de las plataformas genómicas.

El Índice Pronóstico de Van Nuys (IPVN) se emplea en carcinomas *in situ*, pues conocemos que después de su extirpación tiene alta incidencia de recidivas locales (20 %), de las cuales cerca de la mitad serán invasivas, con el consiguiente riesgo de metástasis y muerte de la paciente. El IPVN interrelaciona los factores pronósticos de recidiva local y crea un índice pronóstico de recidiva cuyo resultado puede servir de guía terapéutica.

### 1.5.5 Estadificación del cáncer de mama

Basados en la extensión anatómica del cáncer de mama, se utiliza el sistema de clasificación y estadificación TNM. Este sistema utiliza designaciones específicas para clasificar el tamaño tumoral (T), la afectación ganglionar (N) y las metástasis a distancia (M), y después estos datos son agrupados en categorías o estadios con pronósticos similares (Tabla 1).

El *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *Union International Contra el Cancer* (UICC) acordaron, en 1992, un sistema TNM para la clasificación y estadificación del cáncer de mama. Ofrece los detalles con vistas a la clasificación T, N y M. Se puede estadificar el cáncer de mama mediante diagnóstico clínico (cTNM), evaluación quirúrgica (sTNM) o estudio patológico posquirúrgico (pTNM). Este sistema de clasificación es simple, flexible, valora la extensión de la enfermedad y proporciona información pronóstica (Tabla 2). La última edición (8.a) del AJCC *Cancer Staging System* se ha publicado, y como novedad, ha incorporado la inclusión de factores biológicos y plataformas genómicas<sup>1</sup>.

**Tabla 1.** *Clasificación del tumor primario (TNM). Fuente: Cirugía de la Mama. Guías Clínicas de la AEC 2017.*

T: TUMOR	CLASIFICACIÓN	
Tx	El tumor primario no se puede medir	
T0	No hay evidencia de tumor primario	
Tis	Carcinoma in situ: Intraductal o Enfermedad de Paget del pezón no asociada a tumor	
T1	Tumor ≤ 2 cm o menos en su diámetro máximo T1mi: Micro invasión ≤ 0,1 cm de diámetro máximo T1a: > 0,1 cm pero ≤ 0,5 cm T1h: > 0,5 cm pero < 1 cm	
T2	Tumor > 2,0 cm pero ≤ 5,0 cm	
T3	Tumor > 5,0 cm	
T4	Tumor de cualquier tamaño que se extiende a piel o pared torácica (no pectoral mayor) T4a: Extensión a pared torácica T4b: Edema o ulceración de la piel o nódulos dérmicos satélites T4c: Extensión a ambos (4a y 4b) T4d: Cáncer inflamatorio	
N GL. LINFÁTICOS	CLASIFICACIÓN	
	Cínica (cN)	Patológica (pN)
Nx	No se puede clasificar	No se puede clasificar
N0	Ganglios linfáticos regionales (GLR) sin metástasis	GLR sin metástasis histológicas, sin más estudios pN0(i-): GLR sin metástasis histológicas, IHQ (-) pN0(i+): GLR sin metástasis histológicas, IHQ (+) ≤2mm pN0(mol-): GLR sin metástasis histológicas, PCR (-) pN0(mol+): GLR sin metástasis histológicas, PCR (+)
N1	Metástasis en ganglios linfáticos (GL) axilares móviles ipsilaterales	Micrometástasis o metástasis en 1-3 GLR y/o metástasis en GL centinela de mama interna pN1mi: Micrometástasis (> 0,2 mm pero ≤ 2 mm) pN1a: Metástasis (> 2 mm) de 1 a 3 GL axilares pN1b: Metástasis en GL centinela de mama interna pN1c: Metástasis de 1 a 3 GL axilares y en GL centinela de mama interna
N2	GL axilares metastásicos fijos entre sí o a otras estructuras, o clínicamente aparentes en mama interna y en ausencia de evidencia clínica de metástasis axilares pN2a: GL axilares metastásicos fijos entre sí o a otras estructuras pN2b: Metástasis solo en GL clínicamente aparentes en mama interna y en ausencia de evidencia clínica de metástasis axilares	Metástasis entre 4 y 9 GL axilares, o en mama interna clínicamente aparentes y en ausencia de metástasis axilares pN2a: Metástasis entre 4 y 9 GL axilares pN2b: Metástasis solo en mama interna clínicamente aparentes y en ausencia de metástasis axilares
N3	Metástasis GL ipsilaterales infraclaviculares o clínicamente aparentes en mama interna y evidencia clínica de metástasis supraclaviculares N3a: Metástasis ipsilaterales infraclaviculares y evidencia clínica de metástasis axilares. N3b: Metástasis ipsilaterales clínicamente aparentes en mama interna y evidencia clínica de metástasis axilares. N3c: Metástasis supraclaviculares ipsilaterales	Metástasis en ≥10 GL axilares o en GL infraclaviculares, o metástasis en mama interna clínicamente aparentes con 1-3 metástasis axilares, o metástasis en GL centinela de mama interna y > de 3 GL axilares con metástasis, o metástasis en GL supraclaviculares ipsilaterales. pN3a: Metástasis en ≥ 10 ganglios axilares o en GL infraclaviculares. pN3b: Metástasis en mama interna clínicamente aparentes con 1-3 metástasis axilares, o metástasis en GL centinela de mama interna y > de 3 GL axilares con metástasis pN3c: Metástasis supraclaviculares

M:METÁSTASIS	CLASIFICACIÓN
Mx	No se puede medir o evaluar
M0	No se evidencian metástasis a distancia
M1	Se evidencian metástasis a distancia

**Tabla 2.** Agrupación por Estadios anatómicos. Fuente: Cirugía de la Mama. Guías Clínicas de la AEC 2017.

Estadio	Tumor (T)	Ganglios (N)	Metástasis (M)
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T0 T1	N1 mic N1 mic	M0 M0
Estadio IIA	T0 T1 T2	N1 N1 N0	M0 M0 M0
Estadio IIB	T2 T3	N1 N0	M0 M0
Estadio IIIA	T0 T1 T2 T3 T3	N2 N2 N2 N1 N2	M0 M0 M0 M0 M0
Estadio IIIB	T4 T4 T4	N0 N1 N2	M0 M0 M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N3	M
Estadio IV	Cualquier T	N	M1

### 1.5.6 Clasificación molecular del cáncer de mama

Perou y cols., en el año 2000, fueron los primeros en clasificar molecularmente el cáncer de mama, estudiando un numeroso grupo de genes mediante microarrays, e identificando inicialmente un grupo de casi 500 genes muy variables en expresión en los

tumores de diferentes pacientes, pero mínimamente cambiantes entre las muestras de tumor de la misma paciente (genes “intrínsecos”). Esta clasificación se basa en el estado de los receptores hormonales (+/-), la amplificación o sobreexpresión de HER2 y el marcador de proliferación Ki67; definiendo así los cuatro subtipos intrínsecos de cáncer de mama en función de los perfiles de expresión génica (aunque dentro de cada uno de ellos es posible reconocer ya en la actualidad numerosas variantes): luminal A, luminal B, HER2 positivo y basal like (Tabla 3). Un aspecto de especial relevancia fue la comprobación del valor pronóstico de esta subdivisión, así como la opción de dividir qué tumores se beneficiarán de una terapia u otra, y cuales son más agresivos que otros; observando que los tumores luminales, especialmente del subtipo A, presentaban un pronóstico significativamente más favorable que el resto<sup>57</sup>.

- *Luminal A*. Constituye entre el 50 % y 60 % del total. Se caracteriza por la expresión de genes activados por el RE y que se encuentran expresados en el epitelio de la luz de los ductos mamarios. Presentan, además, baja expresión de genes de proliferación. Desde un punto de vista inmunohistoquímico presentan elevada expresión de RE y RP, un bajo índice proliferativo Ki-67 y un bajo grado histológico. Son los tumores que presentan un mejor pronóstico con una menor tasa de recaídas y mejor supervivencia. Define un grupo de tumores en los que el tratamiento adyuvante se basa en la terapia endocrina, y en los que en la mayoría de los casos la quimioterapia puede no ser necesaria. La recaída es más frecuente a nivel óseo, presentando menor tasa de recaídas viscerales y sistema nervioso central (SNC). Asimismo, presentan mayor supervivencia en caso de recaída.
- *Luminal B*. Constituyen un 10-20 % del total. Se caracterizan, además de por expresar receptores estrogénicos, por presentar un fenotipo más agresivo, con mayor grado histológico e índice proliferativo más elevado (Ki-67/MIB1 > 14 %). Pueden presentar también coexpresión de HER2. Por todo ello, presentan un peor pronóstico que los tumores clasificados como luminales A. Presentan también un patrón de metastatización a distancia, ya que, aunque comparten con los luminales A el hueso como primer lugar de metástasis, son más frecuentes

las recidivas viscerales, especialmente en el hígado. Las nuevas plataformas genómicas empleadas para la toma de decisiones de tratamiento adyuvante (ejemplo: Oncotype DX, Mammaprint o Prosigna) suelen clasificar a los tumores luminales B como de “alto riesgo”, de modo que, aunque deben recibir tratamiento endocrino adyuvante por la presencia de receptores estrogénicos positivos, la quimioterapia debe ser incluida en los tratamientos complementarios.

- *HER2 “enriquecido o positivo”*. Tumores que presentan HER2 positivo con ausencia de expresión de receptores de estrógenos y progesterona. Presenta sobreexpresión de genes relacionados con la activación de la proliferación celular. Aunque con características biológicas de agresividad tumoral, este subtipo intrínseco define un perfil de tumores que responden de manera muy selectiva a agentes antiher-2 (trastuzumab, trastuzumab+emtasina, pertuzumab, y los inhibidores de la tirosina quinasa como lapatinib y neratinib, entre otros). Tienen alta tasa de respuesta a esquemas de quimioterapia. La localización ósea es la más habitual para la enfermedad diseminada, siendo también más frecuente en este subtipo las recaídas viscerales si comparamos con el grupo anterior. Además, es el grupo que más frecuentemente afecta al SNC en las recaídas.
- *Basal like*. Los tumores denominados “basal like” constituyen alrededor de un 15% de todos los carcinomas de mama. En el 80 % de los casos se corresponden con tumores clasificados como “triple negativo” por inmunohistoquímica RE (-), RP (-), HER2 (-). Presentan elevados índices proliferativos, alto grado histológico, aparición en edades más tempranas y mayor probabilidad de afectación ganglionar. Además, su patrón de recaída a distancia suele ser precoz y con afectación visceral. Las neoplasias relacionadas con mutaciones en genes BRCA1, responsables del cáncer de mama hereditario, son con mucha frecuencia tumores *basal like*. En enfermedad localizada la quimioterapia es el único tratamiento disponible. Los esquemas con antraciclinas y taxanos son de primera elección en enfermedad avanzada, con la salvedad de las pacientes con mutación patogénica en BRCA que se prefiere tratamiento con sales de platino<sup>74</sup>.

**Tabla 3.** Subtipos de Cáncer de Mama determinados por perfiles de expresión Génica.  
 Fuente: Schnitt S. *Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy, Breast Long Course. USCAP 2009, 261.*

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
Luminal A	RE(+) y/o RP (+); HER2/neu (-)	Subtipo más común y menos agresivo. Buen pronóstico. Bajo grado histológico. Respuesta hormonal. Asociado a incremento de edad.
Luminal B	RE(+) y/o RP (+); HER2/neu (+)	Similar al Subtipo Luminal A. Peor resultado que el Subtipo Luminal A. Más frecuentemente RE(+)/RP(-)
Basal	RE(-) y/o RP (-); HER2/neu (-) CK 5/6(+) y/o EGFR (+)	Subtipo agresivo. Alto grado histológico e índice mitótico. Riego en edades menores (40 años). Más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas.
HER2/neu (+) RE (-)	RE(-) y/o RP (-); HER2/neu (+)	Menos común. Subtipo altamente agresivo. Alto grado histológico. Riego en mujeres <40 años, mayor que el subtipo Luminal. La etnia afroamericana puede ser un factor de riesgo Resultado mejorado por HER2/neu (+)

### 1.5.7 Plataformas genómicas y su utilidad como herramienta pronóstica y predictora

Además de los estudios genéticos encaminados a definir, mediante estudios genómicos, diferentes subtipos intrínsecos con valor pronóstico o predictor se han desarrollado diferentes plataformas que tienen como base común la identificación de genes que permitan seleccionar de manera más adecuada a las pacientes que se benefician de tratamiento con quimioterapia adyuvante, y que presentan factores clásicos clinicopatológicos de riesgo intermedio que no permiten tomar esa decisión. Se han diseñado casi una decena de perfiles, algunos de los cuales se encuentran ya validados, comercializados y disponibles para el uso en la práctica clínica.

- *Oncotype DX*. Se trata de una firma de 21 genes (16 genes relacionados con el cáncer y 5 genes de referencia) determinados mediante RT-PcR. Se realiza en tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina. El resultado se expresa como una variable continua con valores de entre el 0 y el 100) denominado

“*Recurrence Score*”. Establece tres grupos pronósticos (bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo)

- *Mammaprint*. Basado en la expresión de 70 genes y desarrollado por el *Netherlands Cancer Institute*. Inicialmente solo en muestras de tejido fresco/ congelado, aunque en la actualidad es posible realizarlo sobre muestra de parafina. *Mammaprint* establece una información cualitativa dicotómica (alto riesgo, bajo riesgo) y define pacientes que precisan o no quimioterapia adyuvante además de la terapia endocrina. Igualmente, aporta información adaptada por subtipos intrínsecos (luminal A, luminal B, HER2 y *basal like*).
- *Prosigna (PAM50)*. *Prosigna* se deriva de la plataforma Pam-50 (50 genes clasificadores y 5 genes de control). Se realiza sobre muestras en parafina mediante un equipo que puede ser instalado localmente, lo que constituye una ventaja considerable. Por una parte, informa sobre el subtipo intrínseco del tumor de forma precisa (luminal A, luminal B, HER2, basal like) y, por otra, ofrece un *recurrence score* basado en una combinación de la expresión PAM50 y datos clínicos como el tamaño tumoral y la afectación ganglionar.

## 1.6 PRUEBAS DIAGNOSTICAS

La detección en etapas precoces del cáncer de mama sigue siendo uno de los principales objetivos a alcanzar para conseguir mayores tasas de supervivencia y de curación en las pacientes diagnosticadas de esta patología. Actualmente conocemos que existen lesiones precursoras de cáncer que diagnosticados precozmente y tratadas de forma adecuada en etapas donde la enfermedad aún no es invasiva son potencialmente curables. Los métodos utilizados para llegar a un diagnóstico precoz principalmente son la mamografía y la exploración física realizadas por profesionales expertos, seguidos de ecografía, autoexploración y resonancia magnética (RM).

