

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**Valor pronóstico de los niveles de expresión del
ARNm de Osteopontina en inmunofenotipos
de cáncer de mama**

Memoria presentada para obtener el grado de Doctor en Bioquímica por

Fernando Ortiz Martínez

Dirigida por la Dra. Gloria Peiró Cabrera

Alicante, 2013



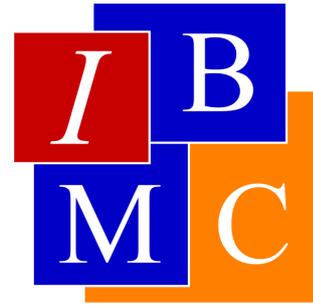
Dra. Gloria Peiró Cabrera, investigadora del SNS Carlos III de la Fundación de la Comunidad Valenciana para la Investigación en el Hospital General Universitario de Alicante,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “Valor pronóstico de los niveles de expresión del ARNm de Osteopontina en inmunofenotipos de cáncer de mama” ha sido realizado por D. Fernando Ortiz Martínez bajo mi dirección en el Laboratorio de Genómica y Proteómica de la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Alicante, para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Alicante, a 21 de enero de 2013.

Fdo. Dra. Gloria Peiró Cabrera



D. Antonio Ferrer Montiel, Director del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche

Informa:

Que la tesis doctoral titulada “Valor pronóstico de los niveles de expresión del ARNm de Osteopontina en inmunofenotipos de cáncer de mama”, ha sido realizada por D. Fernando Ortiz Martínez, bajo la inmediata dirección y supervisión de la Dra. Gloria Peiró Cabrera, y da su conformidad para que sea presentada ante la comisión de doctorado.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado, a 21 de enero de 2013.

Fdo. Prof. Dr. Antonio Vicente Ferrer Montiel

Director del Instituto de Biología Molecular y Celular

“Lo que hacemos en la vida tiene su eco en la eternidad”

Máximo Décimo Meridio (*Gladiator*, 2000)

AGRADECIMIENTOS

A Gloria, por confiar en mí desde el primer momento y aceptarme en su grupo de investigación, por transmitirme sus conocimientos científicos y de patología, por su interés y constancia, y por todas las horas de dedicación que le ha llevado la corrección de este trabajo.

A Miguel y Pepe, por ser mis “padrinos” en el mundo de la ciencia y aceptarme en su laboratorio como estudiante de prácticas en el IBMC. Sin este primer paso hubiese sido mucho más complicado encontrar un puesto como predoc. A Ángeles, Charo, Estefa, Lourdes y Pilar porque fueron quiénes me enseñaron a trabajar en un laboratorio por primera vez, y que además, siempre fuisteis unas excelentes amigas y compañeras.

A José Manuel y José Luís, por dirigir mi Trabajo de Fin de Máster y a todos los miembros del Laboratorio de Genética del Instituto de Bioingeniería, por hacerme sentir parte de ellos durante el curso del Máster.

A todas mis compañeras de la Unidad de Investigación, Ana, Carla, Laura Andreu, María, Miriam y Reyes, por el buen ambiente de trabajo, por las risas que tenemos todos los días y lo más importante, porque tendré muy buen recuerdo de lo que han sido estos cuatro años gracias a vosotras. En especial a Ari, por todo lo que me ha enseñado sobre ciencia desde que ha llegado, y a Laura Sánchez por su paciencia y por sus numerosas clases de PCR cauntitativa. Sin olvidar a los que han dejado el laboratorio como Dani, que apostó por mí tras la entrevista que tuvimos y me ayudó a solicitar becas predoctorales. También Fran, que siempre estuvo dispuesto a ayudarme

cuando lo necesité. Por último, Lucía, por ser tan buena compañera, por su sentido del humor y por ser un referente en el laboratorio.

A la Fundación de la Comunidad Valenciana para la Investigación quiero agradecerle que me haya dado la posibilidad de trabajar en la Unidad de Investigación durante estos 4 años. En especial a Emi, que me ayudó a solicitar innumerables becas predoctorales.

A los compañeros del CIBERehd, que siempre nos han ayudado cuando lo hemos necesitado, sobre todo a Rubén, por su dedicación al buen funcionamiento de la Unidad de Investigación.

Al Servicio de Anatomía Patológica, por proporcionarnos las muestras, indispensables para este trabajo. En especial a Nacho, que además de ser un gran compañero de viaje, gracias a él y a Gloria pude presentar mis resultados en el congreso USCAP 101st 2012 en Vancouver, Canadá.

A Dani Ciprián, a quien he echado de menos desde que se fue a Salamanca, y a Pepe Sánchez, por enseñarme a realizar los análisis estadísticos necesarios para terminar este trabajo. A José Ponce por facilitarme los seguimientos de las pacientes incluidas en el estudio.

A mi padre, mi hermano y mi hermana, por su apoyo y porque gracias a ellos he podido estudiar la Licenciatura de Bioquímica y así realizar esta tesis doctoral. A Flora, por estar conmigo todos estos años, por ser como es y porque el hecho de estar con ella me da ánimos todos los días. Por último, a quienes ya no están, mi madre y mis abuelos, que les debo todo, y que estarían orgullosos de haberme visto finalizar mi carrera y mi doctorado.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSP	<i>Bone sialoprotein</i>
CK	Citoqueratina
CM	Cáncer de mama
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FC	<i>Fold change</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HGUA	Hospital General Universitario de Alicante
IHC	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
kDa	kiloDalton
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NFkB	<i>Nuclear Factor kappa-B</i>
NPI	<i>Nottingham Prognostic Index</i>
OPN	Osteopontina
OPN-c	Osteopontina c
OPN-t	Osteopontina total
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RE	Receptor de estrógenos

RP	Receptor de progesterona
SIBLINGs	<i>Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins</i>
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
STATs	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
TGF-α	<i>Transforming Growth Factor alpha</i>
TN/Basal	Triple Negative/Basal-like
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
μg	Microgramo
μl	Microlitro

ÍNDICE

ÍNDICE

I.- RESUMEN.....	3
------------------	---

II.- INTRODUCCIÓN

1.- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	9
1.1.- El cáncer de mama a nivel mundial.....	9
1.2.- El cáncer de mama en Europa y España.....	10
2.- CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA.....	12
2.1.- Clasificación del cáncer de mama basado en el perfil de expresión génica.....	12
2.2.- Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama	
2.2.1.- Luminal.....	16
2.2.2.- HER2-positivo.....	16
2.2.3.- Triple-Negativo/Basal- <i>like</i>	16
2.2.4.- Normal.....	17
2.2.5.- <i>Claudin-low</i>	17
2.3.- Origen de los subtipos moleculares.....	18
2.4.- Subtipos de cáncer de mama en la práctica clínica.....	20
3.- EL PROCESO DE METÁSTASIS.....	21
3.1.- Evolución de la metástasis.....	21
3.2.- El microambiente tumoral.....	22
3.3.- Moléculas de adhesión celular en cáncer de mama:	
Cadherinas, Selectinas, Integrinas y CD44.....	23
3.4.- Metástasis óseas en cáncer de mama.....	24

4.- OSTEOPONTINA Y LA FAMILIA DE PROTEINAS SIBLINGS	
4.1.- La familia de proteínas SIBLINGS.....	26
4.2.- Papel de SIBLINGS en condiciones fisiológicas.....	28
4.3.- Papel de SIBLINGS en la etiopatogenia de tumores.....	29
5.- EL GEN DE LA OSTEOPONTINA: <i>SPP1</i>	30
5.1.- Estructura de <i>SPP1</i>	31
5.2.- Procesamiento alternativo (“ <i>alternative splicing</i> ”) de OPN.....	32
5.3.- La proteína OPN.....	33
5.4.- Función de OPN.....	35
6.- PAPEL DE OPN EN LA REGULACIÓN DEL PROCESO DE METÁSTASIS	
6.1.- OPN y sus receptores celulares.....	35
6.2.- OPN y proteasas celulares.....	36
6.3.- OPN y angiogénesis.....	36
6.4.- OPN y regulación de oncogenes.....	37
7.- PAPEL DE OPN EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	
CELULAR ONCOGÉNICAS.....	39
7.1.- Vía de señalización de PI3K/Akt.....	39
7.2.- Vía de transducción Wnt.....	41
7.3.- Vías de neoangiogénesis.....	41
7.4.- Vía de JAK2/STAT3.....	43
8.- PAPEL DE OPN EN DIFERENTES TIPOS DE NEOPLASIAS.	
8.1.- Cáncer de páncreas.....	43
8.2.- Cáncer de próstata.....	44
8.3.- Cáncer de pulmón.....	44

8.4.- Carcinoma hepatocelular.....	44
8.5.- Cáncer de colon.....	44
8.6.- Sarcomas de partes blandas.....	45
9.- OPN EN CÁNCER DE MAMA	
9.1.- Niveles de OPN en sangre de pacientes con cáncer de mama.....	45
9.2.- OPN en tumores de mama.....	46
9.2.1.- Detección de la expresión proteica por inmunohistoquímica	46
9.2.2.- Detección de los niveles de ARN mensajero por qRT-PCR.....	46
9.3.- Correlación de OPN con variables clínico-patológicas y otros biomarcadores.....	47
9.4.- Correlación entre la expresión de OPN y el pronóstico.....	47
9.5.- OPN y subtipos moleculares de cáncer de mama.....	48
III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	
1.- MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	57
1.1.- Muestras tumorales.....	57
1.2.- Diseño del estudio.....	57
1.2.1.- Selección de pacientes.....	57
1.2.2.- Variables de estudio.....	58
1.3.-Líneas celulares.....	59

2.- METODOLOGÍA.....	66
2.1.- Condiciones de los cultivos celulares.....	66
2.2.- Extracción de ARN.....	67
2.2.1.- Extracción de ARN de tejido parafinado.....	67
2.2.2.- Extracción de ARN de células en cultivo.....	68
2.2.3.- Medida de la concentración de ARN.....	69
2.3.- Reacción de retrotranscripción a ADN complementario.....	70
2.4.- PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	71
2.5.- Cálculo de la expresión génica por el método de $\Delta\Delta\text{ct}$	75
2.6.- Análisis estadístico.....	77

V.- RESULTADOS

1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES

CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	83
--------------------------	----

2.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES MOLECULARES.....85

2.1.- Expresión de ARNm de OPN-t.....	85
---------------------------------------	----

2.1.1.- Mediana de la expresión de ARNm de OPN-t en inmunofenotipos.....	86
---	----

2.2.- Expresión de ARNm de OPN-c.....	86
---------------------------------------	----

2.2.1.- Mediana de la expresión de ARNm de OPN-c en inmunofenotipos.....	88
---	----

3.- CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Y MOLECULARES.....	91
--------------------	----

3.1.- Asociación entre OPN-t y variables clínico-patológicas.....	91
---	----

3.2.- Asociación entre OPN-c y variables clínico-patológicas.....	92
4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	
4.1- Análisis Univariado (Kaplan-Meier; test de log-rank)	
4.1.1- Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE).....	94
4.1.1.1.- Variables clínico-patológicas y SLE.....	94
4.1.1.2.- Expresión de OPN y SLE.....	97
4.1.1.3.- Inmunofenotipos estratificados por los niveles de expresión de ARNm de OPN.....	99
4.1.2.- Supervivencia Global (SG).....	106
4.1.2.1- Variables clínico-patológicas y SG.....	106
4.1.2.2.- Expresión de OPN y SG.....	109
4.1.2.3.- Inmunofenotipos estratificados por los niveles de expresión de ARNm de OPN.....	110
4.2.- Análisis Multivariado (Regresión de Cox)	
4.2.1.- Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE).....	112
4.2.2.- Supervivencia Global (SG).....	114
5.- EXPRESIÓN DE OPN EN LÍNEAS CELULARES.....	115
VI.- DISCUSIÓN.....	121
VII.- CONCLUSIONES.....	137
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ratios de incidencia y mortatidad de cáncer de mama por áreas mundiales.....	10
Figura 2.- Ratios de incidencia y mortalidad de cáncer de mama en la Unión Europea (27 países).....	11
Figura 3.- (A) Dendrograma sobre los subtipos moleculares descritos por Perou <i>et al.</i> (B) Expresión génica de genes asociados a cada uno de los subtipos moleculares.....	15
Figura 4.- Supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama descritos por Perou <i>et al.</i>	18
Figura 5.- Modelo sobre la jerarquía del epitelio mamario ligado a los subtipos de cáncer de mama.....	20
Figura 6.- Secuencia y transcritos de los genes SIBLINGs.....	27
Figura 7.- Localización en el cromosoma 4 del gen <i>SPP1</i> y representación de sus exones.....	32
Figura 8.- Secuencias de las variantes transcripcionales del gen <i>SPP1</i>	33
Figura 9.- La proteína de OPN.....	34
Figura 10.- Papel de OPN en la metástasis.....	38
Figura 11.- Interacción de OPN con receptores celulares.....	40
Figura 12.- Papel de OPN en la angiogénesis.....	42
Figura 13.- Línea celular MCF-7.....	60
Figura 14.- Línea celular T47-D.....	61
Figura 15.- Línea celular BT-474.....	62

Figura 16.- Línea celular SK-BR-3.....	63
Figura 17.- Línea celular MDA-MB-468.....	64
Figura 18.- Línea celular MDA-MB-231.....	65
Figura 19.- Línea celular 184A1.....	66
Figura 20.- Amplificación génica del ARNm de OPN-t, OPN-c y <i>PUM1</i> por qRT-PCR.....	71
Figura 21.- Fases de la qRT-PCR empleando sondas TaqMan®.....	73
Figura 22.- Mediana del FC de ARNm de OPN-t en inmunofenotipos.....	86
Figura 23.- Niveles de expresión de OPN-t en inmunofenotipos.....	87
Figura 24.- Mediana del FC de ARNm de OPN-c según inmunofenotipos.....	89
Figura 25.- Niveles de expresión de OPN-c en inmunofenotipos.....	91
Figura 26.- Curvas de Kaplan-Meier para la SLE según inmunofenotipos.....	96
Figura 27.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t.....	98
Figura 28.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c.....	98
Figura 29.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t en los diferentes subtipos.....	102
Figura 30.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c en los diferentes subtipos.....	104
Figura 31.- Curvas de Kaplan-Meier para la SG según inmunofenotipos.....	108

Índice

Figura 32.- Curva de Kaplan-Meier para la SG según la expresión de OPN-t.....	110
Figura 33.- Expresión de ARNm de OPN-t y OPN-c en líneas celulares de cáncer de mama representativas de los distintos subtipos moleculares.....	116

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Ensayos TaqMan® empleados.....	74
Tabla 2.- Características clínico-patológicas de los tumores analizados.....	84
Tabla 3.- Expresión de OPN-t en los CM.....	85
Tabla 4.- Test de K-S para la variable OPN-t.....	85
Tabla 5.- Mediana del FC de ARNm OPN-t en inmunofenotipos.....	86
Tabla 6.- Categorización de la expresión de OPN-t.....	87
Tabla 7.- Expresión de OPN-c.....	88
Tabla 8.- Mediana del FC de la expresión de OPN-c en los diferentes subtipos.....	89
Tabla 9.- Expresión de OPN-c en todos los tumores.....	90
Tabla 10.- Correlación entre expresión de OPN-t y las variables clínico-patológicas.....	92
Tabla 11.- Correlación entre ARNm de OPN-c y las variables clínico-patológicas.....	93
Tabla 12.- Correlación de las variables clínico-patológicas con la SLE.....	95
Tabla 13.- Mediana de la SLE en los diferentes subtipos.....	96
Tabla 14.- Mediana de la SLE según la expresión de OPN-t y OPN-c.....	97
Tabla 15.- Mediana de la SLE según la expresión de OPN-t en inmunofenotipos.....	99
Tabla 16.- Mediana de la SLE según la expresión de OPN-c en inmunofenotipos.....	100
Tabla 17.- Correlación de las variables clínico-patológicas con la SG.....	107
Tabla 18.- Mediana de la SG en inmunofenotipos.....	108

Índice

Tabla 19.- Mediana de la SG según la expresión de OPN-t y OPN-c.....	109
Tabla 20.- Mediana de la SG según la expresión de OPN-t en inmunofenotipos.....	111
Tabla 21.- Mediana de la SG según la expresión de OPN-c en inmunofenotipos.....	112
Tabla 22.- Resultados del análisis multivariado para la SLE incluyendo OPN-t.....	113
Tabla 23.- Resultados del análisis multivariado para la SLE incluyendo OPN-c.....	114
Tabla 24.- Resultados del análisis multivariado para la SG.....	115

I.- RESUMEN

Osteopontina (OPN) es una fosfoglicoproteína secretada por varios tipos celulares a la que se le atribuyen varias funciones dependiendo del tejido, como son la formación ósea, la transducción de señales intercelulares, la activación del sistema inmune, la adhesión y la motilidad celular. La sobreexpresión del ARNm y la proteína de OPN han sido correlacionadas con tumores de alto grado histológico, desarrollo de metástasis y mal pronóstico de los pacientes en diversos tipos de neoplasias. En este estudio, se ha investigado el papel del ARNm de OPN como marcador pronóstico en una serie de pacientes con cáncer de mama.

