



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana,  
Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva

Tesis Doctoral

# Expresión de TSP-1 en carcinoma de mama

Ana Isabel García Salguero

Málaga, 2016



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Ana Isabel García Salguero

 <http://orcid.org/0000-0001-7531-5558>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



El Prof. Dr. **Luis Vicioso Recio**, Profesor Titular del Área de Anatomía Patológica de la Universidad de Málaga, y la Dra. **Dra. Martina Álvarez Pérez**, Profesora Asociada del Área de Anatomía Patológica de la Universidad de Málaga.

### **Certifican**

que **D<sup>a</sup>. Ana Isabel García Salguero** ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada

### **Expresión de TSP-1 en carcinoma de mama**

Revisado el presente trabajo, estimamos que puede ser presentado al tribunal que ha de juzgarlo, y autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral en la Universidad de Málaga.

En Málaga, febrero de 2016

**Prof Dr. Luis Vicioso Recio**

Profesor Titular del Área de Anatomía Patológica

**Dra. Martina Álvarez Pérez**

Profesora Asociada del Área de Anatomía Patológica



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*A mis padres*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.*

Voltaire (1694-1778)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Agradecimientos

Muchas son las personas que han participado en este trabajo y a ellos quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral: al Dr. Luis Vicioso, por la idea original de este estudio y su confianza en mí para defenderla, y por su contribución a mi formación como patóloga en el plano asistencial e investigador; y a la Dra. Martina Álvarez, por su gran ayuda con su paciencia y sabios consejos.

Gracias a los pacientes, de los que nace y a los que va destinado este trabajo, que con su consentimiento desinteresado nos permiten seguir investigando sus enfermedades.

Gracias a María José por su trabajo en la realización de técnicas de inmunohistoquímica.

Gracias a Jana e Isa por ser más que compañeras y seguir apoyándome desde la distancia.

Gracias a mis hermanos, sobrinos, suegros, cuñados, amigos y a todos aquellos que están cerca de mí, que me han prestado un gran apoyo moral y afectivo.

Gracias a Marta y Leo por haber llegado a este mundo. Gracias por perdonarme mis momentos de ausencia y siempre recibirme con una sonrisa y un beso.

Gracias, infinitas gracias a mi marido, Paco, por su comprensión y apoyo inestimable en este proyecto. Gracias por estar siempre a mi lado y gracias, simplemente, por existir.

Y gracias a mis padres, por su apoyo incondicional, y por su constancia y esfuerzo en mi educación.

A todos, muchas gracias.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Cáncer de mama	1
1.1.1. Epidemiología	1
1.1.2. Etiología	6
1.1.3. Localización	9
1.1.4. Diagnóstico	9
1.1.5. Tipos histológicos	11
1.1.6. Receptores hormonales	12
1.1.7. HER2/neu	12
1.1.8. Subtipos moleculares	13
1.1.9. Diseminación y metástasis	15
1.1.10. Gradación del carcinoma invasivo	17
1.1.11. Estadíaje	18
1.1.12. Tratamiento	18
1.2. Angiogénesis	21
1.2.1. Definición	21
1.2.2. Etapas de la angiogénesis	21
1.2.3. Factores que regulan la angiogénesis	26
1.2.4. Angiogénesis tumoral	32
1.3. Trombospondina 1	35
1.3.1. Interacción de la TSP-1 con sus receptores	38
1.3.2. Señal de transducción y organización esquelética inducida por TSP-1	45
1.3.3. Ejemplos de las funciones en vivo de la TSP-1	46
1.3.4. TSP-1 en el tejido mamario normal y tumoral	61



<b>2. Planteamiento del tema</b>	<b>67</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>69</b>
3.1. Población de estudio . . . . .	69
3.2. Métodos . . . . .	70
3.2.1. Construcción del TMA . . . . .	70
3.2.2. Marcadores inmunohistoquímicos . . . . .	71
3.2.3. Valoración e interpretación de la inmunotinción . . . . .	73
3.2.4. Conveniencia del método . . . . .	73
3.3. Variables estudiadas . . . . .	73
3.3.1. Variables clínicopatológicas . . . . .	73
3.3.2. Variables histopatológicas . . . . .	75
3.3.3. Variables inmunohistoquímicas . . . . .	78
3.3.4. Estudio estadístico y análisis de los datos . . . . .	82
<b>4. Resultados</b>	<b>83</b>
4.1. Descripción de la serie . . . . .	83
4.1.1. Sexo . . . . .	83
4.1.2. Edad . . . . .	84
4.1.3. Tamaño . . . . .	84
4.1.4. Tipo histológico . . . . .	84
4.1.5. Grado histológico . . . . .	84
4.1.6. Ganglios afectados . . . . .	85
4.1.7. Receptores hormonales y HER2 . . . . .	86
4.1.8. Índice de proliferación (Ki67) . . . . .	87
4.1.9. Subtipos moleculares . . . . .	87
4.1.10. Fenotipo basal y luminal . . . . .	88
4.1.11. Expresión de p53 . . . . .	88
4.1.12. Expresión de VEGF . . . . .	89
4.1.13. Expresión de TSP-1 estromal y celular . . . . .	89
4.2. Estadística analítica . . . . .	90
4.2.1. Expresión de trombospondina-1 . . . . .	90
4.2.2. Fenotipo basal . . . . .	102
4.2.3. Fenotipo luminal . . . . .	107

---

4.3. Estudio de supervivencia . . . . .	111
4.3.1. Supervivencia global . . . . .	111
4.3.2. Relación entre supervivencia y el tamaño tumoral . . . . .	111
4.3.3. Relación entre supervivencia y la afectación ganglionar . . . . .	112
4.3.4. Relación entre supervivencia y la expresión de TSP-1 estromal . . . . .	112
4.3.5. Relación entre supervivencia y la expresión de TSP-1 celular . . . . .	113
4.3.6. Relación entre la supervivencia, la expresión de TSP-1 estromal y la afectación ganglionar . . . . .	113
4.3.7. Relación entre la supervivencia, la expresión de TSP-1 celular y la afectación ganglionar . . . . .	115
4.3.8. Relación entre la supervivencia y el fenotipo basal . . . . .	116
4.3.9. Relación entre la supervivencia y el fenotipo luminal . . . . .	116
4.3.10. Relación entre la supervivencia y el fenotipo triple negativo . . . . .	117
<b>5. Discusión</b>	<b>121</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>137</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>137</b>
<b>8. Índice de tablas</b>	<b>164</b>
<b>9. Índice de figuras</b>	<b>167</b>



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Cáncer de mama

#### 1.1.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo (11,9 % de todos los tumores) y el más frecuente en las mujeres a nivel mundial con una estimación de 1.670.000 casos nuevos diagnosticados en 2012, correspondiendo a una tasa de 43 casos nuevos por 100.000 habitantes y representando el 25 % de todos los tumores invasores diagnosticados en mujeres (excluyendo los tumores cutáneos no melanomas) [1, 2]. Comparado con las estimaciones de 2002 [3] y de 2008 [4, 5], ha habido un aumento tanto en número de casos como en tasa de incidencia (1.152.000 y 40,4/100.000 en 2002, respectivamente; 1.384.000 y 42,3/100.000 en 2008). Se ha pronosticado que la incidencia internacional de cáncer de mama en mujeres alcanzará aproximadamente los 3,2 millones de casos nuevos por año en 2050. Actualmente es el cáncer con la tasa de incidencia más alta en la mayoría de regiones del mundo (Figura 1.1), excepto algunos países del este y noreste de África así como zonas de América Central y del Sur y el sureste de Asia (sobre todo India), donde el cáncer cervical es el más común, mientras que la incidencia de cáncer de pulmón se estima mayor en unos pocos países incluyendo China y Vietnam [6]. Aunque es el cáncer más frecuente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, una ligera mayoría de casos ocurre en mujeres de regiones menos desarrolladas. Las tasas de incidencia pueden variar hasta cerca de cuatro veces a lo largo de las diferentes regiones del mundo, con índices que oscilan entre los 27 casos por 100.000 en África Central y en el este de Asia hasta los 96 por 100.000 en Europa occidental [2].



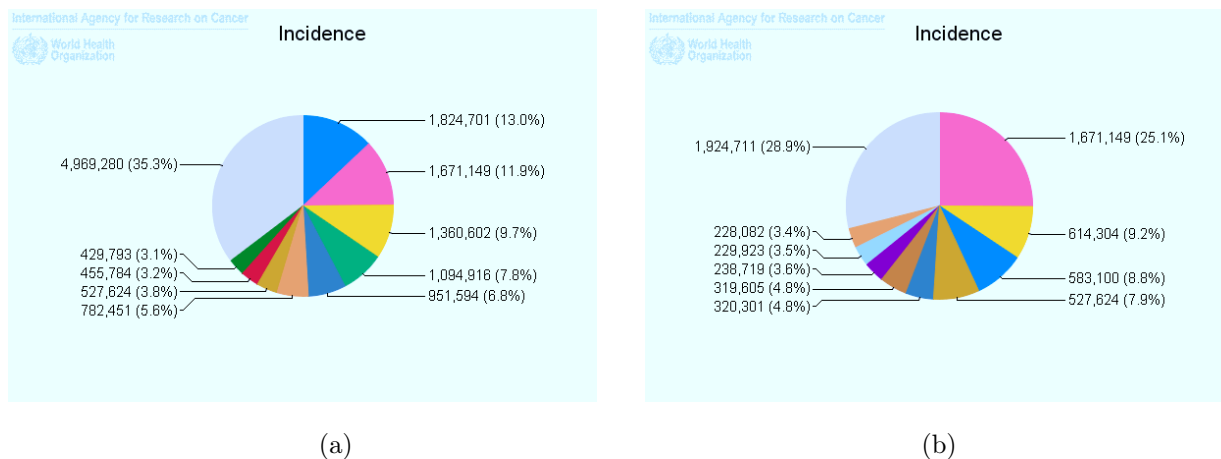
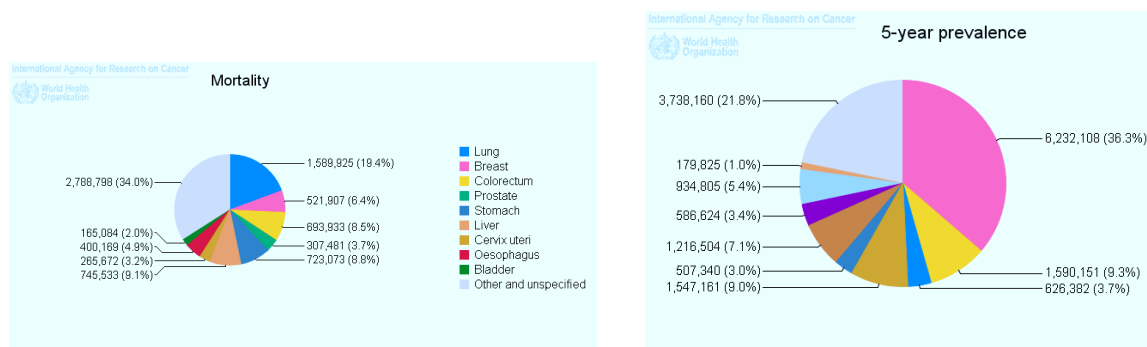


Figura 1.1: (a) Tasa de incidencia mundial en hombres y mujeres, y (b) tasa de incidencia mundial sólo en mujeres. Fuente: <http://globocan.iarc.fr/>.

El cáncer de mama llega a ser la quinta causa de muerte en todo el mundo (522.00 muertes, 6,4 %) y sigue siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres de las regiones menos desarrolladas (324.00 muertes, un 14,3 % del total), pero actualmente es la segunda causa de muerte por cáncer en los países desarrollados, con 198.000 muertes (15,4 % del total) después del cáncer de pulmón (210.000 muertes). El rango de las tasas de mortalidad entre las diferentes regiones del mundo (Figura 1.2) es menor que el de la incidencia debido a que la supervivencia es más favorable en los cánceres de mama de las regiones desarrolladas, con tasas que oscilan entre 6 casos por 100.000 habitantes en Asia oriental a los 20 casos por 100.000 en África occidental [2].

En Europa supone alrededor del 30 % de todos los tumores diagnosticados (más de 400.000 casos) y el 17 % de las muertes oncológicas (sobre 130.000 muertes) corresponden a este tumor [7]. En España se observan cifras similares (30 y 16 %, respectivamente), estimándose en el año 2012 más de 25.000 casos nuevos y más de 6.000 muertes por cáncer de mama [8].

Hay multitud de factores que influyen en esta gran variación regional en las tasas de incidencia del cáncer de mama, particularmente los relacionadas con el estilo de vida. Las mujeres en los países más desarrollados tienden a tener menos hijos, dan a luz a mayor edad y suelen practicar menos la lactancia materna, todo esto aumenta el riesgo de cáncer de mama. Altos niveles de población con obesidad, el consumo de alcohol, el uso de anticonceptivos orales y terapias hormonales sustitutivas, junto con bajos niveles de actividad física, también pueden contribuir. El impacto de los factores asociados al estilo de vida se refuerza por estudios de mujeres emigrantes de zonas con



(a)

(b)

Figura 1.2: (a) Tasa de mortalidad mundial en hombres y mujeres, y (b) tasa de mortalidad mundial sólo en mujeres. Fuente: <http://globocan.iarc.fr/>.

baja incidencia, las cuales han experimentado un aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama cuando se han mudado a un país más desarrollado. También se ha observado un incremento en la incidencia de cáncer de mama a través de sucesivas generaciones de emigrantes. Asimismo, hay que tener en cuenta la influencia de factores genéticos. La existencia de programas de screening en los países industrializados es la responsable del sobrediagnóstico de algunos cánceres que de otra manera no hubieran sido detectados. Este hecho queda ilustrado en una revisión publicada de las tasas de incidencia de varios países incluyendo Reino Unido, Canadá, Australia, Suecia y Noruega, que muestra que después del brusco incremento coincidiendo con la introducción del screening poblacional, la incidencia se mantuvo significativamente más alta que la esperada en los siguientes años. Finalmente, las bajas incidencias de cáncer de mama citadas en algunos países menos desarrollados, pueden estar relacionadas con la proporción de casos que se quedan sin diagnosticar debido a la falta de medios diagnósticos y cuidados médicos. Esto se exagera por la ausencia de un sistema de registro de tumores exhaustivo en muchos de esos países, lo que conlleva a la existencia de datos incompletos, aunque esto también ocurre hasta cierto punto en regiones desarrolladas.

A nivel mundial, el 89 % de los cánceres de mama se diagnostican a partir de los 40 años. Esta distribución también varía de forma importante entre los países más o menos desarrollados (95 % y 84 %, respectivamente) [6]. Sólo alrededor del 6,6 % de casos se diagnostica en mujeres menores de 40 años, 2,4 % en menores de 35 y 0,65 % en menores de 30 [9, 10]. Normalmente, los tumores en pacientes jóvenes son más grandes, peor diferenciados, de un subtipo más agresivo (como el triple

negativo o el HER2 positivo), y se suelen presentar en un estadio más avanzado, bien por ser un subtipo biológicamente más agresivo o por tener una baja sospecha y un diagnóstico tardío. Esto se puede traducir en más recurrencias locorregionales y metástasis a distancia, lo que contribuye a un peor desenlace de las mujeres jóvenes con cáncer de mama [11]. Como sugiere la disparidad en la distribución por edad, estos tumores agresivos a edades tempranas comprenden una mayor proporción de casos en Asia y África en comparación con Norteamérica o Europa [12, 13].

En cuanto al estadio, los datos internacionales sobre el estadio del cáncer de mama en el momento del diagnóstico son limitados. Sin embargo, la información disponible sugiere que la proporción de casos diagnosticados en estadios tempranos es normalmente mucho mayor en los países más ricos que en los menos desarrollados. Por ejemplo, mientras que el 50-60 % de los casos diagnosticados en Estados Unidos y Australia fueron localizados, se ha calculado que tan sólo un 25 % de cánceres de mama se diagnosticaron en un estadio temprano en algunos países menos desarrollados [14]. Muchas de las diferencias entre los países en cuanto a estadio en el diagnóstico se pueden atribuir directamente a la concienciación pública así como a la disponibilidad y uso de los programas de screening de cáncer de mama. Otro factor principal es la disponibilidad y la calidad de los servicios de atención primaria; aun cuando se detecten de forma temprana en las mujeres en países poco desarrollados, pueden recibir un tratamiento retardado o inadecuado. Por otro lado, otro factor que probablemente contribuye a algunas de las diferencias internacionales en cuanto al estadio, es el sobrediagnóstico en los países más desarrollados.

En general, las tasas de incidencia se han mantenido estables en los países europeos, pero han aumentado gradualmente entre las mujeres entre 50 y 69 años, excepto en Suecia donde ha habido una disminución importante en este grupo de edad desde 2002 en adelante. En los Estados Unidos también se han estabilizado después de un descenso brusco entre 1999 y 2003, mientras que en Canadá y Australia han ido descendiendo (siendo sólo significativo en el grupo de 50 a 69 años). Por el contrario, se ha observado un gran aumento en las tasas de incidencia en Japón y Hong Kong. Los datos publicados sobre la tendencia muestran que la incidencia de cáncer de mama ha ido creciendo rápidamente en otros países asiáticos, como Singapur, Taiwan, República de Corea, China, Tailandia, Shangai e India, en mujeres de todas las edades, siendo más importante a partir de los 50 años. Los factores que han ayudado al incremento en las tasas de incidencia del cáncer de mama incluyen la introducción de los programas de screening poblacionales usando la mamografía (sobre todo en relación con las tendencias entre las mujeres de 50-69 años), así como la creciente prevalencia de los factores de riesgo conocidos como la obesidad, pubertad a edad temprana, excesivo consumo de alcohol, actividad física reducida y tener hijos con mayor edad (o

no tenerlos). En cambio, la significativa disminución en la incidencia en el grupo de edad entre 50 y 69 años observada en varios países desarrollados en la última década, parece ser consecuencia de la reducción en el uso de terapias hormonales sustitutivas, resultado de un gran ensayo prospectivo randomizado. Otras posibles razones para este descenso en la incidencia de cáncer de mama incluyen el estancamiento en la participación en el screening mamográfico y la disminución del grupo de casos que se diagnosticaban por screening antes de que fueran sintomáticos. Aparte de por el crecimiento de la población, se espera que las tasas de incidencia se eleven mucho más en muchos países poco desarrollados debido al aumento en la esperanza de vida junto con la adopción de un estilo de vida más occidentalizado, incluyendo mayor consumo de alcohol, menos actividad y retraso de la maternidad.

La tasa de supervivencia en el cáncer de mama es más alta que en otros tipos de cáncer, con la mayoría de pacientes vivas al menos 5 años después del diagnóstico en los países desarrollados. Sin embargo, muchas de ellas sufren recurrencias y metástasis tardías. Como ejemplo, la supervivencia relativa de mujeres con cáncer de mama en Europa disminuyó del 82 % después de 5 años al 72 % después de 10 años. Uno de los factores decisivos más importantes en la supervivencia es el estadio en el momento del diagnóstico, junto con otros como el tamaño tumoral y la existencia de metástasis ganglionares o a distancia. En Estados Unidos, para mujeres con cáncer de mama entre 2001 y 2007, la supervivencia relativa a los 5 años variaba de entre el 99 % para los tumores localizados hasta el 23 % para las pacientes con metástasis a distancia. A través de todo el mundo se han registrado resultados similares. Otros factores pronósticos y predictivos que se han asociado a una mejor supervivencia son tener entre 40 y 69 años al diagnóstico, bajo grado tumoral (bien diferenciado), ausencia de comorbilidades (tales como enfermedad cardiovascular, diabetes y otros cánceres), perfil genético favorable, no sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2/neu) y presencia de receptores de estrógenos y progesterona positivos. Hay que ser cauteloso a la hora de comparar la supervivencia a nivel internacional debido a la variación de factores como el periodo de tiempo considerado, el tamaño poblacional, la calidad de los datos, el método estadístico; aun así, está claro que existen diferencias considerables en el pronóstico del cáncer de mama entre los diferentes países. En los más desarrollados, la supervivencia tiende a ser mayor (entre el 85 % y el 90 %) en Norteamérica, Australia, Japón y el norte de Europa, y más baja (entre el 75 % y el 80 %) en el este de Europa y el Reino Unido. Los datos limitados disponibles sobre Asia, África y Sudamérica, generalmente indican tasas de supervivencias mucho más bajas que en los países ricos, aunque existen algunas excepciones. Muchas de las variaciones actuales entre los países en cuanto a la supervivencia probablemente se deban a desigualdades en el acceso a los

programas de detección precoz y a un tratamiento adecuado. En los países menos desarrollados también existen barreras educacionales y culturales que a menudo llevan a una detección tardía de la enfermedad, tales como la falta de conocimiento sobre el cáncer de mama, la creencia errónea de que se trata de una enfermedad incurable o contagiosa, el estigma de sufrir una mastectomía y el miedo al rechazo por parte de la pareja o la comunidad [15].

Se han registrado mejorías en supervivencia continuas y significativas para el cáncer de mama en Norteamérica, Europa y Australia en las últimas décadas, y generalmente, en todos los grupos de edad (aunque en diferentes cantidades). Varios estudios de diferentes partes del mundo han indicado que estas mejorías se deben a la combinación de un diagnóstico precoz (debido al screening con mamografía de pacientes asintomáticas) y a los avances en el tratamiento. También existen evidencias emergentes de mejoras en la supervivencia del cáncer de mama entre mujeres de algunos países asiáticos desde principios y mediados de los años 90, a pesar de las barreras mencionadas anteriormente.

Aunque la mayoría de las muertes por cáncer de mama ocurren en los países menos desarrollados (269.000 o el 59%), el índice de mortalidad es normalmente más alto entre los países más ricos (11,8 y 17,1 muertes por 100.000, respectivamente). Desde finales de los 80 y principios de los 90, ha habido una tendencia generalizada a la disminución de las tasas de mortalidad de cáncer de mama de entre un 2% y un 3% por año en Norteamérica, algunas partes de Europa y Australia, lo que contrasta con el rápido incremento de mortalidad sufrido en algunos países de Asia, África y el centro y sur de América.

### 1.1.2. Etiología

La etiología del cáncer de mama es multifactorial y los factores de riesgo más importantes son la edad, factores familiares y reproductivos. El estilo de vida y los desequilibrios hormonales también influyen en el riesgo de cáncer de mama aunque los datos son todavía inconsistentes y no concluyentes [16].

#### Edad

El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de nuevos cánceres de mama. La incidencia de cáncer de mama tiene una curva de edad característica, con una estimación del 64% en mujeres a partir de los 55 años.

### Factores reproductivos

Los factores reproductivos a lo largo de la vida se han considerado desde hace más de medio siglo factores de riesgo. El riesgo de cáncer de mama se incrementa con una menarquia temprana, nuliparidad, aumento en la edad del primer embarazo y menopausia tardía.

El cáncer de mama ocurre con más frecuencia entre mujeres que han tenido una menarquia temprana. Cada año de retraso en la aparición de la menarquia se asocia con una reducción del 5 % en el riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida. Se considera que el comienzo de la menarquia a los 11 años o menos es un factor de riesgo probado, y el comienzo a los 15 años o más es un factor protector.

En cuanto a la maternidad, es más frecuente el cáncer de mama en mujeres nulíparas o en las que tienen su primer hijo a edades más tardías. Tener al menos un hijo se asocia con una reducción del riesgo de desarrollar cáncer de mama a largo plazo. Este efecto protector se incrementa con el número de hijos y cada nacimiento reduce el riesgo relativo una media del 7 %. Esta disminución del riesgo es mayor cuando se tienen hijos a edades jóvenes, así las mujeres que tienen su primer hijo antes de los 20 años tienen un 30 % menos de riesgo que las que los tienen después de los 35.

Durante años se consideró la lactancia como un importante factor protector frente al cáncer de mama, pero en los últimos años se le está restando importancia. Los resultados de varios estudios epidemiológicos se mantienen inconclusos, indicando tanto que no existe asociación como que existe un débil efecto protector [17]. Parece que su impacto se relaciona más con la duración de la lactancia, preferiblemente de al menos 2 años, suponiendo, según algunos autores, un descenso del riesgo del 4 % por cada 12 meses de lactancia [18].

Por último, la menopausia a edades tardías también aumenta el riesgo de cáncer. Así, cada año de retraso en la aparición de la menopausia, se asocia con un incremento del 3 % en el riesgo. Y es que, aunque el riesgo de cáncer es mayor con la edad, hay un importante descenso en la tasa de riesgo elevado a edades después de la menopausia.

### Estilo de vida

Se han asociado un gran número de factores sobre el estilo de vida con el cáncer de mama, entre ellos la dieta, obesidad, consumo de alcohol y tabaco.

El alcohol es un factor de riesgo bien establecido y en algunos estudios se estima que entre bebedoras de alcohol el riesgo de cáncer de mama se eleva un 30 %. Por cada 10g adicionales de alcohol por día, el riesgo aumenta aproximadamente un 7 %. En varios estudios prospectivos, la ingesta elevada de ácido fólico parece mitigar por completo el excesivo riesgo debido al alcohol.

En cuanto al tipo de dieta, algunos estudios han investigado la relación entre el consumo de carne y lácteos con el cáncer de mama, pero se han obtenidos resultados conflictivos. En algunos se ha encontrado un aumento del riesgo de cáncer con el consumo de carne, lácteos y grasas en la dieta, pero en otros no se ha observado ninguna asociación. Por otro lado, para algunos autores, la ingesta de fibra parece tener un efecto protector frente al cáncer de mama, pero en estudios posteriores tampoco se ha encontrado asociación entre ellos.

La obesidad se relaciona con un aumento del riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, particularmente el efecto de grandes aumentos de peso a partir de los 18 años, con un 2 % de incremento por unidad de IMC. Esto parece deberse al elevado nivel de estrógenos presentes en las mujeres obesas.

La actividad física parece tener un efecto protector, aunque se comience después de la menopausia. Las mujeres más activas físicamente tienen un 20-40 % menos de riesgo de cáncer, independientemente de su estatus menopáusico y del tipo e intensidad de la actividad.

Después de muchas investigaciones, la relación entre el tabaco y el cáncer de mama permanece controvertida, siendo para unos autores un factor de riesgo mientras que para otros no ejerce ningún efecto.

### **Estado hormonal**

Se relaciona un mayor riesgo de cáncer de mama en mujeres expuestas a hormonas exógenas, tales como el uso de anticonceptivos orales y terapia hormonal sustitutiva. Los anticonceptivos orales pueden producir un leve incremento en el riesgo de cáncer de mama en las mujeres que los usan durante mucho años, aunque esto parece ser un efecto a corto plazo. En varios estudios se ha observado que las mujeres que toman actualmente tratamiento anticonceptivo combinado (con estrógenos y progesterona) tienen un riesgo relativo similar al observado después de 10 años o más de haber dejado de usarlo (1,24 y 1,01, respectivamente), pero los datos siguen siendo contradictorios.

El uso de terapia hormonal sustitutiva (THS) también ha sido un área controvertida en el estudio del cáncer de mama. Algunos estudios confirman un aumento en el riesgo cáncer al usar THS de hasta un 26 % tras 5,2 años de tratamiento, independientemente del tipo de terapia. Otros estudios más recientes informan que los tratamientos a largo plazo que contienen progesterona son más perjudiciales que los que sólo usan estrógenos.

## Factores genéticos

Las mujeres con historia familiar de cáncer de mama tienen mayor riesgo de desarrollarlo. Se ha estimado que tener un familiar de primer grado con cáncer de mama aumenta el riesgo en un 80 %, dos familiares de primer grado prácticamente lo triplica, y si se tienen 3 o más, el riesgo se cuadruplica. Generalmente se trata de una herencia autosómica dominante con penetrancia limitada. El número de genes implicados en el cáncer de mama todavía no se conocen pero sí se han identificado las dos mutaciones más comunes, en los genes BRCA1 y BRCA2, localizadas en los cromosomas 17q y 13q-12-13, respectivamente, y que son los responsables de aproximadamente dos tercios de los carcinomas familiares y del 5 % de todos los casos. Se cree que la frecuencia en la población es de 1,2 por 1000 mujeres. El riesgo de desarrollar cáncer en los portadores de la mutación de BRCA1 y BRCA2 es del 80-85 %, siendo del 65 % a los 70 años en portadoras de la mutación BRCA1 y del 45 % en las de BRCA2 [16]. Las alteraciones del BCRA1 también predisponen al cáncer de ovario y posiblemente al de trompa de Falopio. Los carcinomas asociados a la mutación de BRCA1 en un alto porcentaje, suelen tener características medulares, siendo tumores de alto grado, mitóticamente muy activos, con patrón de crecimiento sincitial, márgenes pujanates, necrosis confluyente y negatividad para receptores de estrógenos. Así, aquellas mujeres en las que se detecta mutación de estos genes pueden ser sometidas a un seguimiento riguroso o a una mastectomía profiláctica.

### 1.1.3. Localización

El carcinoma de mama surge del epitelio mamario y más frecuentemente de las células epiteliales de la unidad ductolobulillar terminal (UDLT)[19]. Se describe una ligera mayor frecuencia de afectación en la mama izquierda, llegando en algunas series a alcanzar un 13 % más. Aproximadamente el 50 % de los tumores aparecen en el cuadrante superoexterno, 17 % en la región central (a menos de 1 cm de la areola), 15 % en el cuadrante superointerno, 10 % en el inferoexterno, 5 % en el inferointerno y el 3 % son difusos. Estas diferencias de frecuencia entre los cuadrantes parecen deberse a la cantidad de parénquima mamario existente en cada región [20].

### 1.1.4. Diagnóstico

#### Síntomas y signos

La mayoría de mujeres con cáncer de mama se presentan con síntomas, aunque gracias a la introducción de los programas de screening, cada vez es mayor el porcentaje de casos que se detectan

en pacientes asintomáticas mediante mamografías. El cáncer de mama no tienen signos ni síntomas específicos que permitan distinguirlo de forma fiable de algunas patologías benignas de mama. No obstante, la frecuencia es diferente según la edad, siendo las patologías benignas más frecuentes en mujeres jóvenes y el cáncer la causa más común de síntomas en mujeres mayores.

Los hallazgos sintomáticos más frecuentes son nódulos en la mama, que pueden estar asociados o no con dolor. Las anomalías en el pezón son menos comunes (secreción, retracción, distorsión o eczema) y otras formas de presentación son más raras. Las anomalías en la mama se deben evaluar mediante examen clínico, pruebas de imagen (mamografía o ultrasonidos) y una muestra de tejido, bien con citología por punción con aguja fina o con biopsia por punción con aguja gruesa.

El examen clínico, particularmente la palpación, es el método tradicional de detección y evaluación de patología mamaria. Es una técnica sumamente útil y práctica, ya sea realizada por el médico como por la propia paciente. Sin embargo, su sensibilidad y poder discriminatorio son limitados. Sólo el 60 % de los tumores detectados por mamografía son palpables. El examen debe ser sistemático y tener en cuenta la naturaleza del bulto y si existen hundimientos en la piel o cambios en el contorno del pecho. Es importante examinar también la axila para la detección de ganglios linfáticos sospechosos.

### Pruebas de imagen

El uso generalizado de la mamografía ha cambiado radicalmente el abordaje diagnóstico del cáncer de mama y es que con esta técnica se pueden detectar tumores extremadamente pequeños (de 1 a 2 mm). Las imágenes mamográficas del cáncer de mama son variadas e incluyen masas bien definidas, mal definidas y espiculadas, deformidad en el parénquima y presencia de calcificaciones, con o sin masa. El hallazgo más frecuente es una masa tumoral sin calcificaciones. La incidencia de calcificaciones en el carcinoma es del 50 % al 60 %, y en patología benigna del 20 %. Los hallazgos mamográficos se informan, de forma universal, mediante el sistema BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System/ Sistema de informes y registro de datos de imagen de la Mama), creado por el Colegio Americano de Radiología en 1992.

Es importante realizar mamografías, excepto en mujeres menores de 35 años, donde casi nunca tienen valor, al menos que exista una alta sospecha clínica o evidencia de malignidad en el tejido/biopsia. Hay que tener en cuenta que una mamografía negativa no descarta la posibilidad de la presencia de un carcinoma, ya que alrededor del 20 % de los tumores palpables no son detectados con esta técnica. La incidencia de falsos positivos es cercana al 1 % [20].

### 1.1.5. Tipos histológicos

A pesar del gran avance en los últimos años en el estudio de la patología y la biología molecular del cáncer de mama, todavía no se ha llegado a una clasificación definida a nivel molecular de los tumores de mama, de forma que la clasificación histológica tradicional basada en la morfología microscópica sigue siendo de referencia para patólogos y clínicos. La clasificación de los tumores de mama de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la más usada y abarca no sólo los carcinomas invasores de mama, también las lesiones precursoras, lesiones de bajo potencial maligno, proliferaciones epiteliales benignas, neoplasias fibroepiteliales, mioepiteliales y mesenquimales, así como otros tumores [21].

Se consideran lesiones precursoras al carcinoma ductal in situ y a la neoplasia lobulillar, que abarca al carcinoma lobulillar in situ y a la hiperplasia lobulillar atípica. El carcinoma lobulillar in situ se divide a su vez en carcinoma lobulillar in situ clásico y en pleomórfico. El carcinoma microinvasor se clasifica como tumor epitelial.

Tradicionalmente los carcinomas invasores se dividían en dos categorías principales, tipo ductal y lobulillar, existiendo también formas mixtas e intermedias. El término ductal se debe tomar para implicar que el tumor surge o afecta a un ducto, y de forma similar se supone la relación del carcinoma lobulillar con el lobulillo. Pero distintos estudios indican que en realidad ambos tumores surgen del mismo segmento de la glándula mamaria (por ejemplo, la UDLT), aunque ciertamente, la mayoría de carcinomas ductales afectan preferentemente a estructuras con apariencia de ductos, y los lobulillares afectan al lobulillo.

En la actualidad, el carcinoma ductal ha pasado a denominarse carcinoma invasor de tipo no específico en la última clasificación de la OMS. Este carcinoma es el más frecuente de todos, representando aproximadamente el 75 % de todos los casos. Dentro de este tipo histológico nos encontramos varias variantes menos comunes: carcinoma pleomórfico, carcinoma con células gigantes estromales de tipo osteoclasto, de características coriocarcinomas y de características melanóticas.

El carcinoma lobulillar también se divide en diferentes tipos: clásico, sólido, alveolar, pleomórfico, tubulolobulillar y lobulillar mixto, siendo el tipo clásico el más común de ellos.

El resto de los carcinomas invasores son menos comunes y se distinguen por sus características citoarquitecturales: carcinoma tubular, carcinoma cribiforme, carcinoma mucinoso, carcinoma con características medulares, carcinoma con diferenciación apocrina, carcinoma con diferenciación en células en anillo de sello, carcinoma micropapilar invasor, carcinoma metaplásico de tipo no especial.

Y existe otro grupo clasificado como tipos raros: carcinoma con características neuroendocrinas, carcinoma secretor, carcinoma papilar invasor, carcinoma de células acínicas, carcinoma mucopidermoide, carcinoma polimorfo, carcinoma oncocítico, carcinoma rico en lípidos, carcinoma de células claras rico en glucógeno, carcinoma sebáceo y tumores de tipo glándula salival/anejo cutáneo (el cilindroma y el hidradenoma de células claras).

Los carcinomas de tipo mixto se componen de un patrón especializado en al menos el 50 % del tumor y de otro patrón no especializado entre el 10 % y el 49 %.

### 1.1.6. Receptores hormonales

Un progreso crucial en la evaluación del cáncer de mama ha sido la determinación de los receptores hormonales (estrógenos y progesterona), ya que su presencia en el tejido tumoral se relaciona tanto con la respuesta a la terapia hormonal como a la quimioterapia. Para ello se realiza una tinción inmunohistoquímica y se evalúan dos parámetros, el número de núcleos de células tumorales teñidos y la intensidad de la tinción. El primero se expresa en porcentaje, teniendo en cuenta el total de la población tumoral, y el segundo se valora como negativa, débil, moderada o intensa [20].

Normalmente, las concentraciones del receptor de estrógenos son más bajas (y las de andrógenos más altas) en tumores de mujeres premenopausicas que en las postmenopausicas. Fisher et al. encontraron una asociación significativa entre la presencia de receptores de estrógenos y el bajo grado histológico, ausencia de necrosis tumoral, presencia de marcada elastosis tumoral, y pacientes de mayor edad [22]. La positividad para receptores hormonales se relaciona también con inmunoreactividad para bcl-2 y ausencia de mutaciones de p53, y se correlaciona inversamente con la presencia de receptores del factor de crecimiento epidérmico.

Hay que señalar que la mayoría de las células del carcinoma de mama tienen también receptores para andrógenos, y se pueden encontrar en ausencia de receptores de estrógenos y progesterona. De hecho, parece que son más frecuentes en tumores estrógenos negativos [20].

### 1.1.7. HER2/neu

HER2/neu (c-erbB-2) es un oncogén que codifica una glicoproteína transmembrana con actividad tirosinquinasa conocida como p185 o HER2, y que pertenece a la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico. HER2 es un miembro de la superfamilia HER que está compuesta por receptores tirosinquinasa involucrados en la regulación de la proliferación y supervivencia de las células epiteliales y que se compone de cuatro receptores: HER1 (receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGFR)), HER2 (neu, c-erbB2), HER3 y HER4. A HER2 se le considera un receptor huérfano ya que no tiene ligando conocido, al contrario que el resto de los receptores de la familia HER [23].

HER2/neu es un oncogén que favorece la proliferación, migración e invasión en el cáncer de mama. Este gen se encuentra amplificado en un 25-30 % de estos cánceres y se relaciona con la sobreexpresión de la proteína HER2. Su sobreexpresión aumenta el potencial metastatizante de las células tumorales, se asocia con resistencia a citotóxicos, así como a características histológicas peculiares (alto grado histológico, aumento de la actividad mitótica y ausencia de receptores hormonales), presentando estas pacientes una mortalidad más alta en estadios tempranos de la enfermedad, recaída en menor tiempo y una incidencia elevada de metástasis [24]. Se puede determinar mediante inmunohistoquímica o FISH, existiendo una buena correlación entre ambos métodos. Se recomienda empezar realizando la tinción inmunohistoquímica. Si los resultados son 3+ o 0, la determinación se puede parar aquí con seguridad (ya que su correlación con FISH es cercana al 100 %), pero si se obtiene un resultado de 1+ o 2+, se recomienda realizar el estudio mediante FISH.

Actualmente, ha mejorado drásticamente el curso clínico de las pacientes con HER2 positivo gracias a la introducción de tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab) convirtiéndose el HER2 en una importante diana terapéutica, aunque no todas las pacientes responden bien, existiendo un 15 % de recaídas [23]. La sobreexpresión de HER2/neu es un buen predictor de la respuesta a trastuzumab (Herceptin), pero no lo es de la respuesta a quimioterapia o de la supervivencia global.

En cuanto a su relación con los tipos tumorales, se encuentra en casi todos los casos de carcinoma ductal in situ de alto grado (tipo comedo), en el 20 % al 30 % de los carcinomas invasores no específicos, y en un menor porcentaje en los carcinomas lobulillares invasores [20].

### 1.1.8. Subtipos moleculares

El carcinoma de mama ya no se considera una sola entidad, sino que representa un grupo de tumores que muestra un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clinicopatológica. La clasificación histológica actual de los carcinomas de mama no refleja la heterogeneidad de los tumores en su comportamiento biológico ni permite identificar los pacientes que presentarán mejores respuestas y beneficios con las diferentes modalidades terapéuticas. Actualmente se asume que la diversidad clínica y pronóstica de los carcinomas que son semejantes y homogéneos en cuanto a sus factores pronósticos clásicos, se establece a nivel molecular, al expresar distintos genes que les confieren variabilidad biológica y pronóstica [25].

Durante los últimos años, el estudio de estos genes mediante microarrays de ADN, ha hecho posible, por un lado, comprender el comportamiento biológico del cáncer de mama y, por otro lado, individualizar el pronóstico y el tratamiento de algunos pacientes [26]. El avance de las tecnologías de análisis genómico ha permitido clasificar los carcinomas de mama en cinco subtipos: luminal A y B, HER2-positivo, basal y similar a la mama normal [25, 27].

Los carcinomas de mama de tipo luminal son los subtipos con mejor pronóstico y se caracterizan por expresar el gen del receptor estrogénico, genes asociados (LIV1 y ciclina D1) y queratinas de bajo peso molecular (CK7, CK8, CK18, CK19, etc.), de forma semejante al epitelio luminal de los conductos mamarios [28]. La gran diferencia biológica entre los tumores luminal A y B radica en su capacidad proliferativa, incluyendo genes como CCNB1, MKI67 Y MYBL2, que se expresan más en los tumores luminal B que en los luminal A, considerándose los primeros de peor pronóstico que los segundos [29]. Al expresar receptores de estrógenos (RE), estos tumores pueden tratarse con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa pero muestran una baja respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

El carcinoma de mama HER2-positivo muestra expresión aumentada de genes asociados a c-erbB-2 y suele asociarse a otros marcadores de mal pronóstico, incluyendo alteraciones de otros genes como topoisomerasa II alfa, GATA4, genes de angiogénesis y proteólisis. Aunque muestran una mejor respuesta a la quimioterapia y cerca de 50 % responde al tratamiento con trastuzumab, el pronóstico es malo.

El subtipo basal se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas características de la capa basal (CK5/6, CK14, CK17) y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Estos tumores suelen presentar mutaciones en el gen oncosupresor p53, sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se caracterizan por la ausencia de expresión de RE, de genes relacionados, y de HER2. Este subtipo se asocia a la mutación BRCA1 y presenta el comportamiento más agresivo a pesar de su alta sensibilidad a la quimioterapia.

El carcinoma de mama de subtipo normal comparte características del tejido mamario normal, muestra una fuerte expresión de genes normalmente expresados en el tejido adiposo y baja expresión de genes epiteliales luminales.

Aunque actualmente se considera que el análisis de los perfiles de expresión génica constituye la mejor forma de clasificar los carcinomas de mama, en la mayoría de los hospitales su uso se encuentra limitado ya que son técnicas caras y difíciles de aplicar en material parafinado. En la práctica, la mayor parte de los diagnósticos de rutina se realiza mediante hematoxilina-eosina (HE) y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Diversos estudios sugieren que, con un limitado número

de marcadores inmunohistoquímicos (RE, RP, c-erbB-2, queratinas basales o de alto peso molecular, queratinas luminales o de bajo peso molecular, p63 y EGFR como marcadores más relevantes) [30, 31, 32], se pueden catalogar los carcinomas de mama en subtipos equivalentes a aquellos basados en perfiles de expresión génica. La ventaja del estudio IHQ es que utiliza marcadores que se encuentran disponibles en la mayoría de los servicios de Anatomía Patológica y puede aplicarse sobre material archivado del que se puede obtener información clínica y evolutiva.

Pese a que todavía no se ha establecido claramente la mejor combinación de biomarcadores para IHQ, la clasificación más aceptada por la mayoría de los autores se basa en la expresión de receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y HER2, así como en la expresión de proteínas características de las células basales/mioepiteliales (CK5/6, CK14, p63 y EGFR). De acuerdo con el estado de estos marcadores se definieron cinco subtipos [28]:

- **Luminal A:** RE+, RP+/-, HER2-.
- **Luminal B:** RE+, RP+/-, HER2+.
- **HER2:** RE-, RP-, HER2 +.
- **Basal-like o triple negativo:** RE-, RP-, HER2- y CK5/6+, CK14+, p63+ y/o EGFR+.
- **Normal o triple negativo-no basal:** RE-, RP-, HER2-, CK5/6-, CK14-, p63- y/o EGFR-.

Esta clasificación inmunohistoquímica, al igual que la realizada mediante estudios genómicos, proporciona un mayor entendimiento de la heterogeneidad del cáncer de mama, muestra las diferentes características clinicopatológicas y distintos patrones de supervivencia, e informa sobre la respuesta terapéutica. En combinación con los parámetros pronósticos tradicionales, los subtipos moleculares definidos por IHQ pueden, no sólo ayudar a los clínicos a evaluar el riesgo de recurrencia, patrones de recurrencia y lugar de preferencia de la recurrencia en cada paciente de forma individual, sino que también mejorar nuestro conocimiento de la biología y evolución del tumor. Así mismo, se puede usar para determinar tratamientos dirigidos y estrategias de seguimiento [33].

### 1.1.9. Diseminación y metástasis

El carcinoma de mama se extiende por invasión directa, por la vía linfática y por la vía hematológica. Algunas metástasis están ya presentes en el momento del diagnóstico, y otras se manifiestan clínicamente en meses, años o décadas después del tratamiento inicial.

La invasión local puede ocurrir en el propio parénquima mamario, pezón, piel, fascia, músculo pectoral u otras estructuras de la pared torácica, bien por extensión directa del estroma o por los

vasos linfáticos intramamarios, y posiblemente también a través de los espacios presentes en los focos de hiperplasia pseudoangiomatosa estromal. El grado de invasión local es normalmente mayor en los carcinomas lobulillares y sus variantes, presumiblemente debido a la pérdida de E-cadherina en las células tumorales. Se ha encontrado invasión del pezón en el 23 % al 31 % de los carcinomas invasivos clínicamente detectables, la mayoría se trataba de tumores localizados a menos de 2,5 cm del pezón.

La recurrencia local tras mastectomía aparece como nódulos en la cicatriz o cerca de ella, o como nódulos subcutáneos paraesternales. Aunque las mujeres con recurrencias locales suelen tener más riesgo de metástasis a distancia, parece que se trata de dos hechos independientes que ocurren en diferentes momentos.

Las dos estaciones linfáticas que típicamente se afectan en un carcinoma metastásico son la cadena ganglionar axilar y la mamaria interna, considerándose el área supraclavicular una extensión de la primera. Las metástasis en los ganglios axilares se presentan en el 40 % y el 50 % de los casos detectables clínicamente y se dividen en niveles según su localización en relación con la inserción del músculo pectoral menor: nivel bajo o proximal, medio y alto o distal. Cuando están afectados extensamente se pueden detectar clínicamente mediante palpación, pero el margen de error es alto. La afectación de los ganglios supraclaviculares está presente en cerca del 20 % de las pacientes con metástasis axilares, pero es casi cero en los casos sin compromiso axilar. La cadena mamaria interna se extiende por el borde anterior de los espacios intercostales, al lado de la arteria torácica interna. La incidencia total de afectación en los carcinomas detectables clínicamente es del 22 %. Se afecta en menos del 1 % de los tumores localizados en la mitad externa de la mama y ganglios axilares negativos, aproximadamente el 20 % en los de la mitad interna y axila negativa, alrededor del 30 % en los de la mitad externa y metástasis axilar, y más del 50 % en los tumores de la mitad interna y ganglios axilares positivos.

Las metástasis a distancia más frecuentes son en huesos, pulmón y pleura, hígado, ovario, glándula suprarrenal y sistema nervioso central (incluyendo leptomeninges y ojos). La meningitis carcinomatosa es un patrón de diseminación particularmente devastador. Las metástasis difusas en el bazo son muy raras, pero pueden ocurrir y causar una púrpura trombocitopénica idiopática. El carcinoma lobulillar (incluyendo la variante de células en anillo de sello) tiene tendencia a metastatizar en la cavidad abdominal, particularmente en el tracto gastrointestinal, ovarios y en las superficies serosas.

### 1.1.10. Gradación del carcinoma invasivo

El carcinoma invasor no específico y todos los otros tipos de tumores invasivos se gradan rutinariamente teniendo en cuenta la formación de túbulos/glándulas, el pleomorfismo nuclear y el número de mitosis. Ya desde los años 20 y 30, muchos estudios han demostrado una clara asociación entre el grado histológico y la supervivencia. Ahora se considera un importante factor pronóstico y siempre hay que incluirlo en el informe histológico. La evaluación del grado histológico se ha vuelto cada vez más objetiva gracias a las modificaciones efectuadas sobre el método de Patley y Scarff, primero por Bloom y Richardson y más recientemente por Elston y Ellis. Esta última, conocida como el sistema de puntuación histológica de Nottingham es la que se utiliza en la actualidad.

#### Método de gradación

El grado histológico combinado de Nottingham evalúa la cantidad de formación tubular, la extensión del pleomorfismo nuclear y el índice mitótico (el número de mitosis). A cada variable se le da una puntuación de 1 a 3, para asegurarse de que cada factor se valora individualmente.

Para la valoración de la formación de túbulos, se tiene en cuenta qué porcentaje del área del tumor presenta estructuras glandulares (dividiéndose los 3 valores en más del 75 % de área, entre el 10 % y el 75 %, y menos del 10 %), siendo mayor la puntuación cuanto menos porcentaje exista.

El pleomorfismo nuclear se valora tomando como referencia la regularidad del tamaño y forma nuclear de las células epiteliales normales del tejido adyacente al tumor. La irregularidad creciente del contorno nuclear y el número y tamaño del nucleolo son características que también nos ayudan a valorar el pleomorfismo.