### **1.6.1. Autoexploración**

La autoexploración mamaria es una técnica de fácil uso, no cruenta, asequible a toda la población y que no requiere de ningún tipo de instrumentación compleja para su realización. La autoexploración mamaria permite a la mujer familiarizarse con su propia anatomía pudiendo apreciar cambios de textura, tamaño o apariencia de la mama como un signo de alarma a partir del cual consultar al médico quien determinará la conveniencia, o no, de realizar otras pruebas complementarias. No obstante, es necesario resaltar que esta técnica exclusiva no ha demostrado ser un método eficaz para disminuir la mortalidad ni mejorar la detección precoz del cáncer de mama.

### **1.6.2. Exploración mamaria por un clínico experto**

Es junto con la mamografía una de las técnicas empleadas en la consulta diaria para el diagnóstico precoz así como para el seguimiento postratamiento de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama. Por otra parte, en pacientes más jóvenes donde la mamografía tiene menor sensibilidad y no es realizada de forma habitual, la exploración física de la mama adquiere un papel importante en la detección precoz de esta patología. Sin embargo, no se ha podido demostrar que de su aplicación se derive un descenso en los índices de mortalidad por cáncer de mama<sup>75</sup>.

### **1.6.3 Ecografía mamaria**

Esta técnica está exenta de efectos secundarios y que en muchos casos proporciona al clínico información que puede sugerir si se trata de una lesión de características benignas o malignas. Incluso en aquellos casos en los que es difícil su interpretación, puede ser utilizada como guía para la realización de una punción aspiración o biopsia. Una de las principales indicaciones de su uso es en el “screening” de las mujeres de edad comprendida entre los 30 y 39 años, en las cuales por la mayor densidad radiológica del tejido mamario tiene menor resolución. Sin embargo, cuando se trata de detectar la presencia de microcalcificaciones características de ciertos tipos de lesiones mamarias malignas la ventaja de la mamografía es indudable frente a la ecografía con una sensibilidad aproximada de 22%<sup>76</sup>. A pesar de todo esto, uno de los

principales inconvenientes que tiene la ecografía es que su sensibilidad al diagnóstico disminuye cuando se trata de lesiones no palpables, que posee una baja especificidad y que hasta ahora no hay estudios que demuestren que mediante su uso como test de despistaje tumoral se haya conseguido disminuir la mortalidad por cáncer de mama.

#### **1.6.4 Mamografía**

La mamografía es una exploración no invasiva que utiliza radiación ionizante (rayos X) de baja energía para detectar anomalías estructurales en la mama. Se considera como una de las técnicas más importantes para el diagnóstico precoz del cáncer de mama ya que puede detectar alteraciones en el parénquima mamario sospechosas de malignidad antes de que sean evidentes en la exploración física. Presenta una sensibilidad en general de un 75%, encontrándose comprendida entre un 54 a un 58% para mujeres menores de 40 años y entre un 80% a un 94% para aquellas mujeres de más de 65 años<sup>76</sup>. Los programas de “*screening*” poblacional incluyen actualmente la mamografía como una de las pruebas más importantes a realizar recomendando su realización de forma bianual a las mujeres de 50 a 69 años ya que ha conseguido disminuir la mortalidad por esta patología entre un 25% a un 30%. Sin embargo, por sí sola la mamografía no confirma el diagnóstico de malignidad, siendo necesaria la realización de una prueba invasiva confirmatoria como es la biopsia para alcanzar la confirmación histopatológica.

#### **1.6.5 Resonancia magnética de la mama**

La resonancia nuclear magnética (RM) es una técnica diagnóstica de gran utilidad en la detección y la caracterización de la patología mamaria. Presenta algunas ventajas, entre ellas, su alta sensibilidad de alrededor del 70-100% frente al 13-59% de la mamografía y el 13-65% de la ecografía para detectar tumores de pequeño tamaño<sup>77</sup>. Entre las desventajas podemos encontrar su moderada especificidad para diferenciar entre lesiones benignas de aquellas que son de carácter maligno obteniendo alrededor de un 5% de falsos positivos que requieren la realización de nuevas pruebas como la biopsia. Es por estos motivos que actualmente el uso de la RM está recomendado fundamentalmente en aquellas mujeres de alto riesgo por ser portadoras de una

mutación genética en BRCA relacionada con el cáncer de mama hereditario, en aquellas mujeres que no está descrita la mutación, pero si tiene antecedentes de primer grado portadores de la mutación, y en aquellas mujeres que fueron sometidas a irradiación torácica ente los 10 a 30 años de edad. También se recomienda en la reevaluación de la respuesta del tratamiento neoadyuvante y en pacientes que debutan con metástasis axilares de origen desconocido.

## ***2. HIPÓTESIS***

## **2. HIPÓTESIS**

La expresión inmunohistoquímica de algunas metaloproteasas puede estar relacionada con el proceso de carcinogénesis en pacientes con cáncer de mama y, por lo tanto, la presencia de estas proteínas en el tejido afecto podría considerarse como factor de mal pronóstico.

### ***3. OBJETIVOS***

### **3. OBJETIVOS**

Estudiar la expresión de MMPs (1-2-3-9) en el tejido mamario de un grupo de pacientes con cáncer de mama y un grupo control de tejido mamario sin enfermedad.

Analizar la relación entre la expresión de MMPs y diferentes parámetros clínico-patológicos.

Determinar la relación directa en la expresión inmunohistoquímica de diferentes MMPs (1-2-3-9) en el tejido tumoral con el proceso de carcinogénesis en un grupo de pacientes con cáncer de mama.

## ***4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO***

## **4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO**

### **4.1. Diseño del estudio**

Estudio de cohortes de casos y controles retrospectivo, no aleatorizado, de julio de 2015 a julio de 2020; el grupo de estudio (casos) estuvo constituido por 154 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, y el grupo control por 42 mujeres con patología tumoral benigna (pacientes diagnosticadas de enfermedades como fibroadenoma, lipoma, quistes o necrosis grasa de la mama). De todas las pacientes se obtuvieron muestras del tejido mamario, para su posterior análisis y estudio de la expresión inmunohistoquímica de las MMPs 1-2-3 y 9.

La base de datos anónima de las pacientes sometidas a estudio, así como las muestras del tejido mamario, fue gestionada a través del Biobanco para Investigación del Hospital Universitario Clínico San Cecilio (HUCSC), perteneciente a la Red Nacional de Biobancos (Proyecto RD09/0076/00148), asegurando así, el tratamiento integral de las muestras y datos asociados de acuerdo a la Ley 14/2007 de 3 de julio de Investigación biomédica.

### **4.2 Selección de casos**

El presente trabajo se realizó sobre 196 pacientes mayores de edad, intervenidas de cirugía mamaria por los Servicios de Cirugía General de los Hospitales asociados al Biobanco en el periodo comprendido entre julio de 2015 y julio de 2020. Los criterios de inclusión del estudio han sido: mujeres mayores de 18 años, sin carga hereditaria, y no diagnosticadas o tratadas previamente por cáncer de mama. Todas las pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para el uso de muestras en la investigación biomédica. El Comité Ético de Investigación Clínica de Granada (código del proyecto: PI-0730-2013) aprobó el estudio. Igualmente, se respetaron los principios de la Declaración de Helsinki (64º Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre del 2013). Además, la Unidad “Banco de Tumores” dentro del Biobanco funciona de acuerdo al Proceso Asistencial Red de Bancos de Tumores de Andalucía (refrendados

mediante una autorización del SAS (R.S.C 786/05), aprobado por el Comité de Ética Andaluz.

La información clínica y anatomopatológica se obtuvo solo para el grupo de casos, registrándose los siguientes datos: edad, fecha de diagnóstico, factores de riesgo, menopausia, mama afectada, localización del tumor, tipo histológico, estadio tumoral, receptores hormonales, tratamiento médico establecido, afectación de los ganglios linfáticos, recidiva tumoral, metástasis a otros órganos y mortalidad a los 5 años. La información de todas las mujeres que se incluyeron en la base de datos suministrada por el Biobanco fue recogida en un fichero en un archivo Excel, utilizando un código numérico adjudicado para los casos (respetando de esta manera la identidad de las pacientes de las que procedían las muestras de tejido tumoral).

#### **4.3 Variable Dependiente**

MMPs 1-2-3 y 9 en los tejidos mamarios de los 2 grupos de estudio (cáncer de mama y tejido mamario no tumoral). Para esto, se realizó la puesta a punto de anticuerpos y su inmunohistoquímica posterior de la siguiente manera:

- *Procesamiento*: Las diferentes muestras de los casos de cáncer de mama (154) y de tejido mamario normal (42) fueron incluidas en varias matrices de tejidos (TMA) para facilitar su posterior tinción e interpretación. Se obtuvo secciones de tejido de 3  $\mu$ m de grosor de los diferentes TMAs, con fijación de las mismas al portaobjetos mediante formol taponado al 10% y se incluyeron en parafina utilizando PTLINK y AutostainerLINK (Dako, Glostrup, Dinamarca). Los anticuerpos para las MMP se obtuvieron de ABCAM (MMPs 1, -2, -9) y ABGENT (MMP - 3).
- *Puesta a punto de anticuerpos*: La puesta a punto de los anticuerpos se realizó en diferentes tejidos donde previamente se había publicado reactividad a ellos y en carcinoma de mama donde posteriormente se iban a aplicar. Brevemente, el protocolo optimizado para los diferentes anticuerpos consiste en un tratamiento inicial con peroxidasa, un periodo de bloqueo (excepto para el anticuerpo Anti-

MMP-2), una incubación con el anticuerpo primario (en unos casos diluido en solución de bloqueo y en otros en solución de dilución de anticuerpos) y, posteriormente, con el anticuerpo secundario. Finalmente, el revelado se lleva a cabo con diaminobencidina. Entre cada una de las etapas anteriores se realizan varios lavados con tampón de lavado.

- *Realización y valoración inmunohistoquímica:* El proceso de tinción se realizó simultáneamente en todos los cortes teñidos con el mismo anticuerpo. Se prepararon controles tanto positivos como negativos (reemplazando el anticuerpo primario con PBS) para cada anticuerpo utilizado. Si se publicaron niveles de reactividad para cada uno de los anticuerpos utilizados, se consideraron diferentes tejidos como controles positivos. La evaluación de la tinción de las MMP fue evaluada de forma independiente por dos patólogos que desconocían los datos clínico-patológicos de los pacientes. Los desacuerdos se resolvieron mediante discusión en una reunión para obtener los resultados. La estratificación de tinción se estableció en base a dos puntuaciones: (1) la puntuación de proporción que representa la fracción de células teñidas positivamente ( $\leq 50\%$  ->  $50\%$ , respectivamente); (2) la intensidad de la tinción (débil, moderada o intensa). Esta evaluación permite una estimación semicuantitativa de los niveles de expresión de proteína en la sección de tejido. Se agregaron las dos puntuaciones y se obtuvo la definición final de cada sección.

#### **4.4 Variables independientes**

Los datos de estas variables se obtuvieron solo para el Grupo de casos, se trata de información biográfica, clínica y anatomopatológica de este grupo de mujeres, y son las siguientes:

**4.4.1 Edad:** Edad por intervalos ( $\leq 50$  años -  $> 50-70$  años -  $> 70$  años).

**4.4.2 Factores de riesgo:**

- Antecedentes familiares 1º grado de cáncer de mama (madre-hermana-hija).

- Antecedentes personales de otros cánceres (pulmón-gástrico-piel-colon-riñón-útero-endometrio).
- Antecedente de lesiones benignas de la mama (enfermedad fibroquística-fibroadenoma).
- Tabaquismo: Consumo habitual de tabaco.
- Obesidad: IMC =>30 kg/m<sup>2</sup>.

**4.4.3** *Menopausia al diagnóstico:* Premenopausia y postmenopausia.

**4.4.4** *Mama afecta:* Lateralidad del proceso tumoral (derecha-izquierda).

**4.4.5** *Localización del tumor:* Cuadrante mamario afectado por el cáncer:

- Cuadrante superior externo (CSE).
- Cuadrante superior interno (CSI).
- Cuadrante inferior externo (CIE).
- Cuadrante inferior interno (CII).
- Retro o periareolar.
- Afectación de varios cuadrantes.

**4.4.6** *Tipo Histológico:* Patrón morfológico del cáncer de mama:

- Carcinoma ductal infiltrante (CDI).
- Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI).
- Otros carcinomas: Carcinoma intraductal, carcinoma neuroendocrino, carcinoma infiltrante y carcinoma coloide.

**4.4.7** *Estadios tumorales:* Sistema de clasificación y estadificación TNM (tamaño tumoral, afectación ganglionar, metástasis a distancia):

- E0: Carcinoma *In Situ*.

- EI: (IA-IB)/T1N0M0-T0N1M0.
- EII: (IIA-IIIB)/T1N1M0-T2N0M0-T2N1M0-T3N0M0.
- EIII: (IIIA-IIIB-IIIC)/T1N2M0-T2N2M0-T3N1,2,3M0-T4N0,1,2M0- Cualquier T1, 2, 3N3M0.
- EIV: Cualquier T y N, M1.

**4.4.8** *Receptores hormonales:* Son receptores hormonales estrogénicos (RE) y progestágenos positivos o negativos.

**4.4.9** *Otros receptores hormonales:* Son un grupo de diferentes proteínas y/o moléculas que expresan las células tumorales (Ki67(+)- HER2(+)-P53(+)- BRCA 1 y 2(+)- E-Cadherina(+).

**4.4.10** *Tratamiento médico al diagnóstico:* El tratamiento al que fue sometida la paciente cuando se le diagnóstico el cáncer de mama:

- Cirugía+Quimioterapia+Radioterapia (CX+QT+RT).
- Cirugía+Quimioterapia (CX+QT).
- Cirugía+Radioterapia (CX+RT).
- Cirugía (CX).

**4.4.11** *Afectación ganglionar:* Sí o No.

**4.4.12** *Recidiva tumoral en los 5 años de seguimiento:* Si o No.

**4.4.13** *Metástasis a otros órganos:* Extensión de la enfermedad tumoral a otros órganos como el hueso, pulmón, cerebro, hígado, o afectación de varios órganos.

**4.4.14** *Mortalidad de las pacientes por cáncer de mama a junio 2020:* Sí o No.

#### 4.5. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico se realizó por el Área de Metodología y Estadística de la Fundación para la investigación Biomédica de Andalucía Oriental (FIBAO) en el HUCSC.