Para realizar el estudio, se cuantificó la expresión relativa del ARNm de OPN total (OPN-t) y su variante transcripcional OPN-c en 309 cánceres de mama humanos clasificados por inmunofenotipos y en líneas celulares de cáncer de mama por la técnica de qRT-PCR.

La expresión de ARNm de OPN-t fue mayor en los tumores del subtipo HER2-positivo y en los Triple negativo/*Basal-like* (TN/Basal), mientras que la OPN-c fue mayor sólo en los tumores TN/Basal. También observamos una elevada expresión génica de OPN-t en las líneas celulares SK-BR-3 (HER2-positivo) y MDA-MB-468 (TN/Basal). Encontramos una correlación significativa entre la sobreexpresión de OPN-t y la presencia de metástasis ganglionares, mientras que la sobreexpresión de OPN-c se demostró más frecuentemente en tumores de más alto grado histológico (2 y 3). El análisis univariado de supervivencia (Kaplan-Meier, log-rank test) mostró que el periodo libre de enfermedad fue más corto en pacientes cuyos tumores sobreexpresaban ambas, OPN-t y OPN-c, y una tendencia a una supervivencia global más corta en aquellas cuyos tumores sobreexpresaban OPN-t. Mediante el análisis

Resumen

multivariado observamos el valor independiente de la OPN-c como factor pronóstico en cuanto al desarrollo de recidivas y/o metástasis.

En base a estos resultados, podemos concluir que la OPN-t y específicamente la variante OPN-c, se asocian a mecanismos de desarrollo de metástasis en el cáncer de mama. Por lo tanto, el estudio de los niveles de expresión del ARNm de OPN podría permitir el seleccionar subgrupos de pacientes dentro de los diferentes inmunofenotipos con mayor riesgo de recidivas y consecuentemente un peor pronóstico. Así pues, en los tumores TN/Basal, que son los que más sobreexpresan OPN-t y OPN-c, podría ser una nueva “diana terapéutica” teniendo en cuenta que este subtipo clínicamente agresivo carece actualmente de una quimioterapia específica.

II.-INTRODUCCIÓN

1 - EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

1.1. El cáncer de mama a nivel mundial

El número de casos de cáncer en el mundo continúa en aumento debido al crecimiento y envejecimiento de la población. A esto se suma los hábitos relacionados con el estilo de vida que favorecen la aparición de la enfermedad, como pueda ser el tabaquismo, la escasa actividad física y la dieta. Estimaciones sobre el futuro de la enfermedad prevén la aparición de más de 12 millones de nuevos casos de cáncer y 7,6 millones de muertes anualmente; de los cuales el 56% de los nuevos diagnósticos y el 64% de muertes sucederán en países en vías de desarrollo. A pesar de que la incidencia en estos países es la mitad que en países desarrollados, en general, la tasa de mortalidad es muy similar en ambos [1-3] .

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia maligna que se diagnostica con mayor frecuencia y la principal causa de muerte en la mujer, alcanzando el 23% (1,38 millones) del número total de casos diagnosticados de cáncer y el 14% (458.000) de muertes por cáncer anualmente. [3].

En general, la incidencia es mayor en los países de Norteamérica, Europa y Oceanía, mientras que se detectan menos casos en Asia, África y Sudamérica. En Asia y África está aumentando tanto el número de casos como el número de muertes a causa de esta neoplasia debido a los cambios en los patrones reproductivos, la inactividad física y la obesidad [4] (Figura 1).

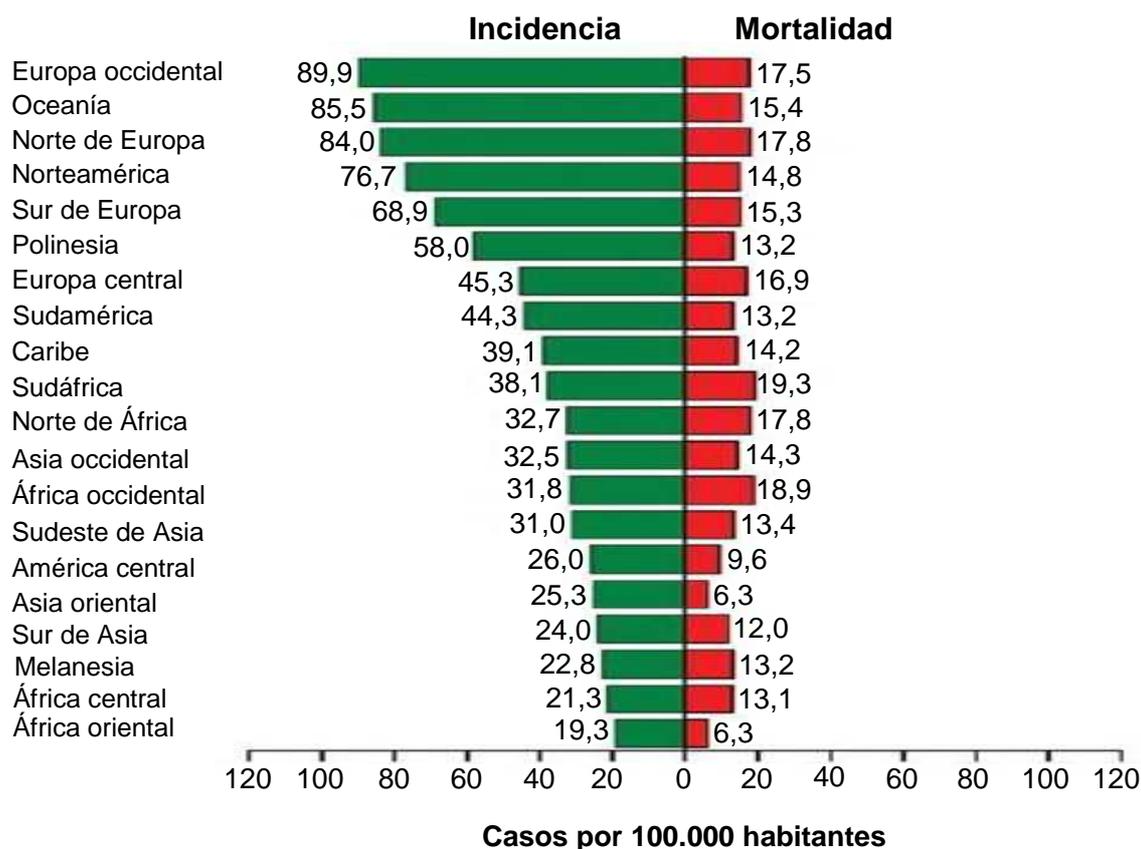


Figura 1.- Ratios de incidencia y mortalidad de cáncer de mama por áreas mundiales. Tomado, con modificaciones, de Jemal *et al.* (2011) [4] .

1.2.- El cáncer de mama en Europa y España

En Europa se detectaron en el año 2004 más de dos millones de pacientes con cáncer y más de un millón de muertes, apareciendo el cáncer de mama en primer lugar entre las mujeres, con una incidencia del 29% y causando el 17,4% de muertes. La tasa de casos detectados sigue aumentando, probablemente debido a la implantación de programas de detección precoz. Sin embargo, la tasa de mortalidad está descendiendo en los últimos años y la esperanza de vida está aumentando en más de cinco años tras su diagnóstico. Estas mejoras son el resultado de una detección precoz y la existencia de terapias más efectivas contra la enfermedad [5] (Figura 2).

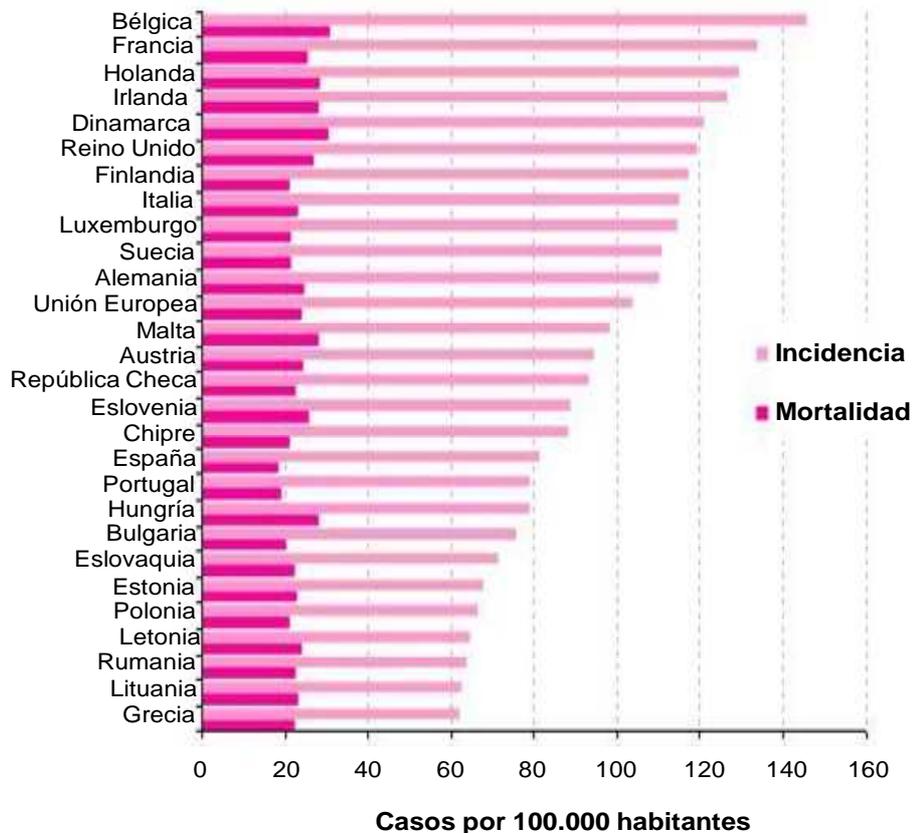


Figura 2.- Ratios de incidencia y mortalidad de cáncer de mama en la Unión Europea (27 países). Tomado, con modificaciones, de Ferlay *et al.* (2010) [5].

En España se observa un patrón de incidencia similar al resto de países europeos. Tras la implantación de los programas de detección se observó un aumento inmediato en el número de casos detectados, ya que hasta entonces no se hacían mamografías de rutina. Por el contrario, en los años posteriores y hasta la actualidad, este aumento ha sido interrumpido e incluso se ha invertido la tendencia en mujeres mayores de 44 años [6]. Algunos estudios atribuyen parte de la disminución de la incidencia a la reducción del uso de tratamientos hormonales para contrarrestar los síntomas de la menopausia [7].

Entre las mujeres jóvenes, el cáncer de mama también es el tipo de neoplasia maligna más frecuente. Además, en este grupo de pacientes, los tumores presentan características más agresivas [8]. A pesar del descenso generalizado de su incidencia en España, el subgrupo de mujeres menores de 45 años ha experimentado un aumento en los últimos 20 años. Una explicación a ello puede ser el estilo de vida, la disminución del número de hijos, la demora en la edad del primer parto, el aumento de la edad de menarquia y el consumo de alcohol y tabaco [9].

2 - CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

2.1.- Clasificación del cáncer de mama por el perfil de expresión génica

El cáncer de mama es una neoplasia heterogénea debido al distinto origen de las células. Ello se ve reflejado en la diferente respuesta a los tratamientos y evolución de cada paciente [10]. La heterogeneidad celular y molecular de esta neoplasia viene determinada por la expresión de numerosos genes implicados principalmente en el control del crecimiento, muerte y diferenciación celulares.

Recientemente, tras el estudio del patrón de expresión génica de miles de genes mediante *microarrays* de ADN complementario (ADNc), Perou *et al.* propusieron una clasificación molecular del cáncer de mama basada en sus características moleculares y fenotípicas [11]. Los rasgos moleculares revelaron similitudes y diferencias en el patrón de expresión de determinados genes entre los diferentes grupos de tumores, además de otras características como el crecimiento tumoral, la actividad de determinadas vías de señalización y la composición celular [10].

En la glándula mamaria normal se encuentran principalmente dos tipos de células epiteliales, las células basales y las células lumbinales. Estos dos tipos celulares pueden distinguirse por inmunohistoquímica según el patrón de expresión de ciertas proteínas: las células lumbinales expresan las citoqueratinas (CK) lumbinales CK8/18 y CK19, las células basales también expresan CKs lumbinales (CK14, CK17) además de CK basales (CK5/6), mientras que las células mioepiteliales expresan CK basales (CK5/6) y marcadores mioepiteliales (p63) [12].

Los estudios de expresión génica mediante *microarrays* definieron cuatro grupos de cáncer de mama con distintas características moleculares: luminal/RE (receptores de estrógenos) positivos (*luminal-like*), triple-negativo (TN)/Basal (*basal-like*), *Erb-B2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 - HER2-)* y normal (*normal-like*). Esta clasificación molecular tiene gran relevancia por su implicación clínica, ya que ha permitido clasificar a las pacientes en diferentes grupos pronósticos [10]. Recientemente se ha descrito un nuevo subtipo molecular similar al subtipo TN/Basal denominado *claudin-low*, debido a la baja expresión de las proteínas claudina 3, 4 y 7, y de la proteína E-cadherina, que constituyen uniones estrechas intercelulares [13] (Figura 3).