La puntuación de las mitosis se determina por el número de figuras mitóticas encontradas en 10 campos de gran aumento consecutivos, en las áreas del tumor con más actividad mitótica. Sólo se deben contar las figuras de mitosis bien definidas; hay que ignorar los núcleos hipercromáticos y picnóticos, ya que representan más apoptosis que proliferación.

Los tres valores se unen y se obtiene una puntuación de 3 a 9, asignándose el grado de la siguiente forma:

Grado 1 - Bien diferenciado: 3-5 puntos

Grado 2 - Moderadamente diferenciado: 6-7 puntos

Grado 3 - Poco diferenciado: 8-9 puntos

### 1.1.11. Estadiaje

El sistema de estadiaje que se usa universalmente es el sistema TNM, adoptado por la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC), basado en el tamaño del tumor primario y su extensión local, la afectación de ganglios linfáticos y la presencia de metástasis a distancia.

### 1.1.12. Tratamiento

El tratamiento del cáncer de mama incluye cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y las nuevas terapias biológicas, dependiendo del tipo y extensión de la enfermedad.

El beneficio del tratamiento adyuvante del cáncer de mama ha sido bien establecido en las últimas décadas, logrando reducir el riesgo de recidiva sistémica. La finalidad de esta terapia consiste en eliminar la enfermedad micrometastásica. Sin embargo, las opciones terapéuticas se han incrementado con un mejor conocimiento de la historia natural del cáncer de mama y sus mecanismos moleculares involucrados. Del mismo modo, el tratamiento hormonal juega un papel esencial en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama con receptores hormonales positivos. Históricamente, el primer tratamiento adyuvante sistémico cuya utilidad se demostró de forma adecuada fue la quimioterapia. Tras ella, el tamoxifeno y, más recientemente, los inhibidores de la aromatasas y el trastuzumab han demostrado asimismo su capacidad para reducir significativamente el porcentaje de pacientes con recurrencia tras la maniobra terapéutica local [34].

#### Cirugía

El tratamiento quirúrgico tradicionalmente suponía la mastectomía radical de Halsted, pero actualmente existe una gran variedad de opciones (algunas conocidas como cirugía conservadora de la mama), como la mastectomía parcial (tumorectomía o segmentectomía) y la mastectomía total simple.

#### Radioterapia

La radioterapia se usa normalmente como tratamiento adyuvante postoperatorio (sobre todo en los casos de cirugía conservadora), dirigido sobre todo a disminuir la posibilidad de recidivas locales, aunque las mejoras tecnológicas introducidas en los últimos años han propiciado que las mujeres que se irradian aumenten su supervivencia. También se usa cuando aparecen recurrencias locales y con fines paliativos para aliviar síntomas provocados por el cáncer o las metástasis.

## Quimioterapia

La quimioterapia ha constituido el arma fundamental del tratamiento complementario del cáncer de mama en los últimos cuarenta años, consiguiéndose avances notables en el pronóstico de las pacientes con metástasis y teniendo un impacto significativo en su supervivencia. Sin embargo, el éxito de esta estrategia es limitado ya que el beneficio de la quimioterapia adyuvante puede ser reducido en algunos subgrupos de pacientes. Es por ello que la elección del tratamiento adyuvante sistémico debe estar basado en los factores pronósticos y predictivos.

El estado de afectación de los ganglios axilares es el factor pronóstico de más peso, existiendo una correlación directa entre el número de ganglios afectos y el riesgo de recaída (30 % a 10 años cuando no hay ninguno, más de 70 % cuando hay más de 10, en ausencia de tratamiento adyuvante). En general, se considera que las enfermas con riesgo de recaída superior al 10 % a 10 años (5 % para algunos autores) deben recibir tratamiento adyuvante.

Respecto a los factores predictivos de la respuesta a la quimioterapia, todavía no existe ninguno realmente fiable. La ausencia de expresión de receptores hormonales, el grado histológico alto, el índice de proliferación elevado, y el HER2/neu amplificado definen una población que obtiene mayor beneficio con la quimioterapia, pero las enfermas con tumores que no tienen estas características también pueden beneficiarse de la misma.

Se han obtenido los mejores resultados con terapias combinadas, usando varios quimioterápicos como los platinos, antraciclina y taxanos-ciclosfosfamida-metotrexate-5-FU.

## Terapia hormonal

La terapia hormonal, que antiguamente incluía la castración quirúrgica, la adrenalectomía y la hipofisectomía, actualmente se basa en el uso de fármacos antiestrogénicos. De ellos, el tamoxifeno, perteneciente al grupo de los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), ha sido el más importante en los últimos 20 años, hasta el punto de llegar a ser el tratamiento endocrino de elección para todos los estadios de carcinoma de mama positivos para receptores de estrógenos. En varios ensayos clínicos se ha demostrado una reducción en el riesgo tanto de recidiva como de muerte independientemente de la actividad hormonal ovárica de las pacientes y del estadio clínico tumoral (tanto en pacientes con afectación ganglionar como sin ella) tras terapias de uno, dos y cinco años. En las mujeres postmenopáusicas la magnitud de este beneficio alcanza una reducción del riesgo relativo de recaída de entre el 44 % (para mujeres de 50 a 59 años) y el 61 % (para aquellas con más de 70 años) y del riesgo de muerte de entre el 34 % y el 47 %. En términos absolutos, la administración del tamoxifeno reduce el riesgo de recidiva a cinco años un 12,3 % en

las mujeres mayores de 50 años. Además, el tratamiento adyuvante con tamoxifeno durante cinco años se asocia con una reducción de riesgo de cáncer de mama contralateral, con una disminución proporcional del 27 % en menores de 50 años y del 31 % en mayores de 50 años.

A la vista de estos resultados, el tratamiento hormonal fue reconocido como el tratamiento de elección en mujeres postmenopáusicas con receptores hormonales positivos; sin embargo, el uso de quimioterapia asociada a tamoxifeno ha demostrado una disminución de la mortalidad del 11 % en mujeres entre los 50 y los 69 años a favor del tratamiento combinado de quimio y hormonoterapia.

Más recientemente, debido a la presencia de efectos adversos graves con tamoxifeno (cáncer de endometrio y fenómenos tromboembólicos) y a la ausencia de beneficios del mismo más allá de cinco años (permaneciendo el riesgo de recaída hasta muchos años después), se ha extendido el uso de los inhibidores de la aromataza (exemestano, anastrozol y letrozol), los cuales han demostrado superioridad en el contexto de la enfermedad avanzada. En la actualidad, el comité de expertos de ASCO (American Society of Clinical Oncology) considera que, el tratamiento hormonal óptimo en mujeres postmenopáusicas debe completar la utilización de uno de los tres inhibidores de la aromataza ya sea como terapia de inicio o como terapia de sustitución tras el tamoxifeno. Asumiendo que el tratamiento con tamoxifeno debe ser por cinco años pero que el beneficio tras los dos primeros es menor, se ha explorado el relevo con inhibidores de la aromataza tras 2-3 años de tamoxifeno [35].

Los consensos internacionales incluyen la opción de la ablación ovárica (mediante ooforectomía, irradiación ovárica o administración de análogos de la LH-RH durante dos a cinco años) como tratamiento adyuvante en mujeres premenopáusicas seleccionadas con receptores hormonales positivos.

La decisión de dar o no hormonoterapia o quimioterapia a las pacientes con ganglios negativos depende de varios parámetros clínicos y patológicos.

### **Tratamientos biológicos**

Actualmente están en auge los llamados tratamientos biológicos, basados en fármacos cuya acción se dirige específicamente a las células cancerosas e interfieren con su capacidad de crecimiento.

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que se dirige específicamente contra el receptor HER2, y se utiliza para el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, tanto en estadios precoces como avanzados de la enfermedad. Este fármaco ha demostrado una mejora en la supervivencia de estas paciente y, a diferencia de la quimioterapia, la sobreexpresión (y aun mejor, la amplificación génica) de HER2 predice la respuesta al trastuzumab. Asimismo, el lapatinib actúa contra el cáncer de mama HER2 positivo.

Los fármacos antiangiogénicos actúan sobre las proteínas necesarias para el crecimiento de los vasos que nutren al tumor. Es el caso del fármaco conocido como bevacizumab, que inhibe el factor de crecimiento del endotelio vascular y, por tanto, evita el crecimiento tumoral.

Las nuevas investigaciones sobre proteínas o los patrones del ARN mensajero son posibles vías de desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de futuro.

## 1.2. Angiogénesis

### 1.2.1. Definición

La angiogénesis es el proceso por el cual se producen vasos sanguíneos a partir de otros ya establecidos. Se encuentra regulada por una serie de factores angiogénicos y antiangiogénicos. En el adulto la red vascular está en estado quiescente, sin embargo, la angiogénesis se puede activar ante determinados estímulos cuando el organismo requiere una mayor cantidad de nutrientes, y esta activación puede ser transitoria o mantenida. La angiogénesis es transitoria en la cicatrización de las heridas y en la transformación cíclica de estructuras del sistema reproductor femenino como son: formación del cuerpo lúteo, regeneración del endometrio funcional, en el desarrollo de estructuras placentarias y cambios relacionados con la lactancia en la glándula mamaria. En determinadas enfermedades como la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, la psoriasis y los hemangiomas, y en la progresión tumoral aparece una angiogénesis mantenida y persistente.

La angiogénesis ha sido estudiada en múltiples neoplasias, entre ellas los carcinomas mamarios [36, 37].

### 1.2.2. Etapas de la angiogénesis

La angiogénesis es un proceso complejo que comprende una serie de etapas, las cuales pueden esquematizarse de la siguiente forma:

- Estímulo angiogénico (activación de células endoteliales y pericitos).
- Degradación de la matriz extracelular.
- Migración de células endoteliales.
- Proliferación de células endoteliales y formación de una nueva luz capilar.
- Estabilización de los nuevos vasos.

### Estímulo angiogénico

La hipoxia es el principal factor desencadenante de la angiogénesis. Ésta induce un incremento en la célula del factor inducible por la hipoxia (HIF-1), que en el núcleo promueve la transcripción de diversos genes, entre los que se encuentran dos potentes factores angiogénicos como son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF) [38]. La unión de estos factores a los receptores de las células endoteliales induce la fosforilación de distintas proteínas, activándose así las señales de supervivencia para estas células.

Por otro lado, la apoptosis, o proceso por el cual se produce una muerte celular programada, es también fundamental en la remodelación de los vasos sanguíneos, ya que así, se eliminan los vasos no necesarios, aunque parece que la apoptosis es necesaria en la iniciación del proceso angiogénico. La apoptosis de las células endoteliales se produce por la pérdida de adhesión al sustrato.

En el proceso angiogénico existen factores que promueven la apoptosis de las células endoteliales y otros que ejercen un cierto efecto protector sobre el endotelio, promoviendo la supervivencia y la proliferación de los mismos. Por lo tanto, durante la angiogénesis no solo se establece un equilibrio dinámico entre señales pro y antiangiogénicas, sino también entre señales de supervivencia y de muerte celular.

Entre los factores que promueven la apoptosis de la célula endotelial caben señalar varios factores de los que hablaremos posteriormente, como son: el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), y por otro lado hay factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) que son factores de supervivencia. Estos factores pueden conseguir su acción activando a la proteinquinasa B (Akt) a través de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3k), lo que constituye una vía clave en la activación endotelial, ya que transmite señales de supervivencia, migración y proliferación.

La PI3k, a través de receptores tirosinquinasa, produce fosforilación de fosfoinositidos. Así se reclutan a la membrana celular moléculas esenciales para la supervivencia, motilidad y participación en procesos morfogénicos como la tubulogénesis [39]. La PI3k produce una fosforilación de Akt. Akt tiene una distribución citoplásmica pero su fosforilación provoca un reclutamiento hacia la membrana celular. De esta forma queda expuesto un dominio quinasa que quedaba oculto en su forma inactiva. Este dominio quinasa de Akt en la membrana es activado por dos proteinquinasas de membranas que son PDK 1 y 2. De esta forma Akt vuelve al citoplasma en su forma activa y ejerce la fosforilación de distintos efectores relacionados con la supervivencia celular, proliferación del metabolismo de la glucosa y síntesis de proteínas [40].

La activación de Akt también puede producirse por una segunda vía, protagonizada por las integrinas que se conectan a sus ligandos de la matriz extracelular, lo que produce la activación de quinasas asociadas a las adhesiones focales (FAK)[41], las cuales actúan sobre Akt. Las adhesiones focales son regiones concretas de la superficie celular en las que se concentran moléculas de adhesión al sustrato (sobre todo integrinas) y numerosas proteínas que conectan estas moléculas al citoesqueleto.

Algunos factores como VEGF consiguen igualmente una mayor supervivencia de las células endoteliales provocando un incremento de los niveles de las proteínas antiapoptóticas A1 y bcl-2.

Además, la activación del receptor VEGFR2 por VEGF favorece la proliferación celular. VEGF fosforila y activa a la fosfolipasa C que cataliza la síntesis de diacilglicerol e inositol1, 4, 5 trifosfatos que activan a la proteinquinasa C. Dicha enzima activa una importante vía de proliferación celular [42, 43].

### Degradación de la matriz extracelular

Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales y células de sostén que están ancladas en una matriz extracelular. Para que se lleve a cabo el proceso angiogénico hay que destruir esta matriz extracelular.

La degradación de la matriz celular se produce a través de una serie de proteasas que se liberan tras el estímulo angiogénico. Su consecución es necesaria para la posterior migración celular; además, se precisa la formación de sitios de anclaje que hagan posible el desplazamiento.

Cuando los factores angiogénicos activan a las células endoteliales, inducen la expresión de activadores del plasminógeno, tipo uroquinasa (u-PA) y tisular (t-PA) [44]. Estos activadores convierten al plasminógeno en plasmina, una potente proteasa que activa a los precursores de las metaloproteinasas de matriz, iniciándose así la degradación proteolítica.

Existen múltiples metaloproteinasas de matriz extracelular, de las que la tipo 2 es la que mayor importancia presenta en la angiogénesis. De hecho se considera fundamental para la adquisición del fenotipo angiogénico. La metaloproteinasa-2 (MMP-2) degrada a las proteínas que constituyen la membrana basal, como son el colágeno IV y la laminina. La MMP-2 está expresada en la mayoría de las células. Se segrega de forma inactiva y se activa a través de otra metaloproteinasa de membrana, la MT1-MMP (MMP-14), que está regulada por las células perivasculares [45].

Es esencial controlar la actividad proteolítica en áreas concretas de la superficie celular. Esto se consigue gracias a la unión de las metaloproteinasas a las integrinas [46], proteínas de membrana celular mediante las que la célula se adhiere al sustrato y transmite señales desde el exterior al interior de la célula [47].

### Migración de las células endoteliales

Una vez producida la degradación de la lámina basal, ocurre la migración de células endoteliales, que protuyen de la pared del vaso y migran a través del espacio intersticial.

Algunos factores angiogénicos pueden provocar señales de migración, transmitidas por su receptor de membrana que provoca la fosforilación y activación de FAK, protein-quinasa asociada a las adhesiones focales. Las adhesiones focales son regiones concretas de la superficie celular en las que se concentran moléculas de adhesión al sustrato (sobre todo integrinas) y numerosas proteínas que conectan estas moléculas al citoesqueleto. Estas adhesiones focales desempeñan fundamentalmente una función mecánica en la migración, aunque también están involucradas en otros procesos celulares.

Cuando la célula endotelial migra dentro del intersticio, otras células endoteliales le siguen y forman cordones en el estroma perivascular. Existen dos tipos diferentes de migración:

- Configuración bipolar o bicelular: dos o más células endoteliales migran desde la pared del vaso hacia el espacio perivascular, cargadas de polirribosomas y abundantes filamentos intermedios.
- Formación lineal: una única célula proyecta sus pseudópodos, migrando dentro del tejido conectivo que rodea las paredes capilares.

Para la migración de las células endoteliales se requiere interacción con moléculas de la matriz extracelular, como son la fibronectina, laminina y vitronectina, en la que intervienen las integrinas. Las integrinas son una amplia familia de proteínas transmembrana que se forman por heterodimerización de unidades alfa y beta. Existen más de 15 subunidades alfa distintas, y 8 subunidades beta. Estas subunidades forman 20 combinaciones distintas, de las cuales la más implicada en la angiogénesis es la integrina  $\alpha v\beta 3$ .

La migración de las células endoteliales se produce por la unión de las células a unos residuos de aminoácidos que quedan expuestos en la matriz por proteólisis del colágeno. Estos residuos de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) son reconocidos por la integrina  $\alpha v\beta 3$  expresada en la superficie endotelial. La célula endotelial utiliza la unión RGD como una matriz provisional para desarrollar y coordinar su capacidad de adhesión y de invasión durante la angiogénesis.

La integrina  $\alpha v\beta 3$  es crítica para la diferenciación, maduración y supervivencia de los vasos, y está presente en la superficie del endotelio activado, permitiendo la expansión de las células y la creación de luces vasculares [48]. En resumen, las integrinas son proteínas de membrana celular

gracias a las cuales la célula se adhiere al sustrato y transmite señales desde el exterior al interior de la célula [47].

Otras moléculas de adhesión celular son las cadherinas, proteínas de membrana gracias a las cuales se producen uniones intercelulares entre células homólogas. La cadherina presente en las células endoteliales es una cadherina específica, la VE-cadherina o cadherina-5. Su papel en la angiogénesis es poco conocido, aunque se sabe que su deficiencia inhibe la transmisión de la señal de supervivencia dependiente de factores angiogénicos, induciendo la apoptosis. VE-cadherina aparece asociada espacialmente con los receptores de factores angiogénicos, sugiriendo algún tipo de interacción esencial para la transmisión de la señal angiogénica [39].

A lo largo de un vaso neoforado se observa una variación de la composición de la matriz extracelular que rodea a las células endoteliales según la zona. Así, en la zona más distal del brote vascular las células muestran mayor proliferación y se rodean de colágeno tipo V y de fibronectina, mientras que en la región más proximal las células se estabilizan, recubriéndose de membrana basal compuesta por fibronectina, laminina 1 y colágeno de tipo IV [49].

### **Proliferación de células endoteliales y formación de una luz capilar**

El último paso en el proceso angiogénico es la formación de nuevos vasos. Se trata de una etapa no bien caracterizada, aunque perfectamente controlada en el tiempo y en el espacio, de modo que las células endoteliales proliferantes no ocluyen la luz de los capilares que se van formando. A medida que el nuevo brote se forma, algunas de las células han de volver a estado de quiescencia para formar las paredes de los nuevos capilares, incrementar su adhesividad a otras células endoteliales, comenzar a producir la lámina basal y la matriz extracelular, y reclutar las células perivasculares necesarias para estabilizarlos.

Para la formación de los nuevos vasos sanguíneos es fundamental que estas células se adhieran. Las integrinas, esenciales en la activación endotelial, también desempeñan una importante función en la morfogénesis de los nuevos vasos, ya que aumentan la adhesión entre las células endoteliales, y entre éstas y el sustrato.

La integrina  $\alpha 6\beta 1$  es el principal mediador de la adhesión de las células endoteliales a la laminina.

### **Estabilización de los nuevos vasos**

La maduración de los nuevos vasos incluye la creación de una nueva membrana basal, y la estabilización de dichas estructuras vasculares por el recubrimiento de células de soporte, como las células musculares lisas en grandes vasos, o los pericitos en los capilares [50].

Los pericitos son las células perivasculares que rodean a los capilares y se cree que derivan de células musculares lisas preexistentes, contribuyendo a la estabilización de los capilares, gracias al control del equilibrio proteolítico [51].

Experimentos *in vivo* sugieren que los vasos que no llegan a rodearse de células de soporte, requieren factores angiogénicos para su supervivencia. Mientras que los vasos maduros y estables pueden sobrevivir en ausencia de dichos factores [52].

Los factores angiogénicos estimulan el desarrollo y migración de los pericitos, contribuyendo así a la estabilización vascular y, a su vez, actúan como potentes factores quimiotácticos atrayendo a las células musculares lisas [53].

Por otro lado, existen factores específicos para las células endoteliales, con funciones de estabilización y mantenimiento de los vasos maduros, y que promueven la interacción entre las células endoteliales y musculares lisas [54].

### 1.2.3. Factores que regulan la angiogénesis

Existen diversos factores implicados en la angiogénesis, unos con acción proangiogénica y otros antiangiogénica, de forma que cuando existe un balance positivo a favor de los factores angiogénicos se produce la angiogénesis.

Los principales factores proangiogénicos son: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF), angiopoyetinas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  ( $TGF\beta$ ), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ), interleuquinas (IL).

Entre los factores antiangiogénicos se encuentran la angiostatina, endostatina, trombospondina-1, angiopoyetina-2, interferón- $\alpha$  e interleuquina [47].

#### Factores proangiogénicos

- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El VEGF también conocido como VPF (factor de permeabilidad vascular) o vasculotropina es una glicoproteína básica homodimérica de 34-42 kDa, ligadora de heparina, formada por polipéptidos con extremo N terminal idénticos unidos por puentes disulfuro que es secretada y expresada por múltiples células de origen humano y animal [55].

Existen distintos tipos de VEGF [56]: VEGF-A (también conocido como VEGF), VEGF-

B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. La acción de VEGF-B no es bien conocida, VEGF-C y VEGF-D se relacionan con la linfangiogénesis [57] y de VEGF-E se sabe que está codificado por el genoma del virus orf.

VEGF es un potente mitógeno específico para las células endoteliales procedentes de arterias, venas y linfáticos pero carece de actividad mitogénica sobre otros tipos celulares [58]. En las células endoteliales se encuentran los receptores de VEGF, denominados VEGFR1/flt-1 y VEGFR2/flk-1. Al igual que ocurre con el VEGF, la hipoxia también aumenta el número de estos receptores. El VEGFR1 se activa de manera directa, mientras que VEGFR2 aumenta como resultado de señales procedentes de los tejidos isquémicos. La vía más utilizada por VEGF es VEGFR2, e incluso se cree que VEGFR1 sería un regulador negativo de VEGFR2, ya que compiten por el VEGF existente.

En la actualidad VEGF es el factor angiogénico más estudiado en cuanto a su significado clínico. Se trata de una citoquina angiogénica muy potente que juega un papel crucial en la proliferación tumoral, así como en procesos inflamatorios e isquémicos. Es un factor de supervivencia de las células endoteliales tanto durante la angiogénesis fisiológica como tumoral, promoviendo su proliferación y migración y realizando funciones de vasodilatación y permeabilidad vascular, pero inhibiendo la apoptosis [59, 60, 61]. In vivo VEGF es necesario para la vasculogénesis, la angiogénesis y también regula la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Es esencial para el desarrollo de la neovasculatura durante la formación tumoral y estimula el desarrollo de metástasis. VEGF es secretado por las células tumorales, pero también por las células del huésped (es decir, monocitos, macrófagos, células del parénquima, etc) reclutadas por el tumor que pueden producir este factor de crecimiento en respuesta a estímulos del medio ambiente, principalmente la hipoxia, ciertas citoquinas y estradiol [62, 63].

Los factores capaces de inducir la expresión de VEGF son: hipoxia, factores de crecimiento como el factor crecimiento insulínico-1, ciertas citoquinas (interleuquinas-1, 3, 6 y 10), así como p53 mutado y alteraciones del gen VHL. La expresión de VEGF contribuye directamente a un peor pronóstico y a la tendencia de metástasis en diferentes tumores sólidos, tales como carcinomas del tracto genital [64], próstata [65], colon [66], vejiga [67], de células renales [68], de tiroides [69] y el carcinoma de mama [70].

- Factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF)

El factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF) es la enzima timidina fosforilasa que, al metabolizar la timidina, produce metabolitos que ejercen un efecto

quimiotáctico sobre las células endoteliales. Este metabolito es la 2-desoxirribosa, la cual por sí sola ejerce una acción angiogénica. Además, tanto la 2-desoxirribosa como la timidina protegen a las células endoteliales de la apoptosis que induce la hipoxia.

- Angiopoyetinas

Otros factores implicados en la angiogénesis son las angiopoyetinas, de las que existen cuatro tipos, aunque las más estudiadas son la angiopoyetina 1 y 2. Estas actúan uniéndose al receptor tirosinquinasa Tie 2/Tek.

La angiopoyetina 1 es producida por las células perivasculares y mantiene el endotelio en estado quiescente, además está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad de los vasos [71], y es necesaria para hacer que los vasos maduros sean insensibles al VEGF y parece favorecer el crecimiento en diámetro del vaso [72]. La angiopoyetina 2 se estimula en función de la hipoxia.

Ambas angiopoyetinas compiten por el mismo receptor produciendo una alteración en el estado de quiescencia endotelial. En condiciones en las que se estimula la angiogénesis, una región del vaso maduro se desestabiliza, haciéndose sensible al VEGF. La angiopoyetina 2 parece tener un papel clave en esta desestabilización, actuando como antagonista de la angiopoyetina 1 [73]. El vaso desestabilizado experimenta la formación de un brote angiogénico cuando está presente VEGF, o involuciona si no lo está.

- Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Existen varios tipos de factores de crecimiento fibroblástico:

El factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), denominado factor de crecimiento fibroblástico  $\beta$ , fue el primer factor angiogénico reconocido [74].

El factor vascular de crecimiento-1, también denominado factor de crecimiento fibroblástico  $\alpha$ , comparte muchas de sus características angiogénicas.

El factor de crecimiento fibroblástico-7, también denominado KGF (factor de crecimiento de queratinocitos), no es directamente angiogénico, aunque induce la producción de VEGF, por lo que tendría un papel indirecto en el proceso de la angiogénesis.

El FGF-2 se expresa en casi todos los tipos celulares. Este factor es un importante mitógeno, modula la diferenciación, inhibe la apoptosis y es quimiotáctico. Interviene en las funciones de reparación, regeneración y homeostasis tisular. Está presente en las células endoteliales induciendo la proliferación, la atracción quimiotáctica y un incremento en la expresión de

uroquinasa [75]. Presenta una alta afinidad por la heparina, uniéndose a proteoglicanos del tipo heparan sulfato. Se puede considerar por lo tanto que la matriz extracelular sería una reserva de FGF en estado latente. Cuando VEGF inicia el proceso angiogénico se desencadena una proteólisis que induce la liberación de FGF-2 activo, por lo que así se amplifican los efectos de VEGF.

Los factores de crecimiento fibroblástico se unen a receptores tirosinquinasa. En dichas uniones pueden actuar diversos proteoglicanos con cadenas heparan sulfato, debido al dominio de unión a heparina de los FGF. Se piensa que la presencia de heparina estabiliza y prolonga la unión de los FGF a sus receptores, aumentando así la transmisión de la señal [76].

- Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una proteína que participa en diversos procesos embrionarios, fundamentalmente relacionados con la organogénesis.

El HGF actúa en la disociación celular, en la adquisición de motilidad y capacidad invasiva y promueve la morfogénesis en diversos tipos epiteliales (células renales y mamarias)[77]. Además, el HGF estimula la morfogénesis de los capilares, protege de la apoptosis a las células endoteliales y estimula su migración y sus capacidades invasivas, de ahí su importancia como factor angiogénico.

El HGF se expresa en los fibroblastos y en células perivasculares, se secreta de forma inactiva y requiere de una activación proteolítica.

El receptor del HGF es el producto del protooncogen *c-met*, que es un receptor tirosinquinasa expresado por los epitelios y presente en las células endoteliales [78].

Las células estimuladas por HGF producen un aumento en la expresión del factor de transcripción *Ets-1*. Este factor induce la expresión de proteasas como el activador del plasminogéno tipo uroquinasa y el receptor del activador del plasminogéno tipo uroquinasa. Así se produciría un fenómeno de retroalimentación positiva, ya que estas proteasas activarían al HGF inactivo [79].

- Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico es un inductor indirecto de la angiogénesis, debido a la capacidad de inducir la expresión de VEGF y *Ets-1* en las células tumorales.

Por otro lado, el factor de crecimiento epidérmico induce la expresión de la "proteína ligadora" del FGF. Esta "proteína ligadora" de FGF es un activador del FGF-1 y FGF-2, que

produce, por lo tanto, un incremento de las señales angiogénicas [80].

- Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ )

Hay tres tipos de factores de crecimiento transformante  $\beta$  que se relacionan con el proceso angiogénico: TGF $\beta$  1, 2 y 3.

Los TGF $\beta$  son indirectamente proangiogénicos ya que producen un efecto quimiotáctico sobre células inflamatorias que producen VEGF, FGF-2, TNF- $\alpha$  y PDGF, que son factores directa o indirectamente inductores de angiogénesis [81]. Además de su capacidad para inducir la angiogénesis, los factores de crecimiento transformante  $\beta$  están relacionados en la maduración y estabilización endotelial.

La estimulación de las células endoteliales por la angiopoyetina-1 procedente del mesénquima induce la producción endotelial de PDGF-B, un factor que atrae células mesenquimales y provoca la activación de TGF $\beta$  latente, induciendo la diferenciación del mesénquima en células perivasculares [82].

- Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  induce la angiogénesis por distintas vías, favorece la angiogénesis de forma indirecta ya que aumenta la respuesta inflamatoria. Pero también, produce en las células endoteliales un aumento de expresión de VEGF, IL-8 y FGF-2, promoviendo así la angiogénesis [83].

- Interleuquinas (IL)

Existen diversas interleuquinas relacionadas con la angiogénesis, algunas de las cuales, como las IL-1, IL-6, IL-15, producen un aumento de la expresión de VEGF en algunos tipos celulares.

La interleuquina 13 (IL-13), que es antiinflamatoria, posee propiedades quimiotácticas para el endotelio por lo que también podría actuar en el proceso angiogénico.

Se ha demostrado que la interleuquina 8 (IL-8) es angiogénica *in vitro* e *in vivo*, induciendo la angiogénesis a través de macrófagos [84]. También se ha demostrado que *in vitro* induce la proliferación en las células endoteliales.

### Factores antiangiogénicos

- Trombospondina-1

La trombospondina-1 (TSP-1) es un potente inhibidor multifuncional de la angiogénesis que modula la adhesividad, motilidad y la actividad proteolítica de la célula endotelial impidiendo la acción de los inductores de la angiogénesis [85].

Es una glicoproteína liberada por los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, en respuesta a la estimulación por parte de la trombina, y que participa en la formación y resolución del coágulo de fibrina, uniéndose a la fibrina, el plasminógeno y la uroquinasa. También interfiere en la respuesta inflamatoria a través de la formación de puentes entre las plaquetas y los leucocitos reclutados en el foco inflamatorio [86]. Por otro lado, es un componente transitorio de la matriz extracelular en el desarrollo y la reparación tisular, siendo secretada por múltiples células de la pared vascular, incluyendo las células musculares lisas y las células endoteliales. En las células endoteliales, la TSP-1 puede inhibir la proliferación, la formación de adhesiones focales desestabilizando los contactos de la matriz extracelular, inducir la apoptosis endotelial e inhibir la angiogénesis [85].

Pero las investigaciones sobre su papel en la angiogénesis obtienen resultados conflictivos, ya que puede actuar tanto como un factor antiangiogénico como proangiogénico. Cada vez existen más evidencias de que la TSP-1 puede ser un modulador natural de la angiogénesis, dominando una regulación positiva o negativa dependiendo del contexto y de la concentración de la misma. Por ejemplo, es capaz de activar  $TGF-\beta$ , que es un factor angiogénico y en presencia de colágeno tipo I la TSP-1 inhibe la neoformación vascular [87].

- Angiostatina

La angiostatina, es un agente antiangiogénico derivado de la proteólisis del plasminógeno, se piensa que tiene un efecto antiangiogénico derivado del bloqueo de las señales HGF en el endotelio [88].

- Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico lo producen las células endoteliales y tiene un efecto relajante en las células musculares lisas, controlando el flujo sanguíneo. El aumento de NO provoca una vasodilatación, incrementando la permeabilidad vascular. Además, el NO potencia la supervivencia de VEGF, ya que inactiva a las caspasas y estimula la proliferación del endotelio.

Tiene un efecto bifásico sobre la trombospondina; a dosis extremas (elevadas o bajas) disminuye la expresión de trombospondina, mientras que a dosis intermedias aumenta dicha expresión.

#### 1.2.4. Angiogénesis tumoral

##### Definición

Los vasos sanguíneos son un componente importante en el estroma tumoral, ya que el tumor necesita de oxígeno y nutrientes. Hasta que el tumor alcanza un tamaño de 1 a 2 mm<sup>3</sup> recibe todos los nutrientes y el oxígeno por difusión simple. Una vez que el tumor alcanza un mayor tamaño necesita generar neovascularización que permita el aporte sanguíneo necesarios para continuar su desarrollo.

En los experimentos llevados a cabo por Folkman y cols. en la década de 1960 a 1970, inoculando células tumorales en órganos aislados y perfundidos, se demostró que la ausencia de angiogénesis se asociaba a una restricción del crecimiento tumoral a pequeños esferoides de 1 mm<sup>3</sup> o menos. Esta fue la primera vez que se consiguió que tumores viables crecieran como masas tridimensionales en un tejido sin neovascularización. Cuando se trasladaba el pequeño tumor al ratón del que provenía desarrollaba neovascularización y crecía alcanzando tamaños 1000 veces superiores al obtenido en el órgano aislado [89]. A partir de estos estudios, Folkman, en 1970, formuló la hipótesis de que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente y que los nuevos vasos sanguíneos son necesarios cuando el diámetro de la masa tumoral es mayor de 1-2 mm, puesto que la nutrición no la pueden conseguir por difusión pasiva [90].

En 1976 Gullino realizó un experimento con ratones en los que valoró la capacidad de neovascularización de tejido mamario sano, preneoplásico y neoplásico, implantando pequeñas biopsias en el iris de estos animales. Observó como el 90 % de los tumores mamarios implantados producían neovascularización en 48-72 %, la administración de corticoides cedía la inflamación postcirugía, pero no afectaba al crecimiento de neovasos. Sin embargo, solo el 6 % de los tejidos sanos inducía alguna proliferación vascular. Además, observó que el 30 % de las lesiones preneoplásicas producían un patrón de crecimiento vascular similar al de los implantes tumorales, demostrando así que las células de los tejidos precancerosos en el proceso de transformación neoplásica adquieren capacidad angiogénica [91].

La angiogénesis no es solo necesaria para la nutrición tumoral sino que también es fundamental para la diseminación metastásica. En la producción de las metástasis es necesario que el tumor esté vascularizado para que las células neoplásicas tengan una vía por donde puedan ser vehiculizadas.

Además, cuando estas células neoplásicas llegan al lugar diana también necesitan de la angiogénesis para su nutrición en su nueva ubicación. La actividad angiogénica de cada tumor dependerá del balance entre señales proangiogénicas y antiangiogénicas.

Los factores antiangiogénicos pueden actuar inhibiendo la proliferación celular o inhibiendo la quimiotaxis, y estos pueden actuar desde la circulación o en la matriz extracelular. Estos factores que actúan en la angiogénesis tumoral pueden derivar de las células neoplásicas, de las células endoteliales, de las células adyacentes o actuar por mecanismos no bien aclarados [92].

Las células tumorales presentan un aumento de la secreción de una serie de factores angiogénicos tales como VEGF, TGF $\alpha$  y  $\beta$ , bFGF. Además, las células tumorales son capaces de desencadenar la diferenciación de las células endoteliales y la formación de nuevos vasos a través de la liberación de enzimas proteolíticas y produciendo alteraciones en las células estromales que las rodean.

También se ha demostrado que al estimular a las células endoteliales, éstas aumentan el número de receptores en su superficie. En la transformación al fenotipo angiogénico las células endoteliales tienen que incrementar la producción de factores de crecimiento [93].

El modelo de angiogénesis tumoral es un equilibrio dinámico entre la regresión y crecimiento tumoral, regulado principalmente por VEGF y las angiopoyetinas.

En las fases iniciales de la angiogénesis tumoral se produce una regresión de los vasos presentes en el tejido implicado, antes de que los nuevos vasos se desarrollen.

Los nuevos vasos tumorales parecen reclutar a los vasos ya existentes. Como consecuencia de ese reclutamiento, las células endoteliales aumentan la expresión de citoquinas específicas como la angiopoyetina-2, producida por ellas mismas, y que actúa por un mecanismo autocrino sobre los vasos tumorales como antagonista de los receptores Tie-2, conduciendo a la desestabilización vascular. Así se aumenta la plasticidad de los vasos, permitiendo iniciar el proceso de la angiogénesis y remodelación vascular.

Como ya hemos comentado anteriormente el fenotipo angiogénico se conseguirá cuando el balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos esté a favor de los estímulos proangiogénicos. Cuando esto ocurre se dice que el tumor pasa de la fase prevascular a la fase vascular.

En la fase prevascular el tumor se desarrolla sin neovascularización. Rara vez sobrepasan los 2-3 mm [94]. Suelen ser lesiones asintomáticas y no detectables clínicamente. Sus células pueden crecer tan rápido como en las variedades vascularizadas pero predominan las micrometástasis, ya que la proliferación y la muerte celular se mantienen en equilibrio.

La fase vascular o angiogénica comienza cuando un subgrupo de células dentro del tumor adquiere el fenotipo angiogénico, con capacidad de inducir formación de nuevos vasos, lo que

permite continuar el crecimiento tumoral [95, 96]. Además, gracias a esta vascularización las células pueden metastatizar a órganos distantes [97]. Es por ello que el proceso angiogénico se considera uno de los factores más importantes en la progresión y diseminación neoplásica y en consecuencia como un factor pronóstico.

Los nuevos vasos producidos por el tumor simulan a los de la red capilar normal pero presentan diferencias destacadas, son vasos más proliferantes e inmaduros [98]. Son vasos de paredes finas y ramificaciones anormales que con frecuencia forman uniones arteriovenosas, lo que impide una perfusión adecuada. El revestimiento endotelial suele ser incompleto con ausencia de uniones intercelulares; además, pueden faltarles componentes como la membrana basal, lo que facilita el escape de células tumorales al torrente sanguíneo, con el consiguiente riesgo de metástasis a distancia. No poseen capa muscular, pericitos ni inervación por lo que carecen de control del flujo lo que hace que el flujo sea irregular e impide la nutrición de toda la masa tumoral [99]. Incluso, en tumores muy agresivos los neovasos están compuestos por las propias células tumorales [100].

La vascularización es diferente según el área del tumor en la que nos encontremos. En el área tumoral central existe una continua remodelación de los vasos preexistentes, siendo estos utilizados para la nutrición tumoral. En la periferia del tumor se encuentran las áreas más vascularizadas, en donde existe una mayor proliferación de células endoteliales; estos vasos de la periferia tumoral se comunican con la red vascular preexistente y son los denominados puntos calientes (hot spots). En estas áreas es donde se cuantifica la densidad vascular intratumoral, que es un parámetro utilizado para cuantificar la capacidad angiogénica tumoral.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en las neoplasias la hipoxia es la principal causa de aumento de los factores angiogénicos que ponen en marcha el proceso angiogénico. Resulta lógico pensar que el crecimiento desmesurado de los tumores provoca déficit de la tensión de oxígeno en sus células formándose en ellas señales, como HIF-1, capaces de activar la secreción de factores angiogénicos [101].

### **Influencia en la angiogénesis de otros factores tumorales**

La expresión de algunos factores angiogénicos está regulada además por otros estímulos, incluyendo factores de crecimiento y productos de oncogenes o genes supresores, producidos por el propio tumor y que pueden actuar de forma autocrina o paracrina.

Factores hormonales, como los estrógenos, activan la producción de VEGF en las células tumorales de las neoplasias de mama [102]. Los andrógenos juegan un papel similar en la próstata neoplásica [103]. La forma salvaje de p53 interviene en la angiogénesis provocada por la hipo-

xia induciendo apoptosis o incrementando factores antiangiogénicos, pero también disminuyendo VEGF [104], mientras que, en tumores, la forma mutante se asocia a su incremento. El producto del gen supresor von Hippel-Lindau (vHL) está directamente involucrado en la degradación del VEGF, atribuyéndose la susceptibilidad a cáncer cerebral o renal en la enfermedad a la pérdida de la función de VHL, que disregularía al factor angiogénico. La forma mutante de ras puede regular al alza tanto VEGF como otros factores angiogénicos.

### **Factores antiangiogénicos**

Las células neoplásicas pueden tener también capacidad para expresar factores antiangiogénicos como la trombospondina, angiostatina y endostatina. En esta capacidad se basan algunas hipótesis que intentan explicar por qué en ocasiones la extirpación de una neoplasia primaria se sigue de la progresión de sus depósitos metastáticos, supuestamente frenados en su crecimiento por los inhibidores de la angiogénesis que producía el tumor principal.

### **Intervención de otras estirpes celulares en la angiogénesis tumoral**

No sólo las células neoplásicas juegan un papel importante en el proceso angiogénico, otras estirpes celulares acompañantes pueden intervenir en este proceso, siendo los macrófagos los que tienen el papel más importante. Estos representan el mayor componente del infiltrado inflamatorio en la mayor parte de los tumores, a donde son atraídos por citoquinas y otras moléculas como el VEGF [105].

Los macrófagos asociados al tumor tienen una relación compleja con la biología tumoral, con acciones tanto promotoras como inhibitoras del crecimiento tumoral. Una de sus acciones promotoras está en relación con la angiogénesis, pudiendo influir en cada una de las fases del proceso angiogénico, incluyendo la secreción de factores angiogénicos. La expresión de VEGF en los macrófagos se ha detectado en el citoplasma, tanto como proteína mediante inmunohistoquímica, como en forma de ARNm mediante hibridación in situ. Su secreción se ha estimado en 2-3 veces la de las propias células tumorales, lo que resalta la relevancia de los macrófagos asociados a tumores (TAMs) en la angiogénesis tumoral [106].

## **1.3. Trombospondina 1**

Las trombospondinas (TSPs) son una familia de glicoproteínas de la matriz extracelular (ECM), fijadoras de calcio, oligoméricas y multidominio, que participan en la comunicación entre las cé-

lulas y entre la célula y la matriz. Están presentes tanto en tejidos embrionarios como en adultos [107], y la mayoría, como el corazón, el cartílago y el cerebro, expresan al menos un miembro de la familia. Su estructura molecular contiene una serie de secuencias de péptidos implicados en múltiples funciones biológicas, como en la remodelación tisular asociada al desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la angiogénesis, la sinaptogénesis y en las neoplasias. Estas proteínas median en la interacción entre células normales y neoplásicas con la matriz extracelular y el tejido circundante [108]. Estas actividades derivan de sus interacciones con las superficies celulares, factores de crecimiento, citoquinas o componentes de la matriz extracelular que en conjunto regulan muchos aspectos del fenotipo celular [109].

Esta familia la componen cinco miembros, cuyo peso molecular oscila entre 420 y 520 kDa, cada uno representando a un producto génico por separado, probablemente presentes en la mayoría de las especies de vertebrados, que se pueden dividir en dos subgrupos en base a su arquitectura molecular. El primero, subgrupo A, está constituido por dos proteínas triméricas, TSP-1 y TSP-2, que tienen el mismo conjunto de dominios estructurales y pertenecen a la familia supergénica del repeat tipo 1 de trombospondina (TSR), la cual está compuesta por proteínas que contienen homólogos del repeat tipo 1. Cada subunidad de TSP-1 se compone de dominios globulares amino y carboxi-terminales, una región de secuencia homóloga al procolágeno y tres tipos de secuencias repetitivas centrales denominadas repeats tipo 1, tipo 2 y tipo 3. Por otro lado el segundo subgrupo, denominado subgrupo B, lo conforman proteínas pentaméricas, denominadas TSP-3, TSP-4 y la proteína de la matriz oligomérica del cartílago (COMP o TSP-5), que, por el contrario, carecen de las repeticiones de tipo 1 y de la región homóloga al procolágeno, pero sí contienen una repetición tipo 2 adicional. TSP-5 además carece del dominio N-terminal [110].

Una característica general de los miembros de la familia génica de las trombospondinas es la presencia de un gradiente de secuencias de aminoácidos indentificativo desde el dominio C-terminal (el más alto) al N-terminal (el más bajo). Los repeats tipo 3 y el dominio C-terminal muestran el nivel más alto de conservación, ambos entre un determinado tipo de trombospondina en diferentes especies y entre diferentes miembros de la familia de la misma especie. Los repeats tipo 3 son un conjunto de lugares fijadores de calcio contiguos que se parecen a la calmodulina en la posición de residuo oxigenado. Como con la calmodulina, se detecta un cambio en la configuración de la proteína ante la presencia de diferentes concentraciones de calcio, reflejando la naturaleza cooperativa de la interacción. La fijación de la TSP-1 a algunos de sus receptores también se afecta por el calcio y la conformación de los repeats tipo 3.

TSP-1 y TSP-2 se expresan de forma importante durante la remodelación tisular, que está asociada a la cicatrización y la progresión tumoral. Se ha observado una cicatrización aberrante de heridas en ensayos con ratones que carecen de TSP-1 y TSP-2. Así, en ratones negativos para TSP-1, las heridas cicatrizan más lentamente y hay un descenso en el reclutamiento de macrófagos. Mientras que existe un incremento en la densidad de vasos en las heridas de los TSP-1 negativos, TSP-2 parece tener un efecto más significativo en la angiogénesis de las heridas cutáneas. El papel que tienen los demás miembros de la familia de trombospondinas en la remodelación tisular todavía es menos conocido. El estudio de arrays de genes en tejido tumoral ha revelado que estas proteínas se expresan en algunos casos. Por ejemplo, TSP-4 se expresa más en el carcinoma lobulillar de mama que en el invasor no específico [111], y la expresión de TSP-3 parece estimular la progresión del osteosarcoma [112]. Las TSRs de TSP-1 y 2, así como las de otras proteínas, median en su actividad antiangiogénica. De este modo, al carecer de ellas, no se espera que TSP-3, 4 y 5 inhiban la angiogénesis en el micromedioambiente tumoral [108].

También se han encontrado múltiples copias del TSR en factores del complemento, incluyendo C8, C9 y "properdina", así como en dos proteínas que aparecen en los eritrocitos parasitados por malaria (la proteína circumsporozoita y la proteína anónima relacionada con la trombospondina), en proteínas involucradas en la vía axonal, en N-proteínas del procolágeno y en proteínas involucradas en la angiogénesis como ADAMTS-1, METH-2 y el inhibidor 1 de la angiogénesis específico del cerebro, que al igual que las TSP-1 y 2, parecen inhibir la angiogénesis. Además, la secuencia WSXWS que está incluida en los TSRs, se encuentra en la familia del receptor de citoquina. En conjunto, toda esta información indica que los TSRs están involucrados en las uniones celulares y las interacciones proteína-proteína.

El primer miembro de la familia de trombospondina identificado fue TSP-1 en 1971 [113], cuando se vio que esta proteína era liberada por plaquetas activadas en respuesta a la trombina y participaba en la formación del coágulo de fibrina [114], siendo un componente principal de las plaquetas sanguíneas humanas.

Al igual que la mayoría de las proteínas grandes de la matriz extracelular, TSP-1 presenta múltiples dominios estructurales y lugares de fijación de ligandos. Esta diversidad implica que la TSP-1 puede interactuar al mismo tiempo con uno o más receptores de un mismo tipo celular. Por otro lado, la respuesta celular a TSP-1 puede diferir según los respectivos niveles de expresión de receptores y llevar a respuestas opuestas dependiendo de si se trata de una situación fisiológica o patológica. El hecho de que TSP-1 parece influenciar en numerosos procesos biológicos también se debe relacionar con un control estricto de la expresión de la proteína y con su catabolismo a través

de un receptor endocítico que dirige su degradación. Varios estudios han identificado al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP) como un receptor endocítico responsable de la unión e internalización de TSP-1 [107].

La TSP-1 regula la proliferación, migración y apoptosis celular en una gran variedad de acontecimientos fisiológicos y patológicos, incluyendo la curación de heridas, inflamación, angiogénesis y neoplasia. Estos procesos conllevan a la formación de complejos multiproteicos en la superficie celular y la agrupación de receptores que inicien la transducción de la señal, por lo que la función de TSP-1 es dirigir la formación de estos complejos multiproteicos que modulan el fenotipo celular, de la misma forma que la formación de complejos, los cuales regulan la adhesión celular, la señal de transducción y transcripción, y esto lo hace mediante interacciones específicas con factores de crecimiento, citoquinas, otros componentes de la matriz y proteínas de membrana. Las proteínas de membrana que participan en estos complejos incluyen integrinas, proteína asociada a la integrina (conocida como CD47 o IAP), CD36 y proteoglicanos. El TGF $\beta$  y el PDGF también se unen a la TSP-1. Así, como cada célula expresa un repertorio diferente de receptores, la composición de complejos y de las respuestas celulares varían en cada tipo celular. Por ejemplo, TSP-1 estimula o inhibe la migración de las células musculares lisas vasculares o endoteliales, respectivamente [85].