Se diseñó una Base de Datos protegida con clave la cual se modificaba de manera periódica, y a la que solo tuvo acceso la autora de la tesis doctoral y la estadista de FIBAO que colaboró en el proyecto, y quienes se comprometieron a respetar la confidencialidad de los datos de acuerdo a la Ley sobre la protección de datos de carácter personal.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico IBM-SPSS V.22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Se aplicó el test de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de la variable cuantitativa (edad al diagnóstico de la enfermedad), variable que fue recodificada posteriormente y analizada en 3 intervalos: ( $\leq 50$  años, 51–70 años, y  $>70$  años).

- Estadística descriptiva: Se describió el perfil de la población de estudio. Se emplearon medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, media  $\pm$  desviación estándar, valor mínimo y máximo, incluyendo los intervalos de confianza al 95%. Los resultados de las variables categóricas se han expresado en porcentajes.
- Estadística bivariante: Se utilizó el test de Chi-cuadrado para comparar proporciones entre grupos, cuando este no cumplía las condiciones de validez se utilizó el test exacto de Fisher (tabla 2x2).

## ***5. RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis Descriptivo de la Población de estudio (casos)

#### 5.1.1 Análisis epidemiológico

##### 5.1.1.1. Edad

La edad media de las mujeres de estudio fue de  $63.34 \pm 15.30$  años. Cuando se distribuye la edad por intervalos ( $\leq 50$  años -  $>50-70$  años -  $>70$  años) se observa que del 100% de las pacientes, el 28,6% son mujeres menores de 50 años (Figura 6).

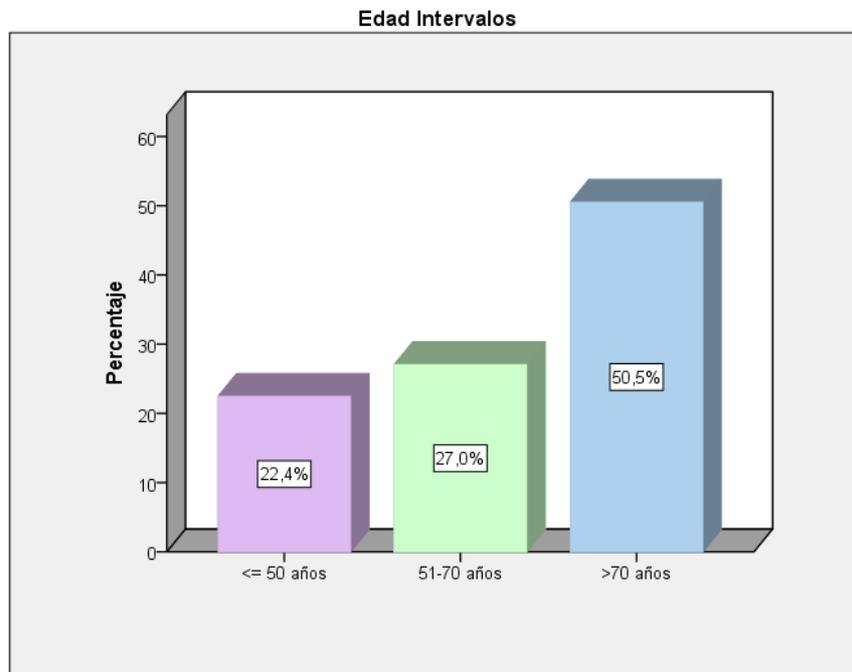


Figura 6. Edad por intervalos

##### 5.1.1.2. Fecha de Diagnóstico

La fecha en la que se diagnosticó el cáncer de mama fue entre los años 2015 y el 2020, con un claro predominio de la prevalencia del cáncer de mama en el año 2017 con un total de 54 pacientes, es decir un 35,1%, seguido por el 2018 con un 21,4%, 2019 con 19,5%, 2020 con 13,6%, y solamente el 5,8% y 4,5% para los años 2016 y 2015 respectivamente (Tabla 4).

**Tabla 4. Año del Diagnóstico**

	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje válido</b>	<b>Porcentaje acumulado</b>
<b>AÑO 2015</b>	7	4,5	4,5	4,5
<b>AÑO 2016</b>	9	5,8	5,8	10,4
<b>AÑO 2017</b>	54	35,1	35,1	45,5
<b>AÑO 2018</b>	33	21,4	21,4	66,9
<b>AÑO 2019</b>	30	19,5	19,5	86,4
<b>AÑO 2020</b>	21	13,6	13,6	100,0
<b>Total</b>	154	100,0	100,0	

#### 5.1.1.3. Factores de riesgo

De los 154 casos, se encontró que 53 mujeres presentaron algún factor de riesgo asociado, entre los cuales el tabaco y la obesidad presentaron un alto porcentaje 35,8% y 30,2% respectivamente. En un 3,8% se evidenciaron antecedentes familiares de cáncer de mama y en un 11,3% se observaron antecedentes personales de otros tipos de cánceres. En 7,5% se encontraron antecedentes previos de lesiones benignas de la mama, y en 6 pacientes hubo más de un factor de riesgo asociado lo que corresponde al 11,3% (Tabla 5).

**Tabla 5. Factores de Riesgo**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
AF 1º GRADO CA MAMA	2	1,3	3,8	3,8
AP OTROS CANCERES	6	3,9	11,3	15,1
AP LESIONES BENIGNAS DE LA MAMA	4	2,6	7,5	22,6
TABAQUISMO	19	12,3	35,8	58,5
OBESIDAD	16	10,4	30,2	88,7
MAS DE UN FR	6	3,9	11,3	100,0
Total	53	34,4	100,0	

#### 5.1.1.4. Menopausia al diagnóstico

Se observó un claro predominio de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama que presentaban menopausia en el momento de su diagnóstico con un 68,9%, frente al 31,1% de mujeres premenopáusicas (Tabla 6).

**Tabla 6. Menopausia al diagnóstico**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
PREMENOPAUSIA	47	30,5	31,1	31,1
POSTMENOPAUSIA	104	67,5	68,9	100,0
Total	151	98,1	100,0	

## 5.1.2 Análisis Diagnóstico y características tumorales

### 5.1.2.1. Mama afectada

La mayoría de las pacientes padecieron el cáncer de mama sobre la mama izquierda con un 69,3%, en comparación con la mama derecha 30,7% (Tabla 7).

**Tabla 7. Mama Afecta**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>MAMA DERECHA</b>	39	25,3	30,7	30,7
<b>MAMA IZQUIERDA</b>	88	57,1	69,3	100,0
<b>Total</b>	127	82,5	100,0	

### 5.1.2.2. Localización del tumor

Del 100% de la mujeres, la localización del tumor de mama más frecuente fue la de varios cuadrantes mamarios con un 38,1%, seguido del cuadrante superior-externo (CSE) con un 21,2%, el 16,1% a nivel retro y periareolar, un 9,3% cuadrante inferior externo (CIE), y de un porcentaje similar del 7,6% para el cuadrante superior interno (CSI) y el cuadrante inferior interno (CII) (Tabla 8).

**Tabla 8. Localización del tumor**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>CSE</b>	25	16,2	21,2	21,2
<b>CSI</b>	9	5,8	7,6	28,8
<b>CIE</b>	11	7,1	9,3	38,1
<b>CII</b>	9	5,8	7,6	45,8
<b>RETRO/PERIAREOLAR</b>	19	12,3	16,1	61,9
<b>VARIOS CUADRANTES</b>	45	29,2	38,1	100,0
<b>Total</b>	118	76,6	100,0	

### 5.1.2.3. Tipo Histológico

De acuerdo con la literatura, el tipo histológico más prevalente de carcinoma mamario es el carcinoma ductal infiltrante (CDI), del 100% de nuestras pacientes, el 87,7% de los casos presentaron este tipo histológico, seguido de un 8,4% de carcinoma lobulillar infiltrante, y tan solo un 3,9% se encontró un tipo histológico

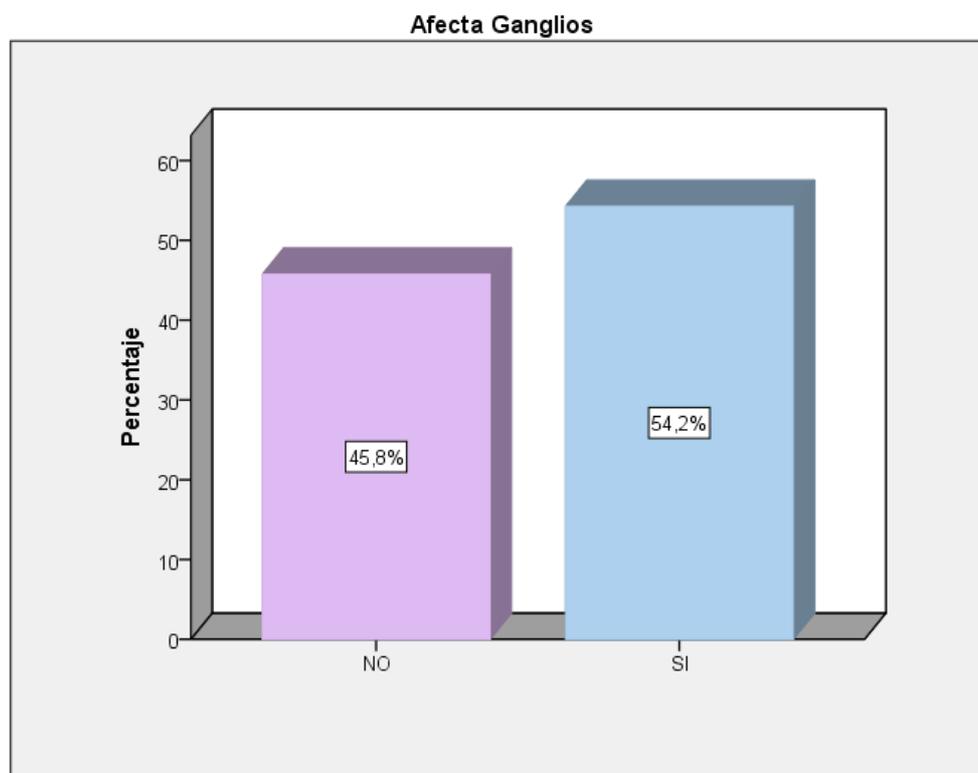
diferente como fue: Carcinoma intraductal, carcinoma neuroendocrino, carcinoma infiltrante y carcinoma coloide (Tabla 9).

**Tabla 9.** *Tipo Histológico*

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>CDI</b>	135	87,7	87,7	87,7
<b>CLI</b>	13	8,4	8,4	96,1
<b>OTROS CARCINOMAS</b>	6	3,9	3,9	100,0
<b>Total</b>	154	100,0	100,0	

5.1.2.4. *Afectación ganglionar al diagnóstico*

Del 100% de las pacientes, se observó que el 54,2% tuvieron afectación ganglionar por las células tumorales, y que el 45,8% no estaban afectadas (Figura 7).



**Figura 7.** *Afectación ganglionar*

### 5.1.2.5. *Estadios Tumorales*

**Tabla 10.** *Estadio Tumoral*

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>EI:IA-IB</b>	26	16,9	23,0	23,0
<b>EII:IIA-IIIB</b>	52	33,8	46,0	69,0
<b>EIII:IIIA-IIIB-IIIC</b>	30	19,5	26,5	95,6
<b>EIV-Cualquier TNM</b>	5	3,2	4,4	100,0
<b>Total</b>	113	73,4	100,0	

El nivel de extensión tumoral se clasifica mediante el sistema TNM, que a su vez se agrupa en estadios tumorales para su evaluación pronóstica. De las 154 mujeres se encontraron datos del estadio tumoral solamente en 113; y de este total el 46,0% se clasificó en Estadio II(EIIA-EIIB), seguida del 26,5% en Estadio III(EIIIA-EIIB), 23,0% en Estadio I(EIA-EIB); solamente 5 pacientes se clasificaron en Estadio IV, lo que le confiere un 4.4% del global de los casos, confirmando así que el carcinoma de mama es una patología que actualmente se diagnostica precozmente, lo que le confiere mejor pronóstico (Tabla 10).

### 5.1.2.6 *Receptores hormonales*

**Tabla 11.** *Receptores hormonales*

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>RE+RP</b>	72	46,8	73,5	73,5
<b>RE-RP-</b>	18	11,7	18,4	91,8
<b>RE+</b>	8	5,2	8,2	100,0
<b>Total</b>	98	63,6	100,0	

Del total de los casos, en 80 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama se encontraron receptores estrogénicos positivos (RE+RP+ y RE+) lo que constituye un 73,5% y 8,2% respectivamente, siendo solo un 18,4% negativas (Tabla 11).

### 5.1.2.7 Otros receptores hormonales

**Tabla 12. Otros receptores Hormonales**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>Ki67+</b>	25	16,2	25,5	25,5
<b>Herb2+</b>	1	,6	1,0	26,5
<b>Ki67+ &amp; Herb2+</b>	8	5,2	8,2	81,6
<b>Ki67+ &amp; Herb2+ &amp; P53+</b>	2	1,3	2,0	83,7
<b>Ki67+ &amp; P53+</b>	11	7,1	11,2	94,9
<b>Ki67+ &amp; BRCA1 y 2+</b>	2	1,3	2,0	96,9
<b>Ki67+ &amp; E-CADHERINA+</b>	2	1,3	2,0	99,0
<b>Herb2+&amp;P53+</b>	1	,6	1,0	100,0
<b>RECEPTORES NEGATIVOS</b>	46	29,9	46,9	73,5
<b>Total</b>	98	63,6	100,0	

Del total de los casos, un 25,5% solamente expresaron el receptor Ki67+, seguida de otras combinaciones de receptores hormonales en menor porcentaje como lo son el 11,2% en Ki67+-P53+; 8.2% en Ki67+-Herb2+; y un porcentaje del 2,0% en Ki67+-Herb2+-P53+; Ki67+-BRCA1y2+, y del 1% para Ki67+-E-CADHERINA+ y Herb2+ y Herb2+-P53+ respectivamente. Se observó que en la mayoría de los casos no se expresaron estos receptores con un 46,9% (Tabla 12).