Las diferencias en los patrones de expresión entre los subtipos moleculares reflejan que hay una clara diferencia en la biología celular de cada tumor. Desde este punto de vista, podría considerarse cada subtipo como el origen de una enfermedad distinta, lo que vendría apoyado por su diferente comportamiento clínico en cuanto a las recidivas y la supervivencia global de las pacientes [14]. En el caso de los subtipos TN/Basal y HER2-positivo, tienen

Introducción

un comportamiento clínico más agresivo, con períodos de recidiva y supervivencia más cortos. Por el contrario, el subtipo Luminal es de mejor pronóstico. A su vez, el subtipo Luminal se divide dos categorías, Luminal A y Luminal B, presentando este último un pronóstico intermedio entre el Luminal A y los subtipos TN/Basal y HER2 [10-11, 14]. El subtipo más recientemente descrito, *claudin-low*, en términos pronósticos, las pacientes presentan una supervivencia menor que en el subtipo Luminal pero similar a los subtipos TN/Basal y HER2-positivo [13] (Figura 4).

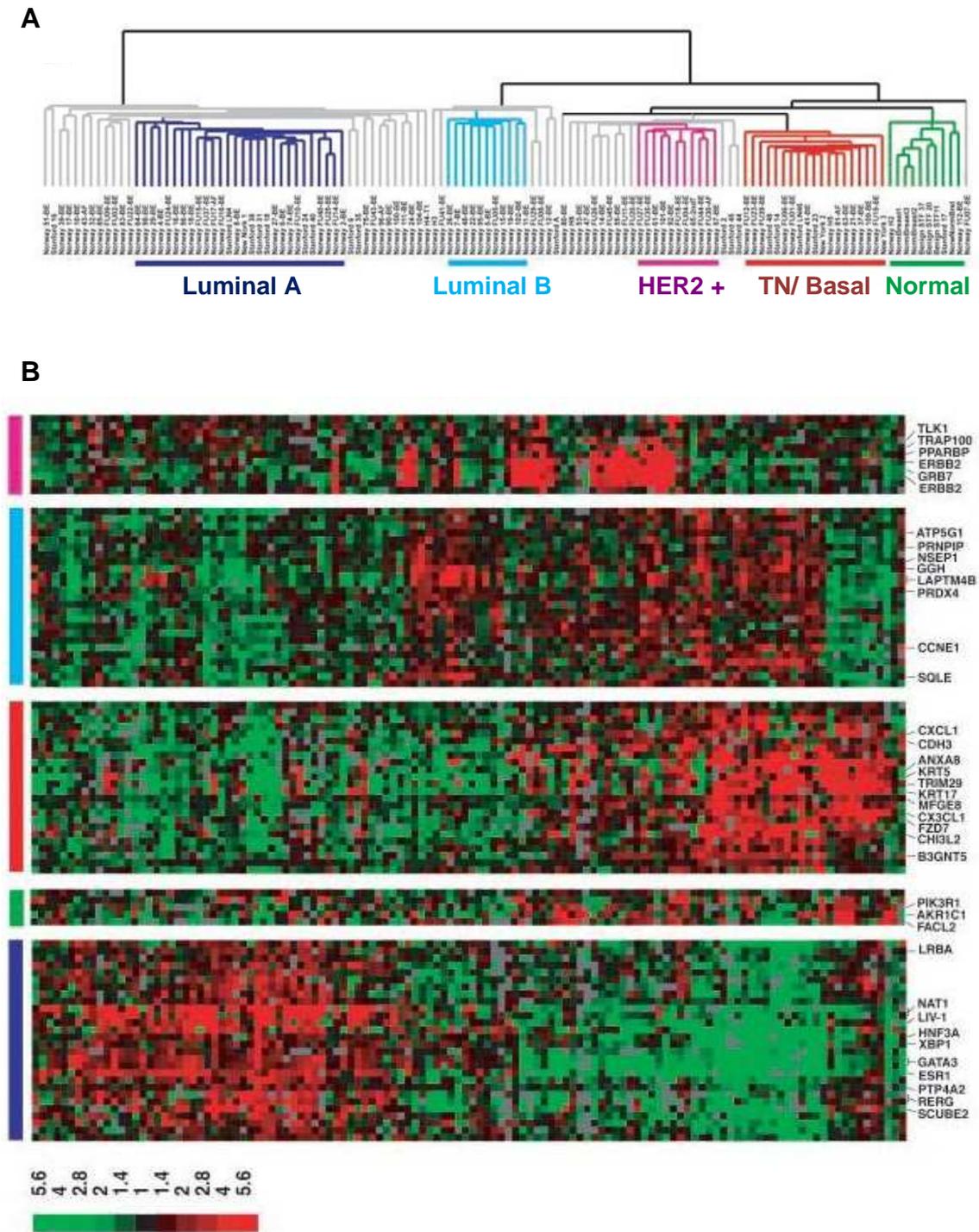


Figura 3.- (A) Dendrograma sobre los subtipos moleculares descritos por Perou *et al.* (B) Expresión génica de genes asociados a cada uno de los subtipos moleculares. Los cuadros rojos representan sobreexpresión génica mientras que los cuadros verdes representan inhibición de la expresión. Tomado, con modificaciones, de Sorlie *et al.* (2003) [14].

2.2.- Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama

2.2.1.-Luminal

Presenta una alta expresión de genes característicos de las células luminales no neoplásicas, de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP). El subtipo Luminal A es el que presenta mayor nivel de expresión del RE/RP, sobretodo del RE-alpha (α) y de los genes *NAT1*, *LIV-1*, *FOXA1*, *XBP1*, *GATA3*, *PTP4A2*, *RERG* y *SCUBE2*, mientras que el subtipo Luminal B presenta una expresión moderada de genes específicos de células luminales y de genes asociados a proliferación celular como *ATP5G1*, *PRNPIP*, *NSEP1*, *GGH*, *LAPTM4B*, *CCNE1* y *SQLE* [11, 14].

2.2.2.- HER2-positivo

El receptor HER2/neu se encuentra sobreexpresado en un 15-20% de los cánceres de mama, muy frecuentemente asociado a la amplificación del gen *Erb-B2*, localizado en el cromosoma 17 (17q22.24) [15], siendo ésta una de sus principales características. Además, estos tumores frecuentemente sobreexpresan los genes *TLK1*, *TRAP100*, *PPARBP* y *GRB7* [14] y presentan mutaciones en el gen *TP53* [11], lo que conlleva un mal pronóstico para las pacientes [16].

2.2.3.-Triple-Negativo/*Basal-like*

Característicamente son negativos para RE, RP y HER2. El subtipo *Basal-like* además de ser RE/RP/HER2-negativo, suele sobreexpresar los genes *CXCL1*, *CX3CL1*, *CDH3*, *ANXA8*, *KRT5*, *KRT17*, *TRIM29*, *MFGE8*, *FZD7*, *CHI3L2* y *B3GNT5* [14]. Presentan frecuentemente mutaciones en el gen *TP53* [11], lo

que conlleva una mala respuesta a la quimioterapia sistémica y por tanto, se asocia a un mal pronóstico [16]. Hay que reseñar que un subgrupo de estos tumores tiene mutaciones en el gen *BRCA1/BRCA2*, los cuales tienen hallazgos histológicos característicos y se presentan en pacientes jóvenes, habitualmente en el contexto de síndromes hereditarios asociados a otros tumores [17].

2.2.4.- Normal

El subtipo “normal” tiene una alta expresión de genes presentes en tejido adiposo y en otros tejidos no epiteliales. Por otro lado, este tipo de tumores sobreexpresan genes de células basales epiteliales y tienen baja expresión de genes presentes en células luminales [11]. Posteriormente se definieron como tumores de baja densidad celular ricos en estroma. Sin embargo, resultados recientes no reproducen los datos inicialmente publicados por el grupo de Perou *et al.*, por lo que actualmente se sugiere que pudo haber una contaminación de células de la mama normal [18].

2.2.5.- Claudin-low

Este subtipo molecular identificado en último lugar se caracteriza, a diferencia de los subtipos luminales y HER2-positivo, por presentar una baja expresión de RE, RP y HER2, CKs18 y 19, así como de otros genes característicos de las células luminales. A pesar de su similitud con el subtipo TN/Basal, no suele sobreexpresar genes asociados a proliferación celular. De hecho, presentan una baja expresión del gen de ciclo celular *MKI67*. Sin embargo, tiene un alto enriquecimiento de marcadores de la transición epitelio-mesénquima (TEM),

Introducción

alta expresión de genes de la respuesta inmune (*CD79B*, *CD14*, *VAV1*) y la inducción de angiogénesis (*VEGFC*, *MMP9*) [14] y presentan propiedades de “células madre” [13]. Todo esto se ha asociado a una mayor resistencia a los tratamientos quimioterápicos en estudios recientes [19].

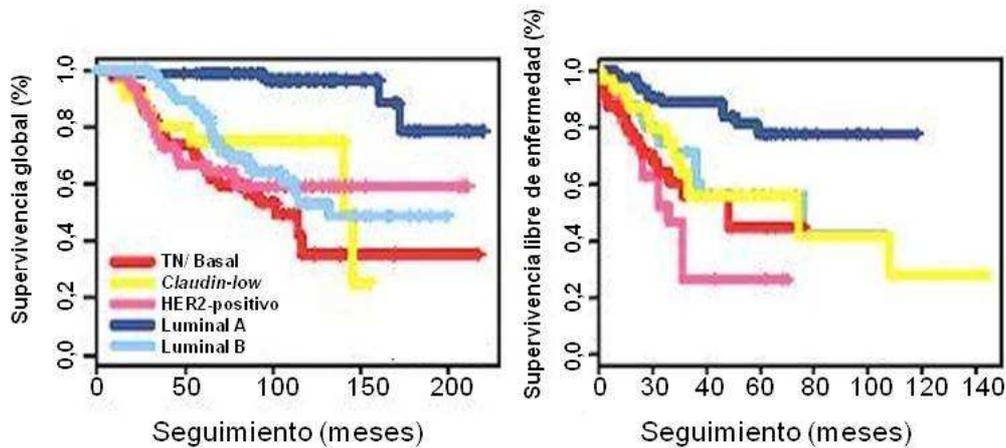


Figura 4.- Supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama descritos por Perou. Tomado, con modificaciones, de Prat *et al.* (2010) [13].

2.3.- Origen de los subtipos moleculares tumorales de mama

Puesto que existen diferencias tanto en los patrones de expresión como en la evolución de la enfermedad según el subtipo de tumor, es probable que cada subtipo se origine en un tipo de célula diferente. Según esta hipótesis, el subtipo Luminal provendría de las células madre de diferenciación luminal [20], mientras que el subtipo Triple-Negativo/*Basal-like* se originaría en las células basales del epitelio mamario. Otros datos que apoyan la existencia de diferentes entidades biológicas son la presencia de mutaciones que favorecen la aparición de un determinado subtipo de cáncer de mama, como es el caso

de las mujeres portadoras de alelos mutados en el gen *BRCA1*, que desarrollan tumores del subtipo Triple-Negativo/*Basal-like* [14, 21].

Después de varios años de estudio de la clasificación molecular del cáncer de mama, Perou *et al.* han propuesto una jerarquía celular dentro de las células mamarias. El proceso de diferenciación comenzaría con las células indiferenciadas sin RE, “células madre” mamarias, que se autorrenovarían a sí mismas y posteriormente se diferenciarían en “células progenitoras” (todavía no definidas). Estas “células progenitoras” darían origen al resto de “células diferenciadas” que se encuentran en la mama [22]. Basado en lo anterior y para poder relacionar el desarrollo de la mama con los distintos subtipos moleculares tumorales, se analizaron muestras de mama normal mediante *microarrays*. De este modo, se observó una similitud en el patrón de expresión entre células en distintos puntos del desarrollo de la mama normal y los subtipos moleculares tumorales [21].

Las “células madre” mamarias progresan hacia “células progenitoras” lumbinales y a su vez, estas se diferencian finalmente en células epiteliales lumbinales. Según la teoría planteada, los tumores del subtipo *claudin-low* se originarían de estas “células madre”, ya que este subtipo expresa genes característicos de células mesenquimales y de “células madre” [13, 22]. Un paso más allá en la diferenciación correspondería a las células mamarias “bipotentes”, progenitoras de células mioepiteliales y células lumbinales. A partir de estas células “bipotentes” se originarían los tumores del subtipo basal, ya que son los que más características comparten con este tipo de células presentes en la mama normal [23]. Por último, las características de células lumbinales de

Introducción

la mama normal se encuentran en los tumores clasificados como Luminal A, Luminal B y un subgrupo de los HER2-positivo [22] (Figura 5).

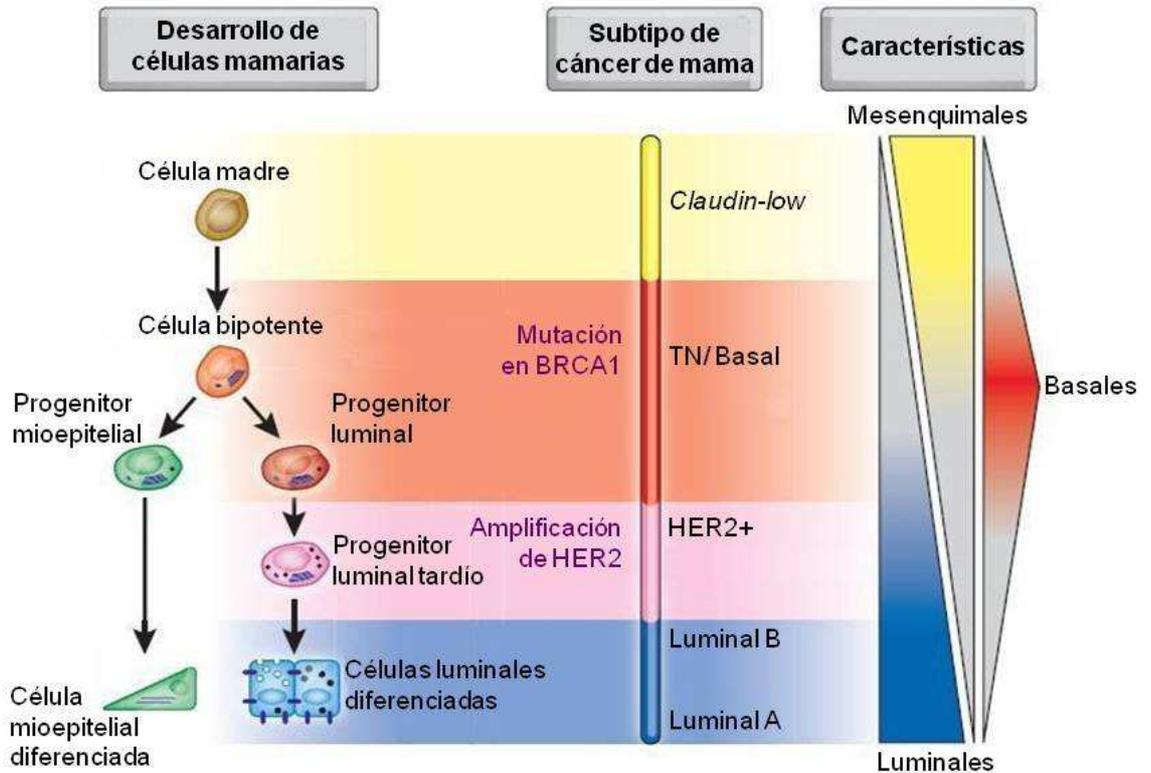


Figura 5.- Modelo sobre la jerarquía del epitelio mamario ligado a los subtipos de cáncer de mama. Tomado, con modificaciones, de Prat *et al.* [22].