Se han hecho progresos importantes en el conocimiento de la función de TSP-1 y TSP-2. En concreto, se ha aclarado el papel de la TSP-1 en la activación de TGF $\beta$  y el papel tanto de TSP-1 como TSP-2 en la angiogénesis. Además, TSP-2 ha mostrado ser importante para la unión de las fibras de colágeno en la piel. A nivel celular, se ha identificado un sitio de unión a integrinas  $\alpha 3\beta 1$  y algunas señales que se inician por TSP-1. Además, se ha descrito la interacción de las vías desencadenantes de señal de varios receptores de TSP-1.

Actualmente se dispone de mucha información sobre el papel de TSP-1 en el cáncer y apoya la hipótesis de que realiza funciones importantes en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Sin embargo, existen resultados conflictivos que definen a la TSP-1 tanto como un supresor tumoral, como un promotor tumoral [115].

### 1.3.1. Interacción de la TSP-1 con sus receptores

Se han identificado varios conjuntos de receptores para las diferentes partes de la TSP-1. Estos receptores incluyen: CD36, integrinas, proteína asociada a la integrina (IAP), proteoglicanos y sulfátidos, la proteína relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LRP), y uno o más receptores no identificados para el C-terminal.

### La interacción de TSP-1 con CD36

CD36, también conocido como GP88, GP IV, GP IIIb y PAS IV, es una proteína transmembrana de cadena simple, de 88kDa, que está glicosilada y palmitoilada. La ubicación exacta de CD36 todavía es controvertida, sugiriéndose dos modelos de uno y dos dominios transmembrana [116, 117]. Originariamente se encontró en plaquetas y monocitos, pero también se distribuye en los megacariocitos, células endoteliales capilares, células del melanoma y células epiteliales mamarias. CD36 es un importante receptor que fija e internaliza LDL oxidado, ácidos grasos y fosfolípidos aniónicos. Como la fijación y acumulación de lípidos por los macrófagos subendoteliales es un paso clave en la formación de células espumosas y el subsiguiente desarrollo de lesiones ateroscleróticas, se ha sugerido que CD36 juega un papel importante en la trombosis y la aterogénesis [118]. CD36 es también un receptor de adhesión que fija colágenos, TSP-1 y eritrocitos infectados por malaria. A través de estas interacciones, CD36 realiza una gran variedad de funciones, como mediar en la unión de plaquetas al colágeno, monocitos y subendotelio, y contribuir a la activación de monocitos y plaquetas. Es responsable en parte de la virulencia del *P. falciparum* mediante el secuestro de los eritrocitos infectados. A través de esta interacción con el antígeno de la malaria, la proteína 1 de membrana del eritrocito *P. falciparum*, CD36 media la citoadhesión de los eritrocitos parasitados con las células endoteliales microvasculares, produciendo una oclusión microvascular local [119].

CD36 en las plaquetas, monocitos y células endoteliales funciona como un receptor para TSP-1. La interacción TSP-1/CD36 está implicada en la adhesión plaqueta/monocito, plaqueta/célula tumoral, en la agregación plaquetaria, en la absorción de las células apoptóticas por los macrófagos, en la activación del TGF- $\beta$ 1 latente por la plasmina en los macrófagos alveolares en las ratas después de una herida, y en el efecto antiangiogénico de TSP-1 sobre las células endoteliales. Se ha sugerido que la secuencia VTCG localizada en los TSRs de la TSP-1 es el principal lugar de alta afinidad para la unión de CD36. Los péptidos que contiene esta secuencia, y los anticuerpos antipéptidos, han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la adhesión celular de TSP-1 [110]. Otras secuencias de TSP-1 pueden también unirse a CD36, una de ellas, GVQXR, se encuentra en el dominio procolágeno así como en los TSRs [120].

La especificidad y capacidad del CD36 para la unión con TSP-1 o el colágeno está controlada por la fosforilación y desfosforilación postranslacional del ectodominio del CD36 en Thr 92. En las plaquetas en reposo, este residuo Thr existe en una forma fosforilada que puede fijar colágeno, pero no TSP-1. La desfosforilación mediante la adición de fosfatasa ácida exógena hace que las plaquetas pierdan la capacidad para fijar colágeno y adquieran la habilidad de fijar TSP-1. El cambio de este Thr por Ala resulta en un CD36 no fosforilado que fija TSP-1 de forma constitutiva

[121]. Aunque se desconoce todavía el mecanismo por el que las fosfatasa son liberadas por las células o las plaquetas activadas, se ha observado que existe una actividad quinasa A de una ectoproteína cAMP-dependiente de plaqueta que puede fosforilar CD36 [122].

Se ha demostrado que TSP-1 está implicada en la actividad inhibitoria específica de VIH en la saliva humana. Un sitio de unión de TSP-1, homólogo al de CD36, está presente en la glicoproteína de membrana gp120 del VIH. Este sitio aparece en las regiones conservadas C2 y C3 de la gp120, las cuales son importantes para la unión del VIH a su receptor celular de alta afinidad CD4. TSP-1 puede unirse directamente a la gp120 de una manera dependiente de la concentración y saturable. Al igual que en la interacción de TSP-1 con CD36, en la interacción de TSP-1 con gp120 está involucrada la secuencia CSVTCG de TSP-1, basado en estudios de inhibición de péptidos. TSP-1 puede inhibir la infección por VIH de las células mononucleares de la sangre periférica, las células T transformadas y la línea celular promonocítica, presumiblemente a través de la interacción con el sitio de unión de TSP-1 con CD36. Las concentraciones de TSP-1 que se requieren para bloquear la infección por VIH están en rango fisiológico [110].

Otro receptor no identificado aislado de las células del adenocarcinoma de pulmón A549 también se une a la secuencia CSVTCG de la TSP-1, un hecho que promueve la adhesión celular. Este receptor es distinto al CD36, ya que se une a la TSP-1 de una manera dependiente de calcio y magnesio, y se caracteriza por dos bandas de 50 y 60 kDa en SDS-PAGE [123].

### La interacción de TSP-1 con las integrinas

Las integrinas son una familia de receptores de superficie celular para proteínas de adhesión que median en una gran variedad de funciones. Se ha revisado de forma extensa su estructura, función y los eventos de señalización intracelular desencadenados por la unión de la integrina. Son capaces de reconocer a numerosas proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina, vitronectina, fibrinógeno, colágenos, factor de von Willebrand y lamininas, así como a proteínas que median en las interacciones de célula/célula [110]. TSP-1 es un ligando para varias integrinas, incluyendo  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ , y  $\alpha 5\beta 1$ , y parece que las interacciones entre TSP-1 e integrinas están implicadas en numerosas de las funciones de la TSP-1. Ésta se une a la superficie celular de las plaquetas a través de la interacción de la secuencia RGD con  $\alpha IIb\beta 3$  y  $\alpha v\beta 3$ . La integrina  $\alpha v\beta 3$  se expresa en numerosos tipos celulares, y en muchos casos media en la adhesión celular con la TSP-1 mediante la interacción con la secuencia RGD. Esta secuencia se localiza en el séptimo repeat tipo 3 fijador de calcio cuya configuración es sensible a diferentes niveles de calcio y patrones de adhesión disulfito [124]. Una proteína isomerasa disulfito que se encuentra en la superficie de las células

endoteliales es capaz de catalizar el intercambio disulfuro en la TSP-1, lo que da como resultado la exposición de la secuencia RGD [125]. La interacción de TSP-1 con  $\alpha v \beta 3$  también regula las vías descendentes de señalización. La ocupación de la integrina  $\alpha v \beta 3$  por TSP-1 o vitronectina en la superficie de las células del músculo liso vascular mejora la señalización del factor de crecimiento insulina-like, incluyendo la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina, la síntesis proteica y de ADN, y la migración de la célula muscular lisa [126].

Otras acciones celulares mediadas por las integrinas apoyadas por la TSP-1 incluyen el crecimiento de neuritas y la respuesta inflamatoria del huésped.  $\alpha 3 \beta 1$  y otras integrinas que contienen la subunidad  $\alpha v$  han mostrado jugar papeles importantes en el crecimiento de neuritas mediada por TSP-1 en las células ganglionares periféricas. La TSP-1 se expresa de forma transitoria a altas concentraciones en tejidos dañados e inflamados, donde las interacciones TSP-1-integrina funcionan en la respuesta inflamatoria del huésped. Por ejemplo, se ha demostrado que la ingestión de eosinófilos apoptóticos por el macrófago humano derivado del monocito está mediada por un mecanismo  $\alpha v \beta 3 / CD36 / TSP-1$ . Además, TSP-1 y su región central de 70 kDa pueden favorecer la adhesión de linfocitos T.

Se ha identificado la integrina  $\alpha 3 \beta 1$  como el principal receptor de integrinas para TSP-1 en las células del carcinoma de mama. Esta integrina está parcialmente activada en las células MDA-MB-435, donde, después del acoplamiento inicial celular a la TSP-1, media la invasión celular, la formación subsecuente de filopodio, y la respuesta quimiotáctica a la TSP-1. La interacción de TSP-1 con  $\alpha 3 \beta 1$  puede modularse por varios factores que regulan las actividades de esta integrina. Se han encontrado niveles bajos de expresión en células MDA-MB-231 y MCF-7, las cuales atacan pobremente y no se extienden del todo a bajas concentraciones de TSP-1. Bajo las mismas condiciones, sin embargo, las células atacan con avidez y se diseminan con TSP-1 cuando los anticuerpos de activación b1 están incluidos. Otros factores, incluyendo suero, insulina y el factor de crecimiento 1 insulina-like, también aumentan la actividad de esta integrina en relación con TSP-1, indicando que la interacción de TSP-1 con  $\alpha 3 \beta 1$  puede estar modulada por varias señales inside-out que regulan el comportamiento celular, influyendo en estas células tumorigénicas y potencialmente metastásicas [127]. Se ha identificado también al dominio fijador de heparina, un péptido de la TSP-1 que contiene 190/201 residuos de aminoácidos desde el N-terminal, como la secuencia de reconocimiento para la integrina  $\alpha 3 \beta 1$  [128].

### La interacción de TSP-1 con la proteína asociada a la integrina (IAP, CD47) y otros receptores para el dominio C-terminal

El dominio C-terminal de la TSP-1 fue el primero identificado, en 1985, específicamente como una región involucrada en la agregación plaquetaria [129].

La IAP es una proteína transmembrana de aproximadamente 50kDa, que se expresa ampliamente, compuesta por un dominio similar al de una inmunoglobulina extracelular, cinco regiones de membrana de memoria y una cola citoplasmática que se puede unir de forma alternativa [130]. IAP está involucrada en una gran variedad de funciones, incluyendo la respuesta inmunitaria a la infección bacteriana, la migración de neutrófilos a través del epitelio, y la memoria. También se ha implicado a la IAP en diferentes aspectos de la respuesta inflamatoria, incluyendo la liberación de citoquinas y la migración transendotelial transepitelial de neutrófilos [110]. A través de la interacción con IAP, TSP-1 interfiere en la actividad de la integrina y su función en numerosas células. Estas interacciones afectan a las funciones de  $\alpha v \beta 3$  en las células del melanoma,  $\alpha II \beta b 3$  en las plaquetas y  $\alpha 2 \beta 1$  en las células musculares lisas y las plaquetas. Cuando las células C32 de melanoma se adhieren a un sustrato escasamente cubierto de vitronectina, TSP-1 soluble, el dominio C-terminal recombinante, y el péptido 4N1K aumentan la diseminación celular dependiente de  $\alpha v \beta 3$ . Esta diseminación estimulada por la TSP-1 se bloquea con la toxina pertussis, lo que indica que la señal de IAP está mediada por una proteína Gi heterotrimérica [131]. La respuesta quimiotáctica de las células musculares lisas mediada por la  $\alpha 2 \beta 1$  está también estimulada por la unión de TSP-1 y 4N1K con IAP [132]. En las plaquetas, IAP se asocia con las integrinas  $\alpha II \beta b 3$  y  $\alpha 2 \beta 1$ , y regula sus funciones. TSP-1 puede acivar directamente a la  $\alpha II \beta b 3$  en la superficie plaquetaria, causando la diseminación de las plaquetas sobre el fibrinógeno inmovilizado, la agregación plaquetaria, y la fosforilación de Lyn y Syk y su asociación con FAK. En esta activación también está involucrada una vía de señalización mediada por la proteína Gi. El colágeno es capaz de inducir la activación/agregación plaquetaria a través de una vía mediada por  $\alpha 2 \beta 1$ , y la sinergia de TSP-1 y el péptido 4N1K con la actividad del colágeno activando las plaquetas mediante IAP [133]. En los mioblastos esqueléticos, otro receptor que está involucrado en la adhesión celular al C-terminal de la TSP-1 permanece sin identificar, pero es posible que IAP juegue un papel en estas células.

Un tercer receptor para el C-terminal de la TSP-1 se aisló de la célula del carcinoma escamoso 11B usando la afinidad cromatográfica de la TSP-1. Este receptor tiene dos componentes de 80 y 150 kDa que no están relacionados entre ellos ni con integrinas. El hecho de que este receptor reconozca al C-terminal de la TSP-1 está apoyado por el hallazgo de que mAb C6.7 inhibe la unión de TSP-1 [134].

### La interacción de TSP-1 con proteoglicanos

Una característica importante de TSP-1 es su capacidad para fijar proteoglicanos (PGs). Éstos forman una gran clase de moléculas que se expresan prácticamente siempre y se caracterizan por un core proteico con al menos una cadena de glucosaminoglicanos (GAG) unida. Las proteínas de este core incluyen proteínas transmembrana, proteínas unidas a GPI y moléculas extracelulares de diferentes tamaños. Sin embargo, en la mayoría de los casos, es el componente GAG de los PGs el que interactúa con las proteínas fijadoras de PG, como la TSP-1. Hay 5 tipos de GAGs unidos a los cores de PG: heparan-sulfato (HS), condroitín-sulfatos (condroitín-4-sulfato wC4S o CSAx y condroitín-6-sulfato wC6S o CSCX), dermatan-sulfato (DS, o CSB, un condroitín-sulfato epidermizado) y el raro keratán-sulfato (KS). Otro GAG, heparina, se usa de forma universal tanto para la purificación de las proteínas fijadoras de heparina como un indicador de la función potencial de GAG o PG. Sin embargo, la heparina es una forma altamente sulfatada de HS que se produce sólo en los mastocitos y no se le debe considerar como un GAG representativo de la mayoría de tejidos. La actividad biológica de la heparina a menudo difiere dramáticamente de la de HS o los heparin-sulfato proteoglicanos (HSPGs) que han sido inmunopurificados. La heparina también se une casi siempre más fuertemente a ligandos que a GAGs derivados de células o de tejidos. Por ejemplo, TSP-1 intacta se une de forma más fuerte a heparina mientras que la unión con HS, C4S y C6S es 6-16 veces más débil [110].

Las uniones de PG y GAG se han descrito en 3 regiones de TSP-1: el dominio fijador de heparina N-terminal (HBD), los TSRs y la región de tipo 3Rc-terminal. Desde hace tiempo se ha conocido el HBD como el lugar para las interacciones entre TSP-1 y HSPG. Se ha visto que HBD derivada de tripsina monomérica se une a la heparina, HS y DS, pero no a C4S.

La región C-terminal tipo 3 de la TSP-1 contiene la secuencia RGD fijadora de integrina en el último repeat tipo 3, así como un lugar de unión IAP en el dominio C-terminal. Recientes descubrimientos apoyan la idea de que la unión C4S a la región C-terminal tipo 3 puede inhibir específicamente los comportamientos celulares que están mediados por otros receptores que reconocen esta parte de la molécula de TSP-1. La fijación de la célula falciforme a la TSP-1 es inhibida fuertemente por C4S, mientras que otros GAGs celulares y heparina tienen poco o ningún efecto. Con la citometría de flujo usando anti-C4S mAb CS56 se ha demostrado que las células falciformes no parecen tener C4S asociado a su superficie celular, lo que sugiere que la inhibición de C4S no se debe al desplazamiento de la unión de TSP-1 a CSPG de la superficie celular [135]. La TSP-1 intacta, el fragmento de 140 kDa de la TSP-1, y una proteína de fusión expresada en el dominio C-terminal (hTSP-1C) ayudan a la fijación de mioblastos C2C12. La fijación de mioblastos a la

TSP-1 intacta también se inhibe por EDTA, demostrando que se requiere una configuración repleta de calcio para la unión. Mientras que C4S inhibe la unión de mioblastos a TSP-1 y al fragmento de 140 kDa en un 90%, la unión y extensión de hTSP-1C no se ve afectada por ella. Estos datos sugieren que la región C-terminal tipo 3 intacta es necesaria para que C4S inhiba la adhesión de C2C12 a TSP-1 [136]. Así, se propone que mientras hay un sitio de unión con C4S específico en la región C-terminal tipo 3 intacta, la fijación de C4S soluble esconde otros sitios de unión de receptores en la región, y así causa el efecto inhibitorio.

### **La interacción de TSP-1 con la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de bajo peso molecular y sulfátidos**

La TSP-1 sintetizada recientemente o se incorpora en la matriz extracelular, o se une a la superficie de membrana celular donde es catabolizada rápidamente. Ambas actividades son inhibidas por la heparina. En 1995, dos grupos de investigación identificaron la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de bajo peso molecular (LRP), un miembro de la familia de receptores de lipoproteína de bajo peso molecular (LDLR), como un receptor que media en el catabolismo de TSP-1. Demostraron que tanto la internalización como la degradación de TSP-1 por las células está bloqueada por anticuerpos anti-LRP y por RAP, un antagonista del ligando de unión a las proteínas LDLR, y que TSP-1 es capaz de fijar LRP purificada. Además, la heparina inhibe la unión celular y el catabolismo de TSP-1, y el pretratamiento heparinitasa de las células inhibe notablemente la degradación de TSP-1 [137, 138]. En otro estudio, Chen et al. mostraron que la absorción de LRP y la degradación de TSP-1 está mediada por la HBD. Es más, tanto TSP-1 y la HBD trimérica muestran una cinética de unión, absorción y degradación similar, indicando que la HBD trivalente es suficiente para mediar el catabolismo de TSP-1 por células [139]. En conjunto, estos datos indican que el catabolismo de TSP-1 por LRP está mediado por la HBD, y que un HSPG es esencial para esta actividad. En las células endoteliales vasculares, el catabolismo de TSP-1 se inhibe por RAP, pero no por anticuerpos anti-LRP, sugiriendo que otra proteína LDLR es la responsable [137].

Los glicolípidos sulfatados o sulfátidos representan otro grupo aniónico de moléculas de unión a TSP-1. Usando hematíes, plaquetas y células de melanoma, dos grupos han purificado las sulfátidos de membrana que fijan TSP-1 [140, 141]. Se encontró que la galactosilceramida I3-sulfato es el componente de unión a TSP-1 más fuerte en los hematíes y en las plaquetas [140].

En resumen, existen varios receptores para las diferentes partes de la TSP-1. Con la excepción de los repeats tipo 2, múltiples receptores se fijan a todos los dominios de la TSP-1. A través de

estas interacciones, se provocan diferentes señales que afectan a varios aspectos de la respuesta celular. Otro nivel de regulación deriva de las interferencias entre los sistemas de receptores. Esto se ejemplifica por la regulación de las actividades de la integrina por IAP. Incluso esas integrinas que no reconocen a TSP-1 como un ligando están estimuladas por péptidos de TSP-1 que fijan IAP. Asimismo, la actividad de la integrina se puede también estimular por péptidos del TSR.

De esta forma, la influencia de ocupación del receptor de TSP-1 depende de: 1) el nivel y el patrón de expresión de los receptores; 2) los estados activos relativos de los receptores; y 3) la coordinación de la maquinaria de señalización intracelular que está asociada a cada receptor. Por ejemplo, mientras que la familia Src de quinasas, p38 y las caspasas parecen estar involucradas en la apoptosis endotelial inducida por la TSP-1, los detalles de esta vía de señalización permanecen todavía por determinar [110].

### 1.3.2. Señal de transducción y organización esquelética inducida por TSP-1

Se ha observado de forma consistente, con datos de los efectos de TSP-1 sobre la señal de transducción de las células musculares lisas *in vitro*, que estas células expresan TSP-1 en vasos dañados, ateroscleróticos y reestenóticos. Además, anticuerpos contra varios dominios de TSP-1 inhiben la proliferación y migración de las células musculares lisas [110]. En un estudio, la respuesta quimiotáctica de estas células a la TSP-1 se inhibe específicamente por péptidos que contienen RGD, sugiriendo que las integrinas están involucradas [142]. Esta observación es consistente con el hallazgo de que  $\alpha v \beta 3$  en estas células se unen a TSP-1 [143]. Por el contrario, Yabkowitz et al. encontraron que los péptidos que contienen RGD no inhiben la respuesta quimiotáctica de las células musculares lisas a TSP-1. Estos autores vieron inhibición con un anticuerpo anti- $\alpha v$ , indicando que las integrinas están implicadas [144]. Mientras que los ensayos de quimiotaxis usados en los dos estudios son similares, se diferencian en que uno usó las células musculares lisas de la vena safena humana y el otro las de la arteria pulmonar bovina.

Las señales en las células musculares lisas son consistentes con la activación de vías descendentes de integrinas. Usando inhibidores específicos de la migración de células musculares lisas, Gahtan et al. han identificado recientemente proteínas que pertenecen a la vía descendente de FAK. Sus datos indican que la migración de células musculares lisas inducida por TSP-1 es dependiente a la activación de la vía MAPK [145].

Se ha observado que la interacción de IAP con TSP-1 desencadena vías de señalización descendentes intracelulares que inducen la muerte celular caspasa independiente en los clones de células

B en la leucemia linfocítica crónica, aunque no está clara la vía exacta que lleva a esta muerte celular [146]. Algunas de las modulaciones de las actividades de las integrinas por TSP-1 han mostrado estar mediadas por la interacción directa de IAP y proteínas Gi heterotriméricas, y la vía de señalización ligada a Gi. En las células musculares lisas, las actividades ERK también se inhiben por la interacción de IAP con TSP-1 [132]. Esto ha sugerido que, a través de la vía de señalización ligada a la proteína Gi, TSP-1 puede afectar la actividad de las integrinas, incluyendo  $\alpha 2\beta 1$  y  $\beta 3$ , así como influenciar en los mecanismos celulares descendentes.

La interacción de TSP-1 y CD36 también parece desencadenar las vías de señalización descendientes intracelulares. TSP-1 induce la dimerización de CD36. Además, la unión del CD36 de la célula endotelial con TSP-1, péptido CSVTCG o anticuerpos contra CD36, inhiben específicamente la movilización de calcio intracelular estimulada por trombina o tripsina a través de sus respectivos receptores, pero no la respuesta de calcio estimulada por VEGF o histamina. Se han descrito que varias proteínas tirosin quinasa de la familia Src están asociadas a CD36 en las células endoteliales y plaquetas. En las células endoteliales de la microvasculatura, CD36 se une más fuertemente a Fyn, lo que parece ser esencial para la inhibición de la angiogénesis inducida por TSP-1. Todavía no se ha determinado el mecanismo por el cual CD36 se asocia con la familia de quinasa Src [110].

### 1.3.3. Ejemplos de las funciones en vivo de la TSP-1

La capacidad de activar TGF- $\beta$  y de inhibir la angiogénesis son las dos primeras funciones de TSP-1 que se han probado in vivo. Dada la variedad de respuestas celulares a TSP-1, seguramente hay más. Quedan todavía por determinar muchos detalles de los mecanismos de inhibición de la angiogénesis y de la activación de TGF- $\beta$ .

#### Activación de TGF- $\beta 1$ por TSP-1

La superfamilia de TGF- $\beta$  incluye TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$ , TGF- $\beta 3$ , activinas, inhibinas, proteínas morfogénicas del hueso y sustancia inhibidora mülleriana. TGF- $\beta 1$  es una citoquina multifuncional, involucrada en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la regulación del crecimiento celular, desdiferenciación, adhesión, motilidad y muerte celular, por lo que su actividad necesita estar firmemente controlada [147]. Actúa como un regulador endógeno de la angiogénesis y como factor anti-oncogénico. TGF- $\beta 1$  activo puede estimular a los monocitos y macrófagos para secretar citoquinas proangiogénicas [148].

TGF- $\beta 1$  se secreta en una forma biológicamente inactiva, TGF- $\beta 1$  latente, que no es capaz de interactuar con su receptor y obtener respuestas biológicas. El pequeño TGF- $\beta 1$  latente es un

homodímero unido a disulfuro que es un producto de un único gen. Antes de la secreción, el péptido asociado a la latencia de N-terminal (LAP) se rompe enzimáticamente y permanece asociado de forma no covalente con el péptido TGF- $\beta$ 1 activo maduro. TGF- $\beta$ 1 latente también puede existir como un gran complejo, en el cual LAP está unido de forma disulfuro a una proteína de unión TGF- $\beta$ 1 latente. LAP es importante para la secreción apropiada del complejo. Se ha sugerido que la región N-terminal de LAP es importante para su interacción con TGF- $\beta$ 1, y esta interacción es esencial para conferir latencia al complejo [149].

La activación de TGF- $\beta$ 1 es vital para la unión a sus receptores celulares y para sus actividades biológicas, como la regulación del crecimiento tumoral. Esta conversión es un paso importante para controlar sus funciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Como TGF- $\beta$ 1 y sus receptores se expresan de forma generalizada, la cantidad de TGF- $\beta$ 1 que es producida es fundamental para la regulación de la actividad de TGF- $\beta$ 1. *In vitro*, TGF- $\beta$ 1 activa puede ser liberada del complejo latente por proteasas, glicosidasas, pH extremo y reactantes de calor. Los mecanismos fisiológicos de activación no se conocen totalmente, aunque se ha sugerido que están involucrados la exposición a especies oxígeno reactivos, uniones a integrina  $\alpha v\beta 6$ , interacción con TSP-1, procesamiento proteolítico por plasmina, y la interacción con el receptor manosa-6-fosfatasa y transglutaminasa tisular [150].

TSP-1 parece ser uno de los activadores fisiológicos más importantes de TGF- $\beta$ 1 *in vivo*. En 1992, Murphy-Ullrich et al. describieron que TSP-1 se unía y activaba a TGF- $\beta$  [87]. Desde esta primera observación, se han usado proteínas de fusión y péptidos sintéticos para estudiar la base molecular de esta interacción, y se han utilizado ratones sin TSP-1 para mostrar que TSP-1 activa a TGF- $\beta$  en los tejidos epiteliales [151]. La activación de TGF- $\beta$ 1 latente por TSP-1 depende de la interacción entre el péptido asociado a latencia (LAP) del TGF- $\beta$  y la activación de la secuencia de TSP-1.

La secuencia de activación de TGF- $\beta$ 1 en TSP-1 se ha localizado en la secuencia RFK entre el primer y segundo TSR (siendo un extremo carboxi-terminal del primero). Una segunda secuencia central de TSP-1, WxxW, ha mostrado ser capaz de unirse al dominio activo de TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, esta secuencia no puede activar al TGF- $\beta$ 1 latente. Existen varias versiones de esta secuencia en TRS de TSP-1 y TSP-2. Aunque los péptidos que contienen WxxW no activan al TGF- $\beta$ 1 latente, pueden bloquear la activación de TGF- $\beta$ 1 por TSP-1 [110].

A concentraciones suficientemente elevadas, los péptidos sintéticos que incluyen la secuencia RFK son suficientes para activar TGF- $\beta$ 1. Ésta se sintetiza como un único polipéptido, antes de ser procesado proteolíticamente hacia el TGF- $\beta$  maduro y un péptido asociado a latencia (LAP). La teoría de reconocimiento molecular se usó para identificar la secuencia en LAP que es responsable

de la interacción con TSP-1. Es una secuencia LSKL en el N-terminal de  $\beta 1$ -LAP y muestra interacción específica con la secuencia RFK en TSP-1. LSKL es capaz de inhibir competitivamente la activación del TGF- $\beta 1$  latente por TSP-1. Estos datos sugieren que la secuencia RFK interactúa con la LSKL para desplazar a LAP y hacer a TGF- $\beta 1$  accesible a sus receptores [85]. Como se conserva LSKL en todos los LAPs de TGF- $\beta 1$ -5, se ha propuesto que TSP-1 puede estar involucrada en la activación de todas esas formas latentes de TGF- $\beta$ . En realidad, se ha observado que TSP-1 puede activar TGF- $\beta 2$  recombinante de una forma LSKL dependiente. Es necesario confirmar la capacidad de TSP-1 de activar otras formas de TGF- $\beta$  latente [110].

Basado en los estudios descritos anteriormente, se ha propuesto un modelo de activación de TGF- $\beta 1$ , en el cual, TSP-1 utiliza un mecanismo de dos pasos para activar TGF- $\beta 1$  latente. La secuencia WxxW de TSP-1 sirve como una secuencia de conexión para interactuar con la parte madura de TGF- $\beta 1$ , la cual ayuda a orientar a TSP-1 en un camino que favorece la unión de la secuencia KRFLK a la LSKL de LAP, causando un cambio configuracional en el complejo latente y exponiendo epitopos que son críticos para la fijación al receptor celular [151].

El miembro más cercano de la familia de TSP a TSP-1, TSP-2, puede inhibir la activación del TGF- $\beta 1$  latente por TSP-1 y, de este modo, regular la actividad de TGF- $\beta 1$ . Se cree que esto se debe a la presencia de la secuencia de unión común WxxW en el TSR de TSP-2. RIR, la secuencia de TSP-2 que corresponde a la secuencia RFK en TSP-1, ha mostrado ser incapaz de activar TGF- $\beta 1$ . Es interesante que estas dos secuencias están en una inserción de cuatro residuos entre el primer y segundo TSR. Cuando TSP-1 y TSP-2 se someten a la digestión de tripsina, la secuencia RIR es destruida preferentemente por la tripsina. La diferencia de sensibilidad a la tripsina de TSP-1 y TSP-2 sugiere que existe una diferencia estructural entre ambas en esta parte de la molécula [110].

El significado fisiológico de la activación de TGF- $\beta 1$  por TSP-1 se ha observado en ratones. Los que carecen de TGF- $\beta 1$  mueren a mitad de gestación o sobreviven sólo unas pocas semanas gracias a factores de crecimiento maternos. La necropsia de los que sobreviven revela una mielopoyesis disregulada, y un síndrome de gasto caracterizado por una respuesta inflamatoria cuyas dianas son el corazón, pulmón, páncreas, estómago, hígado y músculo estriado [152, 153].

La sobreexpresión de TGF- $\beta 1$  tiene también consecuencias catastróficas. Las similitudes histológicas entre los ratones sin TSP-1 y sin TGF- $\beta 1$  son notables en múltiples órganos, incluyendo el pulmón y el páncreas. En los ratones salvajes, tanto TSP-1 como TGF- $\beta 1$  activa se expresan de forma importante en el epitelio bronquial. Coincidiendo con esta alta expresión, la pérdida de TSP-1 y TGF- $\beta 1$  en los respectivos ratones nulos muestra fenotipos pulmonares alterados, similares entre sí, incluyendo hiperplasia epitelial bronquial, hiperplasia de células musculares lisas vasculares,

hemorragia alveolar e inflamación. En los ratones sin TSP-1, TGF- $\beta$ 1 inactivo se puede detectar el epitelio bronquial, aunque los tejidos subyacentes tiñen para TGF- $\beta$ 1 activo. TGF- $\beta$ 1 suprime el reclutamiento de las células inflamatorias hacia el pulmón, así que las anormalidades en los ratones con déficit de TSP-1 deben resultar de una respuesta inmune exagerada contra bacterias que están presentes normalmente. Para probar esta hipótesis directamente se trató a los ratones sin TSP-1 con el péptido KRFK de activación de TGF- $\beta$ 1, pero no con el péptido de control KQFK o PBS, y esto corrigió la anormalidad pulmonar con un alcance tal que los fenotipos son más similares al ratón de tipo salvaje. Por ejemplo, el epitelio de los ratones sin TSP-1 tratados con KRFK tiñen positivamente para TGF- $\beta$ 1 activa. En cambio, los animales de tipo salvaje tratados con el péptido LSKL de LAP, que puede bloquear la activación de TGF- $\beta$ 1 por TSP-1, pierden la tinción positiva para TGF- $\beta$  en el epitelio de las vías aéreas proximales, y causó una hiperplasia epitelial similar a la observada en los ratones carentes de TSP-1 y de TGF- $\beta$ 1 [110].

En el páncreas, la expresión de TSP-1 se ha asociado con las células de los islotes y, en menor medida, con las células intersticiales. Los ratones sin TSP-1 y sin TGF- $\beta$ 1 también muestran cambios morfológicos paralelos en el páncreas, incluyendo inflamación, hiperplasia de células de los islotes e hipoplasia acinar. La tinción fuerte de TGF- $\beta$ s en los acinos de los ratones salvajes está reducida de forma importante en los ratones sin TSP-1. Al igual que en el pulmón, los fenotipos nulos pueden normalizarse con el péptido KRFK de activación de TGF- $\beta$ 1, pero no con el péptido de control. Los animales de tipo salvaje también muestran anormalidades en el páncreas después de ser tratados con el péptido de bloqueo de la activación de TGF- $\beta$ 1, LSKL. Estos datos sugieren que en el pulmón y en el páncreas, y posiblemente en otros órganos, incluyendo hígado, corazón, piel, testículos, hueso y estómago, TSP-1 es el mecanismo principal de activación de TGF- $\beta$ 1, y tiene una función fundamental en el mantenimiento de los fenotipos y funciones normales de estos órganos [110].

Pero, aunque TSP-1 ha mostrado ser el principal activador de TGF- $\beta$ 1 en algunos sistemas orgánicos, no es el único. Esto se ha evidenciado en ensayos donde los ratones sin TGF- $\beta$ 1 muestran un fenotipo mucho más severo que el que muestran los ratones sin TSP-1, y en estos últimos, se puede detectar TGF- $\beta$ 1 activa, aunque en niveles bajos. Por ejemplo, aunque no se puede detectar TGF- $\beta$ 1 activa en el epitelio de las vías aéreas proximales, sí se puede hacer en los tejido subyacentes, y puede detectarse en acinos, pero a niveles de expresión mucho más bajos [154].

En las plaquetas tampoco parece que TSP-1 sea un activador importante del TGF- $\beta$ 1 [155]. Ambas proteínas se secretan de los gránulos- $\alpha$  en respuesta a agonistas como la trombina. TGF- $\beta$ 1 es liberado por los gránulos  $\alpha$  después de la activación plaquetaria por TSP-1, uno de los

componentes fundamentales de estos gránulos. Se ha observado que la TSP-1 purificada de las plaquetas activadas contiene algún TGF- $\beta$ 1 unido, y que la actividad del complejo TSP-1-TGF- $\beta$ 1 explica el 60 % del total de la actividad de TGF- $\beta$ 1 liberada. TSP-1 puede despojarse de TGF- $\beta$ 1 mediante la exposición a pH elevado (pH 11) y esta TSP-1 puede, de una en una, activar al TGF- $\beta$ 1 latente por un mecanismo independiente de células y de proteasa. Ambas formas de TGF- $\beta$ 1, grande y pequeña, pueden ser activadas por TSP-1. Se estima que hay unas 500 moléculas de TSP-1 por cada molécula de TGF- $\beta$ 1 en las plaquetas. A pesar de este exceso de TSP-1, la mayoría de TGF- $\beta$ 1 que es secretado por las plaquetas de tipo salvaje está inactivo. Es más, los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo e inactivo que son secretados por las plaquetas salvajes y las deficitarias de TSP-1 son equivalentes. Esto indica que la mayoría de la TSP-1 que está presente en las plaquetas es incapaz de activar al TGF- $\beta$ 1. Esta pérdida de actividad puede ser debida a la modificación post-translacional de los TSRs o a la presencia de una proteína no identificada que se une a los TSRs de la TSP-1 y bloquea la unión con TGF- $\beta$ 1. Un mecanismo así puede ser necesario para prevenir la activación prematura de TGF- $\beta$ 1 en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas. Este mecanismo parece que no es necesario en las células epiteliales, donde las dos proteínas se expresan de forma constitutiva y se mantiene un nivel basal de TGF- $\beta$ 1 activo [85].

De manera interesante, aunque TSP-1 puede activar potencialmente TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, no parece que sea el principal activador *in vivo* de estos dos factores de crecimiento latentes, puesto que fenotipos de ratones sin TGF- $\beta$ 2 y sin TGF- $\beta$ 3 no muestran paralelismos notables con los ratones sin TSP-1 [110].

En cuanto al crecimiento tumoral, TGF- $\beta$ 1 actúa como un regulador endógeno de la angiogénesis y como factor anti-oncogénico [156]. TGF- $\beta$ 1 activo puede estimular a los monocitos y macrófagos para secretar citoquinas proangiogénicas. Algunos de los aminoácidos de la TSR que activan al TGF- $\beta$ 1 parecen estar también involucrados en el efecto antiangiogénico de la TSP-1 [157]. Varios estudios han descrito que la actividad antiangiogénica de la TSP-1 está mediada por la proteína de membrana CD36. Así, los TSRs funcionan para fijar tanto TGF- $\beta$ 1 como CD36. La expresión de TSR inhibe el crecimiento tumoral a través de la activación de TGF- $\beta$ 1 en xenoinjertos de carcinoma de células escamosas humano. La inyección sistémica de TSRs recombinante inhibe el crecimiento de los tumores experimentales B16F10 a través de la inhibición de la angiogénesis y la activación de TGF- $\beta$ . De este modo, TSP-1 localizado en el entorno tumoral puede funcionar como un supresor del crecimiento de las células tumorales y lo hace activando TGF- $\beta$ 1 en las células tumorales que son sensibles [148].

Los efectos de TGF- $\beta$ 1 en la progresión tumoral pueden ser inhibitorios o estimuladores, dependiendo del nivel de actividad de TGF- $\beta$ 1, el estado del receptor de TGF- $\beta$ 1 [158] o del estadio de progresión tumoral [159]. Por ejemplo, las células del glioma maligno segregan TGF- $\beta$ 1 y pueden activar parcialmente TGF- $\beta$ 1 latente mediante TSP-1 [160]. Mientras que la expresión de TSP-1 en el estroma del carcinoma colo-rectal parece inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral activando TGF- $\beta$ 1 [161], Kawataki et al. encontraron que la sobreexpresión de TSP-1 y TGF- $\beta$ 1 en el tejido aumenta la malignidad de los gliomas generando TGF- $\beta$ 1 activo en el tejido tumoral [162]. Los niveles elevados de TGF- $\beta$ 1 activos en los gliomas malignos pueden causar que estos tumores se hagan más resistentes a TGF- $\beta$ 1 y TSP-1. De forma similar, la exposición prolongada a TSP-1 puede causar la proliferación de células tumorales preexistentes que son resistentes a sus efectos anti-angiogénicos [163]. Además, las células tumorales genéticamente inestables por sí mismas pueden promover la proliferación de una subpoblación de variantes que sobreexpresan factores angiogénicos como compensación a los efectos inhibitorios de TSP-1, y de este modo favorecer la neovascularización. Esto puede permitir que los tumores crezcan de manera más eficiente ante la presencia de TSP-1 y TGF- $\beta$ 1 activo. También se ha observado que un receptor I mutado de TGF- $\beta$ 1 está asociado con la metástasis de carcinoma de mama, linfoma T cutáneo, cáncer de ovario y cáncer de cabeza y cuello, el cual puede ayudar a las células a escapar del efecto inhibidor del TGF- $\beta$ 1. También se ha descrito que TGF- $\beta$ 1 pierde o altera su función supresora de tumor en respuesta a cambios en las actividades del receptor de andrógenos, factor de crecimiento insulina-like I, Akt y mTOR durante la progresión de malignidad en la próstata [164]. Además, la complejidad y la dualidad de las funciones de TGF- $\beta$ 1 está demostrada a fondo por su capacidad de suprimir la proliferación de las células tumorales en estadios tempranos, mientras que más tarde en la progresión tumoral, aumenta la invasión vascular y la metástasis afectando al estroma del huésped [165].

Asimismo, los mecanismos que apoyan la inhibición del crecimiento tumoral y la angiogénesis mediada por TGF- $\beta$ 1 son complejos y varían según el tipo de tumor. Las relaciones entre TSP-1, TGF- $\beta$ 1 y el crecimiento tumoral necesitan ser investigadas más a fondo en diferentes tipos tumorales a fin de determinar las vías de señalización comunes para la regulación de la angiogénesis y el crecimiento tumoral [148].

### **Inhibición de la angiogénesis por TSP-1**

TSP-1 fue la primera proteína inhibidora natural de la angiogénesis identificada. Estudios posteriores han mostrado que TSP-1 y -2 inhiben la angiogénesis en múltiples ensayos in vivo e in

vitro. Además, la sobreexpresión de TSP-1 o -2 en varios tipos celulares inhiben la angiogénesis y el crecimiento tumoral cuando estas células se implantan en ratones.

TSP-1 juega un papel crítico en la inhibición de la angiogénesis, lo que produce una inhibición del crecimiento tumoral y de las metástasis experimentales [166]. En las células endoteliales, TSP-1 inhibe su migración in vitro e induce su apoptosis tanto in vivo como in vitro. El papel que juega la TSP-1 en la progresión tumoral está íntimamente asociado con los niveles de expresión del gen supresor tumoral p53 y de oncogenes como myc y ras, así como de la actividad de TGF- $\beta$ 1 [148].

■ **Los niveles de TPS-1 están regulados por los genes de supresión tumoral y oncogenes**

La angiogénesis tumoral está regulada por un equilibrio dinámico entre factores positivos y negativos, los cuales se pueden modular por genes supresores tumorales, oncogenes y otros genes relacionados [148]. El producto del gen supresor tumoral p53 es un factor de transcripción que induce la detención del crecimiento y la apoptosis. También hay pruebas sustanciales de que p53 regula la expresión de TSP-1 y que la pérdida de la expresión de p53 de tipo salvaje puede contribuir al desarrollo de un fenotipo angiogénico disminuyendo la expresión de TSP-1 e incrementando los niveles de VEGF . Por ejemplo, se observó que los fibroblastos de pacientes con síndrome de Li-Fraumeni portan una mutación que se traduce en un alelo de p53 inactivo [167], lo cual se correlaciona con la reducción de la expresión de TSP-1 y con el cambio a un fenotipo estimulador angiogénico [168] [169]. Además, Gautman et al. describieron que la transfección de ADN del p53 PEI mediante aerosol dentro de los ratones con tumores de pulmón B16-F10 causa un importante descenso de la carga tumoral, inhibiendo las metástasis pulmonares, incrementando la supervivencia, elevando la expresión de TSP-1 y disminuyendo la de VEGF en el tejido pulmonar y en suero [170]. La expresión de TSP-1 está además influenciada por el estado de p53 en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata [171], el carcinoma epitelial de ovario avanzado [172] y en el glioma [173]. En el melanoma maligno, la adquisición de p53 mutante, los niveles bajos de TSP-1 y la elevada infiltración microvascular, pueden estar interrelacionados y correlacionados con un fenotipo metastásico. En el cáncer de colon y vejiga humanos, los bajos niveles de expresión de TSP-1 y el incremento de la densidad vascular se correlacionan con la pérdida de expresión de p53. Sin embargo, el descenso de expresión de TSP-1 en el cáncer de vejiga puede que preceda a la pérdida de p53. Además, la pérdida de la expresión del gen de TSP-1 en los ratones con déficit de p53 lleva a la disminución de la supervivencia global y a cambios imperceptibles en el espectro de los tumores observados [110]. Asimismo, p73, un homólogo de p53, puede

jugar un papel potencial en la regulación de la angiogénesis tumoral por p53. Vikhanskaya et al. han encontrado que la sobreexpresión de p73 en las células del carcinoma ovárico llevan a una expresión disminuida de TSP-1 y a unos niveles incrementados de VEGF (siendo ambos dependientes de p53), lo que resulta en un incremento de la angiogénesis en los tumores con sobreexpresión de p73 [174].

Al contrario que los datos anteriores, otros estudios han fracasado a la hora de demostrar la correlación entre el estado de p53, la expresión de TSP-1 y la progresión tumoral. De hecho, se ha descrito que la expresión del gen de TSP-1 está inversamente relacionada con la acumulación de p53 en los casos de cáncer de colon [175]. Un estudio de Grossfeld et al. no encontró asociación significativa entre la expresión de TSP-1, el estado de p53, la densidad microvascular y la respuesta después de la prostatectomía radical en pacientes con cáncer de próstata en estadio T3 [176]. Además, p53 no afecta a la expresión de TSP-1 en el colangiocarcinoma microvascular [177]. Aunque la pérdida de la actividad antiangiogénica de la TSP-1 funciona como un hecho clave en la transición a un fenotipo angiogénico durante el desarrollo del cáncer de vejiga, la alteración en la expresión de TSP-1 no se puede atribuir al p53 [178]. Por último, en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el ARNm de TSP-1 está inversamente asociado con la expresión de la proteína del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) pero no con el cambio en la expresión del gen p53. Sin embargo, la presencia de mutaciones de p53 se relaciona altamente con niveles elevados de la expresión de la proteína VEGF y con la angiogénesis [179]. Así, la regulación de TSP-1 por p53 puede ser específica de célula o específica de tejido y pueden estar involucrados diferentes mecanismos en varios tipos de tumores.

La expresión de TSP-1 también está regulada por oncogenes. El gen de TSP-1 está disregulado por jun, src y myc. La activación de myc infra-regula la expresión de TSP-1 mediante el incremento del volumen de las copias de TSP-1 o del descenso de su estabilidad. Ras ha mostrado inhibir la expresión de TSP-1 promoviendo la fosforilación y de este modo la activación de myc. A este respecto, la actividad colaboradora de los oncogenes ras y myc lleva a la disregulación de la expresión de TSP-1, lo que facilita la formación tumoral y la angiogénesis. Además, el gen supresor del tumor de Wilms, WT1, reprime la transcripción de TSP-1 uniéndose al promotor de la TSP-1 en respuesta a la sobreexpresión de c-Jun.

En resumen, la función de la TSP-1 en la progresión tumoral está asociada con una angiogénesis disminuida, la cual puede estar regulada por p53, un gen que está mutado aproximadamente en el 50 % de los cánceres. El p53 de tipo salvaje es uno de los varios genes de

supresión tumoral humanos que pueden causar el cambio de un fenotipo angiogénico a otro angioestático en las células tumorales mediante la modulación de la expresión de TSP-1. Esta regulación parece ser específica del tipo de célula y presumiblemente del tipo de tejido. Además, las señales hipóxicas y oncogénicas puedan interactuar con el ambiente tumoral para inhibir la expresión de TSP-1 e inducir la de VEGF y así promover el cambio hacia un fenotipo angiogénico. Asimismo, es importante destacar que los genes de supresión tumoral y los oncogenes regulan la expresión y la actividad de muchos otros factores que pueden afectar directa o indirectamente a la regulación de la angiogénesis [148]

■ **La inhibición del crecimiento tumoral y las metástasis por TSP-1 a través de la regulación de la angiogénesis**

1. El cambio angiogénico y el equilibrio entre factores angiogénicos y angioestáticos

Factores de crecimiento como VEGF y bFGF son esenciales para la angiogénesis tumoral porque estimulan la proliferación y la migración de las células endoteliales mientras que inhiben su apoptosis [180]. La retirada de las señales de supervivencia asociadas a VEGF provoca la apoptosis de las células endoteliales durante el desarrollo embrionario así como durante la progresión tumoral. Además, la actividad inhibidora de VEGF en los tumores causa el desprendimiento y la apoptosis de la célula endotelial, seguido del colapso vascular, hemorragia y necrosis tumoral. Alteraciones en este equilibrio dinámico pueden determinar en última instancia dónde ocurre el cambio angiogénico en el microambiente tumoral. Se puede activar la angiogénesis durante el estadio temprano, preneoplásico, del tumor [148]. En este estadio, el equilibrio entre estimuladores e inhibidores angiogénicos está alterado sólo en lugar del tumor primario. En los estadios clínicos avanzados, sin embargo, ya no se localizan las alteraciones en la expresión de los factores angiogénicos. Mientras que el avance del tumor alcanza los microvasos adyacentes, los factores angiogénicos, como VEGF y bFGF, son liberados por el tumor. Éstos estimulan para que las células endoteliales crezcan, migren hacia el tumor y se organicen formando una red de capilares [181]. La interacción sostenida entre las células tumorales y las estromales (por ejemplo: endoteliales, macrófagos, fibroblastos, etc.), la liberación prevalente de factores y la extensión de la angiogénesis determinan la dirección y el grado de desarrollo tumoral. Por ejemplo, algunos inhibidores angiogénicos, como la angioestatina, alteran el equilibrio dinámico entre la apoptosis y la proliferación de las células tumorales, causando un estado de relativa hibernación con respecto

a la progresión tumoral. Actualmente se acepta que la expresión moderada o fuerte de VEGF está asociada de forma significativa con elevada densidad microvascular en los carcinomas endometriales, mientras que la alta expresión de TSP-1 en tejidos tumorales juega un papel regulador negativo en la angiogénesis tumoral [148].