### 5.1.3 Análisis del tratamiento y evolución

#### 5.1.3.1 Tratamiento médico al diagnóstico

La mayoría de las pacientes con cáncer de mama recibió como tratamiento médico la combinación de cirugía (CX) con quimioterapia (QT) y/o radioterapia (RT),

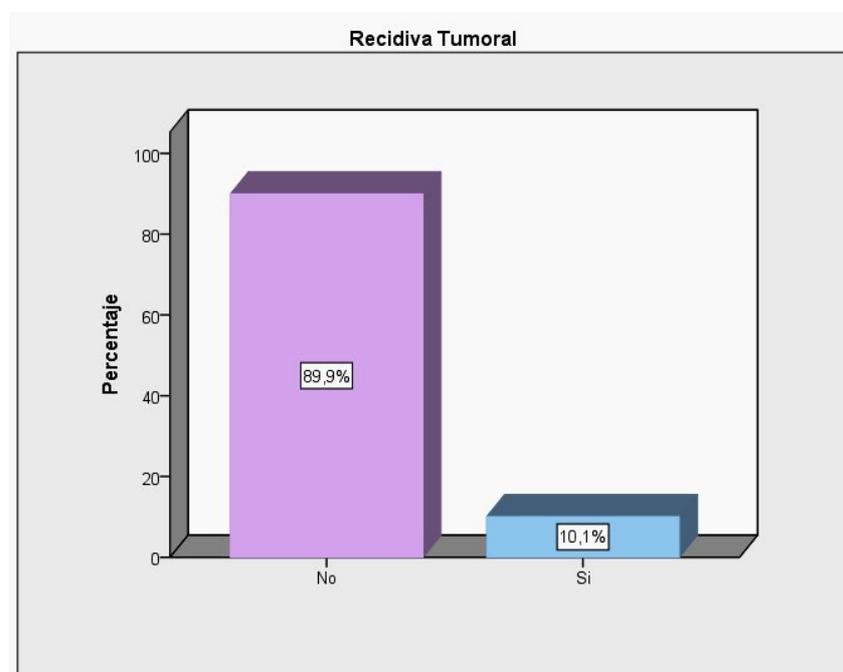
de estas, un 33,8% se beneficiaron de CX+QT+RT, seguidas de un 31,8% CX+QT, 7,1% de CX+RT, y un 27,3% de solo CX (Tabla 13).

**Tabla 13.** *Tratamiento al Diagnóstico*

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Válido	Porcentaje acumulado
<b>CX+QT+RT</b>	52	33,8	33,8	33,8
<b>CX+QT</b>	49	31,8	31,8	65,6
<b>CX+RT</b>	11	7,1	7,1	72,7
<b>CIRUGIA</b>	42	27,3	27,3	100,0
<b>Total</b>	154	100,0	100,0	

### 5.1.3.2 *Recidiva Tumoral*

Del total de las mujeres que fueron diagnosticadas y tratadas por padecer cáncer de mama, un 10,1% presento una recidiva del tumor mamario (Figura 8).



**Figura 8.** *Recidiva tumoral*

### 5.1.3.3 *Metástasis a otros órganos*

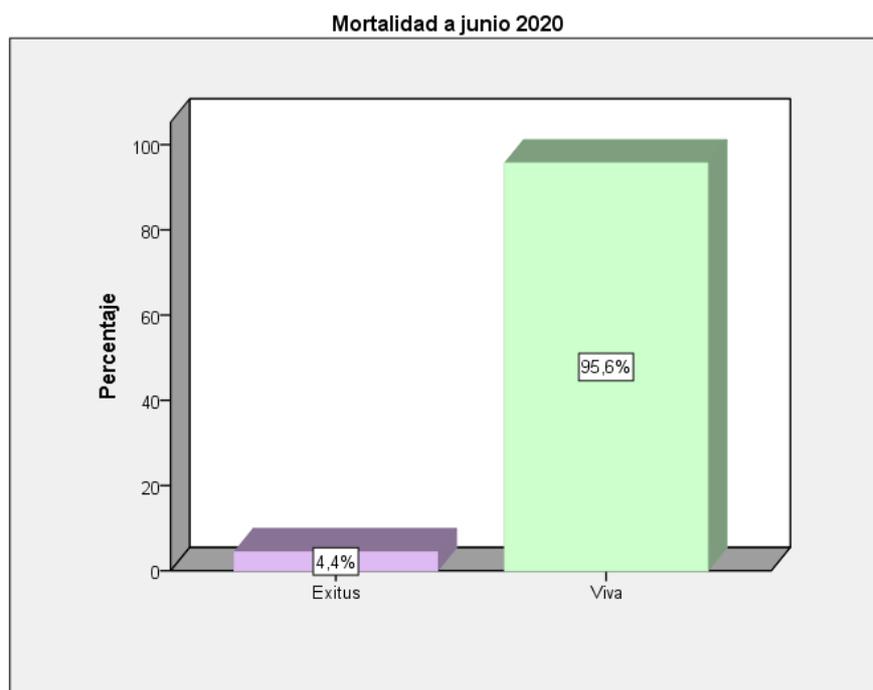
Del total de los casos que se les diagnóstico cáncer de mama, el 32% padecieron otro tipo de cáncer (Ca de ovario/endometrio/renal/colon/piel/estómago); el sitio más

frecuente de invasión tumoral fue el hueso con un 20,0%, seguido del pulmón con 16,0%, cerebro 1,3% e hígado 4,0%. Un 20,0% de los casos tenían más de un órgano afectado (Tabla 14).

**Tabla 14. Metástasis a Otros Organos**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>HUESO</b>	5	3,2	20,0	20,0
<b>PULMÓN</b>	4	2,6	16,0	36,0
<b>CEREBRO</b>	2	1,3	8,0	44,0
<b>HIGADO</b>	1	,6	4,0	48,0
<b>ASOCIACIÓN CON OTRO CÁNCER</b>	8	5,2	32,0	80,0
<b>METÁSTASIS A MÁS DE 1 ORGANOS</b>	5	3,2	20,0	100,0
<b>Total</b>	25	16,2	100,0	

#### 5.1.3.4 Mortalidad de las pacientes por cáncer de mama a junio 2020



**Figura 9. Mortalidad de las pacientes por cáncer de mama a junio 2020**

Del 100% de las mujeres del grupo de casos, el 95,6% (131) estaban vivas a la fecha de finalización del estudio (Figura 9).

## 5.2 Análisis Bivariante

### 5.2.1 Metaloproteasa 1 (MMP-1)

#### 5.2.1.1. MMP-1 porcentaje grupo casos y controles

Tabla 15. MMP-1 Porcentaje grupo casos vs controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-1 Porcentaje</b>	<b>=&lt;50%</b>	<b>Recuento</b>	9	29	38
		<b>% dentro de MMP-1 Porcentaje</b>	23,7%	76,3%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	36,0%	19,9%	22,2%
		<b>% del total</b>	5,3%	17,0%	22,2%
	<b>&gt;50%</b>	<b>Recuento</b>	16	117	133
		<b>% dentro de MMP1 Porcentaje</b>	12,0%	88,0%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	64,0%	80,1%	77,8%
		<b>% del total</b>	9,4%	68,4%	77,8%
<b>Total</b>		<b>Recuento</b>	25	146	171
		<b>% dentro de MMP1 Porcentaje</b>	14,6%	85,4%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	14,6%	85,4%	100,0%

No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre,  $p = 0.73$ . Es decir que presentar un nivel MMP-1 Porcentaje  $\leq 50\%$  o  $> 50\%$  no se relaciona con

tener o no la enfermedad (Tabla 15). Como dato significativo, se observa que del total de las pacientes que expresaron niveles de MMP-1 porcentaje el 85,4% fueron casos, es decir en las células tumorales (Tabla 15).

5.2.1.2. *MMP-1 Intensidad grupo casos y controles*

**Tabla 16.** *MMP-1 intensidad grupo casos vs controles*

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-1 Intensidad</b>	<b>Débil</b>	<b>Recuento</b>	22	96	118
		<b>% dentro de MMP-1 Intensidad</b>	18,6%	81,4%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	84,6%	64,4%	67,4%
		<b>% del total</b>	12,6%	54,9%	67,4%
	<b>Moderado</b>	<b>Recuento</b>	4	53	57
		<b>% dentro de MMP1 Intensidad</b>	7,0%	93,0%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	15,4%	35,6%	32,6%
		<b>% del total</b>	2,3%	30,3%	32,6%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>	26	149	175	
	<b>% dentro de MMP-1 Intensidad</b>	14,9%	85,1%	100,0%	
	<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%	
	<b>% del total</b>	14,9%	85,1%	100,0%	

En la tabla anterior se analiza la relación entre la variable MMP-1 intensidad y la variable grupo de estudio (casos y controles), encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables  $p=0.043$ . Es decir, expresar en el tejido tumoral la MMP-1 intensidad está relacionado con padecer la enfermedad (Tabla 16).

### 5.2.1.3. Metaloproteasa 1(MMP-1) Cantidad de estroma grupo casos y controles

**Tabla 17.** MMP-1 Cantidad de estroma grupo casos vs controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-1 Cantidad Estroma</b>	<b>Escaso número de células teñidas</b>	<b>Recuento</b>	9	63	72
		<b>% dentro de MMP-1 Cantidad Estroma</b>	12,5%	87,5%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	12,5%	87,5%	100,0%
<b>Total</b>		<b>Recuento</b>	9	63	72
		<b>% dentro de MMP-1 Cantidad Estroma</b>	12,5%	87,5%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	12,5%	87,5%	100,0%

Al analizar la variable MMP-1 cantidad de estroma y su relación con la variable grupo, se observa que el 100% de las mujeres (72) presentaron escaso número de células teñidas; de las cuales el 87,5% eran casos frente al 12,5% de controles (Tabla 17).

## 5.2.2 Metaloproteasa 2 (MMP-2)

### 5.2.2.1. Metaloproteasa 2(MMP-2) porcentaje grupo casos y controles

**Tabla 18.** MMP-2 Porcentaje Grupo Casos vs Controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-2 Porcentaje</b>	<b>=&lt;50%</b>	<b>Recuento</b>	22	126	148
		<b>% dentro de MMP-2 Porcentaje</b>	14,9%	85,1%	100,0%

	<b>% dentro de GRUPO</b>	95,7%	84,0%	85,5%
	<b>% del total</b>	12,7%	72,8%	85,5%
<b>&gt;50%</b>	<b>Recuento</b>	1	24	25
	<b>% dentro de MMP-2 Porcentaje</b>	4,0%	96,0%	100,0%
	<b>% dentro de GRUPO</b>	4,3%	16,0%	14,5%
	<b>% del total</b>	0,6%	13,9%	14,5%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>	23	150	173
	<b>% dentro de MMP-2 Porcentaje</b>	13,3%	86,7%	100,0%
	<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
	<b>% del total</b>	13,3%	86,7%	100,0%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la anterior tabla ( $p=0.139$ ) (Tabla 18).

#### 5.2.2.2. Metaloproteasa 2(MMP-2) intensidad grupo casos y controles

**Tabla 19.MMP-2 Intensidad grupo casos vs controles**

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-2 Intensidad</b>	<b>Débil</b>	<b>Recuento</b>	21	137	158
		<b>% dentro de MMP-2 Intensidad</b>	13,3%	86,7%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	91,3%	91,3%	91,3%
		<b>% del total</b>	12,1%	79,2%	91,3%
	<b>Moderado</b>	<b>Recuento</b>	2	13	15
		<b>% dentro de MMP-2 Intensidad</b>	13,3%	86,7%	100,0%

	<b>% dentro de GRUPO</b>	8,7%	8,7%	8,7%
	<b>% del total</b>	1,2%	7,5%	8,7%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>	23	150	173
	<b>% dentro de MMP-2 Intensidad</b>	13,3%	86,7%	100,0%
	<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
	<b>% del total</b>	13,3%	86,7%	100,0%

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la MMP-2 intensidad,  $p=0.996$ , entre el grupo de casos y controles (Tabla 19).

#### 5.2.2.3. Metaloproteasa 2(MMP-2) cantidad de estroma grupo casos y controles

**Tabla 20.** MMP-2 Cantidad de estroma grupo casos vs controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-2 Cantidad de estroma</b>	<b>Escaso número de células teñidas</b>	<b>Recuento</b>	21	31	52
		<b>% dentro de MMP-2 cantidad de estroma</b>	40,4%	59,6%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	40,4%	59,6%	100,0%
<b>Total</b>		<b>Recuento</b>	21	31	52
		<b>% dentro de MMP-2 cantidad de estroma</b>	40,4%	59,6%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	40,4%	59,6%	100,0%

Al analizar la variable MMP-2 cantidad de estroma y su relación con la variable grupo, se observa que el 100% de las mujeres(52) presentaron escaso número de células teñidas; de las cuales el 59,6% eran casos frente al 40,4% de controles (Tabla 20).

### 5.2.3 Metaloproteasa 3(MMP-3)

#### 5.2.3.1 Metaloproteasa 3(MMP-3) porcentaje grupo casos y controles

**Tabla 21.** MMP-3 porcentaje grupo casos vs controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-3 Porcentaje</b>	<b>=&lt;50%</b>	<b>Recuento</b>	16	57	73
		<b>% dentro de MMP-3 Porcentaje</b>	21,9%	78,1%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	64,0%	38,8%	42,4%
		<b>% del total</b>	9,3%	33,1%	42,4%
	<b>&gt;50%</b>	<b>Recuento</b>	9	90	99
		<b>% dentro de MMP-3 Porcentaje</b>	9,1%	90,9%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	36,0%	61,2%	57,6%
		<b>% del total</b>	5,2%	52,3%	57,6%
<b>Total</b>		<b>Recuento</b>	25	147	172
		<b>% dentro de MMP-3 Porcentaje</b>	14,5%	85,5%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	14,5%	85,5%	100,0%

En la tabla anterior se analizó la relación entre la variable MMP-3 porcentaje (= <50% y >50%), y la variable grupo de estudio(casos y controles), encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables  $p=0.018$  (tabla

21). Del 100% (99) de las mujeres que presentaron MMP-3 Porcentaje >50%, el 61,2% se encontraban en el grupo de casos, frente a un 36,0% del grupo control. Es decir, expresar niveles de MMP-3 Porcentaje >50% en las células tumorales está relacionado con el proceso de carcinogénesis (Tabla 21).

5.2.3.2. *Metaloproteasa 3(MMP-3) intensidad grupo casos y controles*

**Tabla 22.** MMP-3 Intensidad Grupo Casos vs Controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-3 Intensidad Débil</b>	<b>Recuento</b>		12	104	116
	<b>% dentro de MMP-3 Intensidad</b>		10,3%	89,7%	100,0%
	<b>% dentro de GRUPO</b>		48,0%	70,7%	67,4%
	<b>% del total</b>		7,0%	60,5%	67,4%
<b>MMP-3 Intensidad Moderado</b>	<b>Recuento</b>		13	43	56
	<b>% dentro de MMP-3 Intensidad</b>		23,2%	76,8%	100,0%
	<b>% dentro de GRUPO</b>		52,0%	29,3%	32,6%
	<b>% del total</b>		7,6%	25,0%	32,6%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>		25	147	172
	<b>% dentro de MMP-3 Intensidad</b>		14,5%	85,5%	100,0%
	<b>% dentro de GRUPO</b>		100,0%	100,0%	100,0%
	<b>% del total</b>		14,5%	85,5%	100,0%

Con una diferencia estadísticamente significativa,  $p=0.025$ , se observó una asociación entre la variable MMP-3 intensidad (débil-moderada) y la variable grupo de estudio (casos y controles). Aunque las mujeres del grupo control presentaron unos niveles de MMP-3 Intensidad Moderado del 52,0% frente al 29,3% del mismo estadio

del grupo de casos, esto podría deberse a que, en algunos procesos inflamatorios del tejido mamario, o en células sin patología tumoral también podrían expresar nivel aumentados de MMPs (Tabla 22).