2.4.- Subtipos de cáncer de mama en la práctica clínica

A pesar de los resultados obtenidos, existe cierto escepticismo respecto a la fiabilidad y reproducibilidad del uso de *microarrays* para clasificar los cánceres de mama. Muchas de las discrepancias se atribuyen a la baja afinidad de los *microarrays*, a la falta de especificidad para diferentes isoformas, distintas condiciones de hibridación, medida de la fluorescencia y los algoritmos analíticos aplicados [24]. Para apoyar los resultados procedentes de

microarrays, se han realizado varias réplicas de experimentos sobre la medida de ARN y ADNc en varias plataformas de *microarrays* en diferentes laboratorios. Los resultados derivados de este estudio han demostrado que las medidas son altamente reproducibles aún empleando diferentes plataformas y son lo suficientemente fiables como para emplearlas en la clínica. De hecho, la fiabilidad ofrecida es igual o mayor que la observada mediante técnicas inmunohistoquímicas para la detección de receptores hormonales [25-26].

3.- EL PROCESO DE METÁSTASIS

La metástasis se produce por una serie de interacciones entre las células neoplásicas y el microambiente que las rodea, permitiendo que las células adopten la capacidad de invadir nuevos tejidos. En este proceso, las células tumorales son capaces de reproducirse, aumentando el tamaño del tumor, y en última instancia, causando la disfunción del órgano y la muerte de los pacientes [27].

3.1.- Evolución de la metástasis

La iniciación y progresión de los tumores depende de la adquisición de funciones específicas por las células neoplásicas tanto en el tumor primario como en el lugar donde haya metastatizado. Estas funciones son adquiridas por la activación de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores [27].

Las funciones asociadas al desarrollo de metástasis incluyen la capacidad de las células de invasión local y resistencia a la hipoxia, junto con otras limitaciones fisiológicas, hasta la aparición de un tumor maligno localizado

[27]. Por un mecanismo u otro, las células neoplásicas actúan como células “propagadoras” del tumor inicial [28].

Es sabido que la inestabilidad genómica en las células neoplásicas aumenta la frecuencia de alteraciones necesarias para adquirir la capacidad metastática. La integridad del ADN también puede verse comprometida por la progresión incontrolada del ciclo celular, el acortamiento de los telómeros, la inactivación de los mecanismos de reparación y la pérdida de los mecanismos de control epigenéticos [29].

La capacidad de evasión de la apoptosis y de regeneración de las células neoplásicas que evita la muerte celular es otra propiedad de las células tumorales, permitiendo su proliferación y crecimiento en otras localizaciones. Además, estas células pueden permanecer inactivas durante mucho tiempo, incluso tras la exéresis del tumor [27].

3.2.- El microambiente tumoral

Cada tejido tiene una estructura física y una anatomía funcional establecida. Las células neoplásicas sortean esta organización y se exponen a un estrés celular por falta de oxígeno, bajo pH, presencia de radicales libres y respuesta inflamatoria. Esta presión selectiva puede seleccionar las células tumorales con mayor capacidad de supervivencia en condiciones desfavorables [30].

La matriz extracelular sirve de sostén a través del cual las células se unen mediante un tipo de receptores de la superficie celular llamados integrinas y mediante componentes de la matriz extracelular.

Las **moléculas de adhesión** median las interacciones célula-célula y célula-matriz, siendo esenciales para la transducción de señales responsables

de adhesión, migración, invasión, angiogénesis y metástasis a órganos específicos [31]. Estructuralmente son glicoproteínas y receptores transmembrana de la superficie celular compuestos por un dominio intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que permiten la unión a otras moléculas. Las principales familias de moléculas de adhesión son las cadherinas, las selectinas, las integrinas, las inmunoglobulinas y los receptores de linfocitos [32].

En la mayoría de tumores primarios con capacidad infiltrante, la adhesión intercelular está reducida, normalmente debido a la pérdida de E-cadherina, un mediador de las interacciones de unión entre células. Entre los mecanismos que causan la pérdida de E-cadherina están las mutaciones que truncan la proteína, el silenciamiento o metilación del promotor y la inhibición de la expresión por receptores de factores de crecimiento [33]. Su pérdida contribuye además a la transición epitelio-mesénquima (TEM), donde las células epiteliales adquieren propiedades de “células madre”, posibilitando el desarrollo y la reorganización de nuevos tipos celulares [34].

3.3.- Moléculas de adhesión celular en cáncer de mama: Cadherinas, Selectinas, Integrinas y CD44

Las **cadherinas** son glicoproteínas dependientes de Ca^{2+} responsables de la adhesión célula-célula. En presencia de Ca^{2+} , las células que expresan el mismo tipo de cadherina son susceptibles de establecer contactos célula-célula [35]. La E-cadherina es el prototipo de cadherina que tiene un papel esencial en el mantenimiento de la polaridad e integridad en los epitelios. En el tejido mamario normal se expresa en células luminales y mioepiteliales manteniendo

Introducción

la adhesión célula-célula. En cambio, en el cáncer de mama su expresión puede estar focalmente disminuida en los carcinomas de tipo ductal, mientras que hay una pérdida prácticamente completa en más del 90% de los carcinomas lobulillares, tanto in situ como infiltrantes [36].

La familia de las cadherinas también está compuesta por N-cadherina, VE-cadherina y P-cadherina, las cuales tienen un papel relevante en la progresión del cáncer de mama [31].

Las **selectinas** son moléculas de adhesión relacionadas con la interacción entre el endotelio, leucocitos y plaquetas. Una de sus funciones más importantes es la extravasación y migración de leucocitos durante la inflamación. Las células tumorales de mama siguen un proceso similar para extravasar el sistema circulatorio y de este modo poder colonizar órganos distantes [31].

Las **integrinas** unen diversos ligandos en su dominio extracelular generando estímulos que se transducen al interior celular a través de vías de señalización y el citoesqueleto [37]. La unión de osteopontina (OPN) sobre ciertas integrinas induce la expresión de MMPs y el activador de plasminógeno, de este modo facilitando la invasión tumoral [38].

CD44 es un receptor que se expresa en varios tipos celulares. Algunas de sus isoformas se expresan en células de cáncer de mama, donde se han correlacionado con mayor agresividad tumoral [31, 39].

3.4.- Metástasis ósea en cáncer de mama

El cáncer de mama suele metastatizar en hueso, pulmones, cerebro e hígado. Hay un predominio de pacientes que desarrollan metástasis osteolíticas,

causando las mayores tasas de morbilidad y mortalidad [40]. El proceso por el que estas células neoplásicas adquirirían la capacidad de colonizar el hueso a través de una vía osteolítica fue identificado en 1889 por Stephen Paget [41]. Estudios más recientes demuestran que la formación de metástasis altera la homeostasis del hueso, alterándose el balance de acción de los osteoclastos hacia la degradación de hueso frente a la constante creación de hueso por los osteoblastos [42].

Las células metastáticas de cáncer de mama son capaces de causar lesiones óseas principalmente induciendo la liberación del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) por los osteoclastos, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de citoquinas interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8 y la IL-11 [43].

Los estudios novedosos de Massagué y sus colaboradores con ratones xenotransplantados con células de cáncer de mama identificaron una serie de genes implicados en el proceso de metástasis en el hueso [43]. Los genes sobreexpresados detectados en células capaces de colonizar hueso codifican receptores de superficie celular y proteínas de secreción, cuya principal función es alterar el entorno del tejido óseo y facilitar la formación de lesiones osteolíticas. Entre ellos se encontraron: *CXCR4* (*C-X-C chemokine receptor type 4*), el gen de OPN denominado *SPP1* (*Secreted phosphoprotein 1*), *CTGF* (*connective tissue growth factor*), *MMP1* (*Matrix metalloproteinase 1*) e *IL11* (*interleukin-11*) [43].

4.- OSTEOPONTINA Y LA FAMILIA DE PROTEINAS SIBLINGS

4.1.- La familia de proteínas SIBLINGS

La familia de glicofosfoproteínas denominada SIBLINGS (*Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*) está compuesta por cinco proteínas con la capacidad de unirse a integrinas. Los genes que las codifican se encuentran orientados en el mismo sentido en tándem en el cromosoma 4 y todas contienen la secuencia de unión a integrinas Arg-Gly-Asp. Desde 1990 se ha identificado que varias de las proteínas perteneciente a esta familia se encuentran sobreexpresadas en distintos tipos de tumores de origen epitelial, que frecuentemente presentan microcalcificaciones y además tienen una tendencia alta a metastatizar en hueso [44] (Figura 6).

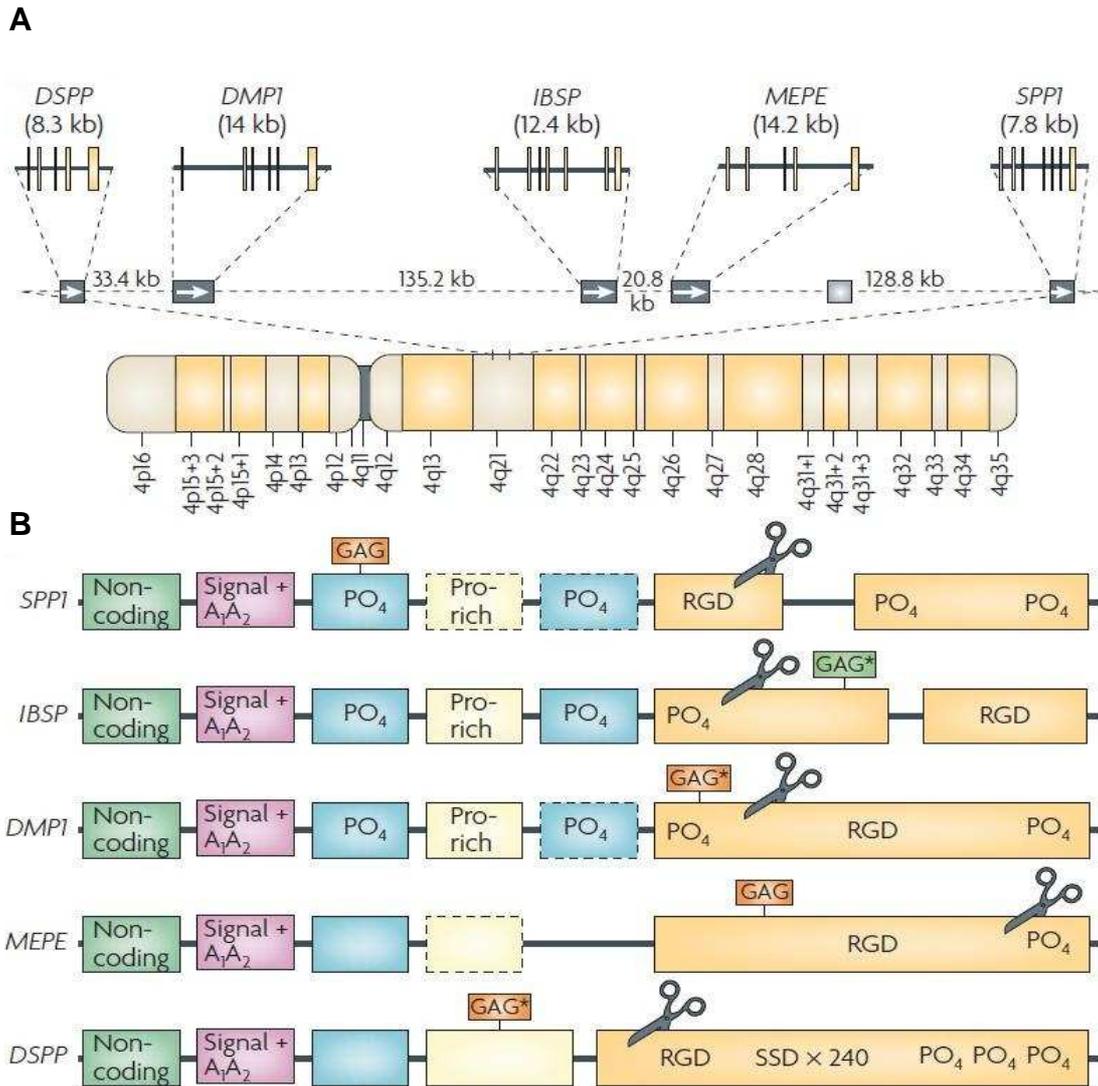


Figura 6.- Secuencia y transcritos de los genes SIBLINGs. (A) Localización cromosómica de los genes SIBLINGs en humanos. (B) Similitud de los exones transcritos de los genes SIBLINGs, característicos por contener un primer exón no codificante, un segundo exón hidrofóbico, los exones 3 y 5 contienen secuencias de fosforilación, el exón 4 es rico en prolina y el último exón presenta un tripéptido de unión a integrinas (RGD). Tomado, con modificaciones, de Bellahcene *et al.* (2008) [44].

Las proteínas que componen esta familia son: OPN, sialoproteína de hueso (*bone sialoprotein*, BSP), la proteína de la matriz de la dentina (*dentin matrix sialoprotein*, DMS), la sialofosfoproteína de la dentina (*dentin sialophosphoprotein*, DSPP) y la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular

Introducción

(*matrix extracellular phosphoglycoprotein*, MEPE). Estas son proteínas solubles secretadas por las células epiteliales en condiciones fisiológicas y ocasionalmente por las células tumorales. Regulan la adhesión celular, la señalización paracrina y autocrina, y la interacción con receptores de la superficie celular [44].

4.2.- Papel de SIBLINGs en condiciones fisiológicas

Las proteínas SIBLINGs se unen a integrinas de la superficie celular y al receptor CD44 en diferentes tejidos, funcionando como transductores de señales de adhesión, supervivencia y motilidad celular a través de la activación de cascadas de quinasas y factores de transcripción. Además, actúan modulando procesos proteolíticos liberando dominios funcionales, modulando la adhesión y la migración celular [44].

A través del factor de transcripción NFκB (nuclear factor kappa-B), las proteínas SIBLINGs también pueden controlar la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis en tejido normal [45]. La activación de NFκB por parte de OPN promueve la supervivencia de células T activadas a través de la fosforilación de la quinasa IKKβ y la inhibición del factor de transcripción Foxo3a [46].