## 2. TSP-1 y la regulación de la angiogénesis tumoral

Se han realizado estudios con péptidos sintéticos para localizar la actividad antiangiogénica de la TSP-1 en los TSRs, implicándose tres secuencias, adyacentes unas a las otras, dentro del segundo TSR de la TSP-1.

El péptido sintético, denominado MAL-II, que contiene la secuencia CSVTCG, fue uno de los primeros en ser identificado. Esta secuencia parece unirse al CD36, por lo que a éste se le considera un receptor esencial. Varias líneas de investigación indican que la actividad antiangiogénica de la TSP-1 está mediada por la inhibición de la migración de las células endoteliales y la inducción de la apoptosis mediante la interacción de la TSP-1 con CD36 [120, 182]. Se ha observado que la expresión de CD36 se correlaciona con una menor vascularización estromal y con un mejor pronóstico en el cáncer de colon [183]. La interacción de TSP-1 con CD36 juega un papel importante en la actividad antiangiogénica de la TSP-1, tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vitro*, CD36 media la inhibición de la migración y formación de canales de la célula endotelial por TSP-1. Tanto las proteínas de fusión GST que contienen la región de fijación de TSP-1 con CD36 y anticuerpos IgG contra CD36 bloquean la inhibición de la migración endotelial causada tanto por TSP-1 como por péptidos antiangiogénicos que contienen la secuencia CSVTCG. Las moléculas que fijan CD36, incluyendo colágeno, LDL oxidado y anticuerpos IgM anti-CD36, pueden también inhibir la migración de la célula endotelial [120]. *In vivo*, TSP-1 puede inhibir la angiogénesis en los ensayos de neovascularización corneal. Por el contrario, no inhibe la neovascularización corneal inducida por FGF-2 en los ratones sin CD36, mientras que otro inhibidor angiogénico, la angioestatina, que presumiblemente no usa a CD36 como receptor, la inhibe en estos ratones. De manera similar, en los ratones sin Fyn, TSP-1 no bloquea la angiogénesis inducida por FGF-2, mientras que la angioestatina sí lo hace. Jiménez et al. han descrito que la activación de la cascada CD36-Fyncaspasa-3-p38MAPK es esencial para el efecto antiangiogénico de la TSP-1, así como para la inducción de la apoptosis de células endoteliales. Estos autores también sugieren que el efecto antiangiogénico de la TSP-1 depende, al menos en parte, de su capacidad para inducir la apoptosis de las células endoteliales [182]. El

hecho de que la interacción de TSP-1 con CD36 provoque rutas de señalización intracelulares explica en parte la capacidad de TSP-1 de inhibir la angiogénesis estimulada por una gran variedad de inductores.

Mientras que unos estudios han confirmado la actividad del péptido Mal-II, otros posteriores se han planteado interrogantes sobre la precisión de su implicación en la actividad antiangiogénica de la molécula intacta de TSP-1. Cuando Mal-II está compuesta por todos sus aminoácidos en configuración L, como ocurre in vivo, no inhibe la angiogénesis. La aparente actividad de Mal-II se debe a la racemización de algunos de los aminoácidos a la conformación D durante la síntesis.

Se ha descrito un péptido adyacente a la secuencia CSVTCG, que incluye la secuencia RFK y la WSHWSPW y que inhibe la angiogénesis inducida por FGF-2 pero no por VEGF. Aquellos péptidos donde la secuencia RFK está mutada también están activos, lo que sugiere que la activación de TGF- $\beta$ 1 no juega un papel importante. Así como la secuencia WSHWSPW se une a heparina, se ha propuesto que este péptido compita con FGF-2 por los sitios de unión a proteoglicanos en la superficie de la célula endotelial. Sin embargo, no está claro que la afinidad de la secuencia WSHWSPW por los proteoglicanos sea lo suficientemente fuerte para competir con FGF-2 [184].

Existe una tercera secuencia adyacente a la CSVTCG, denominada GVITRIR, que es un inhibidor potente de la migración de la células endotelial cuando el péptido se sintetiza con D-isoleucina. Esta secuencia es similar a la secuencia activa dentro de la región homóloga al procolágeno de la TSP-1 [185].

También se han identificado mecanismos de inducción de la apoptosis de las células endoteliales independientes de CD36. Guo et al. describieron que TSP-1 o péptidos que contienen secuencias TSR inducen la apoptosis de estas células en la aorta bovina, una célula que no expresa CD36 o lo hace escasamente [186]. Otros datos indican que TSRs pueden fijar  $\beta$ 1 integrinas y que esta interacción puede inhibir la migración de la célula endotelial. También se ha descrito que CD36, CD9 y  $\beta$ 1 integrinas forman un complejo en las plaquetas. Se ha detectado un complejo de CD36 con  $\beta$ 1 integrinas en las células de la vena umbilical humana que se transforman y expresan CD36. Los TSRs pueden formar parte de un complejo multiproteico que inhibe la función de la célula endotelial. En ausencia de CD36,  $\beta$ 1 integrinas pueden ser suficientes para mediar en los efectos de TSP-1 [148].

Se han propuesto otras dos regiones de TSP-1 que median en el efecto antiangiogénico de la misma. Por un lado, el dominio globular amino-terminal tiene alta afinidad por el sitio de unión de la heparina, el cual se ha sugerido que compite con factores de crecimiento por los sitios de unión de proteoglicanos. Por otro lado, se han obtenido resultados opuestos sobre el efecto de la interacción del carboxi-terminal de la TSP-1 con CD47. Se ha descrito que la expresión elevada de CD47 se correlaciona con un incremento en la apoptosis de la célula endotelial. Parece que la fijación del dominio C-terminal de la TSP-1 a CD47 estimula la migración de la célula endotelial, pero inhibe la angiogénesis. En ausencia de FGF-2, la adición de altas concentraciones de TSP-1 ( $>10$  nM) estimula la migración endotelial [187]. Este efecto es inhibido por los anticuerpos anti-CD47 que bloquean la unión con TSP-1. Los anticuerpos que bloquean la unión de TSP-1 a CD36 tampoco tienen este efecto. Como la actividad en ensayos sobre migración de la célula endotelial normalmente es consistente con la actividad en los ensayos sobre angiogénesis, esta información sugiere que el C-terminal de la TSP-1, y su interacción con CD47, estimulan la angiogénesis. Sin embargo, recientemente se ha descrito que un péptido que contiene la secuencia de unión a CD47 de este dominio inhibe la angiogénesis [188]. Este péptido inhibe *in vitro* la formación de vasos por las células endoteliales capilares del cerebro, así como la angiogénesis inducida por FGF-2 en la córnea. Se requieren estudios adicionales para esclarecer los efectos del dominio C-terminal sobre la angiogénesis.

TSP-1 además puede inhibir la angiogénesis a través de la inhibición de MMP9. La sobreexpresión de TSP-1 disminuye los niveles de MMP9 activo en los tumores de mama y los ratones con déficit de TSP-1 muestran niveles más elevados de MMP9 activa que los de tipo salvaje. El nivel de MMP9 activa se correlaciona con la cantidad de VEGF unido a VEGFR-2. De este modo, TSP-1 inhibe la movilización de VEGF de la matriz extracelular inhibiendo a MMP9 activo [189]. TSP-1 también puede inhibir la actividad de VEGF interactuando con él directamente.

Se han usado gran variedad de modelos con ratones para demostrar que la disregulación de TSP-1 se asocia con el desarrollo de un fenotipo tumorigénico y angiogénico. Gutierrez et al. han descrito recientemente que TSP-1 afecta tanto a la angiogénesis como a la apoptosis de la célula tumoral. Encontraron que TSP-1 tiene un gran impacto sobre el crecimiento tumoral durante los estadios iniciales de iniciación y desarrollo del tumor en ratones Min(+) (neoplasia intestinal múltiple)[190]. Además, un estudio con carcinomas

de estómago indicó que la metilación aberrante de ADN en la región promotora del gen de la TSP-1, causa una inactivación transcripcional y reducción de la expresión de la proteína TSP-1 [191]. En el cáncer colo-rectal, la TSP-1 expresada en el estroma inhibe la angiogénesis tumoral y suprime el crecimiento del tumor activando TGF- $\beta$ 1 [161].

Así como la expresión baja de TSP-1 se correlaciona con un aumento de la vascularización y crecimiento tumoral, la sobreexpresión de TSP-1 suprime el crecimiento tumoral [192, 193]. Se ha propuesto que la TSP-1 funciona como un supresor tumoral actuando como barrera de la matriz en el límite entre el tumor y el estroma donde detiene la angiogénesis tumoral e impide la invasión de las células tumorales y su expansión. La transfección de portadores de expresión de TSP-1 completa inhibe el crecimiento de las células del carcinoma escamoso y del carcinoma de mama. Los tumores que crecen de estas células en ratones presentan una densidad vascular disminuida y la sobreexpresión de TSP-1 conlleva a un incremento en la cantidad de matriz extracelular que se deposita alrededor del tumor. Este efecto puede que se relacione con la habilidad de TSP-1 de activar el TGF- $\beta$ 1, lo cual ha mostrado incrementar la síntesis de matriz. El carcinoma escamoso es un cáncer maligno que presenta un patrón de crecimiento destructivo y tiene la capacidad de metastatizar. Estudios de líneas celulares de carcinoma escamoso han revelado una delección en el cromosoma 15, el cual contiene el gen de la TSP-1[192]. Además, la angiogénesis tumoral en carcinomas escamosos experimentales está reducida significativamente en los tumores que expresan TSP-1. Se ha descrito que la TSP-1 inhibe de forma eficaz el crecimiento del melanoma experimental, un cáncer de mal pronóstico y elevada resistencia al tratamiento. También inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral en el sarcoma de Kaposi, que se caracteriza por una angiogénesis prominente [148]. Durante la progresión de la enfermedad maligna en la próstata, la expresión de TSP-1 está disregulada mientras que está incrementada la de factores angiogénicos, bFGF y/o VEGF, lo que promueve la angiogénesis y de esta forma favorece el crecimiento tumoral. La sobreexpresión de TSP-1 también lleva a un desarrollo retrasado y reducido de lesiones premalignas, hiperplasias epiteliales inducidas farmacológicamente, y suprime la angiogénesis tumoral y las metástasis a distancia [148]. La disregulación de la expresión de TSP-1 y la sobreexpresión de VEGF por anoxia contribuye de forma significativa al desarrollo del glioblastoma, y un incremento en la expresión de TSP-1 es suficiente para suprimir con fuerza la tumorigénesis de la célula del glioblastoma in vivo [194]. En los pacientes con cáncer de pulmón de células

no pequeñas, se ha encontrado una correlación inversa entre la expresión de TSP-1 y la densidad microvascular, donde la expresión reducida se asocia con una supervivencia significativamente más corta en algunos pacientes. De forma similar, en el carcinoma papilar de tiroides, la expresión de TSP-1 se correlaciona inversamente con el grado de invasión del tumor primario hacia órganos vecinos y con la densidad microvascular. Además, la tasa de supervivencia a los 5 años es significativamente más alta en aquellos pacientes que muestran una expresión elevada de TSP-1 que en el grupo de baja expresión [148]. La frecuencia de recurrencia hepática es más alta en pacientes cuyos tumores colo-rectales son VEGF positivos y TSP-1 negativos, de manera significativa. En el carcinoma ductal in situ (DCIS), la TSP-1 se expresa en el estroma y en la membrana basal inmediatamente adyacente, mientras que esta expresión estromal se pierde en los DCIS con características histológicas más agresivas [195, 196]. La expresión reducida de TSP-1 también se relaciona con un fenotipo angiogénico de carcinoma de cérvix invasor [197]. A pesar del predominio de evidencia que indica que la TSP-1 inhibe la tumorigénesis, ciertos estudios han encontrado la relación opuesta. Por ejemplo, Yasui et al. describieron que la expresión de TSP-1 elevada se asocia con un fenotipo angiogénico de carcinoma gástrico [198]. Además, la expresión de TSP-1 aumentan la agresividad tumoral en los colangiocarcinomas intrahepáticos (ICC) [199]. También se ha encontrado que TSP-1 puede favorecer la expresión de la MMP9 en el carcinoma gástrico, en el cáncer de páncreas in vitro y en el cáncer de mama in vitro [200]. La expresión de MMP9 está asociada con la adquisición de un fenotipo agresivo con potencial metastásico elevado. Además, TSP-1 regula de forma positiva el sistema plasminógeno/plasmina y promueve la invasión celular del tumor de mama [201]. Es posible que aunque la expresión elevada de TSP-1 sea una respuesta biológicamente protectora, el crecimiento in vivo de variantes de las células tumorales preexistentes en los tejidos tumorales puedan secretar altos niveles de factores angiogénicos que contrarrestan el efecto inhibitorio de la TSP-1 sobre la neovascularización, con el resultado final del desarrollo de resistencia a TSP-1 del tumor. Puesto que la TSP-1 puede favorecer la migración de las células tumorales, puede promover el crecimiento y la invasión tumoral cuando se debilita su efecto antiangiogénico [202].

TSP-1 ha demostrado inhibir la angiogénesis mediante:

- a) la inhibición de la migración de la célula endotelial,
- b) la inducción de la apoptosis de la célula endotelial,

- c) antagonizando las señales de supervivencia mediadas por VEGF,
- d) inhibiendo la movilización de VEGF por MMP9, y
- e) uniéndose directamente a VEGF.

Además, TSP-1 puede inhibir la angiogénesis mediante la reducción del número de progenitores de células endoteliales circulante. La importancia relativa de estos mecanismos probablemente es diferente en los distintos tipos de tumores.

TSP-1 es una molécula reguladora y su función depende del contexto espacial y temporal. Al ser una proteína multidominio, en algunos casos, los dominios realizan actividades opuestas debido a que se unen a receptores diferentes que afectan a distintas vías de señalización. La complejidad de su función es todavía mayor debido al hecho de que altera la actividad de otras moléculas reguladoras como TGF- $\beta$  y MMP9. Por ello, es inevitable obtener resultados opuestos y aparentemente contradictorios en el estudio de la TSP-1 [148].

Así, mientras que la mayoría de los estudios evidencian que la TSP-1, los TSRs, o los péptidos derivados de los TSRs inhiben la angiogénesis, existen algunas investigaciones en las que se observa que la TSP-1 la promueve. En este caso, la estimulación de la angiogénesis se debe al reclutamiento de células inflamatorias, la estimulación de miofibroblastos o la estimulación de la migración de las células endoteliales tanto directa como indirectamente. Además, el dominio N-terminal de la TSP-1 (NTSP-1), tanto sus productos de proteólisis como en forma de proteína recombinante, estimula la angiogénesis. En un estudio realizado en la córnea de conejos, los autores concluyen que el efecto estimulador de la TSP-1 se debe a la activación incrementada y la quimiotaxis de los polimorfonucleares [203]. Estos estudios demuestran que la TSP-1 estimula el crecimiento y la migración de los miofibroblastos, los cuales, de uno en uno, estimulan la angiogénesis, una conclusión que coincide con los artículos que muestran que la TSP-1 estimula de forma parecida la proliferación y migración de las células musculares lisas. Esto sugiere que existe un mecanismo a través del cual la TSP-1 puede promover la angiogénesis estimulando otros tipos celulares en algunos ensayos, a pesar de que muchos datos también indican que la TSP-1 inhibe el comportamiento de la célula endotelial durante la angiogénesis [148].

### 1.3.4. TSP-1 en el tejido mamario normal y tumoral

La TSP-1 está presente a altas concentraciones en la leche, en otras secreciones mamarias y en el contenido de algunos quistes. TSP-1 es un componente de la fase acuosa de la leche, encontrándose grandes cantidades en el calostro, y sus niveles caen durante la transición del calostro a la leche madura. Se ha observado también que las mamas con carcinoma tienen un contenido de TSP-1 mayor que las mamas con patología benigna, tanto en secreciones como en los citoplasmas de las células malignas [204].

Aunque la TSP-1 se produce en las plaquetas y se almacena en sus gránulos  $\alpha$ , también se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos, así como en una gran variedad de otras células. Según varias investigaciones no parece que las plaquetas sean las responsables de los niveles elevados de TSP-1 presentes en el cáncer de mama, ya que se ha observado que la proteína  $\beta$  tromboglobulina específica de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas no sufre cambios y no se encuentra elevada en las lesiones malignas, por lo que parece reflejar que no hay una actividad plaquetaria específica en estas lesiones. El incremento de la vascularización o la estimulación del endotelio pueden explicar, al menos en parte, la elevada presencia de TSP-1 en el tejido maligno (hasta 15 veces mayor que en el tejido benigno) y esto puede jugar un papel importante en la regulación del crecimiento y diseminación de las células malignas. Sin embargo, es posible que tenga otro origen en la mama, además del endotelio, y que esto contribuya a los altos niveles de TSP-1 que se observan en algunos carcinomas [205].

Con estudios de inmunohistoquímica, se ha demostrado que los depósitos excesivos de TSP-1 están presentes en el estroma de los carcinomas de mama, mientras que el tejido mamario normal no muestra tinción para TSP-1 estromal [206] o sólo una débil tinción en la membrana basal de los ductos normales [207]. Además, con hibridación *in situ* se observa que, en la mama normal, el ARNm de TSP-1 se expresa en las células epiteliales mamarias y que TSP-1 está incorporada en la membrana basal de los ductos no productores de leche.

CD36 se ha relacionado con una proteína de la superficie de la célula epitelial mamaria presente en las secreciones mamarias, llamada PAS-IV. Tanto PAS-IV como CD36 interactúan con TSP-1, lo que sugiere que CD36 es un receptor de la superficie celular en los ductos. Por lo tanto, parece que la distribución de TSP-1 y la aparición de sus receptores son dependientes de la actividad secretora de los ductos mamarios. En la mama normal, no se observa tinción de CD36 ni en células mioepiteliales ni en lumenales. Sí se observa, en intensidad variable, en las células endoteliales y membranas de adipocitos. La distribución de algunas proteínas de adhesión (fibronectina, laminina, tenascina) y de integrinas (incluyendo CD51) también se ha descrito en el tejido mamario normal

e informado de que está alterado en los carcinomas. CD51 (integrina  $\alpha v$ ) parece servir como un receptor de TSP-1 en las células mioepiteliales de los ductos no lactantes, así como ocurre en las células endoteliales y del músculo liso. En la mama normal, CD51 se localiza en la superficie basal de las células mioepiteliales, tiñéndose de forma más débil en las células epiteliales lumbales de los ductos.

En cuanto a las lesiones benignas, en el fibroadenoma la tinción para TSP1 es fuerte en la membrana basal inmediatamente adyacente a la superficie basal de las células mioepiteliales y CD51 se tiñe de forma moderada en las células mioepiteliales y epiteliales de los conductos asociados. No se observa tinción ni en mioepiteliales ni en epiteliales lumbales para CD36. Aunque, como en el tejido mamario normal, se observa expresión de CD36 en células endoteliales y adipocitos. La enfermedad quística muestra un perfil similar de tinción para TSP1, CD51 y CD36. Por el contrario, en los adenomas de la lactancia, tanto TSP-1 como CD51 desaparecen de la unión mioepitelial-estromal de los ductos. Sin embargo, TSP-1 se expresa de forma selectiva en los ápices de las células epiteliales secretoras en los ductos lactantes, confirmando que TSP-1 está presente en las secreciones durante el inicio de la lactancia en humanos. En estos casos la tinción para CD36 es de moderada a fuerte en los ápices de las células lumbales.

En las hiperplasia ductal atípica y el tumor phyllodes, lesiones consideradas borderline o pre-malignas, la cantidad de TSP-1 que rodea a los ductos asociados a ambas está elevado en comparación con el tejido normal. CD51 se expresa de forma moderada tanto en las células mioepiteliales como en las epiteliales de los ductos en la hiperplasia atípica, mientras que no muestran tinción en el tumor phyllodes. Además de en las células endoteliales y los adipocitos, se observa fuerte tinción de CD36 en la capa delimitante de fibroblastos que rodea los ductos hiperplásicos asociados a la hiperplasia atípica. Por otro lado, el CD36 sólo se expresa en las células endoteliales y en las membranas de los adipocitos en el tumor phyllodes [207].

La mayoría de los carcinomas invasores, sobre todos los no específicos, presentan áreas de reacción desmoplásica, que suelen permanecer circunscritas, y en ellas se observa un aumento de TSP1 en el estroma que rodea a grupos de células malignas, las cuales son negativas, mientras que la tinción va desapareciendo en el frente infiltrante del tumor. En las áreas in situ del carcinoma ductal, se observa tinción fuerte en la membrana basal que rodea a los ductos que contienen el carcinoma in situ, mientras que no se observa tinción en las células tumorales. En el carcinoma invasor no específico, se observa tinción débil sólo en unas pocas células malignas (10%). Además, en concordancia con estos hallazgos, se ha localizado ARNm de TSP-1 mediante hibridación in situ en las células mioepiteliales que rodean al carcinoma in situ y en los fibroblastos presentes en

las áreas desmoplásicas del carcinoma infiltrante. Las áreas de desmoplasia se asocian además a un incremento en la densidad microvascular. Por otro lado, se ha observado con mayor frecuencia una tinción más intensa en los carcinomas invasores no específicos pobre o moderadamente diferenciados [206].

CD51 en la mayoría de las áreas de carcinoma in situ es débil en las células malignas y aumenta en la capa periférica, lo que se puede interpretar como un remanente de mioepitelio. En los carcinomas invasores no específicos, el CD51 se expresa de forma moderada en algunos grupos de células neoplásicas, siendo la tinción más prominente en las células de la periferia. No se ha observado reactividad para CD36 ni en el carcinoma invasor no específico ni en el ductal in situ. Aunque, al igual que en lesiones benignas y en el tumor phyllodes, sí se observa tinción consistente en las células endoteliales y en las membranas de los adipocitos.

A este respecto, es más comprensible que los fibroblastos sean los responsables de la presencia de TSP-1 en las áreas desmoplásicas de los carcinomas invasores. Esto coincide con el hecho de que los fibroblastos sintetizan y segregan TSP-1 y que ésta promueve la adhesión y el crecimiento de los fibroblastos [208]. Se ha sugerido que la desmoplasia en los carcinomas invasores no específicos puede tener un efecto protector de la invasión tumoral y metástasis. Se han observado elevados depósitos de fibronectina en la desmoplasia, y esta sobreexpresión parece reflejar un bajo potencial metastásico del tumor. Estos hallazgos, por lo tanto, sugieren que la TSP-1 es poco eficaz en promover la migración de las células del carcinoma invasor no específico humano in vitro, lo que enseguida apunta a que TSP-1 en la desmoplasia puede frenar la migración y proliferación de las células del carcinoma invasor no específico in vivo. Además, la ausencia de expresión de CD36 por las células del carcinoma invasor no específico puede explicarse porque TSP-1 es poco eficaz en promover la migración de estas células in vitro.

En las áreas in situ del carcinoma lobulillar, la distribución de TSP-1, CD51 y CD36 es similar a la observada en los ductales. Sin embargo, la mayoría de las células tumorales que se disponen en fila india (40-80 %) muestran tinción fuerte para TSP-1 y CD51. Menos células (30-40 %) fueron positivas para CD36. La coexpresión de TSP-1 y CD36 por las células del carcinoma lobulillar se relaciona con la actividad secretora de estas células, al igual que ocurría en los adenomas de la lactancia. Usando hibridación in situ, también se ha localizado ARNm de TSP-1 en las células del carcinoma lobulillar, pero no en el estroma. De forma interesante, las células del carcinoma invasor no específico no expresan CD36, mientras que sí lo hacen, junto con TSP-1 en algunas poblaciones del lobulillar. La sobreexpresión de  $\alpha1\beta1$  y  $\alpha6\beta1$  integrinas sugiere que puede incrementar la capacidad de estas subpoblaciones neoplásicas lobulillares para unirse e invadir el estroma circundante

[207].

La diferencia de expresión de TSP-1 entre el carcinoma invasor no específico y el lobulillar, puede reflejar las diferencias biológicas de estos dos tipos principales de carcinoma de mama. A este respecto, la coexpresión de TSP-1 y CD36 puede explicar, en parte, la variabilidad en el comportamiento invasor de las células del carcinoma lobulillar. Por el contrario, en ausencia de CD36, los depósitos excesivos de TSP-1 en la desmoplasia pueden frenar la invasión de las células del carcinoma invasor no específico.

La enfermedad maligna está asociada con la secreción de TSP-1 en el estroma de la inmediata vecindad de las células tumorales. Un incremento local de TSP-1 en la membrana basal en el carcinoma de mama puede promover la adhesión de las células malignas y la penetración de la membrana basal. TSP-1 puede ser la clave en la naturaleza infiltrante de estos carcinomas. Esto está respaldado por el hecho de la existencia de una tinción más intensa para la misma en los carcinomas pobremente diferenciados [206].

Algunos autores, sugieren que la TSP-1 producida por las células estromales en el lecho tumoral pueden fomentar la expresión elevada de factores angiogénicos por las células tumorales y, como consecuencia, estas células neoplásicas tienen gran propensión a metastatizar con éxito a distancia. Como la fuerte expresión de TSP-1 se observa ya en estadios iniciales de la enfermedad, así como en algunas patologías premalignas, se cree que se puede desarrollar una resistencia temprana en los tumores de mama primarios como resultado a la alta exposición in situ a la TSP-1 estromal, lo que lleva al desarrollo de tumores altamente angiogénicos y metastásicos [209].

Varios estudios han medido también los niveles de TSP-1 circulantes en el plasma de las pacientes con carcinoma de mama, encontrándose elevados, al igual que en otras neoplasias (tumores ginecológicos, carcinoma colorrectal y leucemia mieloblástica aguda). En el caso del carcinoma de mama, también se ha observado una relación positiva entre los niveles de TSP-1 intratumorales y los circulantes con la densidad microvascular intratumoral, lo que sugiere que la TSP-1 tiene un papel angiogénico más que antiangiogénico. También se apunta a que los elevados niveles circulantes de TSP-1 parecen derivar del tumor primario más que de otro origen desconocido [210]. Además, se ha demostrado una relación directa entre los niveles plasmáticos de TSP-1 y el estadio del cáncer, encontrándose los niveles más altos en mujeres con cáncer metastásico, por lo que se correlaciona el nivel de TSP-1 en plasma con la progresión del cáncer de mama. Así, se ha propuesto a la TSP-1 como un biomarcador serológico ya que su determinación puede tener valor clínico como marcador de estadio y metástasis [210, 211].

Los niveles plasmáticos de TSP-1 también se han relacionado con el estado de los receptores de estrógenos y progesterona, encontrándose más altos en los tumores negativos para RE, los cuales tienen un comportamiento más agresivo [211]. Según varios estudios, los estrógenos parecen regular al CD36 y también a la TSP-1, tanto en el carcinoma como en la glándula mamaria normal. Así, se ha visto que bajo la exposición a estrógenos, algunas células tumorales expresan el ARNm de la TSP-1 y producen la proteína. Por tanto, se piensa en la posibilidad de que los tumores de mama puedan producir un ambiente proangiogénico en el cual la proteína TSP-1 inducida por el estradiol o interactúa con otras proteínas o se divide generando regiones angiogénicas, que llevan por último a la proliferación celular y a la progresión tumoral [212].

La sobreexpresión de HER2 se relaciona con un efecto favorecedor de la proliferación, migración, metástasis y angiogénesis tumoral. Según se ha plasmado en diferentes estudios, es capaz de aumentar la producción de algunos factores angiogénicos, como VEGF e IL-8 y por otro lado disminuir la producción de TSP-1, fomentando así la angiogénesis [213, 214, 215, 216]. Según estudios realizados por Hong et al., la sobreexpresión de HER2/neu es capaz de disminuir la expresión de TSP-1 en las células tumorales, que a su vez se encuentra elevada en el estroma tumoral debido a una reacción estromal compensadora secundaria, e induciendo así a la angiogénesis [217].

TSP-1 está presente, aunque en una concentración mucho más baja, en el tejido normal y probablemente ayude a una función fisiológica normal. La secreción elevada de TSP-1 puede ser parte de unos cambios adaptativos fisiológicos de la matriz extracelular asociados con la proliferación glandular antes y durante la lactancia. Esto puede explicar los elevados niveles de TSP-1 en el calostro. Investigaciones más a fondo sobre el posible papel de la TSP-1 en la enfermedad maligna han observado que el cáncer de mama que aparece durante la lactancia suele ser más agresivo y con mayor tasa de mortalidad. Así que TSP-1, que normalmente tiene una función fisiológica, se convertiría entonces en un enemigo para el huésped, favoreciendo la adhesión de la célula maligna y las metástasis [206].

El origen y la función exacta de TSP-1 en el cáncer de mama no están todavía claros. In vitro, TSP-1 favorece la fijación, migración e invasión de las células del carcinoma mamario, lo que sugiere que la matriz rica en TSP-1 en el carcinoma invasor no específico es un factor favorable para la progresión tumoral. Sin embargo, en otros estudios TSP-1 muestra una actividad antiangiogénica. Además, la sobreexpresión de TSP-1 en las células tumorales inhibe el crecimiento tumoral in vivo mediante la reducción de la angiogénesis. Por el contrario, cuando se daña la matriz extracelular, TSP-1 estimula a los miofibroblastos, los cuales producen factores angiogénicos [208]. Como las células endoteliales sintetizan TSP-1, la proliferación vascular inducida por la neoplasia puede ser

la responsable de esta secreción de TSP-1 en el estroma vecino a las células malignas. Sin embargo, según los resultados de otros estudios, puede que se sintetice tanto en las células tumorales como en las estromales y en conjunto se segregan en el estroma de la vecindad [206].

Como clásicamente se considera que la TSP-1 es un potente inhibidor de la angiogénesis, su expresión puede suprimir las metástasis secundariamente a la inhibición del tumor primario. Pero por el contrario, la TSP-1 dentro del microambiente tumoral parece promover la migración de las células tumorales y su intravasación, y este efecto puede involucrar la activación del TGF- $\beta$ . Los niveles de TSP-1 en plasma son más altos en los pacientes con tumores avanzados que en la enfermedad temprana, y estos niveles son significativamente más altos que el de los controles normales. Además, las pacientes con metástasis ganglionares tienen un nivel de TSP-1 más alto en plasma. El efecto global de la TSP-1 sobre las metástasis puede variar según el tipo de tumor y puede depender del equilibrio entre el efecto antiangiogénico sobre las células endoteliales y el efecto promigratorio sobre las células tumorales [218].

Se ha descrito que la p53 podría regular en parte la angiogénesis tumoral. Se cree que en estado salvaje puede aumentar la expresión de TSP-1 y de esta forma inhibir la angiogénesis, intentando así frenar el crecimiento tumoral [219]. Aunque se han realizado otras investigaciones en las que no se ha encontrado una asociación entre la expresión de TSP-1 y la sobreexpresión de p53 [220], así como tampoco con VEGF, el factor angiogénico más importante.

En cuanto a los subtipos moleculares de mama, no hay investigaciones que los relacionen directamente con la expresión de TSP-1.

## Capítulo 2

# Planteamiento del tema

La angiogénesis es el proceso de creación de nuevos vasos a partir de otros preexistentes que sucede tanto en condiciones fisiológicas como en algunas patológicas, en especial en el desarrollo del cáncer. En éstos, el desarrollo de la angiogénesis depende de la existencia de un desequilibrio entre factores proangiogénicos, que favorecen la formación de los nuevos vasos, y antiangiogénicos, que se oponen a esta acción.

Una de las neoplasias donde se ha estudiado en profundidad el papel de la angiogénesis es en el carcinoma de mama. Múltiples investigaciones han llegado a la conclusión de que en el cáncer de mama la angiogénesis juega un papel primordial tanto en el crecimiento tumoral local como en el desarrollo de metástasis a distancia. Ello ha dado lugar, en las últimas décadas, a que la inhibición de la angiogénesis se haya convertido en una estrategia atractiva para el tratamiento del cáncer de mama, sobre todo en aquellas pacientes con carcinomas refractarios a otras terapias.

Se han descrito numerosos factores proangiogénicos expresados por este tipo de tumores, siendo VEGF (VEGF-A) uno de los más importantes y estudiado. Sin embargo, la información acerca de los factores antiangiogénicos y su función en el cáncer de mama es mucho menor. TSP-1 se ha considerado tradicionalmente un factor antiangiogénico natural. Su poder antiangiogénico se ha puesto de manifiesto en tumores de diferente origen, siendo capaz de frenar el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Esta función se ha descrito en el carcinoma de mama en numerosas publicaciones. Sin embargo, existen estudios donde se han obtenido resultados opuestos, de forma que TSP-1 podría favorecer la angiogénesis en distintas estirpes tumorales, entre las que se encuentra el carcinoma de mama. Algunos modelos experimentales han mostrado que la sobreexpresión de TSP-1 en el carcinoma de mama reduce su capacidad de crecimiento y de metástasis.



Pero por otro lado, se han relacionado niveles plasmáticos altos de TSP-1 con una mayor densidad microvascular (DMV) y con la enfermedad en estadios avanzados, así como una mayor expresión en tumores pobremente diferenciados. Por este motivo su papel en la progresión tumoral sigue sin estar claro.

En un intento de averiguar el posible rol que ejerce la TSP-1 en el desarrollo del carcinoma de mama, nos planteamos realizar la valoración de la expresión de TSP-1 tanto en el estroma como en las células tumorales mediante estudio inmunohistoquímico de 266 casos de carcinoma, usando la técnica de tissue microarrays (TMA) o matrices de tejido, y su relación con diferentes características clínico-patológicas y factores pronósticos del carcinoma de mama: el tipo histológico, el tamaño tumoral, el grado histológico, la presencia de metástasis ganglionares, el estado de expresión de receptores hormonales y de HER2, el índice de proliferación celular (Ki67) y la expresión de p53, así como con la expresión de VEGF. Por otro lado también se valoran mediante inmunohistoquímica los fenotipos luminal y basal en la serie y la expresión de TSP-1 en ambos.

En definitiva se persigue:

1. Conocer la expresión de TSP-1 en los diferentes tipos y grados histológicos del carcinoma de mama, su relación con factores pronósticos determinantes como el tamaño tumoral y la existencia de metástasis ganglionares, así como con la expresión de receptores de estrógenos y progesterona, HER2, Ki67, p53 y VEGF.
2. Conocer la expresión de TSP-1 en los carcinomas de fenotipo inmunohistoquímico asociado a su origen en células luminales o basales.
3. Intentar averiguar la posible relación de la expresión inmunohistoquímica de TSP-1, con la mayor o menor agresividad y el valor pronóstico en el carcinoma de mama.

## Capítulo 3

# Material y métodos

### 3.1. Población de estudio

Para la realización de este estudio se han seleccionado 266 casos de pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama invasor, durante el periodo transcurrido entre 1996 y 2002, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga. La selección se realizó siguiendo los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión:

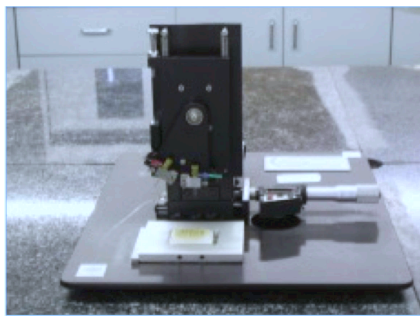
1. Carcinomas de mama extirpados quirúrgicamente, mediante mastectomía o cirugía conservadora con amplios márgenes libres de tumor.
2. Primera neoplasia mamaria diagnosticada a la paciente.

- Criterios de exclusión:

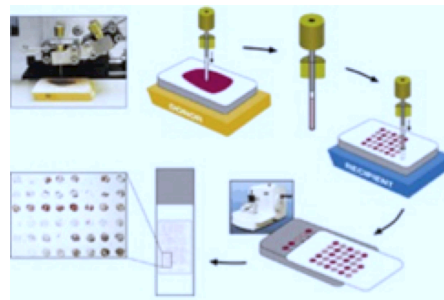
1. Lesiones benignas o las de potencial biológico incierto.
2. Aquellos casos en los que únicamente tuviésemos diagnóstico por biopsia con aguja gruesa, aún cuando el diagnóstico fuera de carcinoma infiltrante.
3. Pacientes previamente intervenidas por carcinoma mamario.
4. Tratamiento quimio y/o radioterápico previo a la cirugía.

## 3.2. Métodos

Como primer paso se llevó a cabo un análisis de los informes anatomopatológicos, obteniéndose diferentes datos, como el número de historia clínica, el número de biopsia, nombre y apellidos, edad y el diagnóstico anatomopatológico, incluyendo el tipo histológico y la existencia o no de metástasis ganglionar. En función de esta última característica, los casos se clasificaron en 2 grupos: casos con ganglios afectados (positivos) y casos sin afectación ganglionar (negativos). Posteriormente, se hizo una revisión de las preparaciones histológicas correspondientes para seleccionar el bloque y el área más representativa de tumor, de la cual obtener la muestra destinada a la matriz de tejidos (MT) o tissue microarrays (TMA). Por último, se procedió a la búsqueda de los bloques de parafina elegidos, localizados en el archivo de tejidos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga.



(a)



(b)

Figura 3.1: (a) Arrayer manual montado con agujas de 0.6mm construyendo un bloque receptor y (b) representación de todo el proceso de creación de una laminilla de TMA.

### 3.2.1. Construcción del TMA

Para la realización de los TMA se utilizó un arrayer de tejidos (Beecher Instruments) de tipo manual (Figura 3.1a), adquiriéndose de cada bloque de parafina donante 2 muestras cilíndricas de 0,6 mm de diámetro y 3-4 mm de longitud, y se incluyeron a modo de matriz en un nuevo bloque receptor de parafina. La homogeneización de las muestras una vez introducidas en el bloque receptor se realizó mediante calor (Figura 3.1b). Se construyeron un total de 9 bloques de TMA. Cada uno de ellos incluía 30 casos (2 muestras por cada uno) más 5 casos control, obteniéndose un total de 65 cilindros en cada bloque, excepto en el último TMA realizado, en el que se incluyeron 27 casos más los 5 controles (59 cilindros en total). Se anotó la posición de cada cilindro, para

poder identificarlos posteriormente y se realizaron cortes seriados de 4 micras para la tinción con hematoxilina-eosina y el estudio inmunohistoquímico (Figura 3.2). Los casos se distribuyeron en función de si presentaban o no afectación ganglionar, de manera que los bloques enumerados como 1,3,5 y 7 correspondían a casos con metástasis, y los bloques 2, 4, 6, 8 y 9 a casos sin afectación ganglionar.



Figura 3.2: Cortes teñidos con HE de los TMA realizados en el estudio.

### 3.2.2. Marcadores inmunohistoquímicos

#### Protocolo de inmunotinción

Previo a la tinción inmunohistoquímica de los cortes de TMA, se procedió a determinar el método de desenmascaramiento antigénico más apropiado, en cortes de tejido control de conocida positividad. En los bloques de TMA se realizaron cortes consecutivos de parafina de 4-5 micras de grosor, en portas tratados (ChemMate, DAKO, Copenhague, Dinamarca). Antes de la inmunotinción los cortes de tejido fueron sometidos a un proceso de desenmascaramiento antigénico. La técnica inmunohistoquímica se ha llevado a cabo en los equipos de inmunotinción automatizada DAKO TechMate Horizon y Autostainer, usando como método de visualización de la reacción antígeno-anticuerpo el sistema EnVision (DAKO). De forma resumida: se realizó bloqueo de la peroxidasa endógena (DAKO Peroxidase Block), incubación con anticuerpo primario, incubación con el polímero marcado y luego con el sustrato cromógeno (DAB), contratinción con hematoxilina y montaje. Como control de calidad, cada grupo de inmunotinciones se ha realizado con un determinado anticuerpo, incluyendo un correspondiente control positivo y un control negativo, donde el anticuerpo primario fue sustituido por suero no inmune de la misma especie que el anticuerpo primario (Figura 3.3).

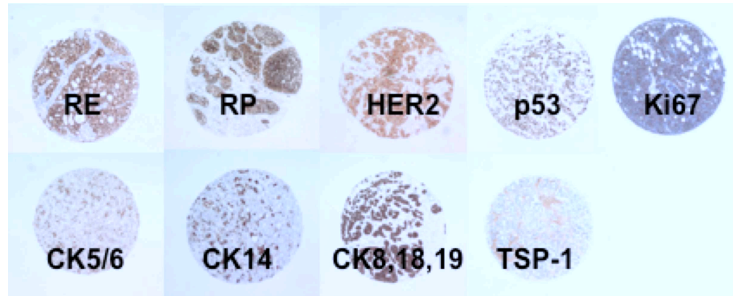


Figura 3.3: Tinciones de IHQ realizadas en el estudio.

#### Anticuerpos utilizados

- TSP-1: utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, clona D4.6, de Thermo Scientific.
- Receptores de estrógenos: para su determinación utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón contra RE, clona 1D5, prediluido, de DakoCytomation, SA, Barcelona.
- Receptores de progesterona: utilizamos el anticuerpo monoclonal de ratón contra RP, clona 1A6, prediluido, de DakoCytomation, SA, Barcelona.
- Oncoproteína p53: utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, clona D0-7, prediluido, de DakoCytomation, SA, Barcelona, que tiñe tanto p53 natural como mutante.
- Oncoproteína c-erb-B2: para la detección inmunohistoquímica del c-erb-B2 utilizamos el kit de farmacodiagnóstico Herceptest™ de DakoCytomation, SA, Barcelona.
- Ki67: usamos un anticuerpo monoclonal, clona SP6, de MASTER DIAGNÓSTICA, S.L., Granada.
- VEGF: para la cuantificación de VEGF utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, clona C-1, SC7269, de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, que se corresponde con los aminoácidos 1-140 de la molécula de VEGF humano. Para este anticuerpo se utilizó una dilución 1:900 y precisó de incubación overnight en una habitación a 4°C.
- CK 5/6: utilizamos el anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina 5/6, clona D5/16B4, de MASTER DIAGNÓSTICA, S.L., Granada.

- CK 14: utilizamos el anticuerpo anti-citoqueratina 14, clona LL002, de MASTER DIAGNÓSTICA, S.L., Granada.
- CK 8/18/19: para su determinación usamos el anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratina 18 humana, clona DC 10, de DakoCytomation, SA, Barcelona.

### 3.2.3. Valoración e interpretación de la inmunotinción

Los datos de tinción inmunohistoquímica se han obtenido tras la observación y cuantificación al microscopio óptico de los cortes de matrices de tejido inmunoteñidos. Se realizó la evaluación de las matrices de forma manual y a doble ciego (dos facultativos patólogos independientes). Con cada marcador inmunohistoquímico realizado, independientemente del control externo, se valoró un control positivo interno a la propia muestra (las células epiteliales normales, linfocitos y/o células estromales, dependiendo del marcador).

### 3.2.4. Conveniencia del método

La metodología de TMA ha permitido un análisis más simplificado debido al estudio simultáneo de un gran número de muestras, y, por otro lado, supone un gran ahorro en reactivos sobre el uso de cortes titulares completos. Los resultados estadísticos son más fiables, dado el elevado número de casos que se pueden analizar con este método. El empleo del inmunoteñidores automáticos ha facilitado la estandarización de condiciones para todos los casos de la serie, evitando la variabilidad metodológica. El uso de EnVision (polímero marcado con enzima) como método de visualización de la reacción inmunohistoquímica ha evitado la tinción inespecífica de biotina endógena que aparece frecuentemente con el sistema avidina-biotina, facilitando así la visualización del anticuerpo, por ser altamente sensible y con notable amplificación de la señal.

## 3.3. Variables estudiadas

### 3.3.1. Variables clínicopatológicas

Los datos clínicopatológicos fueron aportados por la base de datos del RHT o en su defecto se extrajeron de las historias clínicas de los pacientes, siguiendo las directrices del manual de procedimientos de la RN-RHTs.

- **Edad del paciente en el momento del diagnóstico:** fue recogida en años (variable de confusión numérica).

- **Sexo:** se consideró como:

1. Mujer
2. Varón

- **Seguimiento de los pacientes**

La recogida de datos de los pacientes se ha realizado a través del Registro Hospitalario de Tumores (RHT), encargado de la recopilación de unos datos mínimos del paciente y de actualizar el seguimiento anualmente. El seguimiento de todos los casos incluidos en el estudio ha sido actualizado a 31 de diciembre de 2012. Los datos de seguimiento de los pacientes recogidos ha permitido determinar la supervivencia global en meses. Para lo cual, también se recogieron datos como:

1. La fecha de diagnóstico (día-mes-año).
2. Fecha de recidiva posterior (día-mes-año).
3. La fecha de última revisión (día-mes-año).
4. El estado del paciente en la última revisión (E.U.C.), que se tabuló según los siguientes criterios:
  1. Paciente vivo, sin enfermedad
  2. Paciente vivo, con enfermedad
  3. Paciente muerto, por enfermedad
  4. Paciente muerto, por otras causas
  5. Paciente perdido para seguimiento

En el caso de los pacientes fallecidos, se recogió también la variable fecha de fallecimiento (día-mes-año). Mientras que en los casos de los pacientes vivos (EUC de tipo 1, 2 ó 5), se recogió la fecha del último contacto(día-mes-año). A partir de estas fechas y del estado del paciente, se calculó la supervivencia global (en meses); la cual se describe como la diferencia entre la fecha de última de revisión/fallecimiento y la fecha de diagnóstico. La variable supervivencia es numérica de tipo continuo y será la variable dependiente del estudio.

### 3.3.2. Variables histopatológicas

#### ■ **Tamaño tumoral**

Definido como el diámetro tumoral mayor (de las tres medidas tridimensionales recogidas) descrito en el examen macroscópico de la pieza de resección mamaria, se consideró como una variable continua y dividido en dos grupos, menor y mayor o igual a 2 cm de diámetro máximo postfijación, según las recomendaciones del TNM.

#### ■ **Tipo histológico**

Siguiendo la clasificación de la OMS (2012) [21], los casos estudiados se enumeraron de la siguiente forma:

1. Carcinoma invasor de tipo no específico
2. Carcinoma lobulillar infiltrante
3. Carcinoma productor de mucinoso
4. Carcinoma medular
5. Carcinoma tubular
6. Carcinoma mixto
7. Carcinoma papilar
8. Carcinoma in situ

#### ■ **Grado**

Utilizando la clasificación de Nottingham modificada por Bloom-Richardson para los carcinomas infiltrantes, distinguimos entre:

- Grado 1: Bien diferenciado
- Grado 2: Moderadamente diferenciado
- Grado 3: Pobrementemente diferenciado

#### ■ **Afectación ganglionar**

Definido como la presencia de ganglios linfáticos con estructuras glandulares neoplásicas de localización subcapsular o bien tejido glandular neoplásico ocupando y desestructurando parcial/completamente el parénquima ganglionar, con o sin presencia de rebasamiento capsular. Es una variable de confusión numérica. Se categorizó como:

- Valor 1: Presencia de afectación ganglionar.
  - Valor 2: Ausencia de afectación ganglionar.
- **Estadio de extensión TNM**
- Se valoró del siguiente modo [221]:
- Tumor primario (Carcinoma invasor) (pT):
    - pTX: El tumor primario no se puede evaluar.
    - pT0: No hay evidencia de tumor primario.
    - pTis (DCIS): Carcinoma ductal in situ.
    - pTis (LCIS): Carcinoma lobulillar in situ.
    - pTis (Paget): Enfermedad de Paget en el pezón no asociada a carcinoma invasor y/o carcinoma in situ (DCIS y/o LCIS) en el parénquima mamario subyacente.
    - pT1: Tumor  $\leq 20$  mm en su mayor extensión.
      - ◊ pT1mi: Tumor  $\leq 1$  mm en la mayor extensión (microinvasión).
      - ◊ pT1a: Tumor  $> 1$  mm pero  $\leq 5$  mm en la mayor extensión.
      - ◊ pT1b: Tumor  $> 5$  mm pero  $\leq 10$  mm en la mayor extensión.
      - ◊ pT1c: Tumor  $> 10$  mm pero  $\leq 20$  mm en la mayor extensión.
    - pT2: Tumor  $> 20$  mm pero  $\leq 50$  mm en la mayor extensión.
    - pT3: Tumor  $> 50$  mm en la mayor extensión.
    - pT4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos). Nota: La invasión solo de la dermis no se califica como pT4.
      - ◊ pT4a: Extensión a la pared torácica, no incluyendo sólo adherencia/invasión del músculo pectoral.
      - ◊ pT4b: Ulceración y/o nódulos satélites ipsilaterales y/o edema(incluyendo piel de naranja) de la piel, que no tenga criterios para carcinoma inflamatorio.
      - ◊ pT4c: Ambos T4a y T4b.
      - ◊ pT4d: Carcinoma inflamatorio.
  - Ganglios linfáticos regionales (pN):
    - pNX: Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar (por ejemplo, extirpados previamente, o no extirpados para estudio patológico).