5.2.3.3. *Metaloproteasa 3(MMP-3) Cantidad de estroma grupo casos y controles*

**Tabla 23.** MMP3- cantidad de estroma grupo casos vs controles

			GRUPO	
			CASO	Total
<b>MMP-3 Cantidad de Estroma</b>	<b>Escaso número de células teñidas</b>	<b>Recuento</b>	15	15
		<b>% dentro de MMP-3 Cantidad Estroma</b>	100,0%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	100,0%	100,0%
<b>Total</b>		<b>Recuento</b>	15	15
		<b>% dentro de MMP-3 Cantidad Estroma</b>	100,0%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	100,0%	100,0%

El 100% de las pacientes que expresaron niveles de MMP-3 cantidad de Estroma pertenecen al grupo casos, es decir 15 pacientes (Tabla 23).

5.2.4 *Metaloproteasa 9 (MMP-9)*

5.2.4.1 *Metaloproteasa 9 (MMP-9) porcentaje grupo casos y controles*

**Tabla 24.** MMP-9 porcentaje grupo casos vs controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-9 Porcentaje</b>	<b>=&lt;50%</b>	<b>Recuento</b>	28	146	174
		<b>% dentro de MMP-9 Porcentaje</b>	16,1%	83,9%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%

	<b>% del total</b>	16,1%	83,9%	100,0%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>	28	146	174
	<b>% dentro de MMP-9 Porcentaje</b>	16,1%	83,9%	100,0%
	<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
	<b>% del total</b>	16,1%	83,9%	100,0%

Al analizar la variable MMP-9 Porcentaje y su relación con la variable Grupo, se observa que el 100% de las mujeres (174) presentaron niveles  $\leq 50\%$ ; de las cuales el 83,9% eran casos frente al 16,1% de controles (Tabla 24).

#### 5.2.4.2. Metaloproteasa 9 (MMP-9) intensidad grupo casos y controles

**Tabla 25.** MMP-9 intensidad grupo casos vs controles

			<b>GRUPO</b>		<b>Total</b>
			<b>CONTROL</b>	<b>CASO</b>	
<b>MMP-9 Intensidad</b>	<b>Débil</b>	<b>Recuento</b>	28	146	174
		<b>% dentro de MMP-9 Intensidad</b>	16,1%	83,9%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	16,1%	83,9%	100,0%
<b>Total</b>		<b>Recuento</b>	28	146	174
		<b>% dentro de MMP-9 Intensidad</b>	16,1%	83,9%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% del total</b>	16,1%	83,9%	100,0%

De nuevo observamos que el 100% de las mujeres (174) presentaron MMP-9 Intensidad estadio débil, de las cuales el 83,9% eran casos frente al 16,1% de controles (Tabla 25).

5.2.4.3. Metaloproteasa 9 (MMP-9) cantidad de estroma grupo casos y controles

Tabla 26. MMP-9 cantidad de estroma grupo casos vs controles

			GRUPO		Total
			CONTROL	CASO	
<b>MMP-9 Cantidad de Estroma</b>	<b>Escaso número de células teñidas</b>	<b>Recuento</b>	1	27	28
		<b>% dentro de MMP-9 Cantidad de Estroma</b>	3,6%	96,4%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	49,1%	50,0%
		<b>% del total</b>	1,8%	48,2%	50,0%
	<b>Moderado número de células teñidas</b>	<b>Recuento</b>	0	18	18
		<b>% dentro de MMP-9 Cantidad de Estroma</b>	0,0%	100,0%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	0,0%	32,7%	32,1%
		<b>% del total</b>	0,0%	32,1%	32,1%
	<b>Abundante número de células teñidas</b>	<b>Recuento</b>	0	10	10
		<b>% dentro de MMP-9 Cantidad de Estroma</b>	0,0%	100,0%	100,0%
		<b>% dentro de GRUPO</b>	0,0%	18,2%	17,9%
		<b>% del total</b>	0,0%	17,9%	17,9%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>	1	55	56	
	<b>% dentro de MMP-9 Cantidad de Estroma</b>	1,8%	98,2%	100,0%	
	<b>% dentro de GRUPO</b>	100,0%	100,0%	100,0%	
	<b>% del total</b>	1,8%	98,2%	100,0%	

No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa,  $p=0.601$ . Es decir que presentar un nivel MMP-9 cantidad de estroma escaso/moderado/abundante no se relaciona con tener o no la enfermedad (Tabla 26).

Como resultado definitivo de la población estudiada (casos-contróles), observamos que no todas las pacientes presentaron expresión inmunohistoquímica de MMP-1-2-3-9 (porcentaje de intensidad) en el tejido mamario analizado con y sin enfermedad tumoral. Las variables de estudio expresión de intensidad de MMP-1 y porcentaje e intensidad de MMP-3 mostraron asociaciones estadísticamente significativas con el grupo de variables (control-caso,  $p = 0.043$  Chi - cuadrado,  $p = 0.018 / 0.025$  Chi - cuadrado, respectivamente). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para MMP-2 y MMP-9 con el grupo de variables casos-contróles (Tabla 27).

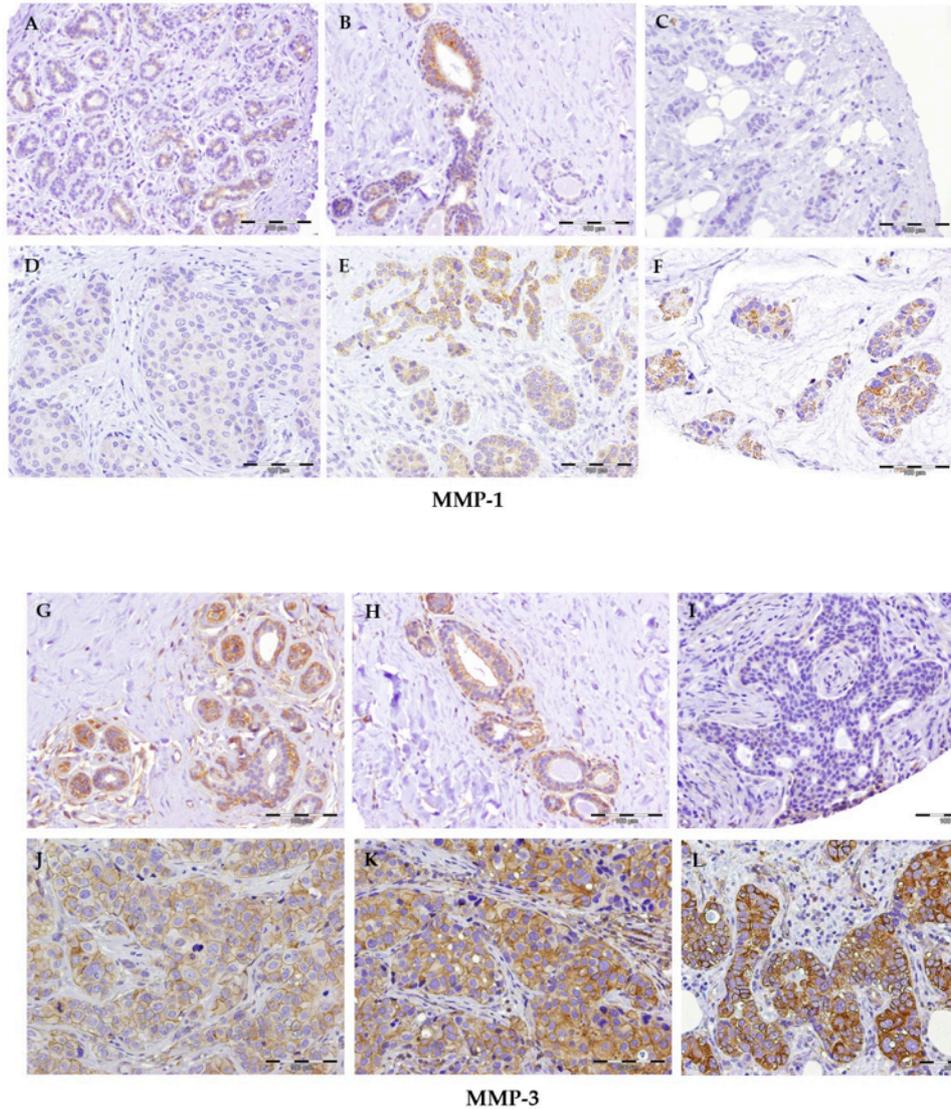
**Tabla 27.** Análisis Estadístico entre las variables MMPs 1-2-3-9 (Porcentaje/Intensidad) y la variable Grupo (Casos y Contróles).

Variables de estudio		Grupo			
		Caso	Control	Total	P
<b>MMP-1 Porcentaje</b>	=<50%	29	9	38	0.073
	>50%	117	16	133	
<b>MMP-1 Intensidad</b>	Débil	96	22	118	0.043
	Moderado	53	4	57	
	Intenso	5	NA	5	*
<b>MMP-2 Porcentaje</b>	=<50%	126	22	148	0.139
	>50%	24	1	25	
<b>MMP-2 Intensidad</b>	Débil	137	21	158	0.996
	Moderado	13	2	15	
	Intenso	NA	NA	NA	*

<b>MMP-3 Porcentaje</b>	=<50%	57	16	73	0.018
	>50%	90	9	99	
<b>MMP-3 Intensidad</b>	Débil	104	12	116	0.025
	Moderado	43	13	56	
	Intenso	7	NA	7	*
<b>MMP-9 Porcentaje</b>	=<50%	146	28	174	
	>50%	NA	NA	NA	
<b>MMP-9 Intensidad</b>	Débil	146	28	174	*
	Moderado	NA	NA	NA	
	Intenso	NA	NA	NA	

*\* No se pudo realizar el análisis estadístico con la categoría por ausencia de datos.*

En la Figura 10 se muestra la inmunotinción de MMP-1 y MMP-3 en las secciones del tejido mamario estudiadas. La tinción con anti-MMP-1 solo se observó en el citoplasma de algunas células glandulares en muestras de tejido normal (Figura 10-A, B). Se encontró reactividad en el citoplasma de las células tumorales y ocasionalmente en algunas células del estroma para los tejidos tumorales. Se describen cuatro niveles diferentes de intensidad de tinción (sin tinción, débil, moderada e intensa, Figura 10-C-F). El anticuerpo anti - MMP3 en tejido mamario normal muestra reactividad en el citoplasma de las células glandulares, especialmente las células mioepiteliales, con diferentes niveles de intensidad. También se observa reactividad en las células del endotelio vascular y en algunas células del infiltrado inflamatorio (Figura 10-G, H). También se observa tinción en el citoplasma de las células tumorales. Se describen cuatro niveles diferentes de intensidad de tinción (sin tinción, débil, moderada e intensa, Figura 10-I-L). En algunas células, la tinción citoplasmática da como resultado una mejora de la membrana.



**Figura 10.** Inmunotinción de MMP -1 (ABCAM, (A – F)): (A, B) secciones de tejido mamario normal; (C-F), secciones de carcinoma de mama con diferente nivel de intensidad de tinción; (C) ausencia de tinción; (D) tinción débil; (E) tinción moderada; (F) tinción intensa. Inmunotinción de MMP-3 (AGENTE, (G–L)): (G, H) secciones de tejido mamario normal; (I–L) secciones de carcinoma de mama con diferentes niveles de intensidad de tinción; (I) ausencia de tinción; (J) tinción débil; (K) tinción moderada; (L) tinción intensa.

No se encontró relación entre la sobreexpresión de MMP -1 y MMP -3 con las características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en este estudio. Sin embargo, del número total de pacientes analizadas con cáncer, identificamos que la intensidad de tinción de MMP -1 y el porcentaje e intensidad de tinción de MMP3

fueron mayores en pacientes posmenopáusicas, en aquellas con receptores hormonales positivos y en el tipo histológico de carcinoma ductal infiltrante (Tabla 28).

**Tabla 28.** Análisis estadístico entre las variables MMP-1 y MMP-3 y las variables clínico-patológicas.

	MMP-1 Intensidad			MMP-3 Intensidad			MMP-3 Porcentaje			
	Leve	Moderado	p	Leve	Moderado	p	≤50%	>50%	p	
Edad por intervalos	≤50 años	32	10		35	8		12	31	
	51-70 años	31	20	0,168	31	17	0,177	20	28	0,210
	>70 años	33	23		38	18		25	31	
Estadio Tumoral	EI	19	7		19	5		10	14	
	EII	33	16		36	14		21	29	
	EIII	19	10	0,549	18	9	0,766	10	17	0,978
	EIV	2	3		4	1		2	3	
Menopausia	Premenopausia	34	11		37	9		14	32	
	Postmenopausia	60	41	0,064	65	33	0,115	41	57	0,204
Afectación Ganglionar	No	42	25		48	19	0,856	26	41	
	Si	54	27	0,730	55	24		30	49	0,510
Recidiva Tumoral	No	79	42		87	35/2	0,510	47	75	
	Si	9	5	1,000	10	2		5	7	1,000
Mama Afecta	Derecha	29	8		23	13		10	26	
	Izquierda	51	34	0,063	62	25	0,520	33	54	0,307
Receptores Hormonales	Estrógenos y Progestágenos +	41	29		45	26		22	49	
	Estrógenos y Progestágenos -	13	4	0,394	14	2	0,085	8	8	0,348