Brown *et al.* estudiaron la expresión de ARNm y de la proteína de OPN en una serie de tejidos humanos normales y de tumores aplicando técnicas de hibridación *in situ*, *Northern blot* e inmunohistoquímica y demostraron por primera vez la presencia de OPN en células luminales epiteliales [47].

OPN es secretada por las células epiteliales gastrointestinales, del tracto urinario y reproductivo, páncreas, vesícula biliar, bronquios, mama, glándulas

salivares y conductos sudoríparos. OPN se localiza fundamentalmente en las células lumbinales glandulares y en fluidos corporales como la leche, orina y sangre. Una de las hipótesis sobre su función es la de protección física de las superficies epiteliales donde se expresa, pero su función en los diferentes fluidos no está bien definida [48].

En tejido mamario se han observado diferencias en la expresión de OPN según el estado lactante o no lactante de la mama. En tejido lactante, se ha detectado una fuerte tinción por inmunohistoquímica de OPN en células lumbinales de la superficie del epitelio glandular. Sin embargo, en tejido no lactante la tinción se limita a células del epitelio ductal [47].

En el hueso normal, OPN es secretada por los osteoblastos secretores de la matriz que se encuentran en el frente mineralizador, acumulándose en la matriz extracelular y en estructuras de la interfase de la matriz. Las funciones supuestas en este tejido son la unión de células óseas a la matriz, el control de la mineralización, la unión de tejido en formación y la reabsorción ósea [48].

OPN también es producida por macrófagos y linfocitos activados, así como células tubulares del riñón, células endoteliales arteriales musculares lisas, células del oído interno y fibroblastos [48].

4.3.- Papel de SIBLINGs en la etiopatogenia de los tumores

En condiciones patológicas, las proteínas SIBLINGs pueden inducir la progresión y la metástasis tumoral. La unión de OPN al receptor de superficie CD44 induce la migración celular a través de cascadas de quinasas que implican la activación de la fosfolipasa C, la proteína quinasa C, PI3K (*fosfatidilinositol 3-quinasa*) y Akt. En conjunto, estas enzimas están

Introducción

involucradas en la vía de señalización PI3K/Akt que regula la progresión del ciclo, la supervivencia y la migración celulares.

Las proteínas SIBLINGs también tienen la capacidad de promover la invasión y degradación de la matriz extracelular. BSP y OPN pueden activar la metaloproteínasa de la matriz extracelular 2 (*matrix metalloproteinase 2*, MMP2), la MMP3 y la MMP9. El aumento de la capacidad de invasión se debe tanto a la activación de las enzimas como a la inhibición de los propios inhibidores de las MMPs que existen en los tejidos [49].

En cuanto a los mecanismos de angiogénesis, OPN estimula por mecanismos paracrinós y autocrinós la expresión de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), uno de los principales factores de la neoangiogénesis. Además, altos niveles de expresión de SIBLINGs han sido correlacionados con la presencia de metástasis óseas [50].

5.- EL GEN DE LA OSTEOPONTINA: *SPP1*

OPN fue descubierta en la Universidad de Lund (Suecia) en 1986, a partir de la secuenciación de un clon aislado de una librería de cDNA de osteosarcoma de rata. Uno de los clones codificaba una proteína de 317 aminoácidos de 32 kDa que inicialmente se denominó "sialoproteína de hueso de rata" y que más tarde fue denominada Osteopontina. Su secuencia de aminoácidos Gly-Arg-Gly-Asp-Ser es idéntica a la de la fibronectina (proteína de la unión celular). Además, posee la secuencia Arg-Gly-Asp, que presenta actividad de adhesión celular en otras proteínas como el colágeno, la laminina y la vitronectina.

En los primeros experimentos se observó que las células de osteosarcoma eran capaces de unirse a superficies cubiertas por OPN y que por tanto, debía existir un receptor de superficie celular que reconociese a esta proteína. Por otro lado, también se demostró una fuerte capacidad de unión de OPN al hidroxapatito (fosfato de calcio), el componente más abundante en la matriz de hueso calcificado. Para reflejar la capacidad que poseía OPN a unirse a la matriz ósea, se propuso pues el nombre de Osteopontina a esta proteína [51].

5.1.- Estructura de *SPP1*

El gen que codifica OPN humana se denomina *SPP1* (*Secreted Phosphoprotein 1*). También conocido como “gen asociado a metástasis” y está localizado en el cromosoma 4 (4q13). Su secuencia está compuesta por siete exones y seis intrones. Los tripletes de codones no están interrumpidos por intrones, por lo que el procesamiento (*splicing*) alternativo no afecta a los tripletes de codones de los exones posteriores. La longitud del gen es de 9 Kb y el ORF (*open reading frame*) está formado por 942 nucleótidos [48].

El primer exón codifica la parte 5', donde se inicia la transcripción al ARN mensajero (ARNm) de OPN, pero no contiene ninguna secuencia que sea traducida a la proteína. La traducción comienza en el exón 2, donde se encuentra el codón del péptido señal y los dos primeros aminoácidos de la proteína. Los exones 3 y 5 contienen secuencias características de fosforilación, en el exón 4 se encuentran secuencias de la transglutaminasa y el exón 6 contiene una secuencia rica en ácido aspártico. Por último, el exón 7 es el mayor de los exones y codifica casi la mitad de la proteína, incluyendo el

motivo RGD y el dominio de rotura por trombina. Además, contiene el codón de terminación de la traducción y una secuencia de poliadenilación que no se traduce a proteína [48] (Figura 7).

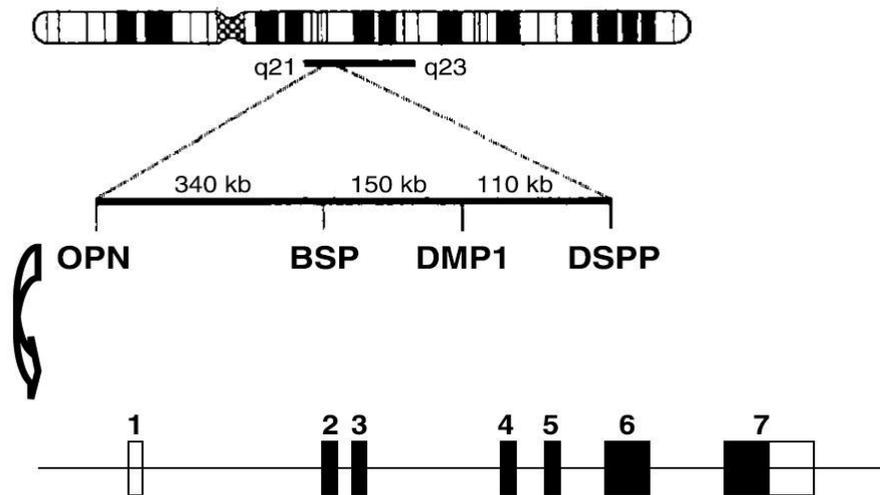


Figura 7.- Localización en el cromosoma 4 del gen *SPP1* y representación de sus exones. Tomado, con modificaciones, de Rodrigues *et al.* (2007) [48].

5.2.- Procesamiento alternativo (“*alternative splicing*”) de OPN

OPN es secretada por células normales y neoplásicas en varias isoformas dependiendo del *splicing* alternativo del ARNm. Existen tres isoformas: OPN-a, OPN-b y OPN-c. La isoforma OPN-c posee una delección del exón 4, mientras que OPN-b tiene una delección del exón 5. Estudios previos han detectado las tres isoformas en células de diversos tumores, pero en la actualidad, no existen datos definitivos sobre sus diferentes niveles de expresión y cuál es su relevancia clínica [52-53].

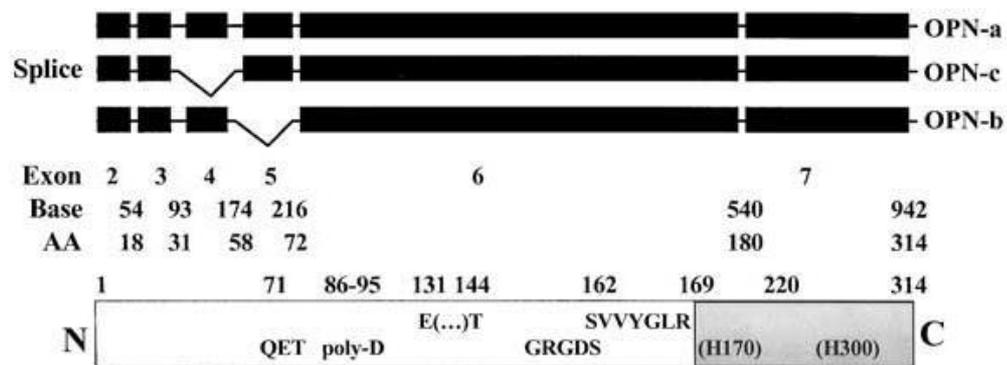


Figura 8.-Secuencias de las variantes transcripcionales del gen *SPP1*. La variante de OPN-c carece del exón 4, mientras que la variante de OPN-b no contiene el exón 5. Tomado, con modificaciones, de He *et al.* (2006) [54].

En experimentos con líneas celulares de mama se ha observado que la isoforma OPN-c facilita la formación de colonias celulares en mayor medida que la isoforma OPN-a. Sin embargo, la sobreexpresión de ninguna de ellas se ha asociado a alteraciones en el ciclo celular [54].

5.3.- La proteína OPN

El peso molecular de OPN es aproximadamente de 35 kDa [48] y su secuencia proteica es rica en aspartato, glutamato y residuos de serina, conteniendo dominios funcionales para unir calcio y uniones a la matriz extracelular. En su extremo N-terminal se encuentra un motivo de unión a hidroxapatito [55].

Las principales modificaciones post-traduccionales observadas en OPN son las fosforilaciones, hasta 36, en residuos de serina y treonina; y las glicosilaciones, hasta 5, en residuos de treonina (Figura 9). Los patrones de fosforilación determinan su función específica en la mineralización y unión a

Introducción

receptores. La relevancia biológica en el patrón de fosforilación de OPN en los tejidos mamario y óseo se desconoce en la actualidad [56].

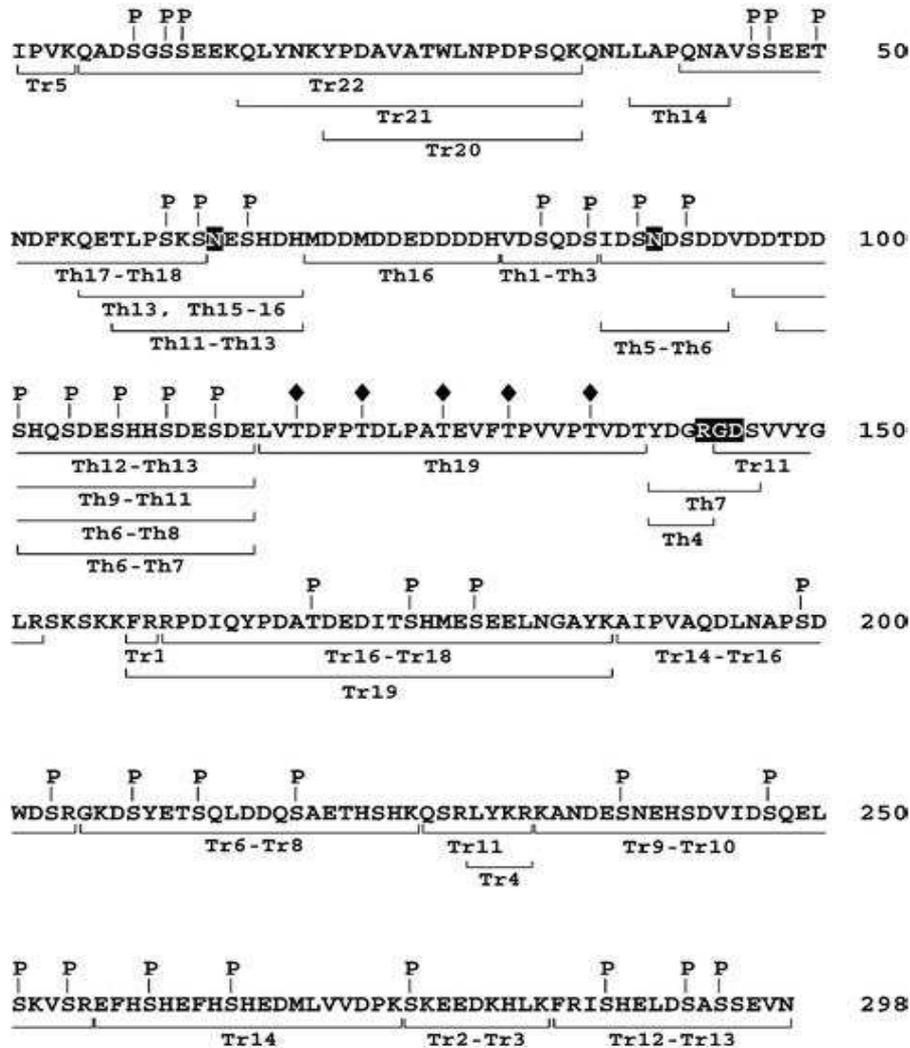


Figura 9.- La proteína de OPN. Secuencia de aminoácidos y localización de las modificaciones postraduccionales de la proteína de OPN. “P” indica fosforilaciones, “◆” glicosilaciones, **N** N-glicosilaciones, **RGD** el motivo de unión a integrinas, y las líneas sólidas péptidos característicos. Tomado, con modificaciones, de Christensen *et al.* (2005) [56].

5.4.- Función de OPN

Los diferentes dominios funcionales de OPN pueden actuar por separado tras su rotura en subunidades por parte de la enzima trombina. Una vez se ha fragmentado la estructura proteica, sus dominios de unión quedan expuestos a los receptores de superficie CD44 y a las integrinas del tipo $\alpha\beta$ [44].

La unión de OPN a sus receptores promueve la migración celular sobre la adhesión, favoreciendo la metástasis. Los fragmentos generados tras su rotura por la trombina también pueden estimular la adhesión, migración e invasión celulares, dependiendo del fragmento proteolítico liberado [57].

Por otro lado, OPN funciona como proteína de unión celular en el proceso de formación de la matriz ósea [58]. Además, es secretada por los osteoblastos y los osteoclastos, y está presente entre la matriz ósea en contacto con células óseas y la matriz ósea externa [48].

6. PAPEL DE OPN EN LA REGULACIÓN DEL PROCESO DE METÁSTASIS

6.1.- OPN y sus receptores celulares

Las **integrinas** son receptores de la superficie celular compuestos por subunidades α y β , unidas por fuerzas no covalentes. Estos receptores son específicos para un amplio número de moléculas además de OPN, como son la vitronectina, fibronectina, fibrinógeno y trombospondina [59].

En las células tumorales se expresan varios tipos de integrinas, lo que hace probable que su sobreexpresión cause la activación constitutiva de algunas vías de señalización y de este modo proliferen las células [48].