- pN0: No metástasis en ganglio linfático regional histológicamente identificada.
- pN0 (i-): No metástasis en ganglio linfático regional histológicamente identificada, inmunohistoquímica (IHQ) negativa.
- pN0 (i+): Células malignas en ganglio (s) linfático (s) regional no mayor de 0,2 mm y no más de 200 células (detectada con HE o IHQ incluyendo células tumorales aisladas [IT]).
- pN0 (mol-): No metástasis en ganglio linfático regional histológicamente identificada, hallazgos moleculares negativos (reacción en cadena de la polimerasa-trascriptasa inversa [RT-PCR]).
- pN0 (mol+): Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no metástasis en ganglio linfático regional detectada mediante histología o IHQ.
- pN1mi: Micrometástasis (mayor de 0,2 mm y/o más de 200 células, pero no mayor 2,0 mm).
- pN1a: Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis mayor de 2,0 mm.
- pN2a: Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2,0 mm).
- pN3a: Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2,0 mm).
- Metástasis a distancia (pM):
  - pM0: Ausencia de metástasis a distancia.
  - pM1: Metástasis a distancia detectable histológicamente comprobada mayor de 0,2 mm.

#### ■ Estadificación

Es una variable de confusión numérica categorizada tal y como sigue:

- Valor 1. = Estadio I, que incluye IA (T1N0M0) y IB (T0N1miM0 y T1N1miN0).
- Valor 2. = Estadio II, que incluye IIA (T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0) y IIB (T2N1M0, T3N0M0).
- Valor 3. = Estadio III, que incluye IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0), IIIB (T4N0, N1, N2 M0) y IIIC (Cualquier T N3 M0).
- Valor 4. = Estadio IV, correspondiente a cualquier tipo de T y N, combinado con M1.

### 3.3.3. Variables inmunohistoquímicas

Cada marcador inmunohistoquímico, según los requerimientos de patrón de tinción, ha sido evaluado e interpretado como sigue:

#### ■ Receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP)

Para su valoración se consideró:

- Valor 1: Positivo, cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción igual o superior al 10 %.
- Valor 2: Negativo, cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción inferior al 10 %.

#### ■ Her2

Las células marcadas específicamente por este anticuerpo presentan un patrón de tinción limitado a la membrana celular, utilizando el siguiente criterio para su evaluación:

- 0: Ausencia de tinción o existe en menos del 10 % de las células tumorales.
- 1+: Tinción de membrana débil o incompleta en más del 10 % de las células tumorales.
- 2+: Tinción de membrana débil o moderada y completa en más del 10 % de las células tumorales.
- 3+: Tinción de membrana fuerte y completa en más del 10 % de las células tumorales.

Se realizó FISH para determinar si existía amplificación o no de HER2/neu a aquellos casos 2+.

Los valores 0 y 1 fueron considerados negativos. Los valores 2 positivos para FISH y 3 fueron considerados positivos.

#### ■ Ki67

Valorado en % de células teñidas (nº ordinales, sin decimales).

- Valor 1:  $\leq 10$
- Valor 2:  $> 10 \leq 30$
- Valor 3:  $> 30$

**■ CK 5/6**

- Valor 1: Tinción positiva.
- Valor 2: Tinción negativa.

**■ CK 14**

- Valor 1: Tinción positiva.
- Valor 2: Tinción negativa.

**■ CK 5/6 + CK 14**

El fenotipo basal de carcinoma de mama se define como positivo para CK 5/6 y/o para CK 14, por lo que se toma como variable la presencia o no de ambas citoqueratinas en conjunto:

- Valor 1: Positivo (valores 1 de CK 5/6 o de CK 14, indistintamente).
- Valor 2: Negativo (valores 2 de ambas a la vez).

**■ CK 8/18/19**

- Valor 1: Tinción positiva.
- Valor 2: Tinción negativa.

**■ Subtipos moleculares**

Siguiendo la clasificación inmunohistoquímica más aceptada [28], basada en la expresión de receptores hormonales, HER2 y marcadores característicos de las células basales/ mioepiteliales (CK 5/6, CK 14, p63 y EGFR), dividimos los subtipos moleculares en:

1. Luminal A: RE+, RP+/- y HER2-.
2. Luminal B: RE+, RP+/- y HER2+.
3. HER2: RE-, RP-, HER2 +.
4. Basal-like o triple negativo: RE-, RP-, HER2- y CK5/6, CK14, p63 y/o EGFR+.
5. Mama normal o triple negativo-no basal: RE-, RP-, HER2-, CK5/6-, CK14-, p63- y/o EGFR-.

**■ p53**

Se consideró para su valoración el siguiente criterio:

- Valor 1: Positivo, cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción igual o superior al 10 %.
- Valor 2: Negativo, cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción inferior al 10 %.

**■ VEGF**

La expresión de VEGF se valoró, en las células tumorales, en el estroma y en los macrófagos, de 0 a 3+ :

- 0: ausencia de tinción.
- 1+: débil tinción.
- 2+: moderada tinción.
- 3+: tinción fuerte.

Se consideraron dos grupos:

- Ausencia de tinción o tinción débil, corresponde al valor 1.
- Tinción moderada o intensa, como valor 2.

**■ TSP-1**

Se valora por separado el estroma y las células tumorales, considerándose de la siguiente forma:

- Valor 0: ausencia de tinción (Figura 3.4).
- Valor 1: tinción estromal mínimamente visible o pocas células tumorales (tinción débil) (Figura 3.5).
- Valor 2: tinción estromal moderada (no es tan intensa como en valor 3) o frecuentes células tumorales positivas (aunque no la mayoría de ellas) (Figura 3.6).
- Valor 3: tinción estromal intensa o de la mayoría de las células tumorales (Figura 3.7).

Para simplificar la evaluación se decide agrupar los resultados de TSP-1 en 2 categorías:

- Valor 1: valores de TSP-1 0 y 1, considerándolo como valor negativo.
- Valor 2: valores de TSP-1 2 y 3, considerándolo como valor positivo.

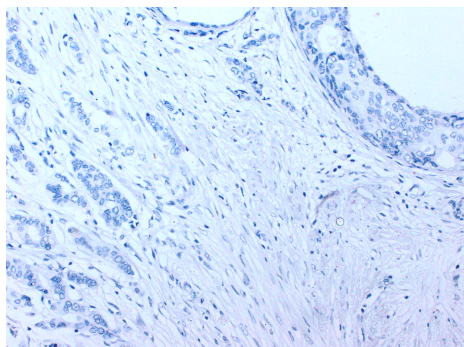
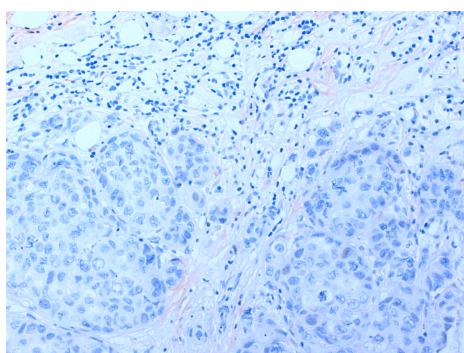
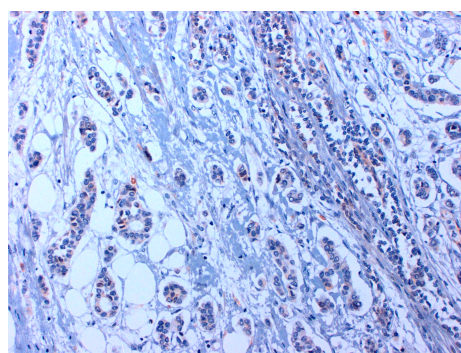


Figura 3.4: Ausencia de tinción de TSP-1.

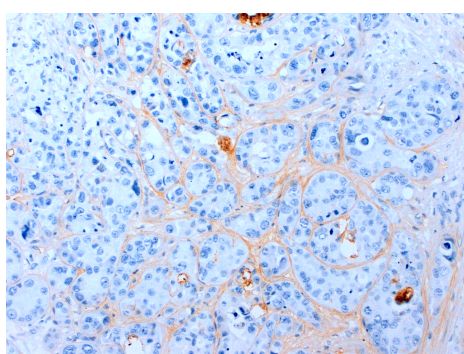


(a)

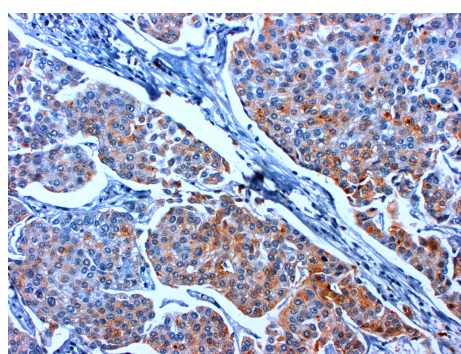


(b)

Figura 3.5: Tinción inmunohistoquímica débil de TSP-1 (a) estromal y (b) celular.



(a)



(b)

Figura 3.6: Tinción inmunohistoquímica moderada de TSP-1 (a) estromal y (b) celular.

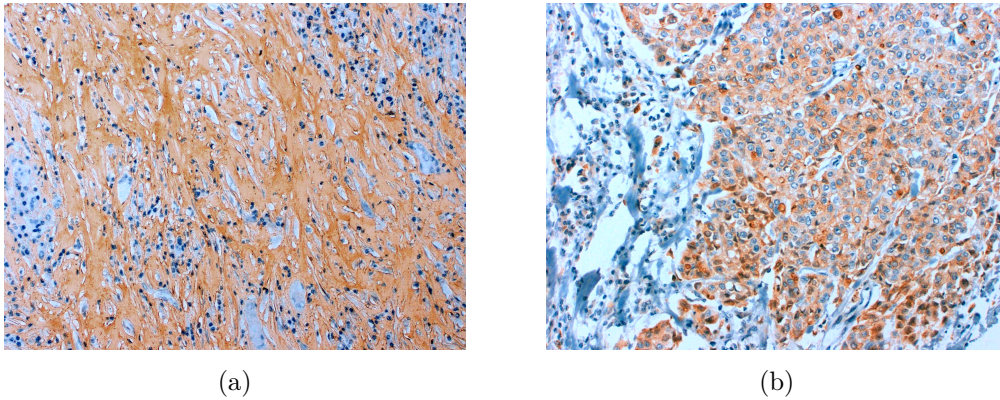


Figura 3.7: Tinción inmunohistoquímica intensa de TSP-1 (a) estromal y (b) celular.

#### 3.3.4. Estudio estadístico y análisis de los datos

Una vez completada la base de datos y actualizado el seguimiento (a 31 de diciembre de 2012), hemos procedido a una descripción de los todos los parámetros clínicopatológicos convencionales (variables de confusión), supervivencia (variable dependiente) y de los marcadores biomoleculares testados en todas las muestras de carcinoma de mama incluidas en el estudio.

El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el software estadístico SPSS (versión 19.0).

Se ha realizado una estadística descriptiva básica inicial seguida de los análisis univariantes utilizando el test de chi-cuadrado, t-test, ANOVA o correlaciones divariados de Pearson (dependiendo de que las variables tengan carácter numérico categorizado o variables numéricas continuas). Se han usado métodos no-paramétricos, U de Mann-Whitney y test de Kruskal-Wallis, para datos sin distribución normal.

Las curvas de supervivencia se han analizado mediante el método de Kaplan-Meier, utilizándose como estadísticos de contraste el Breslow y el logrank.

Se ha considerado significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Finalmente, se ha realizado un análisis multivariante del tipo de regresión de Cox.

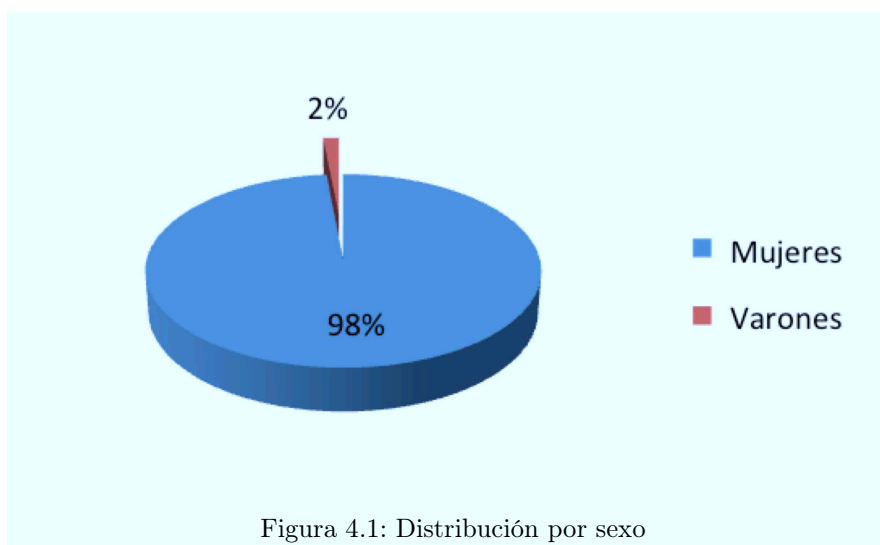
## Capítulo 4

# Resultados

### 4.1. Descripción de la serie

#### 4.1.1. Sexo

En la distribución por sexos, de los 266 casos estudiados sólo 4 correspondieron a varones (1,5%), observándose el gran predominio de mujeres (98,5%) que es característico del carcinoma de mama (Figura 4.1).



#### 4.1.2. Edad

La edad media al diagnóstico fue de 56,94 años, oscilando entre 32 y 82 años (Tabla 4.1).

Variable	Nº de casos	Media	Desviación típica	Rango
Edad	266	56,94	12,43	32-82

Tabla 4.1: Edad media

#### 4.1.3. Tamaño

El tamaño tumoral, expresado en centímetros, mostró un valor medio de 2,6 cm, oscilando entre 0,1 y 9 cm (Tabla 4.2).

Variable	Nº de casos	Media	Desviación típica	Rango
Tamaño	266	2,6	1,46	0,10-9

Tabla 4.2: Tamaño medio

El estadiaje TNM tiene en cuenta 3 rangos de tamaño según los cuales se clasifican en un estadio diferente. Si  $t$  es el tamaño del carcinoma, se considera como estadio T1 cuando  $t \leq 2$  cm, estadio T2 cuando  $2 < t \leq 5$  cm y estadio T3 cuando  $t > 5$  cm. En nuestra serie tenemos que el 34,46 % de los casos tienen estadio T1, la mayoría, con un 59,89 %, tienen estadio T2, y sólo un 5,65 % están en estadio T3.

#### 4.1.4. Tipo histológico

En nuestra serie encontramos un 69,5 % (185) de casos correspondientes a carcinoma invasor no específico (siendo el más frecuente de todos), un 9 % (24) de carcinomas lobulillares y un 14,3 % (38) de carcinomas mixtos. Con menor frecuencia encontramos los tipos histológicos especiales: mucinoso 3,4 % (9), carcinoma tubular y papilar 1,1 % (3), respectivamente, y carcinoma medular e in situ 0,8 % (2), respectivamente (Figura 4.2).

#### 4.1.5. Grado histológico

Según la clasificación en tres categorías usada en el momento del diagnóstico, 157 (63,6 %) de los carcinomas de mama fueron catalogados como grado 2 o moderadamente diferenciados, 67 (27,1 %) se clasificaron como grado 3 o pobremente diferenciados y 23 (9,3 %) como grado 1 o bien diferenciados (Figura 4.3).

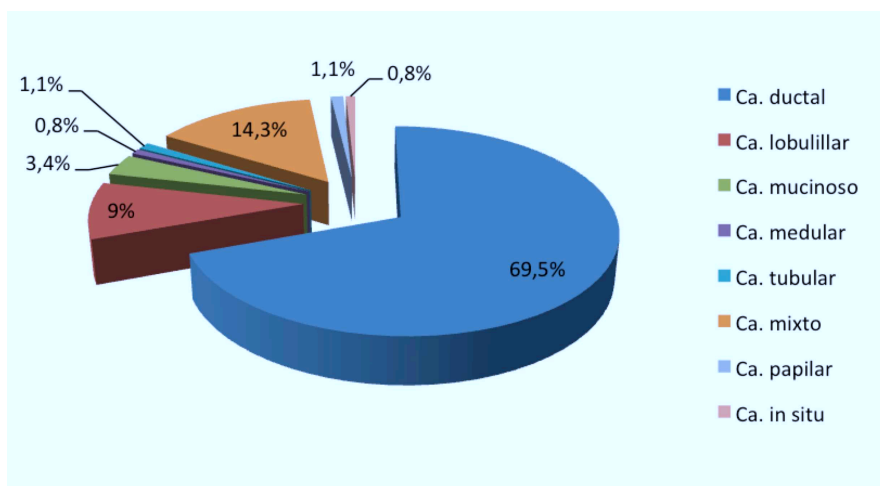


Figura 4.2: Distribución según tipo histológico

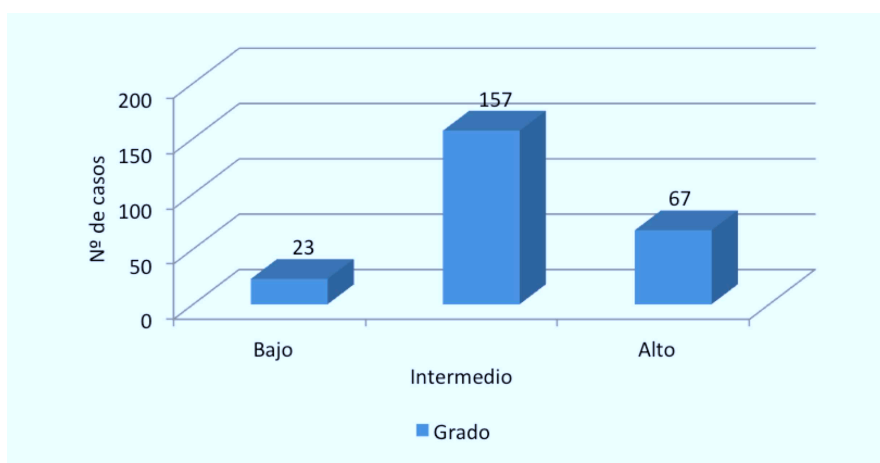


Figura 4.3: Distribución según grado histológico

#### 4.1.6. Ganglios afectados

La proporción de casos fue muy similar entre los que presentaron metástasis ganglionares y los que no, con un discreto mayor número de casos para el grupo de ganglios negativos, 55,3% (147) frente al 44,7% (119) de pacientes con afectación ganglionar (Figura 4.4). Dentro de los casos positivos, el 65,2% presentaban de 1 a 3 ganglios afectados, el 27,2% de 4 a 9, y sólo un 7,6% con 10 o más ganglios (29,1%, 12,2% y 3,4% sobre el total, respectivamente).

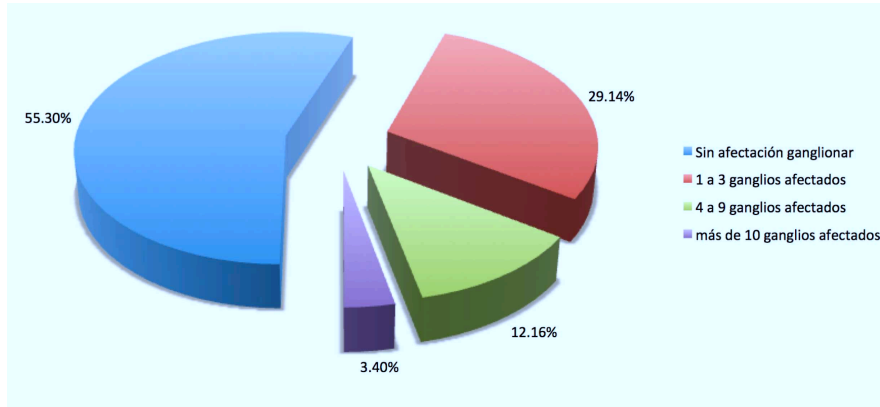


Figura 4.4: Distribución según afectación ganglionar

#### 4.1.7. Receptores hormonales y HER2

De los 266 casos estudiados, 144 (54,1 %) presentaron receptores de estrógenos positivos y 134 (50,4 %) receptores de progesterona positivos, mientras que sólo 31 casos mostraron positividad para HER2 (11,7 %) (Figura 4.5).

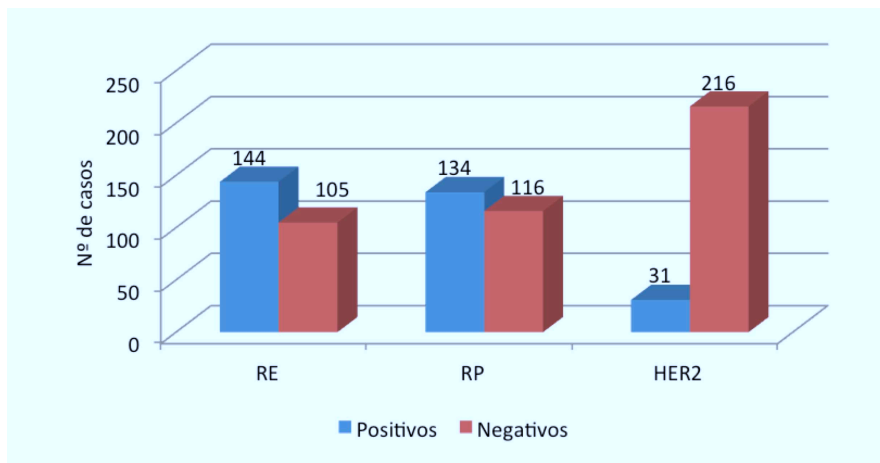


Figura 4.5: Expresión de receptores hormonales y HER2

#### 4.1.8. Índice de proliferación (Ki67)

Cuando estudiamos el índice proliferativo, establecimos 3 niveles de proliferación, siendo bajo cuando Ki67 <10 %, moderado con Ki67 > 10 ≤ 30 % y alto con Ki67 >30 %. Según esto, en nuestro estudio, la Tabla 4.3 muestra que la mayoría de los casos fueron de bajo índice proliferativo (122), después de alto índice (54) y por último moderado (40).

Ki67	Nº de casos	Porcentaje (%)
<10	122	56,5
> 10 ≤ 30	40	18,5
>30	54	25

Tabla 4.3: Distribución según índice de proliferación (Ki67)

#### 4.1.9. Subtipos moleculares

En nuestra serie, el subtipo molecular más frecuente fue el luminal A, con un 50,6 % (124) de los casos, seguido del luminal B con un 18,8 % (46), el HER2 positivo con un 9 % (22), el basal-like con un 7,3 % (18), y el menos frecuente de todos es el triple negativo-no basal (normal), con un 3,7 % (9) de los casos (Figura 4.6).

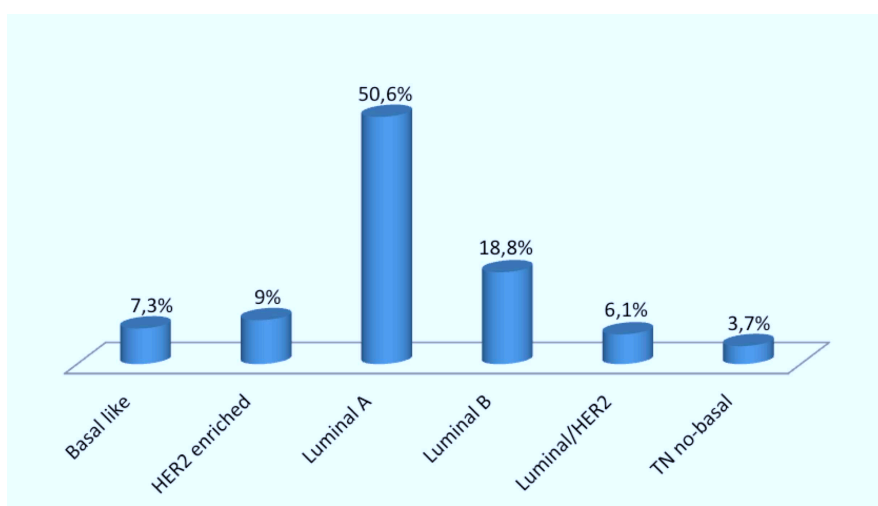


Figura 4.6: Distribución según subtipos moleculares

#### 4.1.10. Fenotipo basal y luminal

Los tumores considerados de fenotipo basal mediante inmunohistoquímica son aquellos que expresan CK5/6 y/o CK14. De los 266 casos estudiados perdimos 15 en el sistema, con lo que dispusimos de 251, de los cuales, sólo 21(8,4%) mostraron positividad para CK 5/14. El resto de tumores (230) expresaron CK 8/18/19, por lo tanto fueron considerados de fenotipo luminal (91,6%)(Figura 4.7).

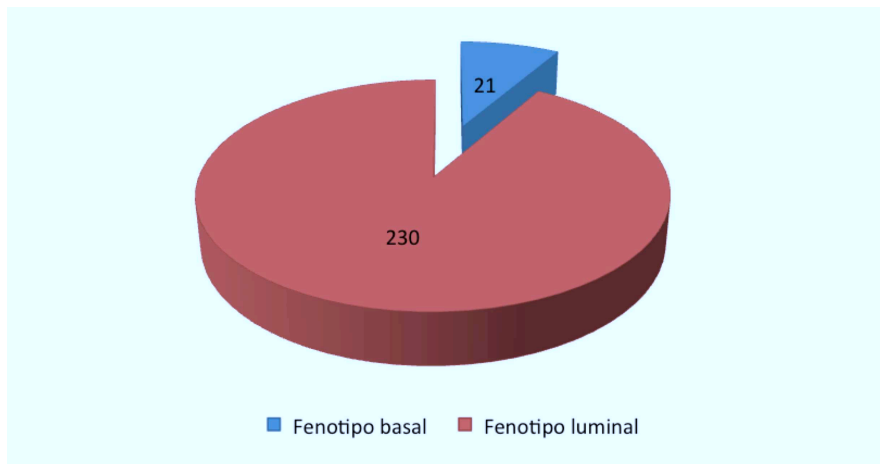


Figura 4.7: Proporción de casos con fenotipo basal y luminal

De los que expresaron citoqueratinas basales, 11 (52,4%) también expresaron, aunque focalmente, citoqueratinas de tipo luminal. Solo 9 casos fueron completamente negativos para CK 8/18/19.

#### 4.1.11. Expresión de p53

La expresión de p53 fue preferentemente negativa en un 82,5% de los casos (Tabla 4.4).

p53	Nº de casos	Porcentaje (%)
Positivo	44	17,5
Negativo	207	82,5

Tabla 4.4: Expresión de p53

#### 4.1.12. Expresión de VEGF

Al valorar la expresión de VEGF en las células tumorales, la gran mayoría de los casos mostraron tinción moderada o intensa (82 %) según se observa en la Tabla 4.5.

VEGF	Nº de casos	Porcentaje (%)
Tinción ausente	48	18
Tinción intensa	218	82

Tabla 4.5: Expresión de VEGF

#### 4.1.13. Expresión de TSP-1 estromal y celular

La mayor parte de los casos mostró una tinción ausente o débil, tanto de TSP-1 estromal como celular (70,7 % y 92,4 %, respectivamente)(Figura 4.8).

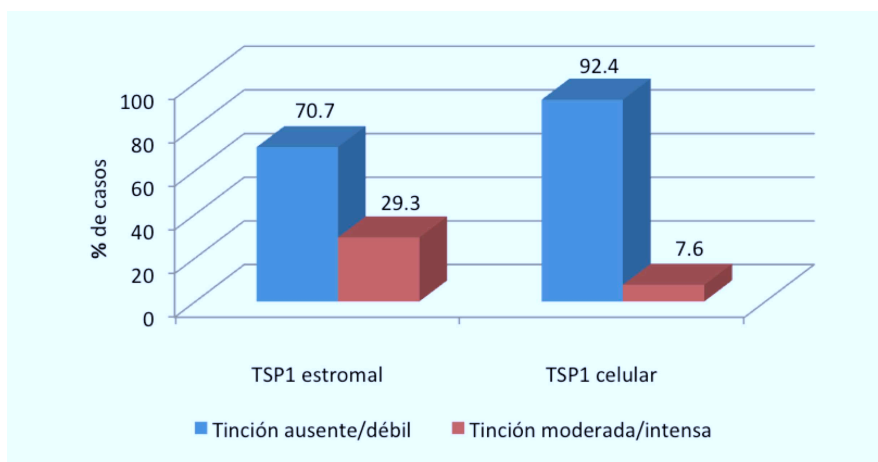


Figura 4.8: Proporción de la expresión de TSP-1 estromal y TSP-1 celular

Cuando tenemos en cuenta su tinción en los diferentes tipos histológicos, la tendencia fue la misma, la mayor parte de los casos no solían expresar TSP-1 estromal ni celular, exceptuando al carcinoma papilar, que mostró una tinción moderada/intensa de TSP-1 estromal en el 66,7 % de los casos (Figura 4.9), y al carcinoma mucinoso, que presentó un porcentaje similar para ambos criterios de tinción de la TSP-1 celular (55,6 % para la escasez de tinción y 44,4 % para la moderada/intensa) (Figura 4.9).

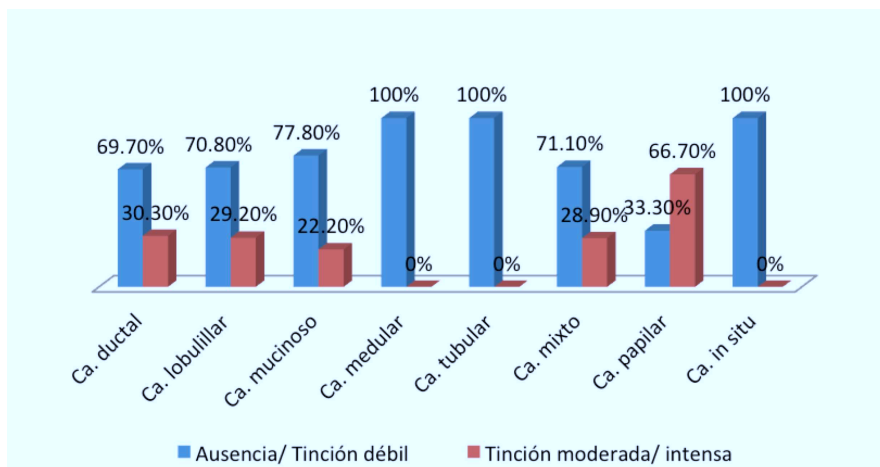


Figura 4.9: Expresión de TSP-1 estromal en función del tipo histológico

## 4.2. Estadística analítica

### 4.2.1. Expresión de trombospondina-1

#### Expresión estromal

- **Relación con el tamaño tumoral**

No se observó relación estadísticamente significativa entre la expresión estromal y TSP-1 y el tamaño tumoral.

- **Relación con el grado histológico**

Al estudiar la relación entre TSP-1 estromal y el grado histológico de la lesión no se observan diferencias significativas (Tabla 4.6). Tanto los casos que expresan TSP-1 estromal como los que no lo hacen, son con más frecuencia tumores moderadamente diferenciados/grado 2

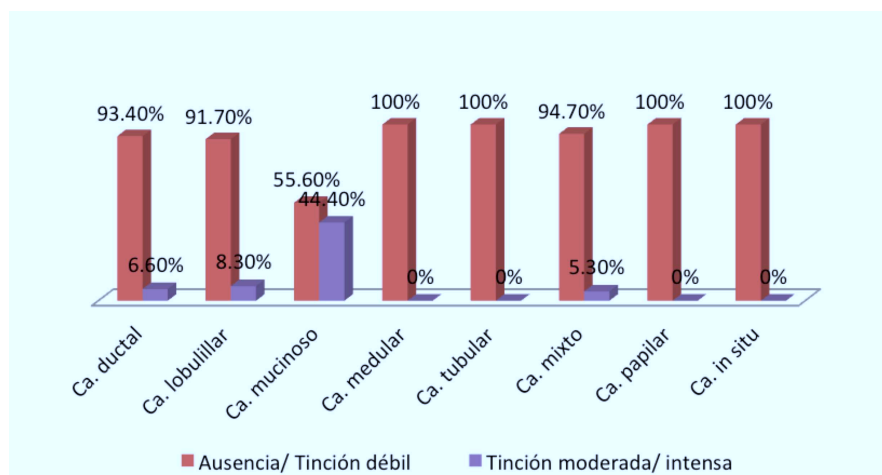


Figura 4.10: Expresión de TSP-1 celular en función del tipo histológico

(55,8 % y 67,1 %, respectivamente). Sin embargo, encontramos un porcentaje algo mayor de casos pobremente diferenciados (grado 3) dentro del grupo de tumores con tinción positiva para TSP-1 estromal, en comparación con los tumores negativos (36,4 % frente al 22,9 %).

TSP-1 Estromal	Nº de casos (%)			Sig.
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Positiva	6 (7,80 %)	43 (55,80 %)	28 (36,40 %)	p= 0,089
Negativa	17 (10,00 %)	114 (67,10 %)	39 (22,90 %)	

Tabla 4.6: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el grado histológico

Al tener en cuenta sólo los casos sin afectación ganglionar, es mayor la diferencia de casos de alto grado entre ambos grupos, existiendo un 35,6 % en los tumores con tinción moderada/intensa de TSP-1 estromal, frente a un 18,6 % en los que no mostraron tinción (Tabla 4.7).

TSP-1 Estromal	Nº de casos sin afectación gg (%)			Sig.
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Positiva	5 (11,10 %)	24 (53,30 %)	16 (35,60 %)	p=0,09
Negativa	11 (12,80 %)	59 (68,60 %)	16 (18,60 %)	

Tabla 4.7: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el grado histológico en los casos sin afectación ganglionar

### ■ Relación con la afectación ganglionar

Aunque no encontramos diferencias significativas en la Tabla 4.8, cabe destacar que es algo más frecuente la presencia de ganglios libres de enfermedad en ambos grupos de tumores (TSP-1 estromal positivos y negativos: 59 % y 53,7 %, respectivamente).

TSP-1 estromal	Nº de casos (%)		Sig.
	Con afectación gg	Sin afectación gg	
Positiva	32 (41 %)	46 (59 %)	p=0,43
Negativa	87 (46,3 %)	101 (53,7 %)	

Tabla 4.8: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la afectación ganglionar

### ■ Relación con los receptores hormonales

Al comparar la expresión de TSP-1 en el estroma con la expresión de los receptores de estrógenos en la Tabla 4.9, observamos que existe una relación significativa ( $p = 0,05$ ) entre ambos marcadores, siendo la tinción para TSP-1 mayoritariamente ausente o débil en los casos con RE positivos. Por otro lado, dentro de los tumores que expresan TSP-1, existe un mayor porcentaje de casos RE negativos que en el grupo TSP-1 negativa (42,9 % frente al 28,8 %).

En el caso de los receptores de progesterona, no obtenemos resultados significativos pero se aprecia una tendencia similar a la de los receptores de estrógenos, la tinción estromal de TSP-1 es con más frecuencia negativa en los tumores con RP positivos. También observamos un porcentaje algo mayor de casos RP negativos dentro del grupo de tumores con tinción positiva de TSP-1, en comparación con el grupo de tinción ausente (42,9 % frente al 34,7 %).

TSP-1 estromal	Nº de casos (%)		Sig.	Nº de casos (%)		Sig.
	RE positivos	RE negativos		RP positivos	RP negativos	
Positiva	32 (57,10 %)	24 (42,90 %)	p=0,05	32 (57,10 %)	24 (42,90 %)	p=0,28
Negativa	104 (71,20 %)	42 (28,80 %)		94 (65,30 %)	50 (34,70 %)	

Tabla 4.9: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de receptores de estrógenos y progesterona

Si nos fijamos sólo en las lesiones sin metástasis ganglionares incluidos en la Tabla 4.10, aunque siguen siendo más frecuentes los tumores RP positivos y con tinción negativa de TSP-1 estromal, se observa que en los tumores con tinción moderada/intensa de TSP-1, existe un

mayor porcentaje de casos RP negativos, que en el grupo de TSP-1 negativa (44,1 % y 26,9 %, respectivamente), acercándose esta relación a la significación estadística ( $p = 0,07$ ).

TSP-1 estromal	Nº de casos sin afectación ganglionar (%)		Sig.
	RP positivos	RP negativos	
Positiva	19 (55,90 %)	15 (44,10 %)	p=0,07
Negativa	57 (73,10 %)	21 (26,90 %)	

Tabla 4.10: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de RP en los casos sin afectación ganglionar

#### ■ Relación con HER2

Cuando analizamos la expresión de TSP-1 estromal y la de HER2 (Tabla 4.11), existe una relación significativa ( $p = 0,05$ ) entre ambas, siendo la tinción de TSP-1 en su mayoría ausente o débil en el grupo de tumores HER2 negativos. Por otro lado, cabe destacar que dentro del grupo de tumores con tinción moderada/intensa de TSP-1 estromal, existe un mayor porcentaje de casos HER2 positivos que en el grupo de tinción negativa para TSP-1 (18,7 % frente al 9,9 %).

TSP-1 estromal	Nº de casos		Sig.
	HER2 positivo	HER2 negativo	
Positiva	14 (18,70 %)	61 (81,30 %)	p=0,05
Negativa	17 (9,90 %)	155 (90,10 %)	

Tabla 4.11: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de HER2

Cuando tenemos en cuenta el grupo de casos con metástasis ganglionares (ver Tabla 4.12), encontramos una tendencia diferente al de total de casos, aquí los casos HER2 positivos se relacionan con una tinción de TSP-1 moderada o intensa en un mayor porcentaje (58,3 %), con una significación de  $p = 0,01$ . En los casos HER2 negativos sigue siendo mayoritaria la tinción ausente o débil (76,2 %).

#### ■ Relación con Ki67

Al relacionar la TSP-1 estromal con el índice de proliferación Ki67, la mayoría de los casos presenta un índice de proliferación bajo (ver Tabla 4.13). Pero se aprecia que dentro del grupo de tumores con tinción estromal de TSP-1 moderada/intensa, existe un mayor porcentaje de casos de tumores de alto índice proliferativo ( $Ki67 > 30\%$ ), un 33,8 %, en comparación con el de tinción ausente/débil (27,2 %). Estos datos no fueron estadísticamente significativos.

TSP-1 estromal	Nº de casos con afectación gg (%)		Sig.
	HER2 positivo	HER2 negativo	
Positiva	7 (58,30 %)	24 (23,80 %)	p=0,01
Negativa	5 (41,70 %)	77 (76,20 %)	

Tabla 4.12: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de HER2 en los casos con afectación ganglionar

TSP-1 Estromal	Nº de casos (%)			Sig.
	Ki67<10	Ki67 > 10 ≤ 30	Ki67>30	
Positiva	33 (50,80 %)	10 (15,40 %)	22 (33,80 %)	p=0,13
Negativa	89 (58,90 %)	30 (19,90 %)	32 (21,20 %)	

Tabla 4.13: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el índice proliferativo (Ki67)

En el caso de los tumores con afectación ganglionar, en el grupo que presenta tinción positiva para TSP-1 estromal, también hay un mayor porcentaje de casos de alto índice proliferativo que en el grupo de tinción negativa (33,3 % frente al 17,1 %), acercándose estos valores a la significación estadística ( $p = 0,06$ ). Estos datos se incluyen en la .Tabla 4.14.

TSP-1 Estromal	Nº de casos con afectación ganglionar (%)			Sig.
	Ki67<10	Ki67 > 10 ≤ 30	Ki67>30	
Positiva	18 (60 %)	2 (6,70 %)	10 (33,30 %)	p=0,06
Negativa	50 (61 %)	18 (22,90 %)	14 (17,10 %)	

Tabla 4.14: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el índice de proliferación en los casos con afectación ganglionar

#### ■ Relación con p53

Cuando estudiamos la relación entre la TSP-1 estromal y la expresión de p53, podemos apreciar que, dentro del grupo de casos con tinción moderada/intensa de TSP-1, hay un mayor porcentaje de lesiones que expresan p53 en comparación con los casos de tinción negativa (22,7 % frente a un 15,3 %), aunque sin correlación estadísticamente significativa entre ambas variables (Tabla 4.15).

TSP-1 estromal	Nº de casos		Sig.
	p53 positivo	p53 negativo	
Positiva	17 (22,70 %)	58 (77,30 %)	p=0,16
Negativa	27 (15,30 %)	149 (84,70 %)	

Tabla 4.15: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de p53

#### ■ Relación con VEGF

Al valorar la expresión de TSP-1 estromal y la de VEGF en la Tabla 4.16 no encontramos una relación estadísticamente significativa, pero se puede observar que dentro de los casos con tinción moderada/intensa de TSP-1 estromal, hay un mayor porcentaje de casos que no expresan VEGF que dentro del grupo TSP-1 negativo (24,4 % y 15,4 %, respectivamente).

TSP-1 estromal	Nº de casos		Sig.
	VEGF positivo	VEGF negativo	
Positiva	59 (75,60 %)	19 (24,40 %)	p=0,08
Negativa	159 (84,60 %)	29 (15,40 %)	

Tabla 4.16: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de VEGF

Por otro lado, sí obtenemos valores significativos cuando sólo analizamos los casos sin afectación ganglionar ( $p = 0,05$ ). Aquí, se aprecia que dentro de los tumores VEGF positivos, la mayor parte (71,7 %) son negativos para TSP-1 estromal mientras que en los VEGF negativos no existen diferencias, con el 50 % de los casos negativos o positivos para TSP-1 estromal (Tabla 4.17).

TSP-1 estromal	Nº de casos sin afectación gg (%)		Sig.
	VEGF positivo	VEGF negativo	
Positiva	36 (28,30 %)	10 (50 %)	p=0,05
Negativa	91 (71,70 %)	10 (50 %)	

Tabla 4.17: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de VEGF en los casos sin afectación ganglionar

#### ■ Relación con el fenotipo luminal y basal

En la relación entre el fenotipo luminal (tumores CK 8/18/19 positivos) y la expresión de TSP-1 estromal, no obtenemos resultados con valores significativos (Tabla 4.18), observando

una tinción preferentemente ausente o débil de TSP-1 estromal en los casos con fenotipo luminal (68 %). No obstante, en este grupo se aprecia un mayor porcentaje de casos con tinción positiva para TSP-1 estromal que en los tumores que no expresan estas queratinas (32 % frente al 11,1 %).

TSP-1 estromal	Nº de casos (%)		Sig.
	CK 8/18/19 positiva	CK 8/18/19 negativa	
Positiva	77 (32 %)	1 (11,1 %)	p=0,18
Negativa	164 (68 %)	8 (88,9 %)	

Tabla 4.18: Relación de la expresión de TSP-1 con el fenotipo luminal

La Tabla 4.19 indica que sí que encontramos una relación significativa ( $p = 0,006$ ) entre la tinción de TSP-1 estromal y la expresión de CK5/14, observando que los tumores de fenotipo basal (positivos para CK 5/14) presentan en un mayor porcentaje tinción moderada o intensa de TSP-1 estromal (57,1 %). Por otro lado, los casos negativos para CK5/14 se relacionan con una ausencia o tinción débil (71,7 %).

TSP-1 estromal	Nº de casos (%)		Sig.
	CK 5/14 positiva	CK 5/14 negativa	
Positiva	12 (57,10 %)	65 (28,30 %)	p=0,006
Negativa	9 (42,90 %)	165 (71,70 %)	

Tabla 4.19: Relación de la expresión de TSP-1 con el fenotipo basal

Cuando analizamos por separado los tumores según la presencia o no afectación ganglionar, obtenemos resultados similares a los totales, siendo significativos en el grupo de casos con metástasis ganglionar ( $p = 0,014$ ), mostrando el 60 % de casos con fenotipo basal una tinción moderada/intensa de TSP-1 estromal, mientras que el 76,2 % de los casos negativos presentan una tinción ausente/débil (Tabla 4.20).

#### ■ Relación con el subtipo molecular triple negativo

La mayoría de los tumores de fenotipo basal pierden la expresión de receptores hormonales (RE y RP) y del oncogén c-erb-B2 (HER2). Creamos una variable con estas características: RE negativos, RP negativos y HER2 negativo. Al estudiar los casos que cumplen o no estas

TSP-1 estromal	Nº de casos con afectación gg (%)		Sig.
	CK 5/14 positiva	CK 5/14 negativa	
Positiva	6 (60 %)	25 (23,8 %)	p=0,014
Negativa	4 (40 %)	80 (76,2 %)	

Tabla 4.20: Relación de la expresión de TSP-1 con el fenotipo basal en los casos con afectación ganglionar

características, observamos en la Tabla 4.21 que tanto los casos con RE/RP/HER2 negativos como los no negativos, muestran en su mayoría tinción estromal de TSP-1 ausente o débil (64,2 % y 71,1 %, respectivamente).

TSP-1 estromal	Nº de casos (%)		Sig.
	RE/RP/HER2 negativos	No RE/RP/HER2 negativos	
Positiva	19 (35,80 %)	55 (28,90 %)	p=0,33
Negativa	34 (64,20 %)	135 (71,10 %)	

Tabla 4.21: Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el subtipo molecular triple negativo

### Expresión celular

#### ■ Relación con el tamaño tumoral

No se observó relación estadísticamente significativa entre la expresión celular y TSP-1 y el tamaño tumoral.

#### ■ Relación con el grado histológico

Cuando analizamos la relación entre la expresión de TSP-1 celular y el grado histológico (Tabla 4.22), se aprecia que tanto los tumores que expresan TSP-1 en las células tumorales como los que no lo hacen, son con más frecuencia moderadamente diferenciados (50 % y 65,5 %, respectivamente), pero encontramos un mayor porcentaje de casos pobremente diferenciados dentro del grupo de tumores con tinción positiva para TSP-1 en comparación con las lesiones negativas para este marcador (37,5 % frente al 26,4 %).

Pero no ocurre lo mismo cuando tenemos en cuenta solo los tumores con afectación ganglionar, como se puede observar en la Tabla 4.23. En este caso, las lesiones que muestran tinción

TSP-1 celular	Nº de casos totales (%)			Sig.
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Positiva	2 (12,50 %)	8 (50 %)	6 (37,50 %)	p=0,5
Negativa	21 (9,10 %)	149 (64,50 %)	61 (26,40 %)	

Tabla 4.22: Relación de la expresión celular de TSP-1 y el grado histológico

moderada o intensa de TSP-1 celular, son en su mayoría de grado 3 (83,3%), mientras que los que no la expresan son de grado 2 (66,4%), siendo estos valores estadísticamente significativos ( $p = 0,014$ ).

TSP-1 celular	Nº de casos con afectación ganglionar (%)			Sig.
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Positiva	0 (0 %)	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)	p=0,14
Negativa	7 (6,4 %)	73 (66,4 %)	30 (27,2 %)	

Tabla 4.23: Relación de la expresión celular de TSP-1 y el grado histológico en los casos con afectación ganglionar

#### ■ Relación con la afectación ganglionar

En el caso de la relación con la afectación ganglionar, se observa que los casos con expresión celular de TSP-1 tienen mayoritariamente ganglios negativos (70%), si bien, este hecho se reproduce también en los casos con TSP-1 celular negativa (63,7%), por lo que no existe relación estadísticamente significativa (Tabla 4.24).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.
	Con afectación gg	Sin afectación gg	
Positiva	6 (30 %)	14 (70 %)	p=0,15
Negativa	113 (46,3 %)	131 (63,7 %)	

Tabla 4.24: Relación de la expresión celular de TSP-1 y la presencia o no de afectación ganglionar

#### ■ Relación con los receptores hormonales

Al cuantificar la TSP-1 en las células tumorales y relacionarla con la expresión de receptores hormonales (Tabla 4.25), hemos observado que tanto los tumores con ausencia o tinción débil como los de tinción moderada o intensa, son preferentemente RE positivos (66,7% y 75%, respectivamente) y RP positivos (61,4% y 81,3%, respectivamente).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.	Nº de casos (%)		Sig.
	RE positivos	RE negativos		RP positivos	RP negativos	
<b>Positiva</b>	12 (75 %)	4 (25 %)	p=0,4	13 (81,30 %)	3 (18,70 %)	p=0,11
<b>Negativa</b>	124 (66,7 %)	62 (33,3 %)		113 (38,6 %)	71 (61,4 %)	

Tabla 4.25: Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de receptores de estrógenos y progesterona

En el caso de los RP, dentro de los tumores sin afectación ganglionar (Tabla 4.26), la tendencia es la misma, siguen siendo más frecuentes los tumores RP positivos, sobre todo en el grupo que expresa TSP-1 celular, con un 90,9% de los casos. Pero observamos que existió un mayor porcentaje de casos RP negativos en los tumores que no expresaban TSP-1 celular en comparación con los que sí la expresaban (34,7% frente a 9,1%), acercándose estos valores a la significación estadística ( $p = 0,08$ ).