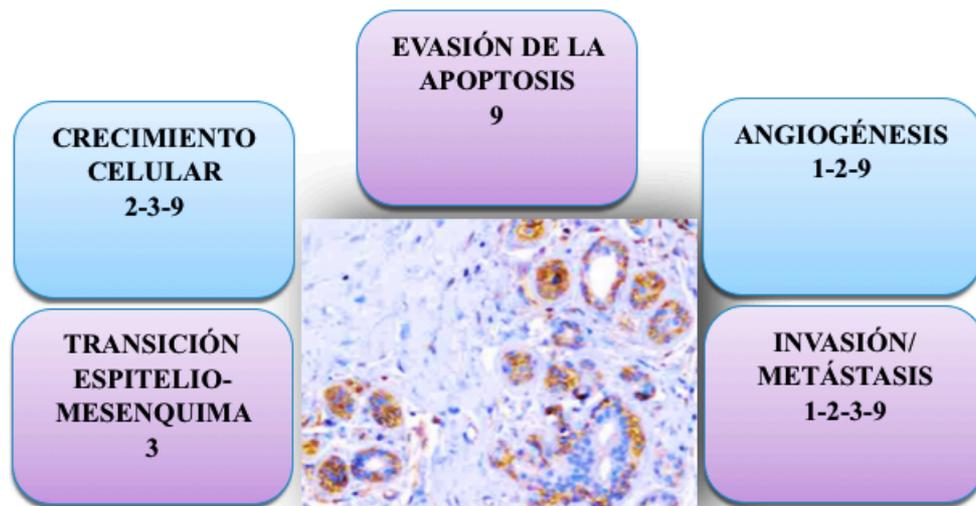
	Estrógenos +	5	3		7	1		3	5	
Factores de Riesgo	Antecedentes familiares 1º grado de C.M.	1	1		1	1		1	1	
	Antecedentes personales de otros cánceres	4	2		1	5		1	5	
	Antecedentes de lesiones benignas de mama	3	1	0,916	3	1	0,056	1	3	0,151
	Tabaquismo	10	8		12	6		3	15	
	Obesidad	10	6		14	2		9	7	
	Más de 1 factor de riesgo	4	1		3	3		1	5	
Tipo Histológico	Carcinoma ductal infiltrante	84	47		91	38		48	81	
	Carcinoma lobulillar infiltrante	8	5	0,748	8	5	0,272	6	7	0,502
	Otros carcinomas	4	1		5	0		3	2	
Tratamiento	Cirugía+Quimioterapia+Radioterapia	31	18		36	15		18	33	
	Cirugía+Quimioterapia	32	16	0,984	31	13	0,856	17	27	0,863
	Cirugía+Radioterapia	7	4		9	2		4	7	
	Cirugía	26	15		28	13		18	23	
Metástasis a otros órganos	Hueso	4	1		4	0		2	2	
	Pulmón	3	1		3	1		1	3	
	Cerebro	1	1	0,674	2	0	0,216	1	1	0,912
	Hígado	0	1		1	0		0	1	
	Metástasis a más de 1 órgano	3	2		3	1		1	3	

## ***6. DISCUSIÓN***

## 6. DISCUSIÓN

El cáncer de mama sigue siendo una de las principales causas de morbimortalidad en el mundo. Para metastatizar, las células malignas de un tumor primario deben invadir a través de las células de los tejidos del huésped y la matriz extracelular. Para que este proceso ocurra, se requiere de la liberación y acción de varias proteasas responsables de la degradación del colágeno intersticial y de otros componentes esenciales de la matriz extracelular; considerándose de este modo que las MMPs juegan un papel importante en las diferentes etapas de la progresión tumoral, siendo objeto de intensos estudios en los últimos años.

Largos años de investigación han demostrado el papel fundamental que desempeñan las proteasas tanto en el desarrollo embrionario, en la reparación y remodelación de tejidos, así como en los procesos de invasión por parte de las células malignas que llevan a la infiltración y metástasis, propiedades que influyen en la malignidad del cáncer. Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, secretadas por células tumorales y estromales, y que participan en la degradación de la matriz extracelular y de las barreras de la membrana basal<sup>78</sup>. Su actividad se encuentra regulada por inhibidores específicos conocidos como inhibidores tisulares de MMPs llamados TIMPs. Se ha demostrado que algunos miembros de la familia de las MMPs promueven el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima, y la formación de nicho premetastásico en pacientes con cáncer, como es el caso de las MMPs 1-2-3 y 9 (Figura 7)<sup>79</sup>.



**Figura 7.** *Papel de las metaloproteasas 1-2-3-9 en la carcinogénesis*

La MMP-1, forma parte de la familia de las colagenasas, y es capaz de degradar el colágeno intersticial I, II y III dando lugar a colágeno desnaturalizado o gelatina. MMP-1 sintetizada por macrófagos, fibroblastos y células dendríticas, se encarga a su vez de promover el crecimiento celular; y es la única MMP capaz de degradar todos los tipos de colágeno de la glándula mamaria y desempeña un papel clave en la degradación de las fibras estromales en varias enfermedades, incluido el cáncer de mama<sup>80</sup>.

Las MMPs-2-9, también llamadas gelatinasas A y B, dirigen su actividad proteolítica a la degradación del colágeno intersticial desnaturalizado o gelatina, colágeno tipo IV y V de la membrana basal. La MMP-2 o gelatinasa-A es fisiológicamente expresada por las células del estroma de la mayoría de los tejidos, pero la expresión de la MMP-9 o gelatinasa-B es débil o ausente en los tejidos normales, y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos. Sin embargo, su expresión puede ser inducida en caso de remodelación tisular como el desarrollo embrionario, cicatrización o el crecimiento y/o invasión tumoral<sup>81</sup>.

La estimulación de la angiogénesis es un papel adicional asignado a la MMP-9, a través de su control sobre la disponibilidad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que es esencial para la neovascularización tumoral<sup>82</sup>. La MMP-9 es sintetizada por células inflamatorias, que estimulan la angiogénesis al liberar VEGF secuestrado, lo que permite su interacción con los receptores de VEGF<sup>26</sup>.

Se sabe que las células metastásicas del cáncer de mama prefieren ciertos órganos para establecer tumores secundarios, como el hueso o el pulmón. Por lo tanto, la diseminación de células cancerosas no es un mecanismo aleatorio, pero parece requerir la formación de un entorno receptivo, es el llamado nicho premetastásico, la MMP-2 también participan en este paso importante del proceso de carcinogénesis<sup>83</sup>.

La MMP-3 pertenece al grupo de las estromelisininas, enzimas que participan en la ruptura de las uniones adherentes mediadas por E-cadherina, lo que significa que las células tumorales pierden el contacto con las células circundantes promoviendo la capacidad de invasión de las células tumorales, es decir, promueve la transición epitelio-mesenquimal, que no son más que cambios estructurales y funcionales en las células epiteliales que permiten su migración a través de la membrana basal<sup>84-85</sup>. Estudios llevados a cabo en cánceres de mama humanos han reportado que los fibroblastos del estroma que rodeaban a las células tumorales, no las células tumorales mismas, son responsables en producir las estromalisininas<sup>86</sup>.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado para analizar la expresión inmunohistoquímica de cuatro MMPs en muestras de tejidos con cáncer de mama y tejido mamario normal. El presente estudio muestra que existe una asociación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica de MMP-1 y

MMP-3 en el tejido mamario de mujeres que padecen cáncer de mama en comparación con el tejido de pacientes sin enfermedad tumoral. La inmunotinción de MMP-1 y MMP-3 fue mayor en las primeras etapas de la enfermedad, lo que sugiere que la función más importante de ambas MMPs se encuentra al comienzo del desarrollo del cáncer de mama.

El cáncer de mama es el tumor maligno más común entre las mujeres en todo el mundo<sup>87</sup>. En los últimos años se ha avanzado considerablemente en la detección precoz de esta patología, lo que ha permitido una mayor supervivencia y altas tasas de curación en las pacientes diagnosticadas de esta enfermedad; por lo tanto, se necesitan nuevos indicadores de progresión tumoral para mejorar aún más el pronóstico de estas pacientes.

El TME se reconoce cada vez más como un componente clave en la progresión del tumor, así como en un objetivo terapéutico prometedor en el cáncer de mama<sup>88</sup>. El TME se compone de MEC, así como de varios elementos celulares y factores solubles que desarrollan una red de proteínas y moléculas de señalización que desempeñan un papel importante en la progresión y metástasis del cáncer de mama<sup>89</sup>. El TME de la mama está modulada por la MEC y las vesículas extracelulares<sup>90</sup>. El microambiente del cáncer a menudo difiere del tejido sano en lo referente a la degradación de proteínas de la MEC. A medida que avanza el cáncer de mama se producen alteraciones importantes en la MEC. La maquinaria epigenética juega, además, un papel central en la generación de un entorno inmunosupresor para el crecimiento del tumor. Por esta razón, las alteraciones epigenéticas que afectan a la función de las células inmunitarias en el microambiente tumoral representan un área de investigación creciente<sup>91</sup>.

Existen distintos mecanismos epigenéticos que regulan las MMPs. La metilación de los genes reguladores del ADN puede afectar indirectamente a la expresión de MMPs en el tejido tumoral. Falzone y col.<sup>92</sup> han descrito la metilación intragénica como un mecanismo responsable de la regulación positiva de MMP-9 en el cáncer. No obstante, algunos resultados sugieren que la expresión elevada o ectópica, en lugar del silenciamiento impulsado por la metilación del gen MMP, podría vincular las MMPs con la tumorigénesis<sup>93</sup>. Por otro lado, los microARN (miARN) regulan la expresión y función de las moléculas de la matriz extracelular y, a menudo, están desregulados en el cáncer de mama<sup>94,95</sup>. En particular, los miARN ha sido un foco de interés en la regulación postranscripcional de las MMPs<sup>96</sup>. Algunos autores han analizado diferentes mecanismos en los que los miARN regulan las MMPs en varios contextos de invasión tumoral, transición epitelio-mesenchimal (TEM) y remodelación de la MEC<sup>97</sup>. Además, los microARN pueden controlar el desarrollo, la invasión y la migración del cáncer de mama directa e indirectamente mediante la regulación de MMP específicas.

Las MMPs están involucradas en los múltiples pasos de la TEM y la progresión del cáncer; por lo tanto, se han considerado como posibles biomarcadores en el diagnóstico y tratamiento para varios tipos de cáncer<sup>98</sup>. El paso inicial para que las células cancerosas adquieran potencial migratorio es la TEM, es la reprogramación que se produce en las células modificadas genética y epigenéticamente<sup>99</sup>. Se ha propuesto la E-cadherina como un indicador TEM y como un objetivo directo para la eliminación dependiente de MMPs, lo que sugiere un papel importante de las MMPs en el desmontaje de las uniones celulares<sup>100</sup>. Algunos autores han descrito que la TEM inducida por Wnt1 se asocia con la activación de MMP-3 y que esta inhibición da como

resultado la represión característica de la TEM<sup>101</sup>. MMP-3 es responsable de producir varios proMMP activos, Suzuki y sus colegas informaron de la transformación de proMMP-1 en la forma completamente activa de MMP-1 por MMP-3<sup>102</sup>.

La sobreexpresión de MMP-1 y MMP-3 se asocia con las características clínico-patológicas de varias neoplasias malignas<sup>37,103</sup>. En este estudio no se ha encontrado ninguna asociación entre la expresión de MMP-1 y MMP-3 y la edad, el tipo histológico, la afectación de los ganglios linfáticos, el tratamiento o los receptores hormonales en cancer de mama (Tabla 28). Ésta es la principal limitación de este estudio. No obstante, del número total de las pacientes analizadas con cáncer, se ha identificado que la intensidad de tinción de MMP-1 y el porcentaje y la intensidad de tinción de MMP-3 aumentaron significativamente en los tejidos cancerosos en un 64,4%, 70.7 y 61.2%, respectivamente, en comparación con los tejidos mamarios normales. Distintos estudios preclínicos han puesto de manifiesto que la sobreexpresión de MMP-1 desempeña un papel importante en el inicio de la tumorigénesis mamaria al estar implicada en la degradación del estroma y la diseminación de factores de crecimiento y mitógenos para las células epiteliales<sup>104</sup>. La expresión anormal de MMP-1 se ha identificado en varios tipos de cánceres malignos<sup>105,106</sup>, aunque su tanto su expresión como su utilidad como factor pronóstico en el cáncer de mama siguen sin estar claros. Algunos estudios han encontrado que la expresión elevada de MMP-1 puede promover el crecimiento local y la formación de metástasis cerebrales por las células del cáncer de mama<sup>107</sup>. También se ha documentado que la expresión génica alta de MMP-1 predice una tasa de supervivencia global más baja en el carcinoma de mama invasivo<sup>108</sup> y un pronóstico más precario en pacientes tratadas con terapia sistémica<sup>109</sup>;

por lo tanto, la expresión de MMP-1 es un indicador de pronóstico significativo y un objetivo farmacológico potencial para el cáncer de mama<sup>110</sup>.

La participación de las MMPs en las diferentes etapas de la progresión tumoral se basa en diversas observaciones clínicas relacionadas con la expresión de estas enzimas en diferentes tipos de cánceres metastásicos, así como en las proteínas de membrana que son modificadas por ellas<sup>111</sup>. Nuestros resultados mostraron niveles de expresión inmunohistoquímica más altos para la intensidad de MMP-1 y el porcentaje e intensidad de MMP-3 para el cáncer de mama en estadios tempranos (EI, EII). Este hecho respaldaría la interacción entre estas dos MMPs y las funciones biológicas de las MMPs relacionadas con los diferentes pasos de la carcinogénesis.

La MMP-3 se expresa en gran medida en la glándula mamaria, donde funciona para regular la morfogénesis de ramificación y la involución post-lactacia<sup>112</sup>. Por otro lado, la MMP-3 proporciona un ejemplo de una MMP que puede ser protectora o pro-tumorigénica en relación con el crecimiento glandular<sup>113</sup>.

Se han publicado algunos estudios sobre la función de la MMP-1 en la progresión y la metástasis del cáncer de mama<sup>114,115</sup>. Otros autores han demostrado la importante función de la MMP-3 en la progresión tumoral y la supervivencia global<sup>116</sup>; sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, ninguno ellos ha analizado la expresión de cuatro MMPs en las biopsias de pacientes con cáncer. Nuestros resultados muestran que solo la expresión de MMP-1 y MMP-3 en el tejido tumoral, podría estar relacionada con la progresión del cáncer de mama y sugieren priorizar estas MMPs como candidatas para el desarrollo de estrategias terapéuticas en estos pacientes.

Pocos estudios han evaluado la expresión inmunohistoquímica de MMP-2 y MMP-9 en cáncer de mama y fibroadenoma. Algunos autores han encontrado una expresión de las proteínas MMP-2 y MMP-9 significativamente más alta en las células del cáncer de mama en comparación con las del fibroadenoma<sup>117</sup>. Sampaio y col.<sup>118</sup> encontraron una expresión mayor de MMP-1, una MMP de membrana tipo 1, en el cáncer de mama comparado con el fibroadenoma. Un estudio publicado por Li et al. llevado a cabo en 270 pacientes con cáncer de mama, puso de manifiesto que las pacientes con ganglios linfáticos negativos, en las que se realizó una mastectomía radical o una mastectomía radical modificada, presentaron mayor expresión de MMP-2 y MMP-9, siendo estas enzimas catalogadas como factores de mal pronóstico. También pueden ser consideradas como factores predictivos potenciales para definir el uso de terapia sistémica adyuvante<sup>119</sup>. MMP-2 y MMP-9 participan, además, en cada paso de la metástasis del cáncer de mama a los huesos<sup>120</sup>. Por estas razones, MMP-2 y MMP-9 se han considerado biomarcadores fiables para la predicción del pronóstico del cáncer de mama<sup>121</sup> y para el desarrollo de metástasis<sup>122-123</sup>.