OPN puede unirse a las integrinas $\alpha\nu\beta1$, $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha8\beta1$ y $\alpha9\beta1$. La unión de OPN a la integrina $\alpha\nu\beta3$ media la migración e invasión de

las células neoplásicas, induce angiogénesis por medio de VEGF y otros factores y activa a los osteoclastos, facilitando así la metástasis óseas [55, 59].

El receptor de adhesión CD44 presenta varias isoformas debido al splicing alternativo, traducándose a varias proteínas similares. A pesar de que su principal ligando es el ácido hialurónico, otras proteínas extracelulares como OPN son capaces de activarlo promoviendo la migración e invasión celulares [60]. La variante CD44v6 se ha identificado como un marcador de metástasis en neoplasias de hígado, pulmón, páncreas, digestivo y linfomas [55].

6.2.- OPN y proteasas celulares

Las enzimas proteolíticas pueden contribuir al proceso de crecimiento tumoral y de metástasis a través de la degradación de la matriz extracelular. OPN es capaz de inducir la expresión y actividad de proteasas de la familia de las MMP contribuyendo al proceso de metástasis. En estudios con líneas celulares se ha observado que OPN incrementa la capacidad infiltrante de las células y la expresión de uPA (*urokinase Plasminogen Activator*), debido a su unión a integrinas de la superficie celular [48].

6.3.- OPN y angiogénesis

Las células endoteliales vasculares expresan integrinas de superficie celular con las que OPN es capaz de interactuar e inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por una parte, se ha demostrado que el bloqueo de la integrina $\alpha\beta 3$ tiene un efecto inhibitor en el proceso de angiogénesis. Por otra parte, el aumento en la expresión de esta integrina y OPN tras daño vascular apoyan su papel clave en la reparación y regeneración vasculares. En otros

estudios se ha observado que la interacción entre la integrina $\alpha\beta 3$ y OPN también protege a las células endoteliales de la entrada en apoptosis, a través de la activación de la vía de NF κ B, contribuyendo al proceso de angiogénesis e induciendo la expresión de VEGF [48].

6.4.- OPN y regulación de oncogenes

OPN es capaz de inducir cambios en la expresión génica de genes implicados en el proceso de metástasis. En concreto, en líneas celulares de cáncer de mama se ha observado mediante *microarrays* que su presencia afecta a la expresión de más de 100 genes, algunos de ellos implicados en los procesos más importantes de la progresión tumoral.

Genes implicados en la proliferación celular, como *IGFBP3* (*insulin growth factor binding protein 3*) que bloquea la proliferación celular, se inhibe bajo la presencia de OPN. La proteína codificada por *GAS6* protege a las células de la apoptosis y aumenta el crecimiento celular a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. Este mecanismo se ve favorecido por el control de OPN en la sobreexpresión de *GAS6*.

La sobreexpresión de OPN también regula ciertos genes implicados en la capacidad de crecimiento replicativo ilimitado que poseen las células tumorales, como *CHK2*, cuya expresión es inhibida por OPN. La proteína *CHK2* tiene un papel fundamental en la regulación de la entrada en apoptosis inducida por daño en el ADN. Por lo tanto, la disminución en su expresión facilita el crecimiento incontrolado celular y permite la inestabilidad genómica, contribuyendo al incremento de mutaciones (Figura 10) [61].

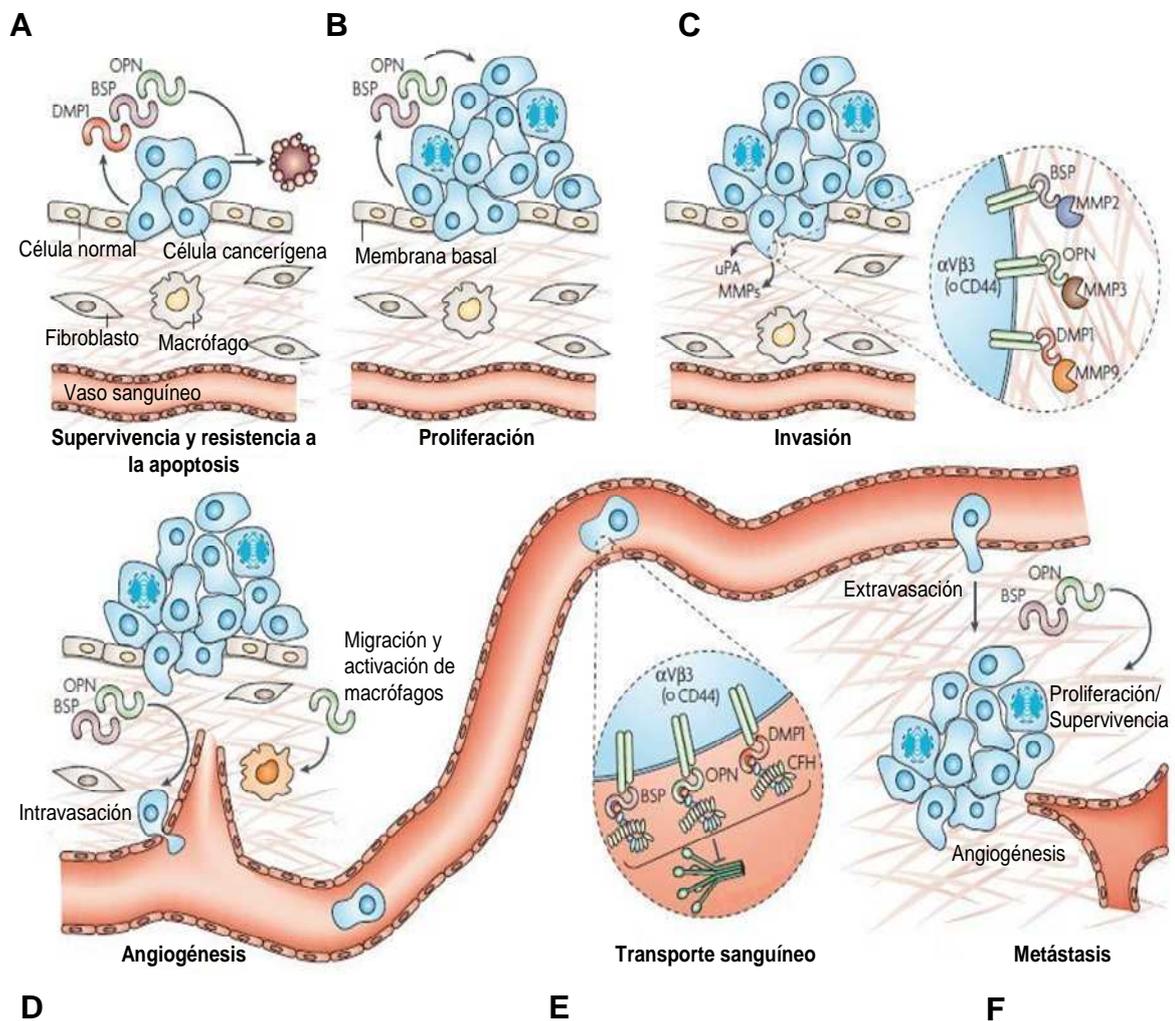


Figura 10.- Papel de OPN en la metástasis. (A-B) Las células del tumor primario secretan altos niveles de OPN, lo cual favorece la proliferación y la supervivencia. (C) Las células con alta capacidad migratoria producen MMPs, degradan la membrana basal y se liberan del tumor primario. (D) OPN activa vías de angiogénesis e induce la migración y activación de macrófagos cerca del tumor primario. (E) Las células tumorales circulantes liberan OPN que al unirse a los receptores celulares las protege de la lisis del sistema del complemento. Así, las células pueden ser transportadas hasta órganos distantes. (F) Las células tumorales circulantes extravasación en órganos produciendo nuevos tumores secundarios. La capacidad de supervivencia, proliferación y angiogénesis adquiridas en el tumor primario ayudan a desarrollar colonias metastásicas. Tomado, con modificaciones, de Bellahcene *et al.* (2008) [44].

7.- OPN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULARES ONCOGÉNICAS

OPN controla varias vías de señalización celular a través de receptores como las integrinas $\alpha\beta$ y CD44, pero en la actualidad no están completamente definidas, siendo el objetivo de numerosas investigaciones [62].

7.1.- Vía de señalización de PI3K/Akt

Esta vía juega un papel importante en múltiples procesos como el metabolismo, la proliferación, la progresión del ciclo y la supervivencia celulares. Esta ruta se activa principalmente por factores de crecimiento (p.e. IGF1R, EGFR, HER2) y factores angiogénicos (VEGF) [63].

La activación de la vía PI3K/Akt favorece la expresión de OPN por las células tumorales. Esto se ha demostrado en cultivos celulares con citoquinas como la interleucina 3 (IL-3) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Como respuesta a estos factores se estimula la liberación de OPN y su unión al receptor CD44 promoviendo la supervivencia celular [64]. Estudios similares también comprobaron que tras la unión de OPN al receptor CD44, se activa la vía PI3K/Akt. Por el contrario, en caso de mutaciones inactivantes de *SSP1* no hubo activación. Por lo tanto, se ha sugerido que OPN podría actuar como activador de un ciclo de retroalimentación positiva de la vía PI3K/Akt, resultando en la inhibición de la apoptosis y un incremento de la supervivencia celular [65].

Experimentos con células de cáncer de mama han demostrado que la activación de EGF también está relacionada con OPN. La activación de la vía de EGF activa a PI3K/Akt y a la vía de la MAPK. Tanto la adición de EGF al medio de cultivo como las mutaciones activantes de *EGFR* se correlacionaron

Introducción

con la sobreexpresión de OPN, causando así una desregulación del crecimiento celular y favoreciendo la diseminación tumoral (Figura 11) [65].

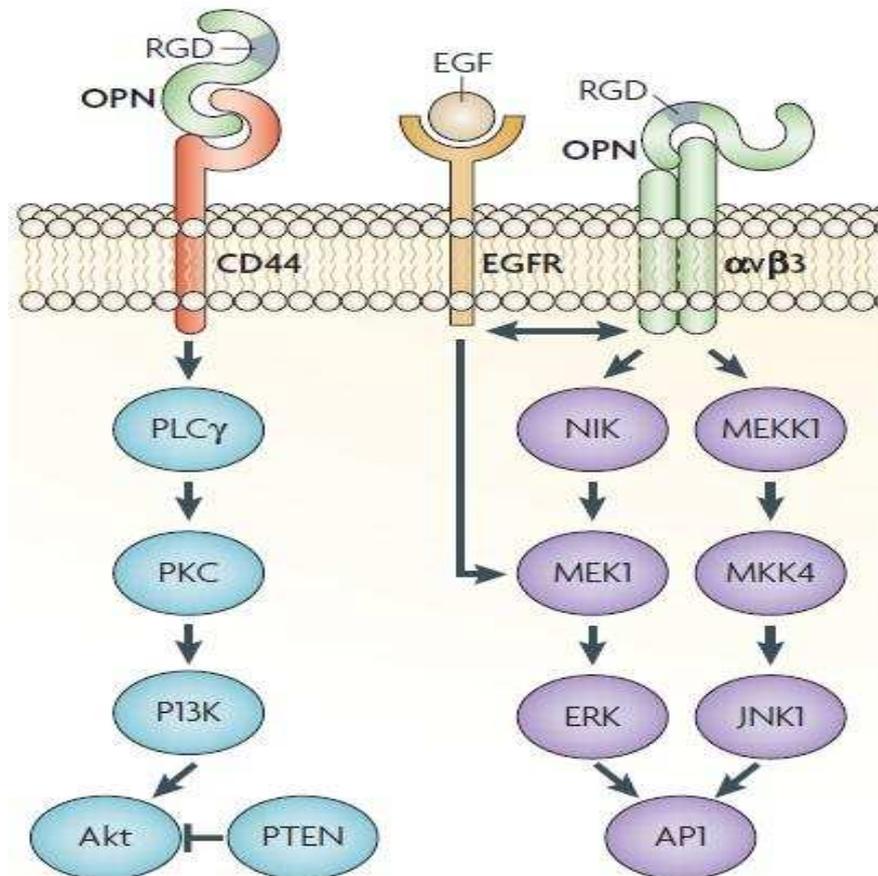


Figura 11.- Interacción de OPN con receptores celulares. OPN es capaz de interactuar con el receptor celular CD44 y la integrina $\alpha\beta3$. Mediante la unión a estos receptores OPN es capaz de activar la vía PI3K/Akt así activando la supervivencia celular, y la vía ERK aumentando la motilidad y migración celulares. Tomado, con modificaciones, de Bellahcene *et al.* (2008) [44].

OPN también induce la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) a través del factor de transcripción NF κ B, que a su vez activa a otro factor de transcripción, la proteína activadora-1 (AP-1). Se ha

observado que mTOR está implicado en la regulación de la vía de PI3K/Akt a través del bloqueo de la activación de AP-1 dependiente de OPN [66].

7.2.- Vía de transducción Wnt

La vía Wnt/Wingless juega un papel importante en el desarrollo embrionario y en la progresión del cáncer. La proteína β -catenina interacciona con la familia de factores de transcripción TCF, que activan la transcripción de los genes diana de Wnt [67]. En cáncer de mama se ha observado que su activación se correlaciona con un incremento de la proliferación celular y las metástasis, resistencia a tratamiento radioterápico, y por tanto, con mal pronóstico. Estudios recientes *in vitro* con líneas celulares de cáncer de mama han demostrado la relación entre OPN y esta vía [68].

7.3.- Vías de neoangiogénesis

El crecimiento de los tumores y el desarrollo de metástasis dependen de la formación *de novo* de vasos sanguíneos que irrigen al tumor. La formación de neovasos está estrechamente regulada por receptores tirosina quinasa que unen factores de crecimiento, principalmente VEGF y su receptor KDR [69].

Kundu *et al.* observaron en experimentos con líneas celulares humanas de cáncer de mama que OPN estimulaba la expresión de VEGF favoreciendo de este modo la angiogénesis y el crecimiento tumoral por vía autocrina y paracrina. Además, los resultados apoyaron que el aumento de la migración celular está regulado por OPN a través de VEGF y de su receptor NRP-1. Estudios en animales de experimentación con curcumina demostraron la inhibición de la angiogénesis tumoral inducida por OPN, con lo que se abre una

nueva opción terapéutica [70]. Datos recientes sobre el tratamiento con anticuerpos anti-OPN han demostrado un efecto antiangiogénico *in vivo* incluso mayor que los tratamientos con anticuerpos anti-VEGF. Por lo tanto, OPN puede ser una diana para el desarrollo de nuevas terapias antiangiogénicas en el cáncer [71].