TSP-1 celular	Nº de casos sin afectación ganglionar (%)		Sig.
	RP positivo	RP negativo	
<b>Positiva</b>	66 (65,3 %)	35 (34,7 %)	p=0,08
<b>Negativa</b>	10 (90,9 %)	1 (9,1 %)	

Tabla 4.26: Relación de la expresión celular de TSP-1 y la expresión de RP en los casos sin afectación ganglionar

#### ■ Relación con HER2

La práctica totalidad de los casos TSP-1 celular positivos han sido HER2 negativos (95%), lo cual se reproduce en los casos con tinción celular negativa (86,8%), por lo que no existe relación estadísticamente significativa (Tabla 4.27).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.
	HER2 positivo	HER2 negativo	
<b>Positiva</b>	1 (5 %)	19 (95 %)	p=0,28
<b>Negativa</b>	30 (13,20 %)	197 (86,80 %)	

Tabla 4.27: Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de HER2

### ■ Relación con Ki67

En cuanto a la relación entre la expresión de TSP-1 celular y el índice proliferativo no se encuentran diferencias significativas (Tabla 4.28), siendo más frecuentes los casos con bajo índice proliferativo, independientemente de la intensidad de tinción estromal de TSP-1 (69,20 % y 55,7 %, respectivamente). Cabe destacar que en el caso de los tumores con expresión inmunohistoquímica moderada/intensa no existe ningún caso con un índice proliferativo de valor intermedio ( $Ki67 \geq 10 \leq 30$ ).

TSP-1 celular	Nº de casos totales (%)			Sig.
	Ki 67 <10	Ki67 $\geq 10 \leq 30$	Ki67 >30	
Positiva	9 (69,20 %)	0 (0 %)	4 (30,80 %)	p=0,2
Negativa	113 (55,70 %)	40 (19,70 %)	50 (24,50 %)	

Tabla 4.28: Relación de la expresión celular de TSP-1 con el índice de proliferación (Ki67)

### ■ Relación con p53

Al relacionar la expresión de TSP-1 en las células tumorales y la de p53 (Tabla 4.29), no se alcanzan valores significativos, ya que han sido más numerosos los casos sin expresión de p53. Pero se puede apreciar un mayor porcentaje de casos p53 positivos en el grupo de tumores con tinción ausente/débil de TSP-1 celular (18,6 % frente al 5 % del grupo con tinción intensa/moderada).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.
	p53 positivo	p53 negativo	
Positiva	1 (5 %)	19 (95 %)	p=0,12
Negativa	43 (18,60 %)	188 (81,40 %)	

Tabla 4.29: Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de p53

### ■ Relación con VEGF

Al igual que en los casos negativos, en los casos con expresión celular de TSP-1 incluidos en la Tabla 4.30 se observa un mayor porcentaje de expresión positiva de VEGF, apreciándose una cifra ligeramente mayor de lesiones VEGF negativas en el grupo con expresión celular moderada/intensa de TSP-1, en comparación con el que carece de expresión de TSP-1 (25 % y 17,6 %, respectivamente).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.
	VEGF positivo	VEGF negativo	
Positiva	15 (75 %)	5 (25 %)	p=0,41
Negativa	201 (82,40 %)	43 (17,60 %)	

Tabla 4.30: Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de VEGF

#### ■ Relación con el fenotipo luminal y basal

Al valorar la relación de la expresión de TSP-1 en las células tumorales y el fenotipo luminal de carcinoma de mama, observamos que la totalidad de los tumores negativos para CK 8/18/19 fueron TSP-1 negativos. No obstante, la ausencia de casos TSP-1 positivos y CK negativos no permitió establecer su correlación estadística (Tabla 4.31).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.
	CK 8/18/18 positiva	CK 8/18/18 negativa	
Positiva	20 (24,40 %)	0 (0 %)	p=0,36
Negativa	211 (91,70 %)	9 (100 %)	

Tabla 4.31: Relación de la expresión celular de TSP-1 con el fenotipo luminal

En cuanto a los datos de la expresión de TSP-1 celular y el fenotipo basal incluidos en la Tabla 4.32, sí existe una relación significativa ( $p = 0,05$ ), siendo más frecuentes los casos con tinción ausente o débil. Pero se observa que dentro de los tumores con fenotipo basal, existe un mayor porcentaje de tumores con tinción moderada/intensa en comparación con los casos CK 5/14 negativa (19 % frente al 7 %).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.
	CK 5/14 positiva	CK 5/14 negativa	
Positiva	4 (19 %)	16 (7 %)	p=0,05
Negativa	17 (81 %)	214 (93 %)	

Tabla 4.32: Relación de la expresión celular de TSP-1 con el fenotipo basal

Esta diferencia es mayor cuando sólo tenemos en cuenta los casos con afectación ganglionar, existiendo un 20 % de casos con fenotipo basal que muestran tinción moderada o intensa, frente a un 3,8 % de casos sin fenotipo basal con esta tinción ( $p = 0,02$ ). En los casos sin afectación ganglionar la tendencia es la misma pero no se obtienen resultados significativos (Tabla 4.33).

TSP-1 celular	Nº de casos con afectación gg (%)		Sig.
	CK 5/14 positiva	CK 5/14 negativa	
Positiva	2 (20 %)	4 (3,80 %)	p=0,02
Negativa	8 (80 %)	101 96,20 %)	

Tabla 4.33: Relación de la expresión celular de TSP-1 con el fenotipo basal en los casos con afectación ganglionar

#### ■ Relación con el subtipo molecular triple negativo

La Tabla 4.34 muestra la relación entre la expresión de TSP-1 celular y aquellos casos que cumplen o no tener RE, RP y HER2 negativos. Se puede observar que tanto los tumores que cumplen esta característica como los que no, muestran en su mayoría tinción ausente o débil para TSP-1 celular (88,7% y 92,6%, respectivamente).

TSP-1 celular	Nº de casos (%)		Sig.
	RE/RP/HER2 negativos	No RE/RP/HER2 negativos	
Positiva	6 (11,30 %)	14 (7,40 %)	p=0,35
Negativa	47 (88,70 %)	176 (92,60 %)	

Tabla 4.34: Relación de la expresión celular de TSP-1 y el subtipo molecular triple negativo

### 4.2.2. Fenotipo basal

#### Relación con el tipo histológico

La mayoría de los tumores con fenotipo basal (CK5/14 positivos) fueron de tipo invasor no específico (85,7%). Solo se advirtió fenotipo basal en un caso de carcinoma lobulillar, en uno de tipo mixto y en un carcinoma papilar (Tabla 4.35).

#### Relación con el grado histológico

En el estudio de la expresión de CK 5/14 y el grado histológico encontramos una relación significativa ( $p = 0,000$ ) entre ambos marcadores, siendo la mayoría de los tumores de fenotipo basal pobremente diferenciados, con un 78,9% de los casos. El 21,1% corresponde a tumores moderadamente diferenciados y no hay ninguno bien diferenciado. Por otro lado, en los tumores que no expresan CK 5/14 la tendencia es diferente, siendo los más frecuentes los moderadamente diferenciados (66%), y mostrando sólo un 23,8% de casos pobremente diferenciados y un 10,2% bien diferenciados (Tabla 4.36).

CK 5/14	Nº de casos (%)	
	Positiva	Negativa
<b>Ca. invasor no específico</b>	18 (85,7 %)	153 (66,50 %)
<b>Ca. lobulillar</b>	1 (4,80 %)	23 (10 %)
<b>Ca. mucinoso</b>	0 (0 %)	9 (3,90 %)
<b>Ca. medular</b>	0 (0 %)	2 (0,90 %)
<b>Ca. tubular</b>	0 (0 %)	3 (1,30 %)
<b>Ca. mixto</b>	1 (4,80 %)	36 (15,7 %)
<b>Ca. papilar</b>	1 (4,80 %)	2 (0,90 %)
<b>Ca. in situ</b>	0 (0 %)	2 (0,90 %)
<b>Sig.</b>	p= 0,42	

Tabla 4.35: Relación del fenotipo basal con el tipo histológico

CK 5/14	Nº de casos (%)			Sig.
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
<b>Positiva</b>	0 (0 %)	4 (21,1 %)	15 (78,9 %)	p=0,000
<b>Negativa</b>	22 (10,2 %)	142 (66 %)	51 (23,82 %)	

Tabla 4.36: Fenotipo basal y grado histológico

### Relación con la afectación ganglionar

La proporción de casos con y sin afectación ganglionar ha sido prácticamente similar dentro de los tumores con fenotipo basal, aunque, en comparación con las lesiones que no expresaron CK 5/14, presentan un porcentaje ligeramente mayor de casos con metástasis en ganglios linfáticos (47,6 % frente a 45,7 %), sin llegar a ser valores significativos (Tabla 4.37).

CK 5/14	Nº de casos (%)		Sig.
	Con mtx gg	Sin mtx gg	
<b>Positiva</b>	10 (47,60 %)	11 (52,40 %)	p=0,86
<b>Negativa</b>	105 (45,70 %)	125 (54,30 %)	

Tabla 4.37: Fenotipo basal y metástasis ganglionares

### Relación con los receptores hormonales

Al estudiar la relación entre la expresión de CK 5/14 por las células tumorales y los receptores hormonales (Tabla 4.38), obtenemos valores que alcanzan significación estadística ( $p = 0,000$ ). Así, la mayoría de los casos de fenotipo basal muestran RE negativos (85,7 %) y RP negativos (85,7 %), al contrario que los tumores negativos para CK 5/14, que son preferentemente RE positivos (61,8 %) y RP positivos (57,5 %).

CK 5/14	Nº de casos (%)		Sig.	Nº de casos (%)		Sig.
	RE positivos	RE negativos		RP positivos	RP negativos	
Positiva	3 (14,30 %)	18 (85,70 %)	p=0,000	3 (14,30 %)	18 (85,70 %)	p=0,000
Negativa	139 (61,80 %)	86 (38,20 %)		131 (57,50 %)	97 (42,50 %)	

Tabla 4.38: Fenotipo basal y expresión de RE y RP

### Relación con HER2

Cuando valoramos la expresión de HER2 en relación con la de CK 5/14, nos encontramos, que aunque la mayor parte de los casos son negativos para HER2, el porcentaje de tumores de fenotipo basal que expresan HER2 es mayor que dentro de las lesiones que no expresan CK 5/14 (20 % frente al 11,9 %), sin alcanzar significación estadística (Tabla 4.39).

CK 5/14	Nº de casos (%)		Sig.
	HER2 positivo	HER2 negativo	
Positiva	4 (20 %)	16 (80 %)	p=0,29
Negativa	27 (11,90 %)	199 (88,10 %)	

Tabla 4.39: Fenotipo basal y expresión de HER2

### Relación con RE/RP/HER2 negativos

Los tumores con fenotipo basal se caracterizan por expresar CK 5 o CK 14, y en su mayoría pierden la expresión de RE, RP y HER2. En nuestro estudio, el 65 % de los casos positivos para CK 5/14 muestran esta característica, son RE, RP y HER2 negativos. Mientras que el 82,4 % de los tumores que no expresan CK 5/14, tampoco muestran negatividad para los 3 marcadores a la vez (Tabla 4.40).

CK 5/14	Nº de casos (%)		Sig.
	RE/RP/HER2 negativos	No RE/RP/HER2 negativos	
Positiva	13 (65%)	7 (35%)	p=0,000
Negativa	39 (17,60%)	183 (82,40%)	

Tabla 4.40: Fenotipo basal y negatividad para RE, RP y HER2

### Relación con Ki67

Obtenemos una relación significativa ( $p = 0,006$ ) entre el fenotipo basal y la expresión de Ki67, mostrando la mayor parte de estos tumores un alto índice proliferativo (55,6%). Encontramos un 33,3% y un 11,1% de casos con un nivel de proliferación bajo y moderado, respectivamente. Al contrario, los casos CK 5/14 negativos presentan más frecuentemente un Ki67 bajo (58,9%), siendo intermedio el 19,3% y bajo el 21,8% (Tabla 4.41).

CK 5/14	Nº de casos (%)			Sig.
	Ki 67 <10	Ki67 $\geq 10 \leq 30$	Ki67 >30	
Positiva	6 (33,30%)	2 (11,10%)	10 (55,60%)	p=0,006
Negativa	116 (58,90%)	38 (19,30%)	43 (21,80%)	

Tabla 4.41: Fenotipo basal e índice proliferativo

### Relación con p53

En el caso de la expresión de p53 y la CK 5/14 (Tabla 4.42) encontramos una relación significativa ( $p = 0,001$ ) entre ambos marcadores. Observamos que la mayoría de los tumores CK 5/14 negativos muestran a su vez negatividad para p53 (85%). En el caso de los tumores con fenotipo basal, también son algo más numerosos los casos con p53 negativo (55%), pero las diferencias son menores y encontramos un importante porcentaje de casos p53 positivos en este grupo (45%).

CK 5/14	Nº de casos totales (%)		Sig.
	p53 positivo	p53 negativo	
Positiva	9 (45%)	11 (55%)	p=0,001
Negativa	34 (15%)	193 (85%)	

Tabla 4.42: Fenotipo basal y expresión de p53

Cuando analizamos los tumores con fenotipo basal con afectación ganglionar (Tabla 4.43), se observa con más frecuencia positividad para p53 (55,6%), al contrario de lo que ocurre en la totalidad de los casos, alcanzando estos valores significación estadística ( $p = 0,001$ ).

CK 5/14	Nº de casos con afectación gg (%)		Sig.
	p53 positivo	p53 negativo	
Positiva	5 (55,60 %)	4 (44,40 %)	p=0,001
Negativa	14 (13,50 %)	90 (86,50 %)	

Tabla 4.43: Fenotipo basal y la expresión de p53 en los casos con afectación ganglionar

#### Relación con VEGF

Al relacionar la CK 5/14 y la expresión de VEGF, se aprecia que la mayoría de los casos con fenotipo basal muestran positividad para VEGF (71,4%), aunque estos valores no alcanzan significación estadística (Tabla 4.44).

CK 5/14	Nº de casos totales (%)		Sig.
	VEGF positivo	VEGF negativo	
Positiva	15 (71,40 %)	6 (28,60 %)	p=0,25
Negativa	188 (81,70 %)	42 (18,30 %)	

Tabla 4.44: Fenotipo basal y expresión de VEGF

Sin embargo, cuando tenemos en cuenta los tumores con y sin metástasis ganglionar por separado (ver Tabla 4.45), encontramos un mayor porcentaje de lesiones VEGF negativas (36,4%) en el grupo de carcinomas basales con ganglios negativos, aunque la mayor parte siguió expresando VEGF (63,4%), alcanzando estos valores significación estadística ( $p = 0,034$ ).

CK 5/14	Nº de casos sin afectación gg (%)		Sig.
	VEGF positivo	VEGF negativo	
Positiva	7 (63,6 %)	4 (36,4 %)	p=0,034
Negativa	109 (87,2 %)	16(12,8 %)	

Tabla 4.45: Fenotipo basal y expresión de VEGF en los casos sin afectación ganglionar

	Nº de casos (%)	
	Positiva	Negativa
<b>CK 8/18/19</b>		
<b>Ca. invasor no específico</b>	163 (95,9%)	7 (4,1%)
<b>Ca. lobulillar</b>	23 (95,8%)	1 (4,2%)
<b>Ca. mucinoso</b>	9 (100%)	0 (0%)
<b>Ca. medular</b>	1 (50%)	1 (50%)
<b>Ca. tubular</b>	3 (100%)	0 (0%)
<b>Ca. mixto</b>	37 (100%)	0 (0%)
<b>Ca. papilar</b>	3 (100%)	0 (0%)
<b>Ca. in situ</b>	2 (100%)	0 (0%)
<b>Sig.</b>	p= 0,04	

Tabla 4.46: Relación entre la expresión de CK 8/18/19 y los tipos histológicos

### 4.2.3. Fenotipo luminal

#### Relación con el tipo histológico

En nuestra serie, los casos más numerosos son los carcinomas invasores no específicos con fenotipo luminal (CK 8/18/19 positivos), correspondiendo al 65,2% (163) del total de casos, alcanzando estos valores significación estadística ( $p = 0,04$ ). Además, se observa que en todos los tipos histológicos la frecuencia de expresión de CK 8/18/19 oscila entre el 95% y el 100%, excepto en los carcinomas medulares, donde se aprecia el mismo número de casos positivos y negativos para CK 8/18/19 (Tabla 4.46).

#### Relación con el grado histológico

Cuando estudiamos la relación entre la expresión de CK 8/18/19, que define al fenotipo luminal, y el grado histológico de la lesión, observamos que la mayoría de los casos positivos son de grado 2 (moderadamente diferenciados) (63,3%), siendo de grado 3 (pobremente diferenciado) un 27% y de grado 1 (bien diferenciado) un 9,7%. Los casos negativos presentan un número similar de casos de grado 3 y 2 (57,1% y 42,9%, respectivamente), no existiendo casos bien diferenciados (Tabla 4.47).

#### Relación con la afectación ganglionar

No encontramos una relación significativa entre la expresión de CK 8/18/19 y la afectación ganglionar, siendo muy parecido el porcentaje de casos con y sin metástasis ganglionares en los

CK 8/18/19	Nº de casos (%)			Sig.
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Positiva	22 (9,70 %)	143 (63,30 %)	61 (27 %)	p=0,18
Negativa	0 (0 %)	3 (42,90 %)	4 (57,10 %)	

Tabla 4.47: Fenotipo luminal y el grado histológico

dos grupos de tumores, aunque un poco más frecuentes los casos con afectación de ganglios en los tumores que no expresan CK 8/18/19 (Tabla 4.48).

CK 8/18/19	Nº de casos (%)		Sig.
	Con mtx gg	Sin mtx gg	
Positiva	110 (45,60 %)	131 (54,40 %)	p=0,55
Negativa	5 (55,60 %)	4 (44,40 %)	

Tabla 4.48: Fenotipo luminal y la afectación ganglionar

### Relación con los receptores hormonales

Al estudiar la relación entre la expresión de CK 8/18/19 y la de los receptores hormonales obtenemos valores significativos (Tabla 4.49). En cuanto a los receptores de estrógenos, los casos que muestran fenotipo luminal (CK 8/18/19 positivos) son con más frecuencia RE positivos (59,1 %). Por el contrario, los casos negativos son en su mayoría RE negativos (88,9 %). Con los receptores de progesterona encontramos resultados similares. Los casos CK 8/18/19 positivos son más frecuentemente RP positivos (55,2 %), mientras que los tumores negativos son mayoritariamente RP negativos (77,8 %).

CK 8/18/18	Nº de casos (%)		Sig.	Nº de casos (%)		Sig.
	RE positivos	RE negativos		RP positivos	RP negativos	
Positiva	140 (59,10 %)	97 (40,90 %)	p=0,004	132 (55,20 %)	107 (44,80 %)	p=0,05
Negativa	1 (11,10 %)	8 (88,90 %)		2 (22,20 %)	7 (77,80 %)	

Tabla 4.49: Fenotipo luminal y la expresión de receptores hormonales

**Relación con HER2**

En la relación con la expresión de HER2 no encontramos diferencias significativas (Tabla 4.50). Los tumores con fenotipo luminal han sido en su mayoría HER2 negativos, al igual que los casos negativos para CK 8/18/19 (87,7 % y 88,9 %, respectivamente).

CK 8/18/19	Nº de casos (%)		Sig.
	HER2 positivo	HER2 negativo	
Positiva	29 (12,30 %)	207 (87,70 %)	p=0,091
Negativa	1 (11,10 %)	8 (88,90 %)	

Tabla 4.50: Fenotipo luminal y la expresión de HER2

**Relación con RE/RP/HER2 negativos**

Los tumores con fenotipo luminal suelen expresar receptores hormonales pero no expresan HER2. Cuando analizamos la relación entre los casos positivos para CK 8/18/19 y la no expresión de RE, RP y HER2 en conjunto, observamos que la mayoría de los casos con fenotipo luminal no cumplen esta característica (80,3 %). Sin embargo, el 77,8 % de casos negativos para CK 8/18/19, sí que presentan negatividad para receptores hormonales y HER2 (Tabla 4.51).

CK 8/18/19	Nº de casos (%)		Sig.
	RE/RP/HER2 negativos	No RE/RP/HER2 negativos	
Positiva	46 (19,70 %)	187 (80,30 %)	p=0,000
Negativa	7 (77,80 %)	2 (22,20 %)	

Tabla 4.51: Fenotipo luminal y la negatividad para RE, RP y HER2

**Relación con Ki67**

La mayor parte de los tumores con fenotipo luminal son lesiones de bajo índice proliferativo (57,8 %). En este grupo encontramos un 23,5 % de casos con elevado Ki67 y un 18,6 % de nivel moderado. Sin embargo, en los tumores que muestran una tinción negativa para CK 8/18/19 son ligeramente más frecuentes las lesiones con Ki67, con un 44,4 % de los casos, mientras que el 33,3 % corresponde a un Ki67 bajo y el 22,2 % a moderado, sin alcanzar valores significativos (Tabla 4.52).

CK 8/18/19	Nº de casos (%)			Sig.
	Ki 67 <10	Ki67 ≥ 10 ≤ 30	Ki67 >30	
Positiva	118 (57,80 %)	38 (18,60 %)	48 (23,50 %)	p=0,28
Negativa	3 (33,30 %)	2 (22,20 %)	4 (44,40 %)	

Tabla 4.52: Fenotipo luminal y el índice proliferativo

### Relación con p53

Cuando analizamos la expresión de p53 (Tabla 4.53), encontramos una relación significativa con la expresión de CK 8/18/19 ( $p = 0,000$ ), de forma que los casos con fenotipo luminal son con más frecuencia p53 negativos (84%). Sin embargo, los casos negativos para CK 8/18/19 expresan en su mayoría p53 (66,7%).

CK 8/18/19	Nº de casos (%)		Sig.
	p53 positivo	p53 negativo	
Positiva	38 (16 %)	199 (84 %)	p=0,000
Negativa	6 (66,70 %)	3 (33,30 %)	

Tabla 4.53: Fenotipo luminal y la expresión de p53

### Relación con VEGF

En cuanto a la relación entre la expresión de CK 8/18/19 y de VEGF (Tabla 4.54), encontramos una relación significativa entre ambos marcadores ( $p = 0,04$ ), de forma que los tumores con fenotipo luminal son en su mayoría VEGF positivos (82,6%). En el caso de las lesiones negativas para CK 8/18/19, las diferencias entre la expresión de VEGF son menores, siendo también un poco más frecuentes los casos positivos (55,6%).

CK 8/18/19	Nº de casos (%)		Sig.
	VEGF positivo	VEGF negativo	
Positiva	198 (82,20 %)	43 (17,80 %)	p=0,04
Negativa	5 (55,60 %)	4 (44,40 %)	

Tabla 4.54: Fenotipo luminal y la expresión de VEGF

## 4.3. Estudio de supervivencia

### 4.3.1. Supervivencia global

Después de más de 10 años de seguimiento, la supervivencia global media estimada de nuestra serie se situó en los 95,170 meses (IC 95 %: 90,352-99,989), siendo la mediana de 120 meses (IC 95 %: 107,483-132,517) (Figura 4.11). Al finalizar nuestro estudio, 136 pacientes permanecen vivos sin enfermedad (51,1 %), 8 (3 %) vivos con enfermedad, 75 (28,2 %) han fallecido por el tumor y 47 (17,7 %) por otras causas.

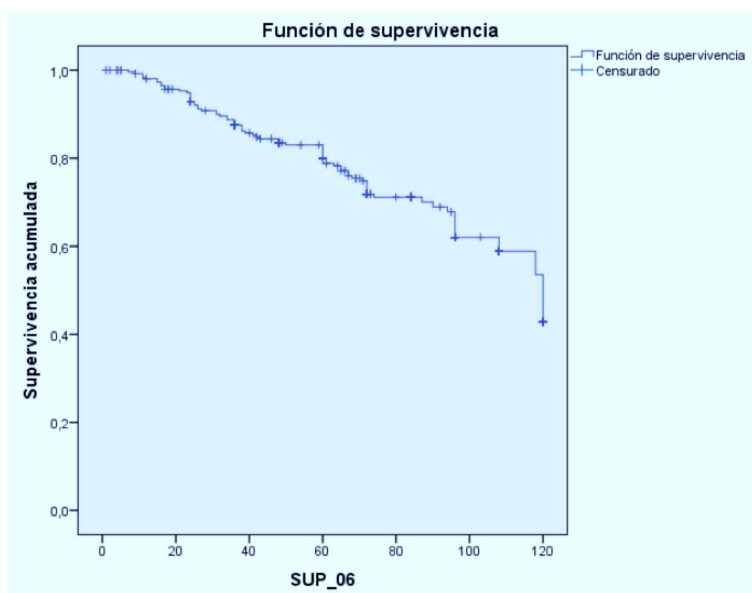


Figura 4.11: Función de supervivencia

Hemos realizado un análisis univariante de la supervivencia global específica de nuestras pacientes, y su relación con distintos parámetros clínicos e histopatológicos.

### 4.3.2. Relación entre supervivencia y el tamaño tumoral

Las pacientes con los tumores de menor tamaño de nuestro estudio presentaron los mejores datos de supervivencia ( $p = 0,04$ ). Los tumores menores o iguales a 2 cm mostraron una supervivencia media estimada de 179,050 meses (IC 95 %: 166,115-191,985). Por su parte, los tumores con tamaños mayores de 2 cm pero menores o iguales a 5 cm tuvieron la peor supervivencia media, de 147,799 meses (IC 95 %: 134, 658-160,940). Sin embargo, los tumores más grandes, de más de 5

cm, presentaron una supervivencia intermedia entre los grupos anteriores, siendo de 168,335 meses (IC 95 %: 126,949-209,720). A los 5 años de seguimiento la probabilidad de supervivencia de las pacientes con tumores menores o iguales a 2 cm era del 93 %, del 82 % para los mayores de 2 y menores o iguales a 5cm, y de 89 % para los mayores de 5 cm (Figura 4.12).

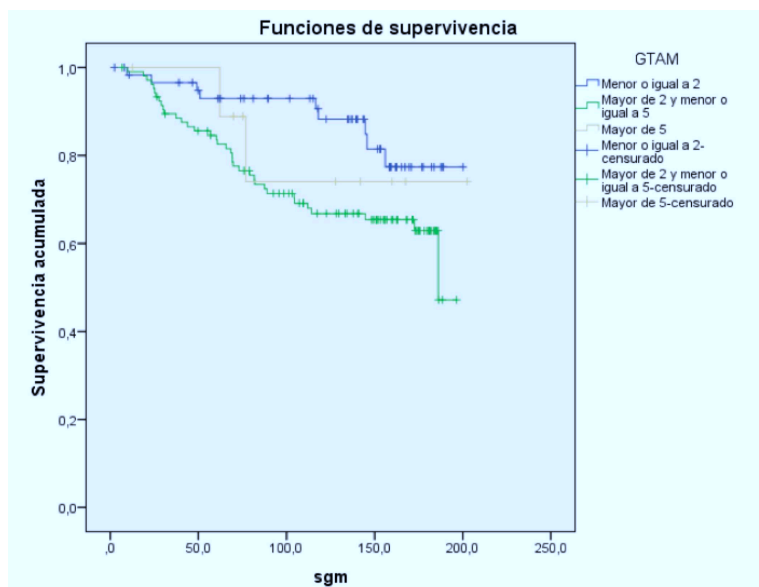


Figura 4.12: Supervivencia global en meses (sgm) según el tamaño tumoral (GTAM).

#### 4.3.3. Relación entre supervivencia y la afectación ganglionar

También obtuvimos diferencias significativas entre la supervivencia y la presencia o no de metástasis ganglionares ( $p = 0,000$ ). La supervivencia media estimada de las pacientes sin afectación ganglionar fue de 157,829 meses (IC 95 %: 154,168-161,490) frente a los 161,225 meses (IC 95 %: 149,159-173,290) de las que presentaron de 1-3 ganglios afectados, y de 125,193 meses (IC 95 %: 105,658-144,728) en el caso de las pacientes con más de 3 metástasis ganglionares, siendo este grupo el que presentó los peores datos de supervivencia (Figura 4.13).

#### 4.3.4. Relación entre supervivencia y la expresión de TSP-1 estromal

No encontramos diferencias significativas entre la supervivencia y la expresión o no de TSP-1 en el estroma. Los casos que mostraron tinción estromal para TSP-1 moderada/intensa tuvieron una supervivencia media estimada de 93,368 meses (IC 95 %: 83,939-102,797), mientras que se obtu-

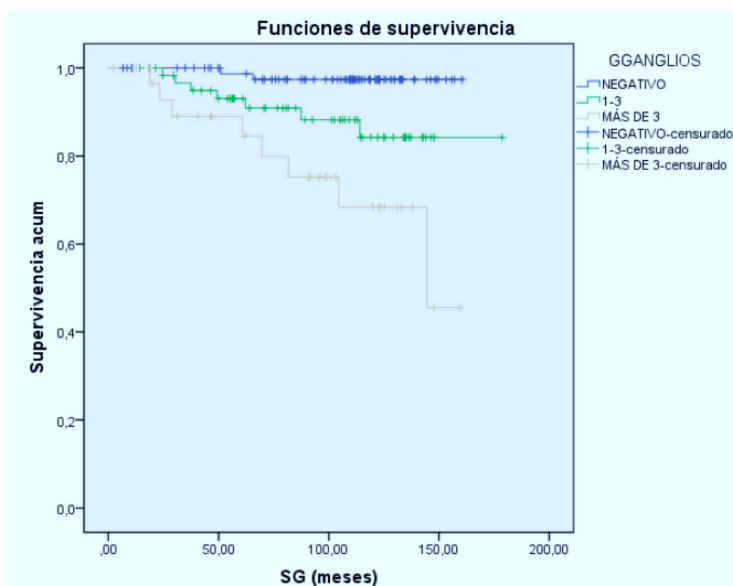


Figura 4.13: Supervivencia global en meses (SG) según la afectación ganglionar (GGANGLIOS).

vieron valores ligeramente menores en los casos con tinción débil o ausente, con una supervivencia media de 95,889 meses (IC 95 %: 90,245-101,533)(Figura 4.14).

#### 4.3.5. Relación entre supervivencia y la expresión de TSP-1 celular

En el caso de la expresión celular de TSP-1, las pacientes que presentaron tinción débil o ausente tuvieron mejores datos con una supervivencia media estimada de 94,487 meses (IC 95 %: 89,440-99,535) frente a los 81,778 meses (IC 95 %: 69,256-94,300) de los casos con tinción moderada/intensa. Estos datos no mostraron significación estadística (Figura 4.15).

#### 4.3.6. Relación entre la supervivencia, la expresión de TSP-1 estromal y la afectación ganglionar

No encontramos diferencias significativas entre la supervivencia global específica, la afectación ganglionar y la expresión o no de TSP-1 estromal( $p= 0,87$ ). Los casos con metástasis ganglionares y que expresaron de forma moderada/intensa TSP-1 en el estroma tuvieron una supervivencia media estimada de 68,633 meses (IC 95 %: 55,161-82,104). Sin embargo, los que mostraron una tinción débil/ausente presentaron mejores resultados con una supervivencia media de 89,651 meses (IC 95 %: 81,179-98,124). A los 5 años de seguimiento, la probabilidad de supervivencia de las

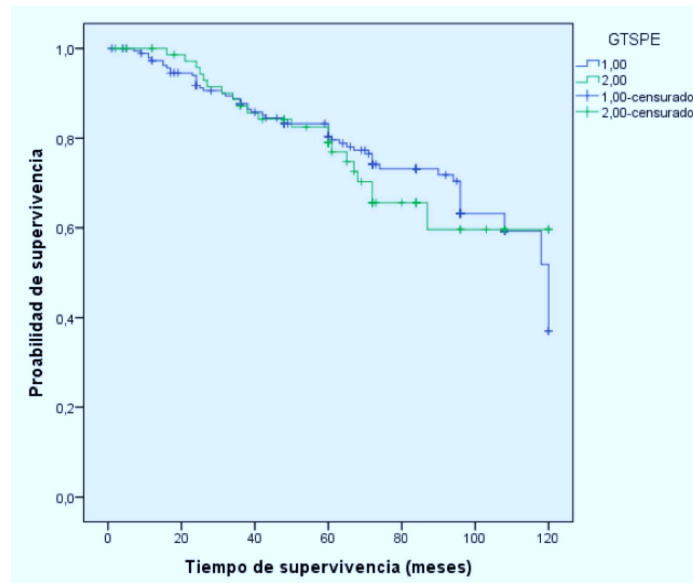


Figura 4.14: Supervivencia según la expresión estromal de TSP-1 (GTSPE), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa.

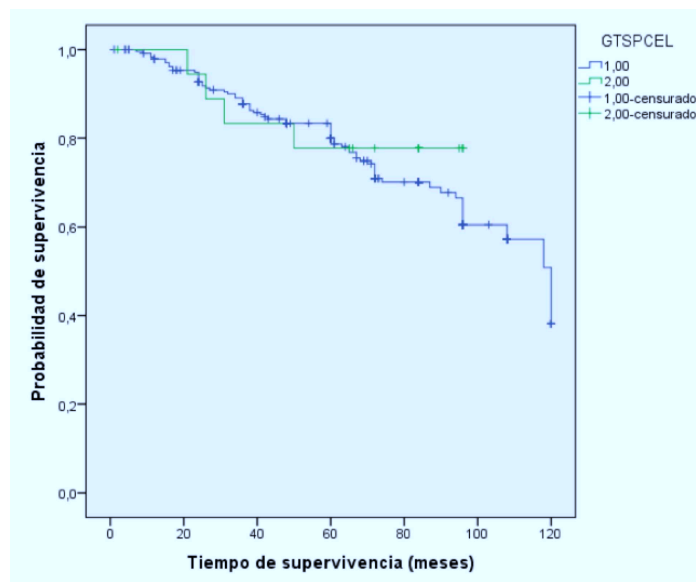


Figura 4.15: Supervivencia según la expresión celular de TSP-1 (GTSPCEL), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa.

pacientes con metástasis ganglionares y sin expresión estromal de TSP-1 fue en torno al 70 %, mientras que la de las pacientes TSP-1 estromal positivas no alcanzó el 60 % (Figura 4.16).

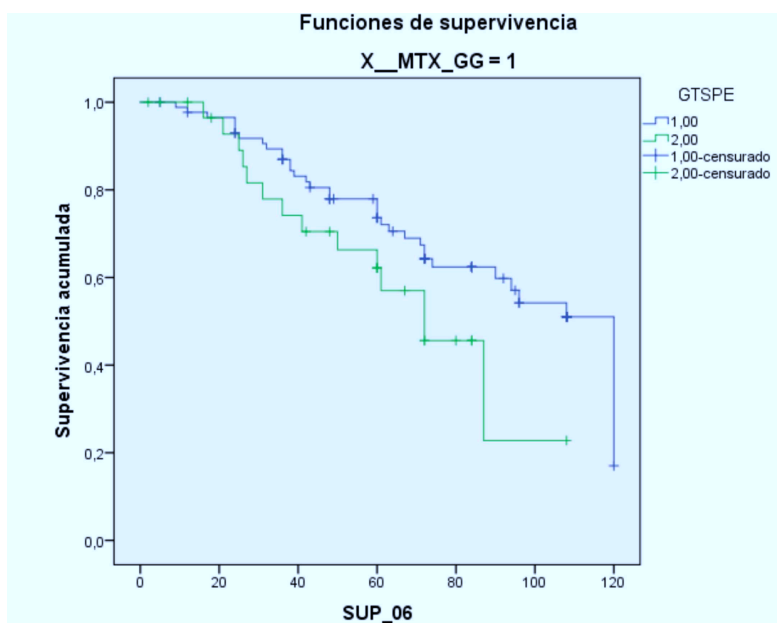


Figura 4.16: Supervivencia de casos con tinción negativa para TSP-1 estromal según la afectación ganglionar.

En el caso de las pacientes sin afectación ganglionar, las que mostraron una tinción débil/ausente tuvieron una supervivencia media algo menor, de 102,188 meses (IC 95 %: 95,082-109,294), en comparación con aquellas cuya tinción de TSP-1 estromal fue positiva, con una supervivencia media de 106,046 meses (IC 95 %: 96,718-115,375). Tanto las que expresaron TSP-1 en el estroma como las que no lo hicieron mostraron una probabilidad de supervivencia a los 5 años del 85 % aproximadamente (Figura 4.17).

#### 4.3.7. Relación entre la supervivencia, la expresión de TSP-1 celular y la afectación ganglionar

En los casos con metástasis ganglionares, hubo una mayor supervivencia media para aquellas pacientes con tumores que no expresaron TSP-1 celular o lo hicieron débilmente, siendo de 86,944 meses (IC 95 %: 79,282-94,605) frente a los 58,400 meses (IC 95 %: 30,962-85,838) de los casos con expresión celular moderada/intensa (Figura 4.18).

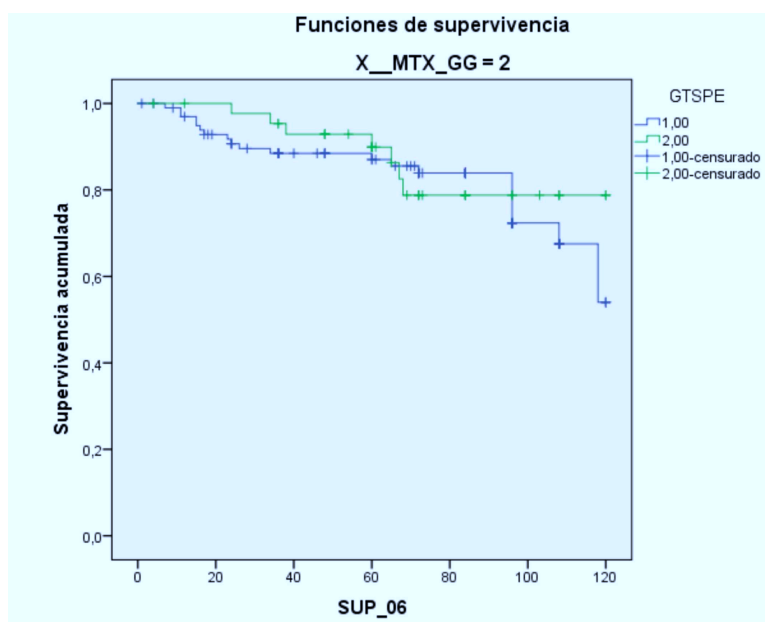


Figura 4.17: Supervivencia de casos con tinción positiva para TSP-1 estromal según la afectación ganglionar.

Ocurre algo similar en los casos sin metástasis ganglionares, teniendo una supervivencia algo mayor las pacientes con tumores con expresión celular negativa de TSP-1, con 101,786 meses de media (IC 95 %: 95,523-108,048), que las que muestran positividad para el marcador con una supervivencia media de 90,615 meses (IC 95 %: 80,476-100,755) (Figura 4.19). Estos datos no mostraron significación estadística.

#### 4.3.8. Relación entre la supervivencia y el fenotipo basal

La supervivencia media estimada de las mujeres con fenotipo basal (CK5/6-14 positivas) fue de 85,719 meses (IC 95 %: 65,281-106,158), mientras que la de los casos con estas citoqueratinas negativas fue de 95,314 meses (IC: 95 %: 90,127-100,501). Estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Figura 4.20).

#### 4.3.9. Relación entre la supervivencia y el fenotipo luminal

Sí obtuvimos diferencias significativas entre la supervivencia y la positividad o no a citoqueratinas luminales CK8/18/19 ( $p = 0,006$ ). Los casos con fenotipo luminal (CK 8/18/19 positivos) tuvieron una supervivencia media estimada de 96,416 meses (IC 95 %: 91,262-101,571), mientras

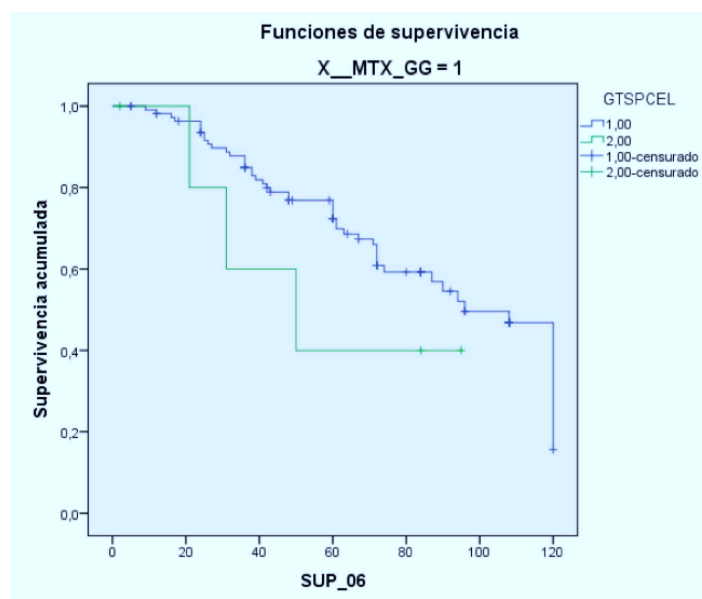


Figura 4.18: Supervivencia (SUP\_06) de casos con metástasis ganglionares ( $X\_MTX\_GG = 1$ ) según la expresión de TSP-1 celular (GTSPCEL), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa.

que en los negativos la supervivencia fue de 67,014 meses (IC 95 % 49,982-84,047). A los 72 meses de seguimiento la probabilidad de supervivencia de las pacientes con tumores de fenotipo luminal fue del 73 %, mientras que para los no luminales fue del 46 % (Figura 4.21).

#### 4.3.10. Relación entre la supervivencia y el fenotipo triple negativo

No conseguimos resultados significativos entre la supervivencia y el fenotipo triple negativo, definido en nuestro estudio como negatividad simultánea para RE, RP y HER2. La supervivencia media estimada de aquellos casos que mostraron simultáneamente negatividad para estos marcadores fue de 77,195 meses (IC 95 %: 58,777-95,614), mientras que los casos que no cumplieron este criterio tuvieron una supervivencia media mucho mejor, de 95,509 meses (IC 95 %: 90,262-100,757) (Figura 4.22).

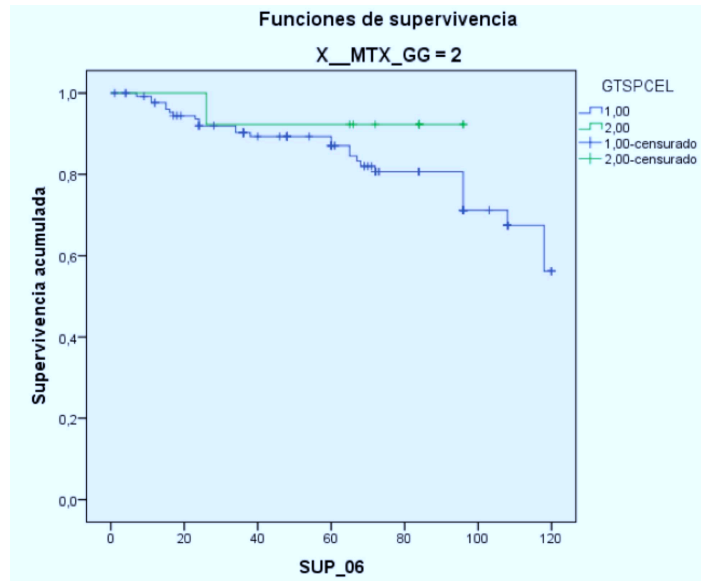


Figura 4.19: Supervivencia (SUP\_06) de casos sin metástasis ganglionares ( $X\_MTX\_GG = 2$ ) según la expresión de TSP-1 celular (GTSPCEL), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa.

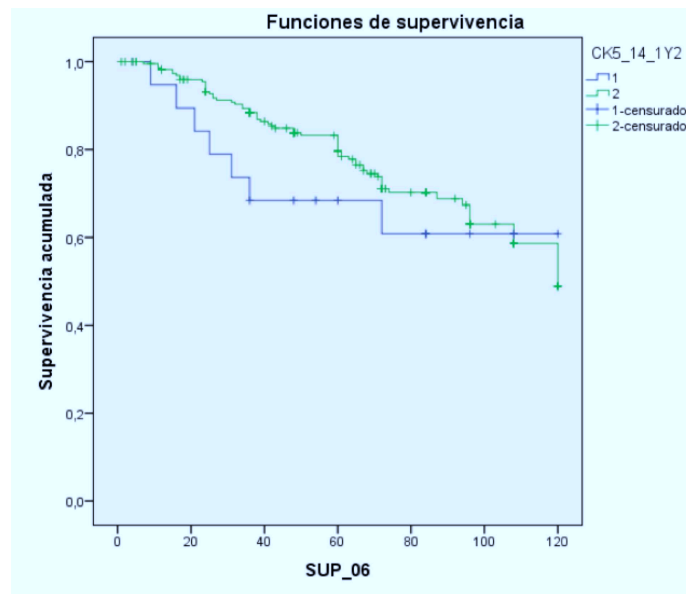


Figura 4.20: Supervivencia (SUP\_06) de casos según la expresión de CK 5/6-14 (CK5\_14\_1Y2), siendo 1 positivo y 2 negativo.

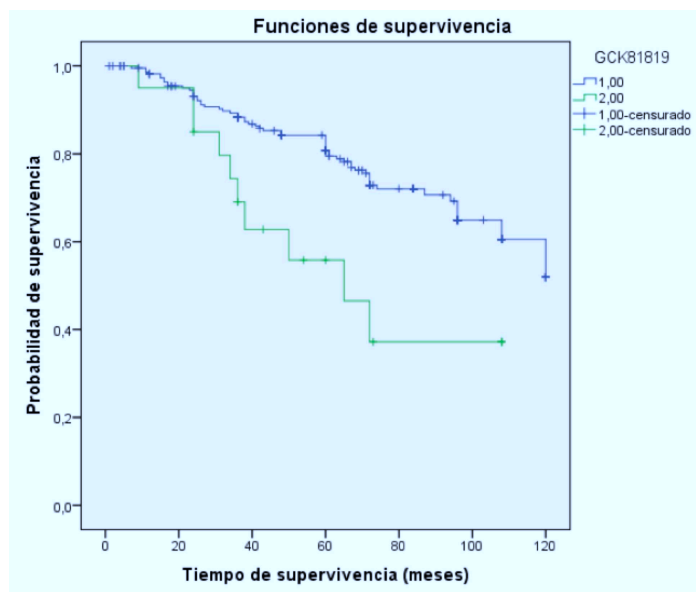


Figura 4.21: Supervivencia de casos según la expresión de CK 8/18/19 (GCK81819), siendo 1 positivo y 2 negativo.

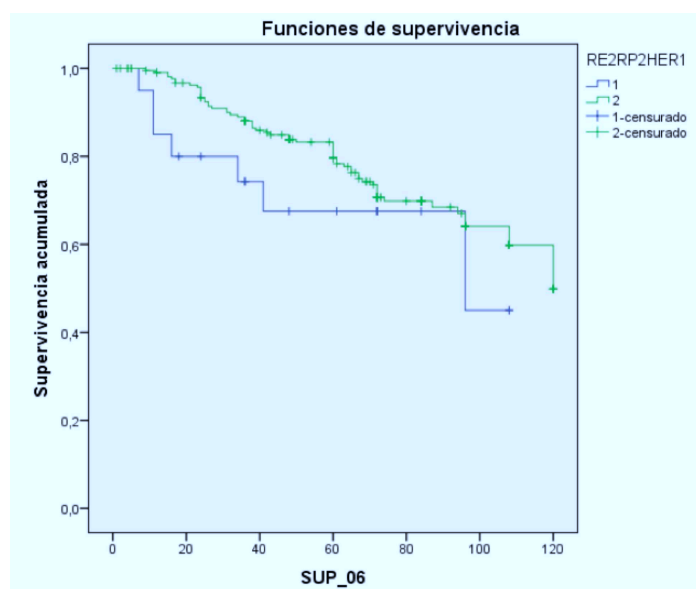


Figura 4.22: Supervivencia (SUP\_06) de casos según la negatividad para RE, RP y HER2 (RE2RP2HER1), siendo 1 los casos negativos en los tres marcadores y 2 en el caso contrario.



## Capítulo 5

# Discusión

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres y su principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. A pesar del avance en los métodos de screening que han facilitado el diagnóstico precoz de esta enfermedad maligna y el desarrollo de nuevas terapias más avanzadas, la tasa de incidencia y de mortalidad sigue aumentando, hasta un 20 % y un 14 % respectivamente desde 2008 a 2012 [1, 2]. Por ello, se continúan estudiando los diferentes factores implicados en la biología de este tipo de cáncer e intentando descubrir las diferentes dianas sobre las que poder actuar para llegar a la curación de esta enfermedad.