En este estudio, la tinción con MMP-2 y MMP-9 no mostró diferencias significativas entre el grupo de casos y controles, no pudiendo confirmar su función como biomarcadores para la predicción, progresión y metástasis en el cáncer de mama. Este hallazgo no es habitual, ya que la expresión de MMP-2 y MMP-9 en el cáncer de mama está bien investigada y descrita en diferentes estudios, pues no solo exhiben actividad proteolítica contra las proteínas de la membrana basal, hecho que se traduce en invasión tumoral, sino que también influyen en el crecimiento del tumor, la angiogénesis y la formación de nichos premetastásicos<sup>124-127</sup>. Es importante destacar que

se han encontrado niveles de expresión dispares de las MMP en los estudios de cáncer de mama. Esto podría deberse tanto a diferencias de tinción asociadas con el anticuerpo primario suministrado por las distintas casas comerciales como a los diversos métodos de tinción inmunohistoquímica utilizados. Actualmente, no existe consenso sobre el umbral para la sobreexpresión y medición de MMP por inmunohistoquímica. Además, los valores de corte para los porcentajes o los niveles de intensidad de la tinción pueden diferir entre los estudios, lo que resulta en tasas de positividad inconsistentes y valores predictivos distintos para la sobreexpresión de MMPs. Esto puede ser una fuente importante de heterogeneidad y podría limitar el uso clínico de la expresión de MMPs para el diagnóstico de este tumor. También es importante considerar el sesgo de publicación en el análisis de la sobreexpresión de MMP, ya que los estudios con resultados negativos tienden a no ser publicados.

Las MMPs están involucradas en muchos procesos biológicos y podrían ser biomarcadores importantes para enfermedades cardiovasculares, trastornos musculoesqueléticos y cáncer. Es importante tener en cuenta que las actividades de las MMPs pueden variar durante la enfermedad debido a las diferencias en las actividades proteolíticas de las MMP hacia diferentes sustratos<sup>128-130</sup>; por tanto, entender la función de las MMPs en el proceso de desarrollo tumoral es una tarea compleja dado que las MMP individuales actúan en diferentes tumores y en distintas etapas de la progresión del cáncer. Seguir solo las MMPs expresadas por el tumor específico sería un nuevo paso hacia la medicina personalizada. Varias MMPs están fuertemente implicadas como dianas prometedoras para la terapia del cáncer de mama. Teniendo en cuenta que la terapia con inhibidores de MMP (MMPI) disminuye drásticamente la progresión de la

enfermedad, se podría plantear la hipótesis de que la inhibición de las MMPs podría ser eficaz para limitar la progresión del tumor durante su fase inicial<sup>131</sup>. Algunos estudios<sup>131-135</sup> han analizado diferentes estrategias para el desarrollo de inhibidores con potencial terapéutico que son capaces de inhibir selectivamente a las MMPs responsables de la promoción de tumores, con especial consideración del potencial de los productos biológicos, incluidos los anticuerpos y las proteínas modificadas basados en la estructura de TIMPs. Napoli y col.<sup>131</sup> mostró la importancia de MMP-9 en la degradación de la MEC y la consecuente progresión del melanoma, así como la posible implicación terapéutica de los MMPI endógenos y exógenos para el diseño de nuevos protocolos terapéuticos para pacientes con esta enfermedad. La mayoría de los MMPI evaluados en ensayos clínicos hasta la fecha han fracasado, debido a que provocan una importante toxicidad musculoesquelética y no han logrado mejorar los resultados clínicos<sup>136,137</sup>. Esto hecho podría explicarse considerando que estos ensayos estudiaron a pacientes con enfermedad en estadio IV. Los ensayos nuevos deben inscribir a pacientes con enfermedad de alto riesgo que aún no presenten enfermedad metastásica. Por otro lado, el fármaco debe administrarse antes de la cirugía, en la llamada "ventana de oportunidad" entre el momento del diagnóstico y la escisión quirúrgica, o en el postoperatorio como adyuvante. Todo ello ayudaría a identificar y validar los biomarcadores de la inhibición enzimática y la metástasis como un indicador del éxito clínico<sup>135</sup>. En este sentido, el estudio D - Care (NCT01077154) investigó el Denosumab, un fármaco con un diseño similar de MMPI, en el contexto neoadyuvante o adyuvante para pacientes con cáncer de mama en estadio II o III con alto riesgo de recurrencia. Se demostró que el Denosumab administrado en mujeres con cáncer de

mama en estadios iniciales disminuyo el riesgo de metástasis ósea<sup>138</sup>. A pesar de los recientes avances en nuestro conocimiento de las MMPs, aún se desconocen múltiples aspectos funcionales de estas proteínas<sup>99</sup>. Por tanto, creemos que se necesitan más estudios que confirmen alguna de las hipótesis propuestas debido a la falta de evidencia en la literatura sobre este tema.

## ***7. CONCLUSIONES***

## 7. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio sugieren un aumento de la expresión de MMP -1 y MMP -3 en el tejido con cáncer de mama en comparación con el tejido del epitelio mamario normal, lo que podría justificar su utilización como biomarcadores potenciales en el diagnóstico del cáncer de mama.

2. La mayor inmunotinción de MMP-1 y MMP-3 en las primeras etapas de la enfermedad podría sugerir que la función más importante de ambas MMPs se encuentra al comienzo del desarrollo del cáncer de mama.

3. Con respecto a la asociación entre la expresión de MMP -1 y MMP -3 y otros factores pronósticos clínico-patológicos, no se han encontrado relaciones significativas entre la expresión de estos biomarcadores y la edad, el tipo histológico, la afectación de los ganglios linfáticos, el tratamiento o los receptores hormonales.

4. La falta de asociación entre la expresión de MMP-1 y MMP-3 y otros factores pronósticos clínico-patológicos ha sido un resultado diferente al encontrado por otros autores; podría ser explicado tanto por los valores de corte considerados en los distintos estudios para los porcentajes y los niveles de intensidad de la tinción como por sesgos de publicación en el análisis de la sobreexpresión de MMP, ya que los estudios con resultados negativos tienden a no ser publicados.

5. MMP -1 y MMP -3 participan en el mantenimiento del fenotipo angiogénico; por tanto, la inhibición de estas proteasas puede ser valiosa tanto para prevenir el cáncer de mama como para bloquear la metástasis de tumores establecidos.

6. Se debe considerar el uso de inhibidores de MMPs en pacientes con cáncer de mama en estadio temprano, ya que hasta la fecha se ha limitado principalmente a pacientes con enfermedad avanzada.

## ***8. BIBLIOGRAFIA***

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. J. A. Torró Richart. Evolución histórica en el tratamiento quirúrgico del cancer de mama. Guías Clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. Cirugía de la Mama. 2017; 22: 297-312.
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. 2021, 71, 209–249.
3. Maringe, C.; Spicer, J.; Morris, M.; Purushotham, A.; Nolte, E.; Sullivan, R.; Rachet, B.; Aggarwal, A. The impact of the COVID- 19. Pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: A national, population-based, modelling study. Lancet Oncol. 2020, 21, 1023–1034.
4. Momenimovahed, Z.; Salehiniya, H. Delay in the diagnosis of breast cancer during coronavirus pandemic. EXCLI J. 2021, 20.
5. Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España. 2021. Available online: <http://www.seom.org> (accessed on 26 June 2021).
6. Registro de Cáncer de Granada. Disponible en: [www.registrocancergranada.es](http://www.registrocancergranada.es)
7. Sellers TA, King RA, Cerhan JR, Chen PL, Grabrick DM, Kushi LH, et al. Fifty-year follow-up of cancer incidence in a historical cohort of Minnesota breast cancer families. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999;8:1051-7.

8. Russo J, Russo IH: Cellular basis of breast cancer susceptibility. *Oncol Res* 1999;11:169-78.
9. Ellis I, Schnitt S, Sastre-Garau X. Invasive breast carcinoma. En: Tavassoli F & Devilee P, editores. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: WHO. IARC Press; 2003. p. 13-59.
10. Carney PA, Miglioretti DL, Yankaskas BC, Kerlikowske K, Rosenberg R, Rutter CM, Geller BM, Abraham LA, Taplin SH, Dignan M et al: individual and combined effects of age, breast density, and hormone replacement therapy use on the accuracy of screening mammography. *Ann Intern Med* 2003, 138(3): 168-175
11. Chin D, Boyle GM, Kane AJ, Theile DR, Hayward NK, Parson PG, Coman WB. Invasion and metastasis markers in cancers. *Br J Plast Surg* 2005; 58:466-474.
12. Cairns RA, Khokha R, Hill RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med* 2003; 3:659-671.
13. Pantel K, Woelfle U. Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors. *J Biol Regul Homeost Agent* 2004; 18:120-125
14. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then *APMIS* 2004; 112: 402-412.
15. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci* 2005; 118:147-156.

16. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPS as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49:187-198.
17. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and Biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73:161-195.
18. Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. Role of metalloproteinases and their inhibitors in tumors. *Medicina (B. Aires)*. 2012; 72: 495-502.
19. Impola U, Uitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhan L, Larjava H, Isaka K, Saarialho-Kore U. Differential expression of Matrilysin-1 (MMP-27), 92KD gelatinase (MMP-9) and Metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* 2004; 202:14-22.
20. Steman M, Paju A, Hanemaaijer R, Tervahartiala T, Leminen A, Steman UH, Kontinen YT, Sorsa T. Collagenases (MMP-1,-8,-13) and trypsinogen-2 in fluid form benign and malignant ovarian cysts. *Tumor Biol* 2003; 24:9-12.
21. Sternlicht MD, Bissett MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 2000; 19:1102-1113.
22. Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, Yan L. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRI) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRI. *Mol Cancer Res* 2004; 2:73-80.

23. Guo H, Li R, Zucker S, Toole BP. EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor surface. *Cancer Res* 2000; 60:888-891.
24. Gabinson EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 2005; 87: 361-368.
25. Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, Patel PS. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 90:81-88.
26. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in breast cancer with special reference to activator protein-2, HER-2 and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7621-7628.
27. Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004; 167: 769-781.
28. Murphy G, Knauper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, Freije J, Pendas AM, Lopez-Otin C. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:25-39.

29. Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001; 265:87-93.
30. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993; 268:23824-23829.
31. DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with and inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; 52: 701-708.
32. Wang CS, Tetu B. Stromelysin-3 expression by mammary tumor-associated fibroblast under in vitro breast cancer cell induction. *Int J Cancer* 2002; 99:792-799.
33. Henriot P, Zhong ZD, Brooks PC, Weinberg KI, DeClerck YA. Contact with fibrillar collagen inhibits melanoma cell proliferation by up-regulating p27<sup>KIP1</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1026-1031.
34. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1705:69-89.
35. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755: 37-69.
36. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *J Biol Chem* 1998; 273: 5400-5404.

37. Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzlod G, Poorman R, Mitchell MA. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 1994; 162: 499-510.
38. Chun TH, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh KT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Weiss ST. MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol* 2004; 167:757-767.
39. Brooks PC, Silletti S, Schalscha TL, Friedlander M, Cheresch DA. Disruption of angiogenesis by PEX a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998; 92:391-400.
40. Sato H, Takino T, Miyamori H. Roles of membrane-Type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96:212-217.
41. Bazarbachi A, Abou Merhi R, Gessain A, Talhouk R, El-Khoury H, Nasr R, Gout O, Sulahian R, Homaidan F, The H, Hermine O, El-Sabban ME. Human T-cell lymphotropic virus type I infected cells extravasate through the endothelial barrier by a local angiogenesis-like mechanism. *Cancer Res* 2004; 64:2039-2046.
42. Yang JM, Xu Z, Wu H, Zhu H, Wu X, Hait WN. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistance cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 420-427.
43. Canitrot Y, Bichat F, Cole S, Deeley R, Gerlach J, Bastian G, Arvelo F, Poupon MF. Multidrug resistance genes MRP and MDR1 expression in small cell lung cancer

- xenografts: relationship with response to chemotherapy. *Cancer Letters* 1998; 130:133-141.
44. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:178-193.
45. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; 295: 2387-2392.
46. Groves MD, Puduvalli VK, Hess KR, Jaeckle KA, Peterson P, Yung WK, Levin VA. Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase, Marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2002; 87:161-167.
47. Hande KR, Collier M, Paradiso L, Stuart-Smith J, Dixon M, Cleudeninn N, Youn GT, Alberti D, Binger K, Wilding G. Phase I and pharmacokinetic study of prinomastat, a matrix metalloprotease inhibitor. *Clin Cancer Res* 2004; 10:909-915.
48. Bissett D, O'Byrne KJ, von Pawel J, Gatzemeier U, Price A, Nicolson M, Mercier K, Mazabel E, Penning C, Zhang MH, Collier MA, Shepherd FA. Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 842-849.
49. Rizvi NA, Humphrey JS, Ness EA, Johnson MD, Gupta E, Williams K, Daly DJ, Sonnichsen D, Conway D, Marshall J, Hurwitz H. A phase I study of oral BMS-275291 a novel nonhydroxamate sheddase-sparing matrix metalloproteinase

- inhibitor in patients with advanced or metastatic cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1963-1970.
50. Eatock M, Cassidy J, Johnson J, Morrinson R, Devlin M, Blackey R, Owen S, Choi L, Twelves C. A dose-finding and pharmacokinetic study of the matrix metalloproteinase inhibitor MMI270 (previously termed CGS27023A) with 5-Fu and folinic acid. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55:39-46.
51. Nozaki S, Sissons S, Chien DS, Sledge GW. Activity of biphenyl matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in a human breast cancer orthotopic model. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 407-412.
52. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist Update* 2004; 7: 195-208.
53. Syed S, Takimoto C, Hidalgo M, Rizzo J, Kunn JG, Hammond LA, Schwartz G, Tolcher A, Patnaik A, Eckhard SG, Rowinsky EK. A phase I and pharmacokinetic study of col-3 (Matastat), and oral tetracycline derivative with potent matrix metalloproteinase and antitumor properties. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6512-6521.
54. Heikkila P, Teronen O, Hirn MY, Sorsa T, Tervahartiala T, Salo T, Kontinen YT, Halttunen T, Moilanen M, Hanemaaijer R, Laitinen M. Inhibition of matrix metalloproteinase-14 in osteosarcoma cells by clodronate. *J Surg Res* 2003; 111: 45-52.
55. Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal on the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000; 19: 6642-6666.