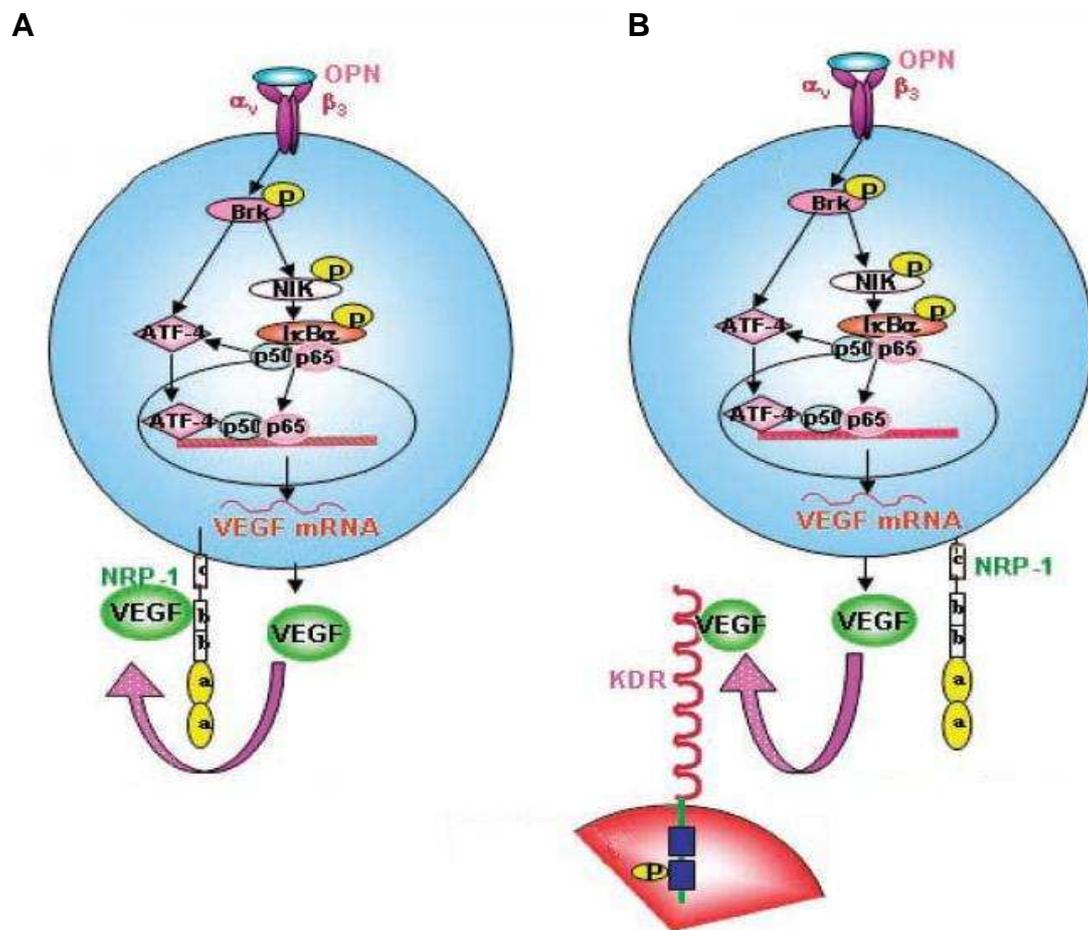


Figura 12.- Papel de OPN en la angiogénesis. (A) La OPN liberada de una célula tumoral puede actuar de manera autocrina activando sobre sí misma vías de señalización. (B) La OPN liberada también puede activar de manera paracrina a las células circundantes. Tomado, con modificaciones, de Chakraborty *et al.* (2008) [50].

7.4.- Vía de JAK2/STAT3

Las proteínas “activadoras de la transcripción de transductores de señales” o STATs regulan vías de señalización de citoquinas, que a su vez regulan el crecimiento, la diferenciación, la supervivencia y el desarrollo celulares mediante el control de otros genes. STATs suelen activarse por receptores de membrana que responden a citoquinas extracelulares, y en ocasiones de forma constitutiva por la presencia de oncoproteínas. Su activación aberrante contribuye al proceso de transformación neoplásica, lo que se confirma por la desregulación de la vía de STAT descrita en varios tipos de tumores [72].

Kundu *et al.* demostraron en cultivos celulares tratados con OPN que la activación/fosforilación de JAK2/STAT3 está medida por la integrina $\alpha\beta3$, confirmando además que esta vía está implicada en el aumento de la migración celular y el bloqueo de la apoptosis inducida por OPN [72].

8.- OPN EN DIFERENTES TIPOS DE NEOPLASIAS

8.1.- Cáncer de páncreas

La presencia de OPN se ha demostrado en numerosas neoplasias en diferentes localizaciones. Por ejemplo, en adenocarcinomas ductales e indiferenciados pancreáticos se ha detectado su sobreexpresión tanto en el tumor como en la sangre de los pacientes hasta en el 70% de los casos [73]. Además, se ha observado un aumento de OPN y de la isoforma OPN-c en pacientes fumadores con cáncer de páncreas, lo que sugiere que la nicotina puede favorecer de algún modo la expresión de OPN [74].

8.2.- Cáncer de próstata

En líneas celulares de próstata normal el nivel de expresión de OPN es inferior comparado con las líneas celulares de cáncer de próstata. Los resultados inmunohistoquímicos confirmaron estos hallazgos, y además se correlacionó significativamente con supervivencias más cortas de los pacientes [75].

8.3.- Cáncer de pulmón

Recientes estudios sobre OPN en cáncer de pulmón han demostrado su papel en la proliferación y la capacidad infiltrante de las células tumorales. También por métodos inmunohistoquímicos se demostró una tinción muy débil o era indetectable en tejido no tumoral, que contrastó con la sobreexpresión de OPN en los diferentes tipos histológicos estudiados [76].

8.4.- Carcinoma hepatocelular

En el hígado, el análisis de la expresión de OPN en líneas celulares, tejido hepático normal y de carcinoma hepatocelular también ha demostrado sobreexpresión en tejido neoplásico. Además, este aumento se correlacionó con la expresión de genes asociados a metástasis (p.ej. MMPs y uPA) [77-78].

8.5.- Cáncer de colon

En líneas celulares y tumores de colon también se han descrito niveles de ARNm de OPN y de su proteína significativamente más elevados que en tejido no tumoral. Además se demostró correlación con factores patológicos de mal pronóstico, como la presencia de metástasis ganglionares, invasión linfática y estadios avanzados de la enfermedad [79]. En una serie de muestras

representativas de la secuencia adenoma-displasia-carcinoma colorrectal se observó que la expresión de OPN fue de muy baja intensidad en tejido normal, moderada en adenomas y muy alta en los carcinomas. Estos resultados sugieren también un papel relevante de OPN en la transición adenoma-displasia-carcinoma colorrectal [80].

8.6.- Sarcomas de partes blandas

De modo similar, estudios de OPN en sarcomas de partes blandas han demostrado la asociación con el grado tumoral, el estadio y la supervivencia de los pacientes [81], por lo que se ha propuesto su potencial utilidad como marcador pronóstico [82].

9.- OPN EN CÁNCER DE MAMA

9.1.- Niveles de expresión de OPN en sangre

OPN es secretada por las células epiteliales mamarias en condiciones fisiológicas. Estudios recientes comparando los niveles de OPN en sangre periférica de mujeres sanas con pacientes con cáncer de mama demostraron que la concentración de OPN era mayor en este último grupo [48]. En el análisis de supervivencia se observó una asociación significativa entre los niveles de OPN y el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global, por lo que algunos autores han sugerido que OPN podría servir como marcador tumoral [83]. Estos resultados se han confirmado en estudios experimentales *in vivo* con ratones [84].

9.2.- OPN en tumores de mama

9.2.1.- Detección de la expresión proteica por inmunohistoquímica

Un extenso estudio inmunohistoquímico demostró la existencia de expresión de OPN en el parénquima mamario de mujeres embarazadas o en estado de lactancia, pero no en el tejido epitelial normal. En cáncer de mama se han descrito frecuencias de expresión de OPN variables (26-86%) [85]. Los primeros resultados al respecto fueron publicados en 1998 por Tuck *et al.* que estudiaron la expresión inmunohistoquímica en una serie cánceres de mama con ganglios linfáticos negativos. Demostraron sobreexpresión de OPN en el 26% de los casos y además expresión focal en macrófagos y linfocitos asociados al tumor. En este grupo de pacientes en estadios iniciales, encontraron asociación entre la presencia de OPN y un pronóstico desfavorable [86]. Por otro lado, Rudland *et al.* observaron en una serie de 333 cánceres de mama, expresión hasta en el 86% de los tumores analizados [87], mientras que en un estudio posterior, en una serie de 291 pacientes, observaron un porcentaje de positividad del 49% [88].

9.2.2.- Detección de los niveles de ARN mensajero por qRT-PCR

Los primeros estudios publicados analizaron la expresión génica de OPN junto a la de otros genes implicados en el proceso de metástasis. Los resultados demostraron que los niveles de ARNm de OPN en cáncer de mama *in situ* (CDIS) eran superiores cuando se comparaban con tejido normal, pero inferiores que en tumores infiltrantes y en las metástasis [89].

Más recientemente, Patani *et al.* analizaron la expresión de transcritos alternativos de OPN (OPN-a, OPN-b y OPN-c) y demostraron que OPN-a se

expresaba en tejido normal y lesiones proliferativas benignas de la mama. Sin embargo, en tumores malignos los niveles de expresión se correlacionaron de manera inversa con el estadio tumoral (TNM). La expresión de OPN-b fue mayor en tumores de alto grado. En cuanto a la expresión de OPN-c, estaba elevada en neoplasias malignas comparada con tejido normal y además, se correlacionó con un alto grado histológico, estadios avanzados y la presencia de metástasis óseas [90]. Hasta la actualidad, no existen estudios que corroboren estos resultados iniciales en series largas de pacientes con cáncer de mama.

9.3.- Correlación de OPN con variables clínico-patológicas y otros biomarcadores

Los estudios publicados sugieren que los niveles altos de OPN correlacionan significativamente con factores clínico-patológicos de mal pronóstico, como son un grado histológico alto, status HER2-positivo o RE/RP-negativo [85, 87, 91], o ganglios axilares positivos [92]. Sin embargo, existen resultados contradictorios en la literatura [88].

9.4.- Correlación entre la expresión de OPN y el pronóstico

Los estudios de correlación entre los niveles de expresión de OPN y la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama sugieren que aquellas cuyos tumores sobreexpresan OPN tienen un mayor riesgo de recidivas y la supervivencia global es más corta [86-88].

El análisis de los niveles de expresión de ARNm de las diferentes isoformas no mostró diferencias significativas para la isoforma OPN-a pero sí

Introducción

para la OPN-b, siendo significativamente más altos en los tumores de las pacientes fallecidas por cáncer de mama comparado con las vivas, en un seguimiento de 10 años. De un modo similar, la variante OPN-c también demostró diferencias significativas [90]. Sin embargo, actualmente no existen estudios que corroboren estos resultados.

9.5.- OPN y subtipos moleculares de cáncer de mama

Los estudios de expresión de OPN en el cáncer de mama dependiendo de su clasificación molecular son muy escasos y además muestran resultados contradictorios. Mientras que para unos investigadores se asociaría al fenotipo luminal [85, 88], en otros es relevante en el fenotipo HER2-positivo pero no en el subtipo TN/Basal [85, 87]. En contraposición con los resultados anteriores, se ha descrito que los tumores con mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* también presentan diferencias en la expresión génica de OPN. El análisis de expresión por *microarrays* y de PCR cuantitativa en estos tumores ha demostrado una mayor expresión de OPN en aquellos con mutaciones en *BRCA1*, que suelen pertenecer al subtipo TN/Basal [91, 93].

III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El gen *SPP1* es un oncogén asociado a metástasis, por lo que sería esperable que los fenotipos tumorales más agresivos (HER2-positivo y TN/Basal) presentasen una mayor expresión de ARNm de OPN. Además, teniendo en cuenta que OPN-c se asocia a características clínicopatológicas de mal pronóstico, sus niveles de expresión génica podrían ayudar a estratificar a las pacientes en subgrupos de riesgo, incluso dentro de cada fenotipo tumoral.

Sería pues, también esperable que la expresión de ARNm de OPN-t y OPN-c fuera mayor en las líneas celulares de CM representativas de los fenotipos más agresivos (HER2-positivo y TN/Basal).

OBJETIVOS

1 - Analizar por métodos moleculares (qRT-PCR) los niveles de expresión génica de OPN-t y OPN-c en una serie de pacientes con cáncer de mama. Clasificar los tumores por inmunofenotipos y realizar un estudio descriptivo de los niveles de ARNm de OPN.

2 - Correlacionar los niveles de expresión ARNm de OPN con las variables clínico-patológicas clásicas.

3 - Correlacionar los niveles de expresión ARNm de OPN con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, estratificando por inmunofenotipos.

4 - Analizar por qRT-PCR la expresión génica de OPN en líneas celulares de cáncer de mama representativas de los diferentes inmunofenotipos.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MUESTRAS BIOLÓGICAS

1.1.- Muestras tumorales

El presente estudio se realizó sobre material de tejido tumoral incluido en parafina de los archivos de Patología del HGUA, los cuales están incluidos en las colecciones del Biobanco de esta Institución.

En este proyecto se incluyeron por una parte pacientes con diagnóstico anterior (1988-2007) a la publicación de la Ley de Investigación Biomédica del 14 de Junio del 2007, y otro grupo de pacientes diagnosticadas hasta diciembre de 2008. Los consentimientos informados se recogieron de manera retrospectiva por los especialistas responsables de las áreas de Ginecología y Oncología. Por otra parte, no se utilizó la información obtenida para modificar la actitud terapéutica.

1.2.- Diseño del estudio

1.2.1.- Selección de pacientes

Criterios de inclusión:

- Diagnóstico histológico de carcinoma de mama infiltrante y seguimiento clínico de al menos 12 meses.
- Muestras representativas de tumores incluidos en parafina de tamaño superior a 5 mm, con la suficiente cantidad y calidad para estudio inmunohistoquímico y molecular (ARN).
- Fenotipo tumoral por métodos inmunohistoquímicos y/o moleculares (hibridación in situ fluorescente –FISH- o cromogénica –CISH-).

Criterios de exclusión:

- Tratamiento neoadyuvante.
- No disponer de consentimiento informado en los casos de las pacientes incluidas en el estudio con diagnóstico posterior a la publicación de la Ley de Investigación Biomédica del 14 de Junio del 2007.

1.2.2.- Variables de estudio

Variables clínicas y de seguimiento:

- Edad en el momento del diagnóstico.
- Fecha de diagnóstico de la neoplasia.
- Tipo de tratamiento quirúrgico (cirugía conservadora vs mastectomía y linfadenectomía axilar homolateral).
- Periodo libre de enfermedad, definido como tiempo transcurrido (en meses) entre el momento del diagnóstico (biopsia/cirugía del tumor primario) y la aparición de recidiva local o metástasis a distancia.
- Supervivencia global, definida como tiempo transcurrido (en meses) entre el momento del diagnóstico y el fallecimiento de la paciente.

Variables morfológicas:

- Tamaño (T) del tumor primario (en mm).
- Grado de diferenciación tumoral (grados I-III) (método de Elston and Ellis, 2001) [94].
- Necrosis tumoral (presencia/ausencia).
- Invasión vascular (presencia/ausencia).