Uno de las áreas ampliamente estudiada para conocer la biología tumoral desde hace años es la angiogénesis tumoral, ya que la angiogénesis que da lugar a la microvascularización tumoral ha demostrado ser crucial para el crecimiento de los tumores sólidos y su diseminación metastásica [222, 223]. El cáncer de mama fue objeto del estudio pionero de Weidner et al. en 1991 [224] sobre el significado de la angiogénesis en la evolución clínica, y posteriormente ha sido uno de los tumores más estudiados en este aspecto. La mayor parte de los estudios han encontrado relación entre un nivel elevado de vascularización y la existencia de metástasis en ganglios linfáticos y a distancia, confirmando el carácter predictor de metástasis de la densidad microvascular (DMV). Asimismo, la gran mayoría de las series encuentran una relación positiva entre la DMV y la evolución de los pacientes, tanto en cuanto a supervivencia libre de enfermedad como a supervivencia global. Además, si se compara con otras variables, en gran parte de los estudios se ha observado un carácter de pronóstico independiente [225, 226]. No obstante, el valor pronóstico es más evidente en pacientes con ganglios no afectados, ya que cuando se consideran los carcinomas de mama en su conjunto los resultados son más contradictorios. Un meta-análisis realizado en 2004 por B. Uzzan et al. confirma la existencia de una relación inversa entre angiogénesis, valorada mediante



DMV, y supervivencia, concluyendo que el cáncer de mama es angiogénico-dependiente [227]. La angiogénesis tumoral depende del equilibrio entre la actividad de los factores proangiogénicos y los antiangiogénicos. Actualmente, VEGF es el factor angiogénico más estudiado en cuanto a su significado clínico. Como se apuntó anteriormente, induce la neoangiogénesis estimulando la proliferación, permeabilidad y migración capilar como respuesta a distintos factores como la hipoxia, ciertas citoquinas, p53 mutado, alteraciones del gen VHL y estradiol [62, 63].

Por otro lado, la TSP-1 se considera un inhibidor natural de la angiogénesis. Se han realizado múltiples estudios donde se demuestra su poder antiangiogénico en diferentes tipos de tumores como en el carcinoma colo-rectal, gástrico, carcinomas de piel o en el glioblastoma [183, 161, 191, 192, 193, 194]. Como consecuencia de esta actividad, TSP-1 puede frenar el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis [148]. Pero a pesar de estos hallazgos, su papel en la progresión tumoral no sigue estando claro, ya que otros estudios han obtenido resultados totalmente opuestos, en los que esta proteína podría favorecer la angiogénesis en diferentes estirpes tumorales, entre ellos el cáncer de mama [198, 199, 200, 201, 202]. Aunque la mayoría de las investigaciones apoya su función antiangiogénica en el cáncer de mama, existen varias publicaciones en las que parece actuar de forma contraria, como por ejemplo el estudio de Byrne et al. en la que se relacionan niveles plasmáticos de TSP-1 con la progresión de la enfermedad, encontrándose más elevados en las pacientes con cáncer metastásico, observándose así que los niveles elevados se relacionan con una mayor densidad microvascular intratumoral [210]. Yee et al. también observaron niveles plasmáticos más altos en pacientes con tumores avanzados que en estadios tempranos [218] y el estudio de Hyder et al. relaciona un posible efecto angiogénico de la TSP-1 inducida por los estrógenos [212].

Cuando se ha estudiado la expresión de TSP-1 en el tejido mamario, se ha demostrado que sus niveles se encuentran elevados en las patologías malignas, localizándose principalmente en el estroma de los carcinomas invasores no específicos, sobre todo en las áreas de desmoplasia, y también en las células tumorales de los carcinomas lobulillares [206]. Por el contrario, sus niveles son bajos en la patología benigna y mínimos o nulos en el tejido mamario normal [207]. Esto hace pensar que la TSP-1 está relacionada y puede favorecer la transformación maligna de la mama. En nuestro estudio, la mayor parte de los tumores analizados mostraron una tinción de TSP-1 ausente o débil tanto en el estroma como en las células tumorales, aunque el número de casos que presentaron una tinción moderada/intensa de TSP-1 estromal fue mayor que el de tinción celular (29,3 % frente al 7,6 %), lo que coincide con los hallazgos en los que se observa que la proteína está presente principalmente en el estroma, mientras que las células tumorales es menos frecuente que la expresen.

Evaluamos también la presencia de TSP-1 según los distintos tipos histológicos y este caso la tendencia fue la misma, la mayoría de los casos fueron negativos para la tinción estromal en los diferentes tipos histológicos (invasor no específico, lobulillar, mucinoso, mixto, medular, tubular, in situ), exceptuando los casos de carcinoma papilar, siendo el único tipo histológico de nuestro estudio en el que son más numerosos los casos con tinción estromal moderada/intensa que los de tinción ausente/débil (66,7% y 33,3%, respectivamente). En cuanto a la tinción celular, los resultados fueron similares, siendo negativa TSP-1 en todos los tipos histológicos, aunque en los mucinosos encontramos más número de casos que expresan TSP-1 celular (55,6% negativos y 44,4% positivos), siendo además el único tipo histológico donde se expresa con mayor frecuencia TSP-1 celular que estromal (44,4% frente al 22%). Los casos de carcinoma medular, tubular e in situ no mostraron tinción para TSP-1 ni estromal ni celular.

Como se ha mencionado anteriormente, en varios estudios previos, como los de Wong et al. y Clezardin et al. [206, 207], se observó que en los carcinomas lobulillares TSP-1 se expresaba con más intensidad en las células tumorales que en el estroma, mientras que en el carcinoma invasor no específico era principalmente una tinción estromal y no se observaba expresión celular. Sin embargo en nuestra serie, tanto los carcinomas invasores no específicos como los lobulillares mostraron más expresión estromal que celular (30,3% frente al 6,6% en los invasores no específicos y 29,2% frente al 8,3% en los lobulillares, respectivamente).

En su estudio Wong et al. también describen que la expresión de TSP-1 se incrementa cuanto peor es la diferenciación del tumor, encontrando los niveles más altos en las lesiones pobremente diferenciadas [206]. En nuestra investigación, aunque los hallazgos no alcanzan la significación estadística, se acercan a ella y podemos observar que los tumores que expresaron TSP-1 estromal fueron en su mayoría de grado 2 (55,8%) y en su minoría de grado 1 (7,8%). Los tumores pobremente diferenciados (grado 3) mostraron un porcentaje importante de tinción positiva estromal (36,4%), siendo más numerosos que los casos de grado 3 que no la expresaron (22,9%). Esta diferencia fue mayor en los casos con afectación ganglionar donde el 35% de las lesiones que expresaron TSP-1 estromal fueron de grado 3, mientras que sólo lo fueron un 18% de las que no mostraron tinción. Por otro lado, en nuestro estudio no se cuantificó el nivel de TSP-1 por lo que no podemos saber si los casos de grado 3 tenían niveles más altos que los demás tumores.

Los resultados fueron parecidos en la evaluación de la tinción celular de TSP-1, presentando un porcentaje similar de casos con tinción positiva que fueron de grado 3 (37,5%). Pero se observó una salvedad, cuando se valoró la expresión de la proteína en las células tumorales de los casos que presentaban metástasis ganglionares, y por tanto más agresivos, la mayor parte de las lesiones que

expresaban fuertemente TSP-1 fueron de grado 3, representando el 83,3% de todos los casos, y no se encontró ningún caso de grado 1. Sin embargo, no podemos establecer claramente una relación porque los resultados no fueron estadísticamente significativos.

El papel de TSP-1 en la metástasis tumoral es controvertido ya que se ha propuesto que esta proteína puede tener tanto propiedades prometastásicas como antimetastásicas. Por un lado se cree que puede estar implicada en diferentes puntos del proceso metastásico mediante interacciones de las células malignas con la matriz extracelular, el endotelio o las plaquetas circulantes [228, 229]. Por otro lado, el estudio de Yee et al. encontró que la TSP-1 inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral en el microambiente del tumor en la mama pero promueve la metástasis hacia el pulmón [218]. Ioachim et al. realizaron un estudio en 2012 en el que se observaron una expresión muy baja de TSP-1 estromal en relación con la afectación ganglionar apoyando su papel como inhibidor de la metástasis tumoral [230]. Sin embargo, en nuestro estudio, al igual que en otros anteriores como el de Bertin et al. y Wang-Rodríguez et al. [208, 231], no se encuentra ninguna correlación entre la expresión de TSP-1 y el estado ganglionar en el cáncer de mama. En nuestro caso fueron más numerosas las lesiones con tinción positiva y sin metástasis, sobre todo las que expresaron TSP-1 en las células tumorales que supusieron el 70% de los casos frente al 59% correspondiente a las que presentaron tinción estromal, pero no alcanzaron significación estadística, por lo que no podemos determinar una posible tendencia antimetastásica.

En el estudio de supervivencia se aprecia que los casos que muestran tinción positiva para TSP-1 estromal y celular, ya sea con o sin metástasis, tienen una peor supervivencia media que los casos negativos para TSP-1, con una excepción, los tumores TSP-1 estromal positivos y sin metástasis ganglionares fueron los que registraron una mejor supervivencia media de 106,046 meses, mientras que los tumores con TSP-1 celular positiva y con metástasis fueron los de peor supervivencia con 58,400 meses de media. Sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Nuestro estudio es uno de los primeros en valorar la expresión de TSP-1 en relación con los fenotipos luminal y basal, definidos por la expresión inmunohistoquímica de citoqueratinas CK 8/18/19 y CK 5/6 o CK 14, respectivamente. Así, observamos que los tumores de fenotipo luminal mostraron en su mayoría una tinción débil o ausente tanto para TSP-1 estromal como celular, sin ser valores significativos. Por otro lado, los basales fueron en un mayor porcentaje positivos para TSP-1 estromal (57,1%), alcanzando este resultado significación estadística ( $p=0,005$ ). Sin embargo, en cuanto a la tinción en las células tumorales, es más frecuente la ausencia de tinción en el fenotipo basal (81%), aunque pudimos comprobar un porcentaje mayor de casos con tinción positiva para TSP-1 celular en las lesiones que expresaban CK 5/6 o CK 14 que en las que no

las expresan (19 % y 7 %, respectivamente), siendo valores significativos ( $p=0,02$ ), y encontrando que esta diferencia fue un poco mayor cuando valoramos los casos con afectación ganglionar (20 % con CK 5/6 o CK 14 y TSP-1 celular positivas, frente al 3,8 % con citoqueratinas negativas y TSP-1 positiva, obteniendo una  $p=0,02$ ). Atendiendo a estos resultados, parece que los tumores de fenotipo basal expresan con más frecuencia TSP-1 en el estroma pero no lo hacen en las células tumorales, donde comúnmente está ausente. Aunque el nivel de expresión de TSP-1 celular en los tumores de fenotipo basal es bajo, es algo mayor que en los que no expresan CK 5/6 o CK 14. Esto se podría explicar por el hecho de que las células basales/mioepiteliales de la mama se caracterizan por expresar CK 5/6 y CK 14 y por presentar en su superficie al CD51. Clezardin et al. describieron al CD51 o integrina  $\alpha v\beta 3$  como un receptor superficial de TSP-1 que se localiza en las células mioepiteliales de los ductos no lactantes, así como en las células endoteliales y las musculares lisas. En el carcinoma, la expresión de CD51 es variable pero cuando está presente es más abundante en las células de la periferia, más relacionadas con el estroma [207]. De esta forma suponemos que los carcinomas de fenotipo basal podrían expresar con más frecuencia TSP-1 que los luminales, probablemente inducido por CD51. De estos hallazgos podríamos deducir que la expresión de TSP-1, principalmente en el estroma tumoral, parece asociarse con lesiones más agresivas y con mayor poder metastásico, lo que podría significar un efecto favorecedor de la progresión tumoral de esta proteína en estos tumores.

El cáncer de mama triple negativo se define mediante inmunohistoquímica como un subtipo caracterizado por la pérdida de expresión de receptores de estrógenos, progesterona y HER2. Hay numerosas similitudes entre los cánceres de mama triple negativo y los de fenotipo basal, sin embargo estos dos términos no son sinónimos. Los tumores triple negativo suelen representar el 10-17 % de todos los carcinomas de mama y afectan con mayor frecuencia a mujeres más jóvenes (<50 años), con más prevalencia en afroamericanas y son significativamente más agresivos que tumores de otros subtipos moleculares, siendo normalmente lesiones de alto grado histológico y con gran potencial metastásico, sobre todo a órganos viscerales y sistema nervioso central [232, 233]. Muestran un pico de recurrencia entre el primer y el tercer año tras el diagnóstico y la mayoría de las muertes ocurren en los primeros 5 años tras el tratamiento [234, 235]. Las pacientes con tumores triple negativo tienen una supervivencia más corta tras la primera metástasis cuando se comparan con controles no triple negativo [236], siendo uno de los principales problemas para el manejo de estos tumores el hecho de que sólo se dispone de la quimioterapia como único tratamiento sistémico.

Teniendo en cuenta la mayor agresividad de estos tumores, en nuestro trabajo se relacionó a aquellos casos que mostraron negatividad simultáneamente para RE, RP y HER2 con la presencia o no de expresión de TSP-1, tanto celular como estromal, sin encontrar diferencias significativas al compararlos con los tumores que no cumplían los requisitos inmunohistoquímicos de triple negativo.

El estado de los receptores hormonales (la presencia de receptores de estrógenos, RE, y/o de progesterona, RP) conlleva implicaciones pronósticas y predictivas en el cáncer de mama. Ha sido usado para tomar decisiones terapéuticas, sin embargo, y aunque se han incluido entre las características determinantes de subgrupos pronósticos, la mayoría de los estudios han mostrado que la presencia de RE y/o RP no tiene un impacto pronóstico muy importante.[237, 238].

El papel fundamental de los receptores hormonales, quizás sea como factores predictivos de respuesta a la terapia hormonal. Más del 50% de tumores con receptores hormonales positivos responderán al tratamiento hormonal, frente al 10% de tumores negativos. Numerosos estudios han confirmado que el período libre de enfermedad y la media de supervivencia son mayores en pacientes con receptores positivos y un grupo importante de estudios lo atribuyen al tratamiento hormonal adyuvante y no considera a estos tumores de mejor pronóstico con largo seguimiento [239, 240]. Sin embargo, estudios más recientes, como el de Blows y el de Cheang, han encontrado una mejor supervivencia en pacientes con receptores hormonales positivos, independientemente del tratamiento [241, 242].

En el presente estudio se ha intentado determinar la existencia de alguna relación entre la presencia de los receptores hormonales y la expresión de TSP-1. En nuestra serie, la mayoría de los casos muestran positividad para RE y no expresan TSP-1 en el estroma. Por otro lado, observamos que dentro de los tumores positivos para TSP-1 estromal, aunque la mayoría expresan RE, existe un mayor porcentaje de casos RE negativos en comparación con los tumores que no expresan TSP-1 estromal, alcanzando significación estadística. En el caso de la expresión de TSP-1 celular la tendencia es similar, siendo más frecuentes los casos RE positivos y TSP-1 negativos, aunque sin encontrar mayor porcentaje de casos RE negativos dentro de los tumores que expresan TSP-1, si bien aquí los resultados no alcanzan la significación estadística. El hecho de encontrar un mayor porcentaje significativo de casos RE negativos en los tumores que expresan TSP-1 estromal que dentro del grupo que no muestran TSP-1 puede estar en concordancia con el estudio de Suh et al. en el cual encontraron niveles plasmáticos de TSP-1 más altos en los cánceres que no expresaban RE, por lo que se relacionaban con tumores que presentaban un comportamiento más agresivo [211] y se podría pensar en la TSP-1 como una proteína favorecedora de la progresión tumoral. Por el contrario, los estudios de Hyder et al. presentan la posibilidad de que los estrógenos actúen

como reguladores de la acción de la TSP-1 sobre las células cancerígenas mamarias humanas, favoreciendo su síntesis por parte de las células tumorales y promoviendo su actuación como factor angiogénico, lo que conllevaría a la proliferación celular y a la progresión tumoral [212]. En nuestro estudio no obtenemos resultados que puedan apoyar esta teoría, ya que la presencia de RE no se relaciona con una mayor expresión de TSP-1, tanto estromal como celular.

En cuanto a los receptores de progesterona obtenemos resultados similares, sin alcanzar la significación estadística, observándose también la tendencia de existir un mayor porcentaje de casos RP negativos en tumores que expresan TSP-1 estromal que los que no lo hacen, sin encontrar esta diferencia en la TSP-1 celular. Sí observamos un hecho que se acerca a ser significativo y es que en los casos sin afectación ganglionar existe un mayor porcentaje de casos RP negativos en los tumores que no expresan TSP-celular en comparación con los que sí lo hacen, al contrario de la tendencia observada en relación con la expresión de RE.

En nuestra serie de casos y según los resultados obtenidos no parece que la presencia de receptores hormonales influya en la expresión de TSP-1.

La sobreexpresión de HER2/neu ocurre en un 25-30% de los cánceres de mama y se asocian a una enfermedad más agresiva y de peor pronóstico. La amplificación de este gen exagera la proliferación tumoral, migración, metástasis y angiogénesis. En la práctica clínica, es necesaria la detección de la amplificación de este oncogén para seleccionar a las pacientes candidatas a la terapia contra HER2/neu con el anticuerpo monoclonal recombinante trastuzumab (Herceptin). Herceptin juega un papel nuevo en las terapias antiangiogénicas en el cáncer de mama ya que se han realizados estudios en los que induce la normalización y regresión de la vascularización en un tumores de mama experimentales que sobreexpresan HER2/neu en ratones. Funciona modulando los efectos de los diferentes activadores e inhibidores de la angiogénesis, activando a los inhibidores, como por ejemplo a la TSP-1, y reduciendo a los activadores angiogénicos, como por ejemplo a VEGF. La disminución de la expresión de HE2/neu se asocia con la regulación positiva de TSP-1 [217]. Y es que HER2 parece jugar un papel importante en la angiogénesis del cáncer de mama. Según el estudio realizado por Wen et al. las señales de HER2 regulan tanto factores pro- como antiangiogénicos en las células del cáncer de mama. La activación de la señal de HER2 incrementa la producción de los factores proangiogénicos VEGF e IL-8 a través de la vía PI3K-AKT y disminuye la del factor antiangiogénico TSP-1 a través de la vía p38 MAP kinasa. Al contrario, la inhibición de las señales de HER2 disminuyen la producción de VEGF e IL-8 y aumentan la de TSP-1. Así, se ha descrito que anticuerpos antiHER2 como el trastuzumab pueden disminuir la expresión de VEGF en las células cancerígenas que sobreexpresan HER2 [213, 214, 215, 216]. Por otro lado, el

tratamiento con trastuzumab favorece la expresión de TSP-1 [214] lo que contribuye a la inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral.

En 2013 Hong et al. realizaron un estudio donde observaron dos patrones de expresión de TSP-1, estromal y tumoral, y los correlacionaron con la expresión de HER2/neu y la angiogénesis. Encontraron que la alta expresión de HER2/neu se relacionaba con una expresión baja de TSP-1 en las células tumorales, mientras que esto coexistía con una expresión alta de TSP-1 en el estroma de alrededor (sobre todo en áreas de desmoplasia) y esto inducía una mayor angiogénesis. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que HER2/neu puede aumentar la angiogénesis tumoral, por lo menos en parte, disminuyendo la expresión de TSP-1 en las células tumorales, y de este modo provocando una importante reacción estromal como compensación que lleva al incremento de la angiogénesis. Por tanto, la combinación de Herceptin y tratamientos antiangiogénicos puede tener efectos sinérgicos antitumorales en la sobreexpresión de HER2/neu en las pacientes con cáncer de mama [217]. En un estudio de Bertin et al. la presencia de TSP-1 sólo en zonas de desmoplasia, no la expresión total de la misma, se correlacionaba también con el estado angiogénico.

En nuestro estudio, al igual que en el de Hong et al., valoramos la expresión estromal y en las células tumorales de TSP-1 y su posible relación con la expresión de HER2. De nuestra serie, los casos HER2 positivos mostraron en un mayor porcentaje expresión estromal de TSP-1, alcanzando significación estadística ( $p=0.05$ ). Asimismo, con una  $p=0,01$ , aquellos casos HER2 positivos y además con metástasis ganglionares, también encontramos un mayor porcentaje de positividad estromal para TSP-1 (58,3%). Por el contrario, prácticamente todos los casos HER2 positivos no expresaron TSP-1 celular. Estos hallazgos coinciden con los descritos anteriormente por Hong, en los cuales la expresión de HER2 se relaciona con una alta expresión estromal de TSP-1 y con una baja expresión de la misma en las células tumorales. Así, observamos cierta tendencia a la presencia de TSP-1 estromal en tumores más agresivos, relacionándose más con un efecto angiogénico por parte de TSP-1 en el estroma.

Ki67 es un marcador de proliferación que se expresa en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), excepto en la fase G0 [243]. Es una proteína nuclear grande que se cree se encuentra involucrada en funciones celulares tales como la regulación del ciclo celular, el procesamiento del ARN ribosómico y la organización del ADN, y que también juega un papel estructural dentro del núcleo. Los pacientes con expresión alta de Ki67 suelen tener un peor curso clínico en gran variedad de patologías malignas, tales como el cáncer de mama, sarcomas, linfomas y gliomas [243]. En el cáncer de mama es el marcador de proliferación más ampliamente estudiado, existiendo numerosas investigaciones que han observado una asociación significativa entre la expresión de Ki67 y el mal

pronóstico de la enfermedad, aunque también se han publicado hallazgos opuestos. Además, la distinción entre los subtipos moleculares intrínsecos luminal A y luminal B se basa principalmente en su expresión, ya que los segundos se asocian a la expresión de genes asociados con la proliferación y por tanto se caracterizan por presentar niveles altos de Ki67 [244].

Asimismo, se ha propuesto que Ki67 pueda jugar un papel predictivo en el carcinoma de mama. Nitz et al. observaron que la incorporación de agentes quimioterápicos en el tratamiento adyuvante de los tumores RE positivos con elevada expresión de Ki67 mostró beneficios en términos de supervivencia, aunque estos datos requieren una evaluación más a fondo [245]. La disminución de la expresión de Ki67 se ha usado como un marcador farmacodinámico de respuesta al tratamiento hormonal neoadyuvante. En este contexto, la expresión de Ki67 junto al tamaño tumoral, el estado de los ganglios y la expresión de RE, se han usado como marcadores de resultados a largo plazo y como criterios para la selección de pacientes para quimioterapia adyuvante postoperatoria tras tratamiento hormonal neoadyuvante. Se ha observado también que niveles bajos de Ki67 al diagnóstico indican que se trata de tumores que improbablemente se beneficien del tratamiento hormonal neoadyuvante, y por tanto estos niveles se han usado como criterio de exclusión para este tipo de tratamiento. Así como existen datos consistentes sobre Ki67 como marcador pronóstico, actualmente, los datos sobre su posible rol predictivo todavía son escasos y se requieren estudios más extensos [244].

En nuestra serie la mayoría de los casos presentaron un índice de proliferación bajo ( $Ki67 < 10\%$ ). Pero pudimos observar que dentro del grupo de tumores con expresión positiva para TSP-1, tanto estromal como celular, existe un mayor porcentaje de casos con un Ki67 alto ( $> 30\%$ ). Esta tendencia se acerca a la significación estadística ( $p=0,06$ ) en el caso de los tumores que expresan tinción estromal de TSP-1 y con afectación ganglionar, donde también se observa un porcentaje mayor de casos con Ki67 elevado que en los tumores negativos para TSP-1 (33,3% frente al 17,10%). Así, apreciamos una cierta tendencia por parte de los tumores que expresan TSP-1 a presentar con más frecuencia un índice proliferativo alto que los tumores que no la expresan, y por tanto tratarse más a menudo de cánceres con mayor agresividad y peor pronóstico, aunque no disponemos de datos significativos.

La proteína p53 es un factor de transcripción codificado por el gen de supresión tumoral p53, cuya mutación es la alteración genética más frecuente en el cáncer humano. La p53 de tipo salvaje normal (wt-p53) lleva a cabo varias funciones importantes en la integración celular y en el control de la estabilidad genómica, siendo capaz de frenar la proliferación de células con ADN dañado mediante la detención del ciclo celular o activando la apoptosis [220]. De esta forma impide la

progresión tumoral. Las mutaciones del gen p53 o la elevada acumulación de la proteína p53 mutada se asocian a un peor desarrollo en una gran variedad de enfermedades malignas, incluyendo el carcinoma de mama [246]. Cerca de un tercio de los carcinomas de mama presentan mutaciones en el gen p53, lo que está asociado con un grado histológico alto y una progresión rápida de la enfermedad [247]. También se ha propuesto que la proteína p53 se encuentra involucrada en la regulación de la angiogénesis y en la expresión de VEGF. Un estudio de Linderholm et al. encontró una asociación entre la expresión de la proteína p53 alterada y el incremento de la expresión de VEGF en los carcinomas de mama, relacionándolo con un pobre pronóstico en estas pacientes [246]. Por otro lado, también se ha descrito que la p53 salvaje puede aumentar la expresión de TSP-1, actuando como inhibidor de la formación de nuevos vasos, y por tanto la p53 puede de esta forma intentar neutralizar el crecimiento de tumores establecidos [219]. Estos datos apoyan la hipótesis de que el gen de supresión tumoral p53 puede regular, al menos en parte, la actividad angiogénica tumoral.

Se ha descrito una correlación inversa entre TSP-1 y la sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 en una gran variedad de tejidos malignos, incluyendo cánceres de vejiga, colorrectal, ovárico y de próstata. Linderholm en 2004 intentó determinar una asociación entre la expresión de TSP-1 y el estado de la p53 en el cáncer de mama, pero no encontró ninguna relación entre ellos, así como tampoco con la expresión de VEGF y la supervivencia de las pacientes [220]. Aunque nuestros resultados no son estadísticamente significativos, observamos que los tumores positivos para TSP-1 estromal muestran mayor porcentaje de casos con expresión de p53, comparándolos con los tumores que no muestran positividad estromal para TSP-1 (22,7% frente al 15,3%). Ocurre lo contrario cuando analizamos la tinción de TSP-1 en las células tumorales, donde hay más porcentaje de casos que expresan p53 dentro de los tumores negativos para TSP-1 que en los positivos.

VEGF es el factor angiogénico más importante hasta el momento. Su expresión contribuye directamente a un peor pronóstico y a la tendencia de metástasis en diferentes tumores sólidos, entre ellos en el carcinoma de mama [70], donde varios estudios previos retrospectivos han evaluado y confirmado su valor pronóstico [248, 249, 250, 251, 252]. En el cáncer de mama se ha descrito la sobreexpresión de VEGF y sus niveles elevados en el tejido tumoral se han asociado a un incremento de la densidad microvascular, a mayores recurrencias del carcinoma [253] y a un menor periodo libre de supervivencia en pacientes con carcinomas de mama en estadio temprano [254]. En este estudio se ha intentado determinar la existencia de alguna relación entre TSP-1 y VEGF, sin apenas alcanzar resultados significativos. Tanto los casos con expresión estromal y celular de TSP-1 como los negativos, expresan en su mayoría VEGF, observándose un mayor porcentaje

de casos VEGF negativos en los tumores con tinción moderada/intensa para TSP-1 que en los que no la expresan. Estos resultados, aunque se acercan, no alcanzan significación estadística. Sí que obtenemos resultados significativos cuando sólo analizamos la expresión de TSP-1 en el estroma tumoral en pacientes sin metástasis ganglionares. En este caso, siguen siendo mayoría los casos que expresan VEGF pero aunque los casos positivos para VEGF son en su mayor parte negativos para TSP-1, en los tumores que no muestran VEGF no se observan diferencias, con el 50 % de los casos negativos o positivos para TSP-1 estromal. En muchas publicaciones se refleja que la actividad angiogénica de un tumor es, en cierto modo, el resultado del equilibrio entre los factores pro- y antiangiogénicos, y la alteración de ese equilibrio neto puede ser debida tanto al descenso en la actividad de los inhibidores naturales como a un incremento de los factores de crecimiento angiogénicos [255, 226]. En nuestro trabajo, el hecho de que los tumores expresen en su mayoría VEGF y a la vez sean negativos para TSP-1, estaría a favor de un desequilibrio entre factores angiogénicos y antiangiogénicos en estos tumores, lo que favorecería la creación de neovasos tumorales.

Además del estudio de la expresión de TSP-1 y su relación con diferentes factores clínico-patológicos, también analizamos la pertenencia de nuestros casos a los fenotipos basal y luminal, basado en la expresión inmunohistoquímica de CK 5/6 o CK 14 y CK 8/18/19, respectivamente, y su relación con los mismos factores clínico-patológicos anteriormente citados.

El carcinoma de mama se ha clasificado usando el análisis de expresión génica en cinco subtipos principales : luminal A, luminal B, subtipo con sobreexpresión de HER2/neu, basal-like y mama normal-like. Estos subtipos se diferencian en términos de desarrollo de la enfermedad de la paciente, supervivencia libre de enfermedad y total, pronóstico, respuesta al tratamiento y raza o etnia. Pero debido al alto precio de los estudios de perfil genético, no se usan en la práctica médica cotidiana. Para ello, se ha desarrollado un panel inmunohistoquímico que nos permite diferenciar entre los diferentes subtipos. Aunque todavía no existe consenso sobre cuál es el más adecuado, la más usada es la clasificación simple basada en la expresión de RE, RP y HER2/neu. Ésta presenta las siguientes características: luminal A RE+ y/o RP+ y HER2/neu -, luminal B RE+ y/o RP+ y HER2/neu +, basal-like RE-, RP- y HER2/neu-, subtipo con sobreexpresión de HER2/neu RE-, RP- y HER2/neu +, y el normal o triple negativo no basal RE-, RP-, HER2-, que además no expresa marcadores basales [256].

Los carcinomas de fenotipo basal son los menos frecuentes y más agresivos. Suelen tener un alto grado nuclear, alto grado histológico y elevado índice mitótico [257]. Además, se suelen relacionar con una mayor prevalencia de tipos histológicos más agresivos, como por ejemplo carcinomas de

alto grado metaplásicos, anaplásicos e indiferenciados [258]. En nuestro estudio de supervivencia se evidenció que los casos con fenotipo basal presentaron una peor supervivencia, siendo de 85,719 meses de media frente a los 96,416 meses de los tumores con fenotipo luminal.

Al relacionar los tumores de fenotipo basal (CK 5/6 o CK 14 positivos) con los diferentes tipos histológicos, se observó que la mayoría eran de tipo invasor no específico (85,7%), siguiendo la tendencia general y sin encontrar diferencias significativas con aquellos casos de fenotipo no basal. Así que en nuestro estudio no encontramos una mayor relación con tipos histológicos más agresivos.

Sí que encontramos una relación significativa con el grado histológico ( $p=0,000$ ) siendo los tumores con fenotipo basal en su mayoría pobremente diferenciados (78,9%), el 21,1% restante moderadamente diferenciados y no encontrando en nuestra serie ningún caso bien diferenciado. Al compararlo con los tumores que no fueron positivos para CK 5/14, vimos que estos últimos eran mayoritariamente de grado 2 (66%). Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura sobre que los carcinomas de fenotipo basal suelen ser de alto grado histológico [258].

A pesar de que los tumores basales son más agresivos, la mayoría de previos describen una menor incidencia de afectación ganglionar de este tipo de tumores en comparación con el resto de fenotipos, siendo el rico en HER2 el que se asocia a una mayor prevalencia de metástasis ganglionares [33]. En nuestro caso, no encontramos una relación significativa en cuanto a la afectación ganglionar, obteniendo un número parecido de casos con y sin afectación ganglionar tanto en los tumores que expresan CK 5/14 como en los que no lo hacen.

Los tumores de fenotipo basal, aunque no siempre, en su mayoría no expresan receptores hormonales. Esto lo describen numerosos estudios como los de Arrechea (2011), Lips (2013), Livasy (2006) y Nielsen (2004) ([28, 29, 31, 30], y nuestros resultados están en concordancia con la literatura ya que el 85,7% de nuestros casos positivos para CK 5/14 son negativos tanto para receptores de estrógenos como de progesterona, con una significación estadística de  $p=0,000$ .

Asimismo, la mayoría de estos tumores no muestran sobreexpresión de HER2 (80%) pero sin diferencias significativas con los casos que no marcan para CK5/14, ya que estos tampoco lo expresan (88,1%). Sólo observamos que el porcentaje de casos basales que expresan HER2 es algo mayor que en los tumores no basales (20% frente al 11,9%).

Como se ha comentado anteriormente, hay numerosas similitudes entre los cánceres de mama triple negativo y los de fenotipo basal, sin embargo estos dos términos no son sinónimos. Aunque la mayoría de los casos triple negativos son de fenotipo basal y la mayoría de los tumores que expresan marcadores basales son triple negativos, no todos los cánceres basales determinados mediante expresión génica pierden la expresión de RE, RP y HER2, y por otro lado, no todos los triples

negativos muestran un fenotipo basal mediante análisis de expresión de arrays [259, 260, 261]. En nuestra serie, el 65 % de los casos basales no expresan RE ni RP ni HER2, por lo tanto son triple negativos, siendo una relación significativa ( $p=0,000$ ) y por tanto apoyando el hecho de que la mayoría de los cánceres basales son triple negativos.

También encontramos una relación significativa con el índice de proliferación ( $p=0,006$ ), observando que el 55,6 % de los tumores basales de nuestro estudio muestran un  $Ki67>30$ , por tanto un índice de proliferación alto. El 33,3 % presenta un índice bajo y el 11,1 % moderado. Por otro lado, aquellos casos que no expresan CK5/14 tienen en su mayoría un índice de proliferación bajo (58,9 %). Estos resultados están en concordancia con lo descrito en la literatura sobre la alta agresividad de los cánceres basales y su tendencia a mostrar un el alto índice proliferativo [258].

Al analizar la relación de tumores basales con la sobreexpresión de la proteína p53, aunque hay un mayor número de casos p53 negativos, observamos un porcentaje bastante elevado de tumores basales que expresan p53, siendo del 45 %, mientras que sólo lo hace un 15 % de los tumores negativos para citoqueratinas basales ( $p=0,001$ ). Sí que aparece una relación positiva cuando tenemos en cuenta sólo a las pacientes con afectación ganglionar. En este caso, la mayor parte de los tumores basales expresan p53 ( $p=0,001$ ). Por ello, parece que existe una cierta tendencia a que los cánceres basales se relacionen con la sobreexpresión de la proteína p53 o la mutación del gen correspondiente, lo cual se vincula con tumores más agresivos y de peor pronóstico. Estos resultados también coinciden con lo descrito en numerosas investigaciones previas donde se pone de manifiesto la prevalencia de los tumores de fenotipo basal a presentar mutaciones del p53 [262].

En cuanto a la expresión de VEGF, la mayoría de los tumores de fenotipo basal son positivos para VEGF, aunque nuestros resultados no son significativos cuando analizamos la totalidad de los casos, sí lo son cuando estudiamos sólo a las pacientes que no presentaron metástasis ganglionares ( $p=0,034$ ). En este caso, aunque también expresaron en su mayoría VEGF, observamos un mayor porcentaje de casos negativos para VEGF en comparación con los tumores que no expresan citoqueratinas basales. Aún así, en general no encontramos diferencias significativas en cuanto a la expresión de VEGF según el fenotipo, ya que los tumores que no expresan las citoqueratinas basales también son positivos para VEGF en su mayor parte.

Al igual que con el fenotipo basal, valoramos los casos que presentaron positividad para CK 8/18/19 y por tanto considerados clásicamente de fenotipo luminal, y los relacionamos con el resto de marcadores y factores clínico-patológicos. Los tumores luminales se caracterizan por mostrar una alta expresión de RE, tienen índices de proliferación bajos, tienden a ser de bajo grado histológico, y tienen el mejor pronóstico, aunque el subtipo luminal B a menudo es de mayor grado, con índice

proliferativo más alto y de peor pronóstico que el luminal A [262].

La mayoría de nuestros casos fueron de tipo invasor no específico y de fenotipo luminal (163 de 267), pero además, todos los demás tipos histológicos, excepto el medular, fueron también de fenotipo luminal (la mayoría alcanzando el 100 % de los casos). En el caso de los carcinomas medulares, sólo encontramos 2 en nuestra serie y uno expresó citoqueratinas luminales mientras que el otro no. Nuestros resultados son acordes a la literatura en cuanto a que los carcinomas de fenotipo luminal son los más frecuentes [256, 262].

No encontramos relación significativa entre los tumores luminales y el grado histológico, siendo los más frecuentes los moderadamente diferenciados, así como tampoco con la afectación ganglionar, siendo muy parecidos los porcentajes de casos con y sin metástasis.

Como se ha comentado anteriormente, el carcinoma de mama de fenotipo luminal se relaciona con positividad para RE y también suelen serlo a los RP. En nuestro estudio se confirma esta tendencia, ya que de los 267 casos, 140 mostraron positividad para RE (59,1 %) y 132 para RP (55,2 %), alcanzando significación estadística, sobre todo en el caso de los RP ( $p=0,004$  y  $p=0,05$ , respectivamente). Además, se pudo comprobar que de los casos que no expresaron citoqueratinas luminales la inmensa mayoría fueron negativos tanto para RE como RP (88,9 % y 77,8 %, respectivamente). Estos hallazgos están en consonancia con los estudios que reflejan la asociación de expresión de receptores con el fenotipo luminal, tanto mediante estudios de expresión génica como inmunohistoquímicos [262].

Asimismo, aunque los resultados obtenidos en cuanto a la relación de los tumores luminales con la sobreexpresión de HER2 no alcanzaron significación estadística ( $p=0,091$ ), la mayor parte de nuestro casos fueron negativos para HER2 (87,7 %), al igual que se describe en numerosos estudios previos en los que el fenotipo luminal A se relaciona con negatividad para este marcador. A pesar de este resultado, no encontramos diferencias con los casos que no expresaron CK8/18/19, ya que éstos en su mayoría también fueron negativos para HER2 (88,9 %).

Evaluamos la posible asociación entre la expresión de CK 8/18/19 y la negatividad simultánea de RE, RP y HER2. En este caso, con una significación de  $p=0,000$ , observamos que el 80,3 % de los casos positivos para citoqueratinas luminales no mostraban negatividad a la vez de estos marcadores, mientras que el 77,8 % de los casos negativos para estas citoqueratinas sí que cumplían esta premisa. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los tumores triple negativos (RE, RP y HER2 negativos) son en su mayoría de fenotipo basal y no luminal [258].

Otra característica ya mencionada de los carcinomas de fenotipo luminal es que suelen presentar un índice de proliferación bajo. En nuestra serie observamos también esta tendencia, mostrando un

mayor número de casos (57,8 %) un bajo índice proliferativo, mientras que el porcentaje de tumores con alto índice fue mayor dentro del grupo de casos que no expresaron citoqueratinas luminales, aunque estos resultados no fueron significativos.

Por otro lado, sí que observamos diferencias significativas ( $p=0,000$ ) en relación con la expresión de p53. Los tumores de nuestra serie que expresaron CK 8/18/19 fueron en su mayoría p53 negativos (84 %). Estos resultados están en concordancia con lo observado en investigaciones previas en las que se demuestra que los tumores de fenotipo luminal no suelen presentar mutaciones del gen p53, a excepción del luminal B donde sí podemos encontrarlas [262].

También fueron significativos los resultados obtenidos entre la relación del fenotipo luminal y la expresión de VEGF, siendo mayoritarios los tumores que la expresaron (82,6 %). Aunque también fueron más frecuentes los casos positivos dentro del grupo de tumores negativos para CK8/18/19, la diferencia fue menor y el porcentaje de negativos para VEGF en estos tumores fue más importante (55,6 % de positivos frente a 44,4 % de negativos).

Aunque la TSP-1 se considera uno de los principales inhibidores de la angiogénesis, su papel en la progresión tumoral, especialmente en el cáncer de mama, sigue sin estar claro ya que diversos estudios han obtenido resultados opuestos en cuanto a su función, de tal forma que para algunos investigadores la TSP-1 ejerce una función antiangiogénica y para otros parece actuar como un favorecedor de la angiogénesis y la progresión tumoral.

En nuestro estudio obtenemos resultados que relacionan la expresión de TSP-1 a nivel del estroma tumoral con factores de mal pronóstico: alto grado histológico, elevado índice de proliferación celular, negatividad para RE, sobreexpresión de HER2, más notable en casos con metástasis ganglionares, e importante presencia de TSP-1 en el estroma de carcinomas de fenotipo basal. De estos hallazgos se podría deducir que la TSP-1 puede tener un efecto favorecedor de la progresión tumoral. De ser así, se podrían crear nuevas líneas de investigación para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas contra la angiogénesis, utilizando a la TSP-1 como diana. Pero para poder llegar a esto, es necesario realizar más investigaciones para determinar el papel exacto que desempeña la TSP-1 en el desarrollo del cáncer de mama, en concreto su función en la angiogénesis tumoral del mismo.



## Capítulo 6

# Conclusiones

De los resultados obtenidos en nuestro estudio extraemos las siguientes conclusiones:

1. TSP-1 es una proteína que se expresa de forma no infrecuente, aunque sí en una minoría, en los carcinomas de mama. Su localización es principalmente en el estroma, y mucho menos frecuente en el citoplasma de las células tumorales.
2. La expresión de TSP-1 en el carcinoma de mama es independiente del tipo histológico y, sobre todo la expresión estromal, se observa con más frecuencia en tumores de alto grado histológico y con elevado índice de proliferación determinado con Ki67, principalmente en casos con metástasis ganglionares.
3. En relación con los marcadores inmunohistoquímicos habituales de índole predictiva/pronóstica, la presencia de TSP-1 estromal se relaciona con la ausencia de receptores hormonales, principalmente receptores estrogénicos, y con la sobreexpresión inmunohistoquímica de HER2.
4. En el carcinoma de mama, la expresión de TSP-1, principalmente estromal, está relacionada con el fenotipo basal determinado mediante inmunohistoquímica para CK5-6/14. Los carcinomas de fenotipo basal se caracterizan por ser mayoritariamente de alto grado histológico, con alto índice de proliferación, receptores hormonales negativos, ausencia de sobreexpresión de HER2, triples negativos en la clasificación molecular subrogada y con expresión positiva de p53.
5. La expresión de TSP-1 en el carcinoma de mama, aunque en nuestro estudio no ha demostrado relación significativa con la supervivencia, se encuentra asociada a factores histopatológicos y marcadores inmunohistoquímicos de peor pronóstico, lo que sugiere una función que provoca mayor agresividad en las neoplasias.





# Bibliografía

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, and et al. *GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. International Agency for Research on Cancer, 2013.
- [2] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, DM Parkin, D. Forman, and F. Bray. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int J Cancer*, 136(5):E359–86, 2015.
- [3] D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2):74–108, 2005.
- [4] J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, and et al. Estimates of worldwide burden of cancer 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, (127):2893–917, 2010.
- [5] J. Ferlay, H. Shin, D. Forman, C. Mathers, and D. Parkin. *GLOBOCAN 2008: cancer incidence and mortality worldwide*. Number 10 in IARC Cancerbase. IARC, Lyon, 2010.
- [6] DR. Youlden, SM. Cramb, NAM. Dunn, JM. Muller, CM. Pyke, and PD. Baade. The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiology*, (36):237–248, 2012.
- [7] N. Ascunce, J. Delfrade, D. Salas, R. Zubizarreta, and M. Ederria. Programas de detección precoz de cáncer de mama en españa: características y principales resultados. *Med Clin (Barc)*, 141(1):13 – 23, 2013.
- [8] MJ. Sánchez, T. Payer, R. De Angelis, N. Larrañaga, R. Capocaccia, and C. Martínez. Cancer incidence and mortality in spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol*, 21(3):30–6, 2010.
- [9] CK. Anders, R. Johnson, J. Litton, and et al. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol*, (36):237–49, 2009.



- [10] H. Fredholm, S. Eaker, J. Frisell, and et al. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One*, 11(4):e7695, 2009.
- [11] HA. Assi, KE. Khoury, H. Dbouk, LE. Khalil, TH. Mouhieddine, and NS. El Saghir. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *J Thorac Dis*, S1(5):S2–S8, 2013.
- [12] F. Kamangar, GM. Dores, and WF. Anderson. Patterns of cancer incidence, mortality and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*, 24(14):2137–50, 2006.
- [13] SP. Leong, ZZ. Shen, TJ. Liu, G. Agarwal, T. Tajima, and NS Paik et al. Is breast cancer the same disease in asian and western countries? *World J Surg*, 34(10):2308–24, 2010.
- [14] SS. Coughlin and DU. Ekweueme. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol*, 33(5):315–18, 2009.
- [15] NS. El Saghir, CA. Adebamowo, BO. Anderson, RW. Carlson, PA. Bird, M. Corbex, and et al. Breast cancer management in low resource countries (LRCs): consensus statement from the breast health global initiative. *Breast*, Suppl.2(20):S3–11, 2011.
- [16] E. Washbrook. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women´s Health Medicine*, 3(1):8–14, 2006.
- [17] R. Bailey L. Lipworth and D. Trichopoulos. History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*, (92):302–312, 2000.
- [18] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without disease. *Lancet*, (360):187–95, 2002.
- [19] FA. Tavassoli and P. Devilee, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC-Press, Lyon, 2004.
- [20] J. Rosai. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Elsevier, Lyon, France, 10th edition, 2011.
- [21] S. Lakhani, I. Ellis, S. Schnitt, and et al. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. IARCPress, Lyon, 4th edition, 2012.

- [22] E.R. Fisher, C.K. Redmond, H. Liu, H. Rockette, B. Fisher, and collaborating NSABP investigators. Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. *Cancer*, 45:349–353, 1980.
- [23] I. Kümler, M.K. Tuxen, and D.L. Nielsen. A systematic review of dual targeting in her2-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40:259–270, 2014.
- [24] E.A. Perez, J. Cortés, A.M. Gonzalez-Angulo, and J.M.S. Bartlett. Her2 testing: Current status and future directions. *Cancer Treatment Reviews*, 40:276–284, 2014.
- [25] C.M. Perou, T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, and et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 406:747–752, 2000.
- [26] T. Sørlie, R. Tibshirani, J. Parker and T. Hastie, J.S. Marron, A. Nobel, and et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:8418–8423, 2003.
- [27] J.A. Foekens, D. Atkins, Y. Zhang, F.C. Sweep, N. Harbeck, A. Paradiso, and et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol*, 24:1665–1671, 2006.
- [28] MA. Arrechea Irigoyen, A. Córdoba Iturriagoitia F. Vicente Garcí and, B. Ibáñez Beroiz, M. Santamaría Martínez, and F. Guillén Grima. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *An. Sist. Sanit. Navar.*, (2):219–233, 2011.
- [29] EH. Lips, L. Mulder, JJ. de Ronde, IAM. Mandjes, and et al. Breast cancer subtyping by immunohistochemistry and histological grade outperforms breast cancer intrinsic subtypes in predicting neoadjuvant chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat*, 140:63–71, 2013.
- [30] T.O. Nielsen, F.D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, and et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10:5367–5374, 2004.
- [31] C.A. Livasy, G. Karaca, R. Nanda, M.S. Tretiakova, O.I. Olopade, D.T. Moore, and et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 19:264–271, 2006.

- [32] M.L. Burness, T. Grushko, and O.I. Olopade. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer*, 16:23–32, 2010.
- [33] S. Park, JS. Koo, MS. Kim, HS. Park, JS. Lee, JS. Lee an SI. Kim, and BW. Park. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *The Breast*, 21:50–57, 2012.
- [34] J. Puente and M. Martín. Actualización del tratamiento adyuvante en cáncer de mama. *PSICOONCOLOGÍA*, 4(2-3):311–329, 2007.
- [35] HJ. Burstein, AA. Prestrud, J.Seidenfeld, H.Anderson, TA. Buchholz, NE. Davidson, and el al. American society of clinical oncology clinical practice guideline: Update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor positive breast cancer. *J Clin Oncol*, (28):3784–3796, 2010.
- [36] E.M. Boneberg, D.F. Legler, M.M. Hoefler, C. Ohlschlegel, H. Steininger, L.Füzesi, G.M. Beer, V. Dupont-Lampert, F. Otto, H.J. Senn, and G. Fürstenberger. Angiogenesis and lymphangiogenesis are downregulated in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 101(4):605–14, 2009.
- [37] L. Vicioso, F.J. Gonzalez, M. Alvarez, N. Ribelles, M. Molina, A. Marquez, L. Perez, A. Matilla, and E. Alba. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor are associated with tumor-associated macrophages in primary breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 125(1):111–8, 2006.
- [38] E. Berra, A. Ginouves, and J. Pouyssegur. The hipoxia-inductible-factor hydroxylases bring fresh air into hipoxia signalling. *EMBO Rep*, 7:41–45, 2006.
- [39] *Angiogénesis*, chapter El proceso angiogénico. 2004.
- [40] D.P. Brazil, J. Park, and B.A. Henmings. Pkb binding proteins. getting in on the akt. *Cell*, 111(3):293–303, 2002.
- [41] G.D. Thakker, D.P. Hajjar, W.A. Muller, and T.K. Rosengart. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endotelial growth factor signaling. *J Biol Chem*, 274(15):100002–100007, 1999.