56. Marchant DJ: Epidemiology of breast cancer. Clin Obstet Gynecol 1982, 25:387-392.
57. Domínguez Cunchillos F, Ballester Sapiña JB, De Castro Parga G. Cirugía de la Mama. Guías Clínicas de la Asociación Española de Cirujanos 2017.
58. Hartmann LC, Sellar TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW et al: Benign breast disease and the risk of breast cancer. N Engl J Med 2005, 353: 229-237.
59. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders KC, Kasid A, Derynck R, Dickson RB: Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. Cell 1987, 48: 417-428.
60. Key TJ, Allen NE, Spencer EA, Travis RC: Nutrition and breast cancer. Breast 2003, 12: 412-416.
61. Barnett GC, Shah M, Redman K, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD: Risk factors for the incidence of breast cancer: do they affect survival from the disease? J Clin Oncol 2008, 26: 3310-3316.
62. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME: Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004, 13: 1558-1568.
63. Han W, Kim SW, Park IA, Kang D, Youn YK, Oh SK, Choe KJ, DY: Young age: an independent risk factor disease-free survival in women. Breast Dis 2005, 23: 9-15.

64. Vander Wal BC, Butzellar RM, Vander Meij S, Boermeester MA, Axillary lymph node ratio and total number of removed lymph nodes: predictors of survival in stage I and II breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002, 28: 481-489.
65. Arriagada R, Rutqvist LE, Johanson H, Kramar A, Rotstein S: Predicting distant dissemination in patients with early breast cancer. *Acta Oncol* 2008, 47:1113-1121.
66. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19: 403-410.
67. Reis-Filho JS, Lakhani SR: Breast cancer special types: why bother? *J Pathol* 2008, 216: 394-398.
68. Barnes DM, Hanby AM: Oestrogen and progesterone receptors in breast cancer: past, present and future. *Histopathology* 2001, 38: 271-274.
69. Li CI, Daling JR, Malone KE: Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. *J Clin Oncol* 2003, 27: 28-34.
70. Lin A, Rugo HS: The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations. *Curr Treat Options Oncol* 2007, 8:47-60.
71. Gerdes J: Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990,1:199-206.

72. Vizoso FJ, Gonzales LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, Garcia-Muniz JL: Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007, 96:903-911.
73. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Annals of Oncology* 2008, 19: 1566-1572.
74. Alcaide Lucena M, Rodríguez González CJ, de Reyes Lartategui S, Gallart Aragón T, Sánchez Barrón MT, García Rubio J, Torné Poyatos P. Clasificación actual del cáncer de mama. Implicación en tratamiento y pronóstico de la enfermedad. *Cirugía Andaluza*. 2021, 32:155-159.
75. Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW: Screening for breast cancer. *JAMA Acoust Soc Am* 1957, 29: 824-833.
76. Yang WT, Tse GM: Sonographic, mammographic, and histopathologic correlation of symptomatic ductal carcinoma in situ. *AJR Am Roentgenol* 2004, 182: 101-110.
77. Eby PR, Lehman CD: Magnetic resonance imaging-guided breast interventions. *Top Magn Reson imaging* 2008, 19:151-162.
78. Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem* 2001;276(21): 18415–18422. Doi: 10.1074/jbc.M010135200.

79. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141(1):52e67.
80. Eck SM, Blackburn JS, Schmucker AC, Burrage PS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinase and G protein coupled receptors: co-conspirators in the pathogenesis of autoimmune disease and cancer. *J Autoimmun* 2009; 33(3e4):214e21.
81. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: new findings and review of the literature. *BMC Cancer* 2009;9:188.
82. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 2004;6(5):447e58.
83. Kajiwara Y, Ueno H, Hashiguchi Y, Shinto E, Shimazaki H, Mochizuki H, et al. Heterogeneity of metalloproteinase expression in colorectal cancer e relation of molecular findings to basic morphology. *Anticancer Res* 2011;31(5): 1567e75.
84. Drabsch Y, ten Dijke P. TGF- $\beta$  signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011;16(2):97e108.
85. Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(8):647e56.
86. Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, et al. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 1):111e8.

87. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* 2021, 71: 7–33.
88. Artacho-Cordón, S.; Ríos-Arrabal, P.C.; Lara, A.; Artacho-Cordón, I.; Calvente, M.I.; Núñez, M. Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgical Oncology* 21 (2012) e143-151e.
89. Bahcecioglu, G.; Basara, G.; Ellis, B.W.; Ren, X.; Zorlutuna, P. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. *Acta Biomater.* 2020, 106, 1–21.
90. Yang, J.; Bahcecioglu, G.; Zorlutuna, P. The Extracellular Matrix and Vesicles Modulate the Breast Tumor Microenvironment. *Bioengineering* 2020, 7, 124.
91. Lodewijk, I.; Nunes, S.P.; Henrique, R.; Jerónimo, C.; Dueñas, M.; Paramio, J.M. Tackling tumor microenvironment through epigenetic tools to improve cancer immunotherapy. *Clin. Epigenetics* 2021, 13, 63.
92. Falzone, L.; Salemi, R.; Travali, S.; Scalisi, A.; McCubrey, J.A.; Candido, S.; Libra, M. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma. *Aging* 2016, 8, 933–944.
93. Simonova, O.A.; Kuznetsova, E.B.; Tanas, A.S.; Rudenko, V.V.; Poddubskaya, E.V.; Kekeeva, T.V.; Trotsenko, I.D.; Larin, S.S.; Kutsev, S.I.; Zaletaev, D.V.; et al. Abnormal Hypermethylation of CpG Dinucleotides in Promoter Regions of Matrix Me-

- tallopoteinases Genes in Breast Cancer and Its Relation to Epigenomic Subtypes and HER2 Overexpression. *Biomedicines* 2020, 8, 116.
94. Rutnam, Z.J.; Wight, T.N.; Yang, B.B. miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. *Matrix Biol.* 2013, 32, 74–85.
95. Falzone, L.; Grimaldi, M.; Celentano, E.; Augustin, L.S.A.; Libra, M. Identification of Modulated MicroRNAs Associated with Breast Cancer, Diet, and Physical Activity. *Cancers* 2020, 12, 2555.
96. Rak, B.; Mehlich, D.; Garbicz, F.; Domosud, Z.; Paskal, W.; Marczewska, J.M.; Włodarski, P.K. Post-transcriptional Regulation of MMP16 and TIMP2 Expression via miR-382, miR-410 and miR-200b in Endometrial Cancer. *Cancer Genom. Proteom.* 2017, 14, 389–401.
97. Javadian, M.; Gharibi, T.; Shekari, N.; Abdollahpour-Alitappeh, M.; Mohammadi, A.; Hossieni, A.; Mohammadi, H.; Kazemi, T. The role of microRNAs regulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer development, progression, and metastasis. *J. Cell Physiol.* 2019, 234, 5399–5412.
98. Gialeli, C.; Theocharis, A.D.; Karamanos, N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011, 278, 16–27.
99. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014, 15, 178–196.

- 100.Rodríguez, D.; Morrison, C.J.; Overall, C.M. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010, 1803, 39–54.
- 101.Blavier, L.; Lazaryev, A.; Shi, X.H.; Dorey, F.J.; Shackelford, G.M.; DeClerk, Y.A. Stromelysin-1 (MMP-3) is a target and a regulator of Wnt1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cancer Biol. Ther.* 2010, 10, 198–208.
- 102.Nagase, H.; Ogata, Y.; Suzuki, K.; Enghild, J.J.; Salvesen, G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem. Soc. Trans.* 1991, 19, 715–718.
- 103.Jeziarska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit* 2009;15(2):RA32e40.
- 104.Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415(6871):530e6.
- 105.Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern S. Simultaneous determination of matrix metallo- proteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis.* 2004; 19:518–524. <https://doi.org/10.1007/s00384-004-0592-6> PMID: 15103490.
- 106.Wieczorek E, Reszka E, Jablonowski Z, Jablonska E, Beata Krol M, Grzegorzcyk A, et al. Genetic poly- morphisms in matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue

- inhibitors of MPs (TIMPs), and bladder cancer susceptibility. *BJU Int.* 2013; 112: 1207–1214. <https://doi.org/10.1111/bju.12230> PMID: 23819551.
- 107.Liu H, Kato Y, Erzinger SA, Kiriakova GM, Qian Y, Palmieri D, Steeg PS, Price JE. The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC Cancer.* 2012;12:583.
- 108.Cheng, S.; Mitsuhiro, T.; Yasuhiro, H.; Toshimichi, A.; Kuramae, T.; Takemoto, N.; Hamada, J.-I.; Miyamoto, M.; Hirano, S.; Kondo, S.; et al. High MMP-1 mRNA expression is a risk factor for disease-free and overall survivals in patients with invasive breast carcinoma. *J. Surg. Res.* 2008, 146, 104–109.
- 109.Shen, C.J.; Kuo, Y.L.; Chen, C.C.; Chen, M.J.; Cheng, Y.M. MMP1 expression is activated by Slug and enhances multi-drug resistance (MDR) in breast cancer. *PLoS ONE* 2017, 12, e0174487.
- 110.Ji Wang, Chenyang Ye, Demin Lu, Yongxia Chen, Yunlu Jia, Xiaogang Ying, Hanchu Xiong, Wenhe Zhao, Jichun Zhou and Linbo Wang. Matrix metalloproteinase-1 expression in breast carcinoma: a marker for unfavorable prognosis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 53), pp: 91379-91390.
- 111.Jones, J.L.; Walker, R.A. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J. Pathol.* 1997, 183, 377–379.
- 112.Alexander CM, Selvarajan S, Mudgett J, Werb Z. Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol.* 2001;152:693–703.

113. McCawley LJ, Crawford HC, King LE, Jr., Mudgett J, Matrisian LM (2004) A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 64(19): 6965-6972.
114. Boström, P.; Söderström, M.; Vahlberg, T.; Söderström, K.O.; Roberts, P.J.; Carpén, O.; Hirsimäki, P. MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer. *BMC Cancer* 2011, 11, 348.
115. Wang, Q.M.; Lv, L.; Tang, Y.; Zhang, L.; Wang, L.F. MMP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancer tissues and the knockdown of MMP-1 expression inhibits tumor cell malignant behaviors in vitro. *Oncol. Lett.* 2019, 17, 1732–1740.
116. Mehner, C.; Miller, E.; Nassar, A.; Bamlet, W.R.; Radisky, E.S.; Radisky, D.C. Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma. *Genes Cancer*. 2015, 6, 480–489.
117. Martins, L.M.; de Melo Escorcio Dourado, C.S.; Campos-Verdes, L.M.; Sampaio, F.A.; Revoredo, C.M.S.; Costa-Silva, D.R.; da Conceição Barros-Oliveira, M.; de Jesus Nery Junior, E.; do Rego-Medeiros, L.M.; Gebrim, L.H.; et al. Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer and breast fibroadenoma: A randomized, double-blind study. *Oncotarget* 2019, 10, 6879–6884.
118. Sampaio, F.A.; Martins, L.M.; Dourado, C.S.M.E.; Revoredo, C.M.S.; Costa-Silva, D.R.; Oliveira, V.A.; Alves-Ribeiro, F.A.; Silva, B.B.D. A case-control study of Me-

- tallothionein-1 expression in breast cancer and breast fibroadenoma. *Sci. Rep.* 2019, 9, 7407.
119. Li HC, Cao DC, Liu Y, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88:75-85.
120. Tauro, M.; Lynch, C.C. Cutting to the Chase: How Matrix Metalloproteinase-2 Activity Controls Breast-Cancer-to-Bone Metastasis. *Cancers* 2018, 10, 185.
121. Foekens, J.A.; Sieuwerts, A.M.; Smid, M.; Look, M.P.; De Weerd, V.; Boersma, A.W.M.; Klijn, J.G.M.; Wiemer, E.A.C.; Martens, J.W.M. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 13021–13026.
122. Chu, C.; Liu, X.; Bai, X.; Zhao, T.; Wang, M.; Xu, R.; Li, M.; Hu, Y.; Li, W.; Yang, L.; et al. MiR-519d suppresses breast cancer tumorigenesis and metastasis via targeting MMP3. *Int. J. Biol. Sci.* 2018, 14, 228–236.
123. Niland, S.; Eble, J.A. Hold on or Cut? Integrin- and MMP-Mediated Cell-Matrix Interactions in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 22, 238.
124. Mook, O.R.; Frederiks, W.M.; Van Noorden, C.J. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1705, 69–89.
125. Bjorklund, M.; Koivunen, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1755, 37–69.

- 126.Otani, Y.; Okazaki, I.; Arai, M.; Kameyama, K.; Wada, N.; Maruyama, K.; Yoshino, K.; Kitajima, M.; Hosoda, Y.; Tsuchiya, M. Gene expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in gastrointestinal tract cancers. *J. Gastroenterol.* 1994, *29*, 391–397.
- 127.Jiang, H.; Li, H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: A systematic review and meta- analysis. *BMC Cancer* 2021, *21*, 149.
- 128.Roy, R.; Yang, J.; Moses, M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009, *27*, 5287–5297.
- 129.Mohammadizadeh, F.; Bagherian-Dehkordia, M. Relationship between matrix metalloproteinase-9 and some clinicopathological prognostic factors of breast carcinoma. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2021, *10*, 17–22.
- 130.Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R.A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017, *147*, 1–73.
- 131.Napoli, S.; Scuderi, C.; Gattuso, G.; Bella, V.D.; Candido, S.; Basile, M.S.; Libra, M.; Falzone, L. Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. *Cells* 2020, *9*, 1151.
- 132.Radisky, E.S.; Raeeszadeh-Sarmazdeh, M.; Radisky, D.C. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. *J Cell Biochem.* 2017, *118*, 3531–3548.

133. Radisky, E.S.; Radisky, D.C. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 2015, 20, 1144–1163.
134. Du, X.; Wang, S.; Lu, J.; Cao, Y.; Song, N.; Yang, T.; Dong, R.; Zang, L.; Yang, Y.; Wu, T.; Li, J. Correlation between MMP1-PAR1 axis and clinical outcome of primary gallbladder carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2011, 41, 1086–1093.
135. Winer, A.; Adams, S.; Mignatti, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol. Cancer Ther.* 2018, 17, 1147–1155.
136. Coussens, L.M.; Fingleton, B.; Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 2002, 295, 2387–2392.
137. Vandenbroucke, R.E.; Libert, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2014, 13, 904–927.
138. Coleman, R.; Zhou, Y.; Jandial, D.; Cadieux, B.; Chan, A. Bone Health Outcomes from the International, Multicenter, Randomized, Phase 3, Placebo-Controlled D-CARE Study Assessing Adjuvant Denosumab in Early Breast Cancer. *Adv Ther.* 2021, 38: 4569–4580.