- [42] S. Kanno, N. Oda, M. Abe, Y. Terai, M. Ito, K. Shitara, K. Tabayashi, M. Shibuya, and Y. Sato. Roles of the two vegf receptors, flt-1 and kdr, in the signal transduction of vegf effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, 19(17):2138–46, 2000.
- [43] L.W. Wu, L.D. Mayo, J.D. Dunbar, K.M. Kessler, O.N. Ozes, R.S. Warren, and D.B. Donner. Varp is an adaptator protein that binds kdr, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem*, 275(9):6059–62, 2000.
- [44] S.J. Mandriota and M.S. Pepper. Vascular endothelial growth factor induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci*, 110(18):2293–302, 1997.
- [45] J. Fang, Y. Shing, D. Wiederschain, L. Yan, C. Butterfield, G. Jackson, J. Harper, G. Tamvakopoulos, and M.A. Moses. Matriz metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8):3884–9, 2000.
- [46] P.C. Brooks, S. Stromblad, L.C. Sanders, T.L. von Schalscha, R.T. Aimes, W.G. Stetler-Stevenson, J.P. Quigley, and D.A. Cheresh. Localization of matrix metalloproteinase mmp-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, 85(5):683–93, 1996.
- [47] G. Bazzoni, E. Dejana, and M.G. Lampugnani. Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths. *Curr Opin Cell Biol*, 11(5):573–81, 1999.
- [48] C.J. Drake, D.A. Cheresh, and C.D. Little. An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *J Cell Sci*, 108(Pt 7):2655–2661, 1995.
- [49] D.M. Form, B.M. Pratt, and J.A. Madri. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. in vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest*, 55(5):521–30, 1986.
- [50] K.K. Hirschi, S.A. Rohovsky, and P.A. D'Amore. Pdgf, tgf-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10t1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol*, 141(3):805–814, 1998.
- [51] M.A. Lafleur, P.A. Forsyth, S.J. Atkinson, G. Murphy, and D.R. Edwards. Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(2):463–73, 2001.

- [52] M. Hellström, I. Kal, P. Lindahl, A. Abramsson, and C. Betsholtz. Role of pdgf-b and pdgfr-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14):3047–55, 1999.
- [53] CL. Grosskreutz, B. Anand-Apte, C. Dupl, TP. Quinn, BI. Terman, B. Zetter, and PA. D'Amore. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res*, 58(2):128–36, 1999.
- [54] C. Suri, J. McClain, G. Thurston, D.M. McDonald, H. Zhou, E.H. Oldmixon, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282(5388):468–71, 1998.
- [55] D.R. Senger, L. Van De Water, L.F. Brown, J.A. Nagy, K.T. Yeo, T.K. Yeo, B. Berse, R.W. Jackman, A.M. Dvorak, and H. Dvorak. Vascular permeability factor (vpf,vegf) in tumor biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 12:303–324, 1993.
- [56] R. Catena, L. Larzabal, M. Larrayoz, E. Molina, J. Hermida, J. Agorreta, R. Montes, R. Pio, L.M. Montuenga, and A. Calvo. Vegf121b and vegf165b are weakly angiogenic isoforms of vegf-a. *Mol Cancer*, 31(9):320, 2010.
- [57] E. Gallego, L. Vicioso, M. Alvarez, I. Hierro, L. Pérez-Villa, A. Blanes, and A. Matilla. Stromal expression of vascular endothelial growth factor c is relevant to predict sentinel lymph node status in melanomas. *Virchows Arch*, 458(5):621–30, 2011.
- [58] N. Ferrara and W.J. Henzel. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Res Commun*, 161:851–859, 1989.
- [59] P. Carmeliet. Angiogenesis in health and disease. *NatMed*, 9(6):653–60, 2003.
- [60] N. Ferrara, HP Gerber, and J. LeCouter. The biology of vegf and its receptors. *J Nat Med*, 9(6):669–76, 2003.
- [61] LE. Benjamin and E. Keshet. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (vegf) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by vegf withdrawa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16):8761–6, 1997.
- [62] N. Ferrara and K. Alitalo. Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*, 5:1359–64, 1999.

- [63] H.F Dvorak, L.F. Brown M. Detmar, and A.M. Dvorak. Vascular permeability factor:vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 146:1029–39, 1995.
- [64] C.A Boocock D.S. Charnock-Jones, A.M. Sharkey, J. McLaren, and et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and kdr in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 87(7):506–516, 1995.
- [65] R.A. Bok, S. Halabi, D.T. Fei, C.R. Rodriquez, and et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor urine levels as predictors of outcome in hormone-refractory prostate cancer patients: a cancer and leukemia group b study. *Cancer Res*, 61:2533–2536, 2001.
- [66] M.P. Wong, N. Cheung, S.T. Yuen, S.Y. Leung, and L.P. Chung. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer*, 81(6):845–50, 1999.
- [67] K. Sato, R. Sasaki, Y. Ogura, N. Shimoda, and et al. Expression of vascular endothelial growth factor gene and its receptor (flt-1) gene in urinary bladder cancer. *Tohoku J Exp Med*, 185:173–184, 1998.
- [68] J. Jacobsen, K. Grankvist, T. Rasmuson, and B. Ljungberg. Different isoform patterns for vascular endothelial growth factor between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU Int*, 97(5):1102–8, 2006.
- [69] C.M. Lennard, A. Patel, J. Wilson, B. Reinhardt, C. Tuman, and et al. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery*, 129:552–558, 2000.
- [70] DJ. Hicklin and LM. Ellis. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23(5):1011–1027, 2005.
- [71] C. Suri, P.F. Jones, S. Patan, and et al. Requisite role of angiopoyetin-1, a ligand for the tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87:1171–80, 1996.
- [72] G. Thurston, C. Suri, K. Smith, and et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoyetin-1. *Science*, 286:2511–14, 1999.

- [73] J. Holash, S.J. Wiegand, and N. Yancopoulos. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and vegf. *Oncogene*, 18:5356–62, 1999.
- [74] Y. Shing, J. Folkman, R. Sullivan, C. Butterfield, J. Murray, and M. Klagsbrun. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 223(4642):1296–9, 1984.
- [75] F. Coulier, P. Pontarotti, R. Roubin, H. Hartung, M. Goldfarb, and D. Birnbaum. Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (fgf) and fgf receptor families. *J Mol Evol*, 44(1):43–56, 1997.
- [76] A.N. Plotnikov, J. Schlessinger, S.R. Hubbard, and M. Mohammadi. Structural basis for fgf receptor dimerization and activation. *Cell*, 98(5):641–50, 1999.
- [77] E.M. Rosen, S.K. Nigam, and I.D. Goldberg. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *Cell Biol*, 127(6):1783–1787, 1994.
- [78] D.P. Bottaro, J.S. Rubin, D.L. Faletto, A.M. Chan, T.E. Kmieciak, G.F. Vande Woude, and S.A. Aaronson. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251(4995):802–4, 1991.
- [79] F. Galimi, M.F. Brizzi, and P.M. Comoglio. The hepatocyte growth factor and its receptor. *Stem Cells*, 11(Suppl 2):22–30, 1993.
- [80] H. Van Cruijssen, G. Giaccone, and K. Hoekman. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer*, 117:883–888, 2005.
- [81] D.M. Wiseman, P.J. Polverini, D.W. Kamp, and S.J. Leibovich. Transforming growth factor-beta (tgf-beta) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 157:793–800, 1998.
- [82] Folkman J and P.A. D'Amore. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 87:1153–1155, 1996.
- [83] S. Yoshida, M. Ono, T. Shono, H. Izumi, T. Ishibashi, H. Susuki, and et al. Involvement of interleukin-8; vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 17:4015–4023, 1997.



- [84] A.E. Koch, P.J. Polverini, S.L. Kunkel, L.A. Harlow, L.A. DiPietro, V.M. Elner, and et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258(5089):1798–1801, 1992.
- [85] J. Lawler. The functions of thrombospondin-1 y -2. *Current Opinion in Cell Biology*, 12:634–640, 2000.
- [86] G. Taraboletti, D. Roberts, L.A. Liotta, and R. Giavazzi. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol*, 111(2):765–72, 1990.
- [87] J.E. Murphy-Ullrich, S. Schultz-Cherry, and M. Hook. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell*, 3:181–188, 1992.
- [88] H.A. Hanford, C.A. Wong, H. Kassan, D.L. Cundiff, N. Chandel, S. Underwood, C.A. Mitchell, and G.A. Soff. Angiostatin 4.5-mediated apoptosis of vascular endothelial cells. *Cancer Res*, 63(14):4275–80, 2003.
- [89] *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*, chapter The intestine as an organ culture. Charles C Thomas, 1970.
- [90] M. Rao and et al. Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 19:1–11, 2004.
- [91] M.A. Gimbrone and P.M. Gullino. Neovascularization induced by intraocular xenografts of normal, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary tissues. *J Natl Cancer Inst*, 56(2):305–318, 1976.
- [92] Z. Li, Y. Shimada, S. Uchida, M. Maeda, and et al. Tgf-beta as well as vegf, pd-ecgf and bfgf contribute to angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 17:453–460, 2000.
- [93] M.M. Taketo. Cyclooxygenase-2 inhibitor in tumorogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 90(21):1609–1620, 1998.
- [94] B.R. Zetter. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*, 49:407–27, 1998.
- [95] J. Folkman. Seminars in medicine of the beth israel hospital, boston. clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 333(26):1757–63, 1995.

- [96] Folkman J Holmgren L, O'Reilly MS. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1(2):149–53, 1995.
- [97] J. Folkman. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21):1182–6, 1971.
- [98] E. Sivridis, A. Giatromanolaki, and M.I. Koukourakis. The vascular network of tumours? what is it not for? *J Pathol*, 201:173–80, 2003.
- [99] P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*, 49:64649–65, 1989.
- [100] R. Folberg, M.J. Hendrix, and A.J. Maniotis. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*, 156:361–81, 2000.
- [101] R.D. Leek, K.L. Talks, F. Pezzella, H. Turley, and et al. Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (hif-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in human breast cancer. *Cancer Res*, 62:1326–1329, 2002.
- [102] P. Bausero, F. Cavaill, G. M'duri, S. Freitas, and M. Perrot-Appanat. Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. *Angiogenesis*, 2(2):167–82, 1998.
- [103] I.B. Joseph, J.B. Nelson, S.R. Denmeade, and J.T. Isaacs. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res*, 3(12):2507–11, 1997.
- [104] V. Chiarugi, L. Magnelli, and O. Gallo. Cox-2, nos and p53 as play markers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med*, 2:715–719, 1998.
- [105] E.Y. Lin, J.F. Li, L. Gnatovskiy, Y. Deng, L. Zhu, and et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res*, 66:11238–11246, 2006.
- [106] L. Bingle, N..J. Brown, and C.E. Lewis. The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol*, 196:254–265, 2002.
- [107] B. Sid, H. Sartelet, G. Bellon, H. El Btaouri, G. Rath, N. Delorme, B. Hayea, and L. Martiny. Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49:245–258, 2004.

- [108] S. Kazerounian, O. Yee, and J. Lawler. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*, 65(5):700–712, 2008.
- [109] JC. Adams and J. Lawler. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, 2011.
- [110] H. Chen et al. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology*, 19:597–614, 2000.
- [111] G. Turashvili, J. Bouchal, G. Burkadze, and Z. Kolar. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: Ii. genomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub*, 149:63–68, 2005.
- [112] CA. Dalla-Torre, M. Yoshimoto, CH. Lee, AM. Joshua, SR. de Toledo, AS. Petrilli, JA. Andrade, S. Chilton-MacNeill, M. Zielenska, and JA. Squire. Effects of thbs3, sparc and spp1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer*, 6:237, 2006.
- [113] NL. Baenziger, GN. Brodie, and PW. Majerus. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Scie*, 68:240–3, 1971.
- [114] B. Vailhe, D. Vittet, and JJ. Feige. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*, 81:439–52, 2001.
- [115] DD. Roberts. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J*, 10:1183–91, 1996.
- [116] S.F. Pearce, J. Wu, and R.L. Silverstein. A carboxyl terminal truncation mutant of cd36 is secreted and binds thrombospondin: evidence for a single transmembrane domain. *Blood*, 84:384–389, 1994.
- [117] N. Tao, S.J. Wagner, and D.M. Lublin. Cd36 is palmitoylated on both n- and c-terminal cytoplasmic tails. *J. Biol. Chem.*, 271:22315–22320, 1996.
- [118] L. Daviet and J.L. McGregor. Vascular biology of cd36: roles of this new adhesion molecule family in different disease states. *Thromb. Haemost.*, 78:65–69, 1997.
- [119] D.I. Baruch, X.C. Ma, B. Pasloske, R.J. Howard, and L.H. Miller. Cd36 peptides that block cytoadherence define the cd36 binding region for plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Blood*, 94:2121–2127, 1999.

- [120] D.W. Dawson, S.F. Pearce, R. Zhong, R.L. Silverstein, and W.A. Frazier and N.P. Bouck. Cd36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 138:707–717, 1997.
- [121] A.S. Asch, I. Liu, F.M. Briccetti, and et al. Analysis of cd36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science*, 262:1436–1440, 1993.
- [122] M. Hatmi, J.M. Gavaret, I. Elalamy, B.B. Vargaftig, and C. Jacquemin. Evidence for camp-dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein iv (cd36). *J. Biol. Chem.*, 271:24776–24780, 1996.
- [123] G.P. Tuszynski, V.L. Rothman, M. Papale, B.K. Hamilton, and J. Eyal. Identification and characterization of a tumor cell receptor for csvtgc, a thrombospondin adhesive domain. *J. Cell Biol*, 120:513–521, 1993.
- [124] J. Lawler and R.O. Hynes. An integrin receptor on normal and thrombasthenic platelets that binds thrombospondin. *Blood*, 74:2022–2027, 1989.
- [125] K.A. Hotchkiss, L.J. Matthias, and P.J. Hogg. Exposure of the cryptic arg-gly-asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1388:478–488, 1998.
- [126] B. Zheng and D.R. Clemmons. Blocking ligand occupancy of the alphavbeta3 integrin inhibits insulin-like growth factor i signaling in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:11217–11222, 1998.
- [127] S. Chandrasekaran, N.H. Guo, R.G. Rodrigues, J. Kaiser, and D.D. Roberts. Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin- 1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and cd98. *J. Biol. Chem.*, 274:11408–11416, 1999.
- [128] H.C. Krutzsch, B.J. Choe, J.M. Sipes, N. Guo, and D.D. Roberts. Identification of an alpha(3)beta(1) integrin recognition sequence in thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.*, 274:24080–24086, 1999.
- [129] V.M. Dixit, D.M. Haverstick, K.M. O'Rourke, and et al. A monoclonal antibody against human thrombospondin inhibits platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3472–3476, 1985.

- [130] F.P. Lindberg, H.D. Gresham, E. Schwarz, and E.J. Brown. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J. Cell Biol.*, 123:485–496, 1993.
- [131] A.G. Gao, F.P. Lindberg, J.M. Dimitry, E.J. Brown, and W.A. Frazier. Thrombospondin modulates avb3 function through integrin-associated protein. *J. Biol. Chem.*, 135:533–544, 1996a.
- [132] X.Q. Wang, F. Lindberg, and W. Frazier. Integrin-associated protein stimulates alpha2beta1-dependent chemotaxis via gi-mediated inhibition of adenylate cyclase and extracellular-regulated kinases. *J. Cell Biol.*, 147:389–399, 1999.
- [133] J. Chung, X.Q. Wang, F.P. Lindberg, and W.A. Frazier. Thrombospondin-1 acts via iap/cd47 to synergize with collagen in alpha2beta1-mediated platelet activation. *Blood*, 94:642–648, 1999.
- [134] R. Yabkowitz and V.M. Dixit. Human carcinoma cells bind thrombospondin through a mr 80,000r105,000 receptor. *Cancer Res*, 51:3648–3656, 1991.
- [135] C.C. Joneckis, D.D. Shock, M.L. Cunningham, E.P. Orringer, and L.V. Parise. Glycoprotein iv-independent adhesion of sickle red blood cells to immobilized thrombospondin under flow conditions. *Blood*, 87:4862–4870, 1996.
- [136] J.C. Adams and J. Lawler. Cell-type specific adhesive interactions of skeletal myoblasts with thrombospondin-1. *Mol. Biol. Cell.*, 5:423–437, 1994.
- [137] S. Godyna, G. Liao, I. Popa, S. Stefansson, and W.S. Argraves. Identification of the low density lipoprotein receptor-related protein (lrp) as an endocytic receptor for thrombospondin-1. *J. Cell Biol*, 129:1403–1410, 1995.
- [138] I. Mikhailenko, M.Z. Kounnas, and D.K. Strickland. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates the cellular internalization and degradation of thrombospondin. a process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 270:9543–9549, 1995.
- [139] H. Chen, J. Sottile, D.K. Strickland, and D.F. Mosher. Binding and degradation of thrombospondin-1 mediated through heparan sulfate proteoglycans and low-density-

- lipoprotein receptor-related protein: localization of the functional activity to the trimeric n-terminal heparin-binding region of thrombospondin-1. *Biochem. J.*, 318:959–963, 1996.
- [140] D.D. Roberts, C.N. Rao, L.A. Liotta, H.R. Gralnick, and V. Ginsburg. Comparison of the specificities of laminin, thrombospondin, and von willebrand factor for binding to sulfated glycolipids. *J. Biol. Chem.*, 261:6872–6877, 1986.
- [141] C.A. Hillery, M.C. Du, R.R. Montgomery, and J.P. Scott. Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. *Blood*, 87:4879–4886, 1996.
- [142] M. Patel, J. Lymn, G. Clunn, and A. Hughes. Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. *Arterio Thromb. Vasc. Biol.*, 17:2107–2114, 1997.
- [143] J. Lawler, R. Weinstein, and R.O. Hynes. Cell attachment to thrombospondin: the role of arg-gly-asp, calcium and integrin receptors. *J. Cell Biol.*, 107:2351–2361, 1988.
- [144] R. Yabkowitz, P.J. Mansfield, U.S. Ryan, and S.J. Suchard. Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.*, 157:24–32, 1993.
- [145] V. Gahtan, X.S. Wang, M. Ikeda, A.I. Willis, G.P. Tuszynski, and B.E. Sumpio. Thrombospondin-1 induces activation of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.*, 29:1031–1035, 1999.
- [146] V. Mateo, L. Lagneaux, D. Bron, and et al. Cd47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.*, 5:1277–1284, 1999.
- [147] J. Massague. Tgf-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:753–791, 1998.
- [148] B. Ren, K.O. Yee, J. Lawler, and R. Khosravi-Far. Regulation of tumor angiogenesis by thombospondin-1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1765:178–188, 2006.
- [149] X. Sha, L. Yang, and L.E. Gentry. Identification and analysis of discrete functional domains in the pro region of pre-pro-transforming growth factor beta 1. *J. Cell Biol.*, 114:827–839, 1991.
- [150] J.S. Munger, J.G. Harpel, P.E. Gleizes, R. Mazziere, I. Nunes, and D.B. Rifkin. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*, 51:1376–1382, 1997.



- [151] J.E. Murphy-Ullrich and M. Poczatek. Activation of latent tgf-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11:59–69, 2000.
- [152] G.P. Boivin, B.A. O'Toole, I.E. Orsmy, and et al. Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor- beta 1-deficient mice. *Am. J. Pathol.*, 146:276–288, 1995.
- [153] R.J. Diebold, M.J. Eis, M. Yin, and et al. Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte-mediated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:12215–12219, 1995.
- [154] S.E. Crawford, V. Stellmach, J.E. Murphy-Ullrich, and et al. Thrombospondin-1 is a major activator of tgf-b1 in vivo. *Cell*, 93:1159–1170, 1998.
- [155] M. Abdelouahed, A. Ludlow, G. Brunner, and J. Lawler. Activation of platelet transforming growth factor-beta 1 in the absence of thrombospondin-1. *J Biol Chem*, 275:17933–17936, 2000.
- [156] S.D. Markowitz and A.B. Roberts. Tumor suppressor activity of the tgfbeta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7:93–102, 1996.
- [157] J. Lawler. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Cell Mol. Med.*, 6:1–12, 2002.
- [158] S. Narayan, T. Thangasamy, and R. Balusu. Transforming growth factor-beta receptor signaling in cancer. *Front Biosci*, 10:1135–1145, 2005.
- [159] J.J. Letterio. Tgf-beta signaling in t cells: roles in lymphoid and epithelial neoplasia. *Oncogene*, 24:5701–5712, 2005.
- [160] A. Sasaki, H. Naganuma, E. Satoh, T. Kawataki, K. Amagasaki, and H. Nukui. Participation of thrombospondin-1 in the activation of latent transforming growth factor-beta in malignant glioma cells. *Neurol. Med. Chir.*, 41:253–258 (Discussion 258–9), 2001.
- [161] K. Miyanaga, Y. Kato, T. Nakamura, M. Matsumura, H. Amaya, T. Horiuchi, Y. Chiba, and K. Tanaka. Expression and role of thrombospondin-1 in colorectal cancer. *Anticancer Res*, 22:3941–3948, 2002.
- [162] T. Kawataki, H. Naganuma, A. Sasaki, H. Yoshikawa, K. Tasaka, and H. Nukui. Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factorbeta expression with malignancy of glioma. *Neuropathology*, 20:161–169, 2000.

- [163] A. Fontana, S. Filleur, J. Guglielmi, L. Frappart, G. Bruno-Bossio, S. Boissier, F. Carbon, and P. Clezardin. Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *Int. J. Cancer*, 116:686–691, 2005.
- [164] D. Danielpour. Functions and regulation of transforming growth factorbeta (tgf-beta) in the prostate. *Eur. J. Cancer*, 41:846–857, 2005.
- [165] F. Tian, S.D. Byfield, W.T. Parks, C.H. Stuelten, D. Nemani, Y.E. Zhang, and A.B. Roberts. Smad-binding defective mutant of transforming growth factor beta type i receptor enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 64:4523–4530, 2004.
- [166] L.C. Armstrong and P. Bornstein. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol.*, 22:63–71, 2003.
- [167] K.M. Dameron, O.V. Volpert, M.A. Tainsky, and N. Bouck. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265:1582–1584, 1994.
- [168] V. Stellmach, O.V. Volpert, S.E. Crawford, J. Lawler, R.O. Hynes, and N. Bouck. Tumor suppressor genes and angiogenesis: the role of tp53 in fibroblasts. *Eur. J. Cancer*, 32A:2394–2400, 1996.
- [169] O.V. Volpert, K.M. Dameron, and N. Bouck. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene*, 14:1495–1502, 1997.
- [170] A. Gautam, C.L. Densmore, S. Melton, E. Golunski, and J.C. Waldrep. Aerosol delivery of p53 complexes inhibits b16-f10 lung metastases through regulation of angiogenesis. *Cancer Gene Ther*, 9:28–36, 2002.
- [171] C. Kwak, R.J. Jin, C. Lee, M.S. Park, and S.E. Lee. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.*, 89:303–309, 2002.
- [172] A.A. Alvarez, J.R. Axelrod, R.S. Whitaker, P.D. Isner, R.C. Bentley, R.K. Dodge, and G.C. Rodriguez. Thrombospondin-1 expression in epithelial ovarian carcinoma: association with p53 status, tumor angiogenesis, and survival in platinum-treated patients. *Gynecol. Oncol.*, 82:273–278, 2001.

- [173] H. Haradaa, K. Nakagawa, M. Saito, S. Kohno, S. Nagato, K. Furukawa, Y. Kumon, K. Hamada, and T. Ohnishi. Introduction of wild-type p53 enhances thrombospondin-1 expression in human glioma cells. *Cancer Lett*, 191:109–119, 2003.
- [174] F. Vikhanskaya, M.R. Bani, P. Borsotti, C. Ghilardi, R. Ceruti, G. Ghisleni, M. Marabese, R. Giavazzi, M. Broggin, and G. Taraboletti. p73 overexpression increases vegf and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis. *Oncogene*, 20:7293–7300, 2001.
- [175] T. Tokunaga, M. Nakamura, Y. Oshika, T. Tsuchida, M. Kazuno, Y. Fukushima, K. Kawai, Y. Abe, H. Kijima, H. Yamazaki, N. Tamaoki, and Y. Ueyama. Alterations in tumour suppressor gene p53 correlate with inhibition of thrombospondin-1 gene expression in colon cancer cells. *Virchows Arch.*, 433:415–418, 1998.
- [176] G.D. Grossfeld, P.R. Carroll, N. Lindeman, M. Meng, S. Groshen, A.C. Feng, D. Hawes, and R.J. Cote. Thrombospondin-1 expression in patients with pathologic stage t3 prostate cancer undergoing radical prostatectomy: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Urology*, 59:97–102, 2002.
- [177] N. Kawahara, M. Ono, K. Taguchi, M. Okamoto, M. Shimada, K. Takenaka an, K. Hayashi, D.F. Mosher, K. Sugimachi, M. Tsuneyoshi, and M. Kuwano. Enhanced expression of thrombospondin-1 and hypovascularity in human cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 28:1512?1517, 1998.
- [178] F.K. Reiher, M. Ivanovich, H. Huang, N.D. Smith, N.P. Bouck, and S.C. Campbell. The role of hypoxia and p53 in the regulation of angiogenesis in bladder cancer. *J. Urol.*, 165:2075–2081, 2001.
- [179] G. Fontanini, L. Boldrini, A. Calcinai, S. Chine, M. Lucchi, A. Mussi, C.A. Angeletti, F. Basolo, and G. Bevilacqua. Thrombospondins i and ii messenger rna expression in lung carcinoma: relationship with p53 alterations, angiogenic growth factors, and vascular density. *Clin. Cancer Res.*, 5:155–161, 1999.
- [180] S. Dimmeler and A.M. Zeiher. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ. Res.*, 87:434–439, 2000.
- [181] S.A. Mousa and A.S. Mousa. Angiogenesis inhibitors: current and future directions. *Curr. Pharm. Des.*, 10:1–9, 2004.

- [182] B. Jimenez, O.V. Volpert, S.E. Crawford, M. Febbraio, R.L. Silverstein, and N. Bouck. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat. Med.*, 6:41–48, 2000.
- [183] T. Tsuchida, H. Kijima, T. Tokunaga, Y. Oshika, H. Hatanaka, Y. Fukushima, Y. Abe, K. Kawai, Y. Yoshida, S. Miura, H. Yamazaki, N. Tamaoki, Y. Ueyama, and M. Nakamura. Expression of the thrombospondin 1 receptor cd36 is correlated with decreased stromal vascularisation in colon cancer. *Int. J. Oncol.*, 14:47–51, 1999.
- [184] T.S. Panetti TS, B.J. Kudryk, and D.F. Mosher. Interaction of recombinant procollagen and properdin modules of thrombospondin-1 with heparin and fibrinogen/fibrin. *J Biol Chem*, 274:430–437, 1999.
- [185] D.W. Dawson, O.V. Volpert, S.F.A. Pearce, and et al. Three distinct d-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. *Mol. Pharmacol.*, 55:332–338, 1999.
- [186] N.H. Guo, H.C. Drutzch, J.K. Inman, and D.D. Roberts. Thrombospondin 1 and type 1 repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res*, 57:1735–1742, 1997.
- [187] D.W. Dawson and N.P. Bouck. *Thrombospondin as an inhibitor of angiogenesis*, pages 185–203. Humana Press Inc, 1999.
- [188] S. Kanda, T. Shono, B. Tomasini-Johansson, P. Klint, and Y. Saito. Role of thrombospondin-1-derived peptide, 4nik, in fgf-2-induced angiogenesis. *Exp. Cell Res*, 252:262–272, 1999.
- [189] J.C. Rodriguez-Manzaneque, T.F. Lane, M.A. Ortega, R.O. Hynes, J. Lawler, and M.L. Iruela-Arispe. Thrombospondin-1 supresses tumor growth by a novel mechanism that includes blockade of matrix matalloproteinase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:12485–12490, 2001.
- [190] L.S. Gutierrez, M. Suckow, J. Lawler, V.A. Ploplis, and F.J. Castellino. Thrombospondin 1-a regulator of adenoma growth and carcinoma progression in the apc(min/+) mouse model. *Carcinogenesis*, 24:199–207, 2003.
- [191] N. Oue, S. Matsumura, H. Nakayama, Y. Kitadai, K. Taniyama, K. Matsusaki, and W. Yasui. Reduced expression of the tsp1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Oncology*, 64:423–429, 2003.

- [192] K. Bleuel, S. Popp, N.E. Fusenig, E.J. Stanbridge, and P. Boukamp. Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2065–2070, 1999.
- [193] M. Streit, P. Velasco, L.F. Brown, and et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 155:441–452, 1999.
- [194] M. Tenan, G. Fulci, M. Albertoni, A.C. Diserens, M.F. Hamou, M. El Atifi-Borel, J.J. Feige, M.S. Pepper, and E.G. Van Meir. Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J. Exp. Med.*, 191:1789–1798, 2000.
- [195] A.J. Rice, M.A. Steward, and C.M. Quinn. Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast. *J. Clin. Pathol.*, 55:921–925, 2002.
- [196] L.F. Brown, A.J. Guidi, S.J. Schnitt, L. Van De Water, M.L. Iruela-Arispe, T.K. Yeo, K. Tognazzi, and H.F. Dvorak. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin. Cancer Res.*, 5:1041–1056, 1999.
- [197] J. Kodama, I. Hashimoto, N. Seki, A. Hongo, M. Yoshinouchi, H. Okuda, and T. Kudo. Thrombospondin-1 and -2 messenger rna expression in invasive cervical cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 7:2826–2831, 2001.
- [198] J. Zhang, R. Ito, N. Oue, X. Zhu, Y. Kitadai, K. Yoshida, H. Nakayama, and W. Yasui. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch.*, 442:563–568, 2003.
- [199] S. Aishima, K. Taguchi, K. Sugimachi, Y. Asayama, H. Nishi, M. Shimada, and M. Tsuneyoshi. The role of thymidine phosphorylase and thrombospondin-1 in angiogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int. J. Surg. Pathol.*, 10:47–56, 2002.
- [200] T.N. Wang, D. Albo, and G.P. Tuszynski. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery*, 132:220–225, 2002.
- [201] D. Albo, D.H. Berger, V.L. Rothman, and G.P. Tuszynski. Role of urokinase plasminogen activator receptor in thrombospondin 1-mediated tumor cell invasion. *J. Surg. Res.*, 82:331–338, 1999.



- [202] S. Filleur, O.V. Volpert, A. Degeorges, C. Volland, F. Reiher, P. Clezardin, N. Bouck, and F. Cabon. In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects. *Genes Dev.*, 15:1373–1382, 2001.
- [203] D. BenEzra. *Angiogenesis: Models, Modulators, and Clinical Applications*, chapter Angiogenesis-Critical Assessment of In Vitro Assays and In Vivo Models. Plenum Press, New York, 1998.
- [204] J. Dawes, P. Clezardin, and D.A. Pratt. Thrombospondin in milk, other breast secretions and breast tissue. *Semin Thromb Haemostas*, 13:378–384, 1987.
- [205] D.A. Pratt, W.R. Miller, and J. Dawes. Thrombospondin in malignant and non-malignant breast tissue. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 5(2):343–350, 1989.
- [206] S.Y. Wong, A.T. Purdie, and P. Han. Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign breast disease. an immunohisiochemical study. *Am. J. Pathol.*, 140:1473–1482, 1992.
- [207] P. Clezardin, L. Frappart, M. Clerget, and et al. Expression of thrombospondin (tsp1) and its receptors (cd36 and cd51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res*, 53:1421–1430, 1993.
- [208] N. Bertin, P. Clezardin, R. Kubiak, and L. Frappart. Thrombospondin-1 and -2 messenger rna expression in normal, benign, and neoplastic human breast tissues: Correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia. *Cancer Res*, 57:396–399, 1997.
- [209] A. Fontana, S. Filleur, J. Guglielmi, L. Frappart, G. Bruno-Bossio, S. Boissier, F. Cabon, and Philippe Clézardin. Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *Int. J. Cancer*, 116:686–691, 2005.
- [210] G.J. Byrne, K.E. Hayden, G. McDowell, H. Lang, C.C. Kirwan, L. Tetlow, S. Kumar, and N.J. Bundred. Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 31:1127–1132, 2007.
- [211] E.J. Suh, M.H. Kabir, U.B. Kang, J.W. Lee, J. Yu, D.Y. Noh, and C. Lee. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and brwd3 as serological biomarkers. *Exp. Mol. Med. Vol.*, 44(1):36–44, 2012.

- [212] S.M. Hyder, Y. Liang, and J. Wu. Estrogen regulation of thrombospondin-1 in human breast cancer cells. *Int J Cancer*, 125(5):1045–1053, 2009.
- [213] A.M. Petit, J. Rak, M.C. Hung, P. Rockwell, N. Goldstein, B. Fendly, and R.S. Kerbel. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and erbb-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol*, 151(6):1523–1530, 1997.
- [214] Y. Izumi, L. Xu, E. di Tomaso, D. Fukumura, and R.K. Jain. Tumour biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, 416:279–280, 2002.
- [215] K.S. Klos, X. Zhou, S. Lee, L. Zhang, W. Yang, Y. Nagata, and D. Yu. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits erbb-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of akt than either treatment alone. *Cancer*, 98(7):1377–1385, 2003.
- [216] C.I. Spiridon, S. Guinn, and E.S. Vitetta. A comparison of the in vitro and in vivo activities of igg and f(ab)2 fragments of a mixture of three monoclonal anti-her-2 antibodies. *Clin Cancer Res*, 10:3542–3551, 2004.
- [217] M.C. Hong, C.Y. Long, Y.F. Tian, and M.P. Wu. Her-2/neu overexpression is associated with thrombospondin-1-related angiogenesis and thrombospondin-1-unrelated lymphangiogenesis in breast cancer. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*, 2:114–121, 2013.
- [218] K.O. Yee, C.M. Connolly, M. Duquette, S. Kazerounian, R. Washington, and J. Lawler. The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat*, 114(1):85–96, 2009.
- [219] L. Albonici, R.P. Sorge, G. Santeusano, P. Garofano, V. Manzari, and G. Barillari. Correlation between pathological data and the rna expression of p53 or p53-targeted genes in primary invasive ductal breast carcinomas: A preliminary study. *Oncology Reports*, 23:1119–1123, 2010.
- [220] B. Linderholm, E. Karlsson, S. Klaar, T. Lindahl, A. Borg, G. Elmberger, and J. Bergh. Thrombospondin-1 expression in relation to p53 status and vegf expression in human breast cancers. *European Journal of Cancer*, 40:2417–2423, 2004.



- [221] S.B. Edge, D.R. Byrd, M.A. Carducci, and C.C. Compton. *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer, New York, NY, 7th edition, 2009.
- [222] J. Folkman. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med*, 1:27–31, 1995.
- [223] L.M. Ellis and I.J. Fidler. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*, 32A:2451–2460, 1996.
- [224] N. Weidner, J.P. Semple, W.R. Welch, and J. Folkman. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J Med*, 324:1–8, 1991.
- [225] G. Gasparini and A.L. Harris. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*, 13:765–82, 1995.
- [226] G. Gasparini. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology:Hematology*, 37:97–114, 2001.
- [227] B. Uzzan, P. Nicolas, M. Cucherat, and G.Y. Perret. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*, 64:2941–55, 2004.
- [228] A.S. Asch, J. Barnwell, and R.L. Silverstein. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J. Clin. Invest.*, 79:1054–1061, 1987.
- [229] C. Tokyol, G. Ersoz, F.H. Dilek, E. Gencer, M.N. Kosar, and O.N. Dilek. Thrombospondin - 1 expression and angiogenesis in breast carcinoma and their relation with platelet activity. *Ups. J. Med. Sci.*, 114:108–115, 2009.
- [230] E. Ioachim, K. Damala, E. Tsanou, and et al. Thrombospondin-1 expression in breast cancer: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *Histol Histopathol*, 27:209–216, 2012.
- [231] J. Wang-Rodriguez, V. Urquidi, A. Rivard, and S. Goodison. Elevated osteopontin and thrombospondin expression identifies malignant human breast carcinoma but is not indicative of metastatic status. *Breast Cancer Res*, 5:136–143, 2003.
- [232] P. Gazinska, A. Grigoriadis, J.P. Brow, R.R. Millis, and et al. Comparison of basal-like triple-negative breast cancer defined by morphology, immunohistochemistry and transcriptional profiles. *Modern Pathology*, 26:955–966, 2013.

- [233] C. Oakman, G. Viale, and A. Di Leo. Management of triple negative breast cancer. *The Breast*, 19:312–321, 2010.
- [234] R. Dent, M. Trudeau, K.I. Pritchard, and et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 13:4429–4434, 2007.
- [235] B.P. Schneider, E.P. Winer, W.D. Foulkes, and et al. Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res*, 14:8010–8018, 2008.
- [236] S. Badve, D.J. Dabbs, F.L. Baehner S.J. Schit and, and et al. Basal-like and triple-negative breast cancers. *Mod Pathol*, 24(2):157–167, 2011.
- [237] *Cancer : Principles & Practice of Oncology*, chapter Malignant Tumors on the breast. Philadelphia: Lippincott-Williams, 2008.
- [238] S.G Hilsenbeck, P.M. Ravdin, C.A. de Moor, G.C. Chamness, C.K. Osborne, and G.M. Clark. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 52(1-3):227–37, 1998.
- [239] D.A. Berry, C. Cirrincione, I.C. Henderson, M.L. Citron, D.R. Budman, L.J. Goldstein, S. Martino, E.A. Perez, H.B. Muss, and L. Norton et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*, 295:1658–1667, 2006.
- [240] E.M. Azzato, D. Greenberg, M. Shah, F. Blows, K.E. Driver, N.E. Caporas, and P.D.P. Pharoah. Prevalent cases in observational studies of cancer survival: do they bias hazard ratio estimates? *British Journal of Cancer*, 100:1806–1811, 2009.
- [241] F.M. Blows, K.E. Driver, M.K. Schmidt, and et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*, 7(5):e1000279, 2010.
- [242] M.C. Cheang, S.K. Chia, D. Voduc, and et al. Ki67 index, her2 status, and prognosis of patients with luminal b breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101(10):736–50, 2009.
- [243] J. Yan, XL. Liu, LZ. Han, G. Xiao, and et al. Relation between ki-67, er, pr, her2/neu, p21, egfr, and top ii-? expression in invasive ductal breast cancer patients and correlations with prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(2):823–829, 2015.

- [244] H.P. Kourea, V. Zolota, and C.D. Scopa. Targeted pathways in breast cancer: Molecular and protein markers guiding therapeutic decisions. *Current Molecular Pharmacology*, 7:4–21, 2014.
- [245] U. Nitz, O. Gluz, J. Huober, H.H. Kreipe, and et al. Final analysis of the prospective wsg-ago ec-doc versus fec phase iii trial in intermediate-risk (pn1) early breast cancer: efficacy and predictive value of ki67 expression. *Ann. Oncol.*, 25:1551–1557, 2014.
- [246] B. Linderholm, B. Lindh, B. Tavelin, K. Grankvist, and R. Henriksson. p53 and vascular endothelial-growth-factor (vegf) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 89:51–62, 2000.
- [247] X.G. Jia, Q. Hong, J.Y. Cheng, and et al. Accumulation of p53 is prognostic for aromatase inhibitor resistance in early-stage postmenopausal patients with er -positive breast cancer. *OncoTargets and Therapy*, 8:549–555, 2015.
- [248] B.K. Linderholm, T. Lindahl, L. Holmberg, S. Klaar, J. Lennerstrand, R. Henriksson, and J. Bergh. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res*, 61(5):2256–60, 2001.
- [249] G. Gasparini, M. Toi, M. Gion, P. Verderio, and et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 89:139–147, 1997.
- [250] G. Gasparini, M. Toi, E. Biganzoli, R. Dittadi, M. Fanelli, A. Morabito, P. Boracchi, and M. Gion. Thrombospondin-1 and -2 in node-negative breast cancer: Correlation with angiogenic factors, p53, cathepsin d, hormone receptors and prognosis. *Oncology*, 60:72–80, 2001.
- [251] D. Coradini, P. Boracchi, M.G. Daidone, C. Pellizzaro, P. Miodini, M. Ammatuna, G. Tomasic, and E. Biganzoli. Contribution of vascular endothelial growth factor to the nottingham prognostic index in node-negative breast cancer. *Br J Cancer*, 85:795–797, 2001.
- [252] G. Gasparini. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Hematology*, 37:97–114, 2001.
- [253] NE. Kushlinskii and ES. Gershtein. Role of vascular endothelial growth factor during breast cancer. *Bull Exp Biol Med*, 133(6):521–8, 2002.

- [254] M. Relf, S. LeJeune, P.A. Scott, and et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*, 57(5):963–969, 1997.
- [255] D. Hanahan and J. Folkman. Patterns of emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86:353–64, 1996.
- [256] M. P.J. McCafferty, N.A. Healy, and M.J. Kerin. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology*, 15(10):485–489, 2009.
- [257] Prat A and et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast*, 2015 (en prensa).
- [258] L.A. Carey, C.M. Perou, C.A. Livasy, and et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the carolina breast cancer study. *JAMA*, 295(21):2492–2502, 2006.
- [259] E. Montagna, P. Maisonneuve, N. Rotmensz, G. Canello, and et al. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: Histologic subtyping to inform the outcome. *Clinical Breast Cancer*, 13(1):31–9, 2013.
- [260] E.A. Rakha, D.S. Tan, W.D. Foulkes, and et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res*, 9:404–405, 2007.
- [261] F. Bertucci, P. Finetti, N. Cervera, and et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*, 70(123):236–240, 2008.
- [262] M. Alizart, J. Saunus, M. Cummings, and S.R. Lakhani. Molecular classification of breast carcinoma. *Diagnostic Histopathology*, 18(3):97–103, 2012.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Índice de Tablas

4.1. Edad media . . . . .	84
4.2. Tamaño medio . . . . .	84
4.3. Distribución según índice de proliferación (Ki67) . . . . .	87
4.4. Expresión de p53 . . . . .	88
4.5. Expresión de VEGF . . . . .	89
4.6. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el grado histológico . . . . .	91
4.7. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el grado histológico en los casos sin afectación ganglionar . . . . .	91
4.8. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la afectación ganglionar . . . . .	92
4.9. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de receptores de estró- genos y progesterona . . . . .	92
4.10. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de RP en los casos sin afectación ganglionar . . . . .	93
4.11. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de HER2 . . . . .	93
4.12. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de HER2 en los casos con afectación ganglionar . . . . .	94
4.13. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el índice proliferativo (Ki67) . . . . .	94
4.14. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el índice de proliferación en los casos con afectación ganglionar . . . . .	94
4.15. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de p53 . . . . .	95
4.16. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de VEGF . . . . .	95
4.17. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con la expresión de VEGF en los casos sin afectación ganglionar . . . . .	95
4.18. Relación de la expresión de TSP-1 con el fenotipo luminal . . . . .	96
4.19. Relación de la expresión de TSP-1 con el fenotipo basal . . . . .	96



4.20. Relación de la expresión de TSP-1 con el fenotipo basal en los casos con afectación ganglionar . . . . .	97
4.21. Relación de la expresión estromal de TSP-1 con el subtipo molecular triple negativo	97
4.22. Relación de la expresión celular de TSP-1 y el grado histológico . . . . .	98
4.23. Relación de la expresión celular de TSP-1 y el grado histológico en los casos con afectación ganglionar . . . . .	98
4.24. Relación de la expresión celular de TSP-1 y la presencia o no de afectación ganglionar	98
4.25. Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de receptores de estrógenos y progesterona . . . . .	99
4.26. Relación de la expresión celular de TSP-1 y la expresión de RP en los casos sin afectación ganglionar . . . . .	99
4.27. Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de HER2 . . . . .	99
4.28. Relación de la expresión celular de TSP-1 con el índice de proliferación (Ki67) . .	100
4.29. Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de p53 . . . . .	100
4.30. Relación de la expresión celular de TSP-1 con la expresión de VEGF . . . . .	101
4.31. Relación de la expresión celular de TSP-1 con el fenotipo luminal . . . . .	101
4.32. Relación de la expresión celular de TSP-1 con el fenotipo basal . . . . .	101
4.33. Relación de la expresión celular de TSP-1 con el fenotipo basal en los casos con afectación ganglionar . . . . .	102
4.34. Relación de la expresión celular de TSP-1 y el subtipo molecular triple negativo . .	102
4.35. Relación del fenotipo basal con el tipo histológico . . . . .	103
4.36. Fenotipo basal y grado histológico . . . . .	103
4.37. Fenotipo basal y metástasis ganglionares . . . . .	103
4.38. Fenotipo basal y expresión de RE y RP . . . . .	104
4.39. Fenotipo basal y expresión de HER2 . . . . .	104
4.40. Fenotipo basal y negatividad para RE, RP y HER2 . . . . .	105
4.41. Fenotipo basal e índice proliferativo . . . . .	105
4.42. Fenotipo basal y expresión de p53 . . . . .	105
4.43. Fenotipo basal y la expresión de p53 en los casos con afectación ganglionar . . . .	106
4.44. Fenotipo basal y expresión de VEGF . . . . .	106
4.45. Fenotipo basal y expresión de VEGF en los casos sin afectación ganglionar . . . .	106
4.46. Relación entre la expresión de CK 8/18/19 y los tipos histológicos . . . . .	107
4.47. Fenotipo luminal y el grado histológico . . . . .	108

---

4.48. Fenotipo luminal y la afectación ganglionar . . . . .	108
4.49. Fenotipo luminal y la expresión de receptores hormonales . . . . .	108
4.50. Fenotipo luminal y la expresión de HER2 . . . . .	109
4.51. Fenotipo luminal y la negatividad para RE, RP y HER2 . . . . .	109
4.52. Fenotipo luminal y el índice proliferativo . . . . .	110
4.53. Fenotipo luminal y la expresión de p53 . . . . .	110
4.54. Fenotipo luminal y la expresión de VEGF . . . . .	110



# Índice de figuras

1.1. (a) Tasa de incidencia mundial en hombres y mujeres, y (b) tasa de incidencia mundial sólo en mujeres. Fuente: <a href="http://globocan.iarc.fr/">http://globocan.iarc.fr/</a> . . . . .	2
1.2. (a) Tasa de mortalidad mundial en hombres y mujeres, y (b) tasa de mortalidad mundial sólo en mujeres. Fuente: <a href="http://globocan.iarc.fr/">http://globocan.iarc.fr/</a> . . . . .	3
3.1. (a) Arrayer manual montado con agujas de 0.6mm construyendo un bloque receptor y (b) representación de todo el proceso de creación de una laminilla de TMA. . . .	70
3.2. Cortes teñidos con HE de los TMA realizados en el estudio. . . . .	71
3.3. Tinciones de IHQ realizadas en el estudio. . . . .	72
3.4. Ausencia de tinción de TSP-1. . . . .	81
3.5. Tinción inmunohistoquímica débil de TSP-1 (a) estromal y (b) celular. . . . .	81
3.6. Tinción inmunohistoquímica moderada de TSP-1 (a) estromal y (b) celular. . . . .	81
3.7. Tinción inmunohistoquímica intensa de TSP-1 (a) estromal y (b) celular. . . . .	82
4.1. Distribución por sexo . . . . .	83
4.2. Distribución según tipo histológico . . . . .	85
4.3. Distribución según grado histológico . . . . .	85
4.4. Distribución según afectación ganglionar . . . . .	86
4.5. Expresión de receptores hormonales y HER2 . . . . .	86
4.6. Distribución según subtipos moleculares . . . . .	87
4.7. Proporción de casos con fenotipo basal y luminal . . . . .	88
4.8. Proporción de la expresión de TSP-1 estromal y TSP-1 celular . . . . .	89
4.9. Expresión de TSP-1 estromal en función del tipo histológico . . . . .	90
4.10. Expresión de TSP-1 celular en función del tipo histológico . . . . .	91
4.11. Función de supervivencia . . . . .	111
4.12. Supervivencia global en meses (sgm) según el tamaño tumoral (GTAM). . . . .	112



4.13. Supervivencia global en meses (SG) según la afectación ganglionar (GGANGLIOS).	113
4.14. Supervivencia según la expresión estromal de TSP-1 (GTSPE), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa. . . . .	114
4.15. Supervivencia según la expresión celular de TSP-1 (GTSPCEL), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa. . . . .	114
4.16. Supervivencia de casos con tinción negativa para TSP-1 estromal según la afectación ganglionar. . . . .	115
4.17. Supervivencia de casos con tinción positiva para TSP-1 estromal según la afectación ganglionar. . . . .	116
4.18. Supervivencia (SUP_06) de casos con metástasis ganglionares (X_MTX_GG = 1) según la expresión de TSP-1 celular (GTSPCEL), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa. . . . .	117
4.19. Supervivencia (SUP_06) de casos sin metástasis ganglionares (X_MTX_GG = 2) según la expresión de TSP-1 celular (GTSPCEL), siendo 1,00 tinción débil/ausente y 2,00 tinción moderada/intensa. . . . .	118
4.20. Supervivencia (SUP_06) de casos según la expresión de CK 5/6-14 (CK5_14_1Y2), siendo 1 positivo y 2 negativo. . . . .	118
4.21. Supervivencia de casos según la expresión de CK 8/18/19 (GCK81819), siendo 1 positivo y 2 negativo. . . . .	119
4.22. Supervivencia (SUP_06) de casos según la negatividad para RE, RP y HER2 (RE2RP2HER1), siendo 1 los casos negativos en los tres marcadores y 2 en el caso contrario. . . . .	119