- Metástasis en ganglios linfáticos (N) (presencia/ausencia/número de ganglios positivos).

Finalmente, los tumores fueron estratificados siguiendo el sistema de clasificación TNM de carcinomas de mama (*American Joint Committee on Cancer TNM Staging System 2002*).

Variables Inmunohistoquímicas:

- Clasificación en inmunofenotipos basado en la clasificación molecular de Perou *et al.* [11], con modificaciones:
 - Luminal A: RE y/o RP >50%, Ki67 <15%, p53 <20%, Bcl2 >50%.
 - Luminal B: RE y/o RP <50%, Ki67 ≥20%, p53 >20%, Bcl2 <50%.
 - HER2-positivo: expresión en al menos 30% de células de intensidad 3+ o amplificación confirmada por métodos de FISH o CISH.
 - TN/Basal: RE/RP/HER2-negativos +/- CK5/6 positiva +/- EGFR positivo.

Variables moleculares:

- Cuantificación de la expresión de ARNm de OPN total (OPN-t).
- Cuantificación de la expresión de ARNm de OPN-c.
- Cuantificación de la expresión de ARNm de *PUM1*.

1.3.-Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en el estudio fueron obtenidas de la “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Rockville, MD, EEUU) y todas son originarias de carcinomas de mama, excepto la línea 184A1 que proviene de células

epiteliales normales de mama. En cuanto al tipo de crecimiento, todas las líneas escogidas son adherentes y presentan un crecimiento en monocapa.

MCF-7:

Es una línea celular epitelial representativa de tumores luminales (ER/PR-positivos y HER2-negativo). Posee varias características del epitelio mamario diferenciado, ya que presenta una alta expresión de RE y tiene la habilidad de procesar estradiol a través de sus receptores citoplasmáticos. En condiciones de alta confluencia celular, estas células son capaces de formar cúmulos celulares en forma de cúpula (Figura 13) [95].

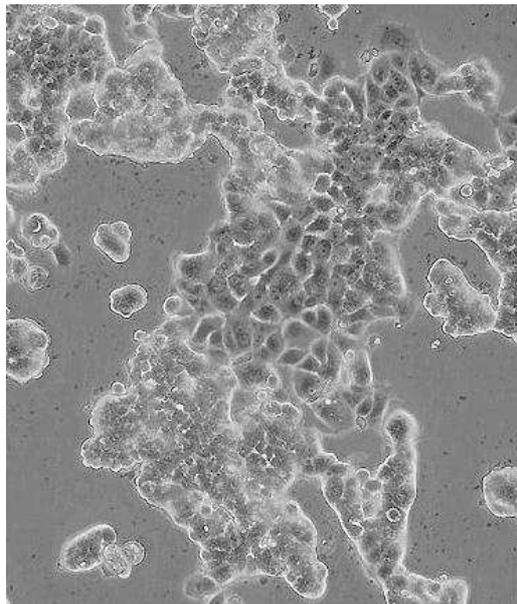


Figura 13.- Línea celular MCF-7. Imagen tomada, con modificaciones, de <http://www.atcc.org>.

T-47D:

Línea celular epitelial representativa de tumores luminales (ER/PR-positivos y HER2-negativo), caracterizada en 1979 por Keidar *et al.* Esta línea está formada por células epiteliales diferenciadas que presentan uniones citoplasmáticas, receptores para calcitonina y receptores de esteroides, como el receptor para beta-estradiol 17 (Figura 14) [96].

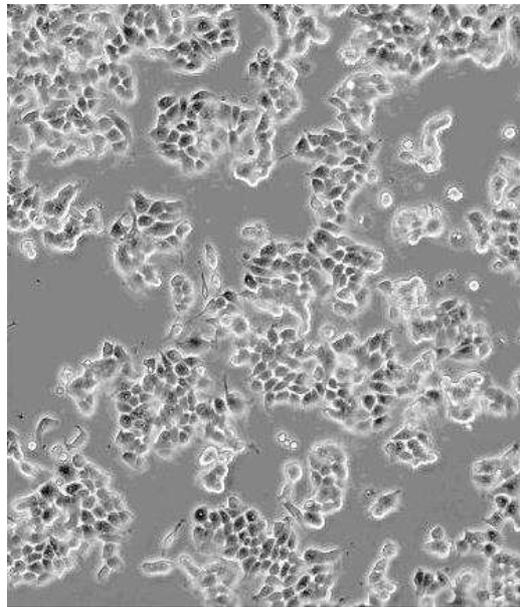


Figura 14.- Línea celular T47-D. Imagen tomada, con modificaciones, de <http://www.atcc.org>.

BT-474:

Línea celular epitelial representativa de tumores luminales con expresión del receptor HER2 (RE/RP/HER2-positivos). Se caracteriza por crecer en grupos aislados. Las colonias son compactas y están formadas por varias capas de células, por lo que en cultivo no suelen confluir totalmente (Figura 15) [97].

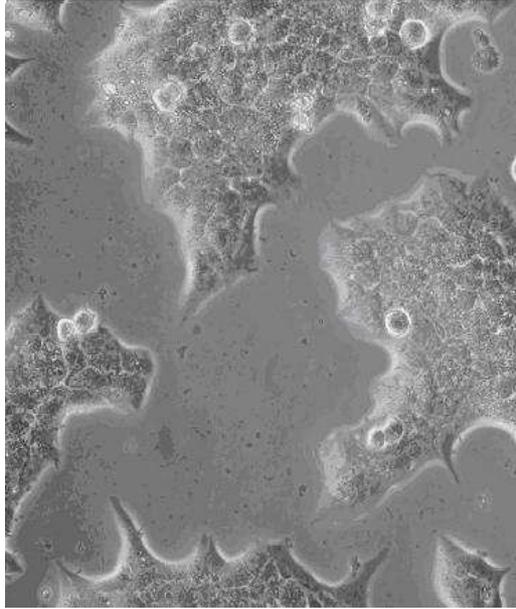


Figura 15.- Línea celular BT-474. Imagen tomada, con modificaciones, de http://icbp.lbl.gov/breastcancer/images/cell_images/.

SK-BR-3:

Esta línea celular epitelial es representativa de tumores HER2-positivo, con expresión de HER2 y ausencia de RE y de RP (RE/RP-negativos y HER2-positivo). Se caracteriza además por poseer microvellosidades y desmosomas en la superficie celular y por la presencia citoplasmática de gránulos de glucógeno y grandes lisosomas (Figura 16) [98].

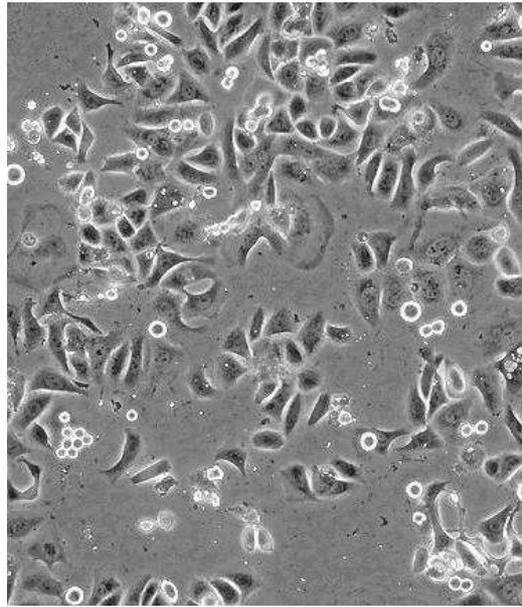


Figura 16.- Línea celular SK-BR-3. Imagen tomada, con modificaciones, de <http://www.atcc.org>.

MDA-MB-468:

Línea celular representativa de tumores TN/Basal, ya que no expresa receptores de estrógenos, progesterona y HER2 (RE/RP/HER2-negativos). Se considera una línea celular neoplásica que presenta además EGFR y el factor de crecimiento transformante alfa (*transforming growth factor alpha*, TGF- α) (Figura 17) [99].

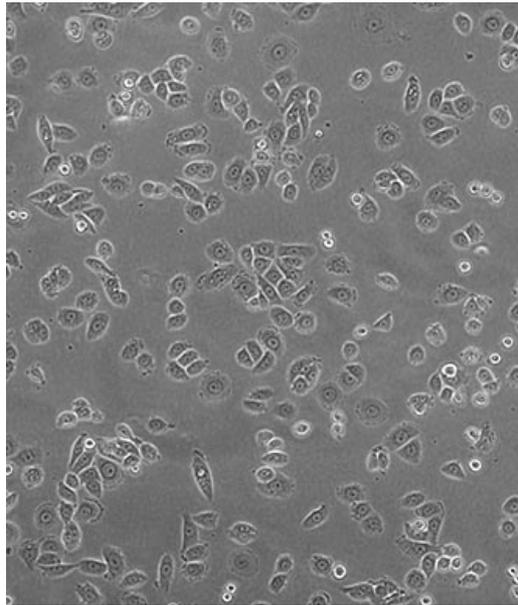


Figura 17.- Línea celular MDA-MB-468. Imagen tomada, con modificaciones, de <http://www.atcc.org>.

MDA-MB-231:

Línea celular representativa de tumores TN/Basal y *Claudin-low*, ya que no expresa receptores de estrógenos, progesterona ni HER2 (RE/RP/HER2-negativos). Esta línea es altamente metastática y oncogénica, y presenta características de “células madre”. Al igual que MDA-MB-468, también expresa EGFR y TGF- α . Además, expresa el oncogén *WNT7B* y tiene baja expresión de genes implicados en las uniones célula-célula de células epiteliales (Figura 18) [13, 100].

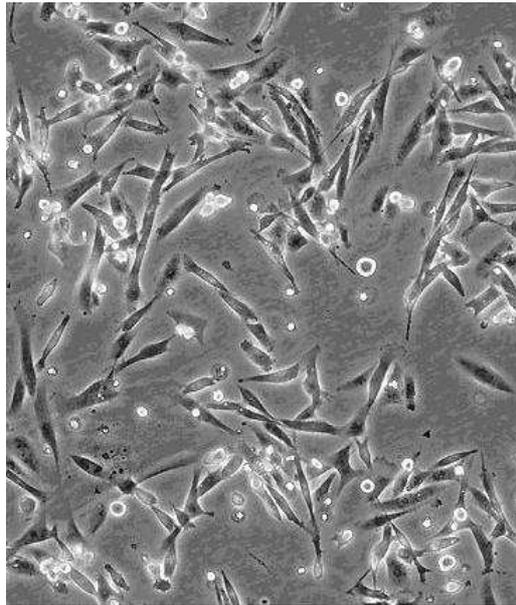


Figura 18.- Línea celular MDA-MB-231. Imagen tomada, con modificaciones, de <http://www.atcc.org>.

184A1:

Es una línea celular representativa de células epiteliales de la glándula mamaria normal, que fue establecida a partir del tratamiento con benzopireno de cultivos primarios de células humanas. Tras la transformación de las células, se obtuvo una línea que a pesar de ser inmortal no es maligna (Figura 19) [101].

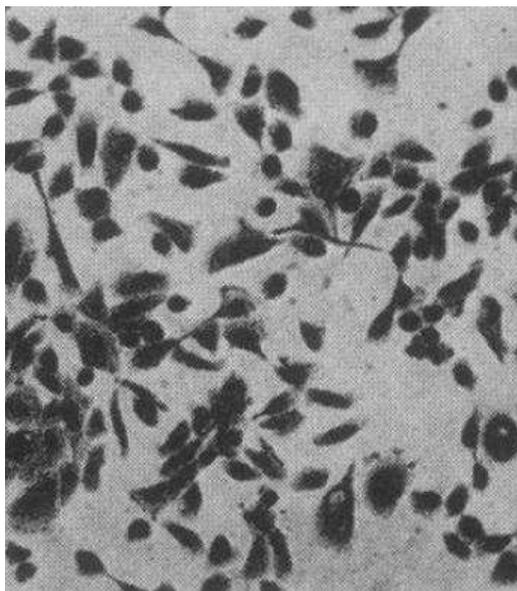


Figura 19.- Línea celular 184A1. Imagen tomada, con modificaciones, de Stampfer *et al.* (1985) [101].

2.- Metodología

2.1.- Condiciones de los cultivos celulares

Las líneas celulares se sembraron en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² (Easy Flask 25, Easy Flask 75, Nunc) en un incubador de CO₂ (C150 CO₂, BINDER WTB) a una temperatura de 37°C y una atmósfera humidificada a una concentración de CO₂ del 5%. La manipulación de las mismas se realizó en una cabina de seguridad biológica de tipo II (BIO-II-A, Telstar).

Las células tumorales MCF-7, T-47D, BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM/Ham's F-12 (DMEM/Ham's F-12 con HEPES y L-Glutamina, PAA) suplementado con suero bovino fetal (FBS Gold Category EU, PAA) al 10% (v/v), penicilina y estreptomycin al 1% (v/v) (Penicillin/Streptomycin 100x, PAA). La línea epitelial no tumoral 184A1 fue

cultivada en medio de células epiteliales de mama no tumoral suplementado con factores de crecimiento y antibióticos (MEGM BulletKit, Lonza).

Cuando las células llegaron a un límite de confluencia del 70-80% se procedió al pase de las mismas a un nuevo frasco. En primer lugar se realizó un lavado con PBS (Dulbecco's PBS sin Ca y Mg, PAA) para eliminar el medio de cultivo. A continuación, se añadió 1 ml de tripsina (Trypsina-EDTA (1x) 0,05% / 0,02% en DPBS, PAA) en frascos de 25 cm² ó 2 ml de tripsina en frascos de 75 cm² y se mantuvieron en el incubador durante 5-10 minutos hasta la pérdida total de adherencia al frasco. Por último, se realizó una dilución 1:5 en un nuevo frasco con medio fresco.

2.2.- Extracción de ARN

2.2.1.- Extracción de ARN de tejido parafinado

Para el estudio de expresión génica se extrajo ARN de tejido tumoral fijado en formalina al 10% e incluido en parafina. A partir de bloques representativos de tumor que contuvieran al menos 30% de células neoplásicas, se obtuvieron 3 cilindros de 1 mm.

En primer lugar, los cilindros de tejido se disgregaron manualmente con una hoja de bisturí sobre una placa Petri estéril. Seguidamente se introdujo el material en un tubo eppendorf, se añadió 1 ml de xilol, se mantuvo durante 5 minutos y se centrifugó 2 minutos en una microfuga a máxima velocidad para precipitar el tejido y eliminar el sobrenadante. Para finalizar la desparafinación del tejido, se añadió 1 ml de etanol absoluto, se mantuvo durante 5 minutos y centrifugó en las mismas condiciones realizadas con xilol. Por último, se retiró

Materiales y métodos

el etanol y se dejó el tejido en la campana de extracción de gases hasta la completa evaporación del etanol.

Para la disgregación total del tejido se introdujo en los tubos una esfera de acero y se añadió 130 µl de tampón PKD (RNeasy FFPE Kit, Qiagen). Posteriormente, los tubos se colocaron en un disruptor celular (TissueLyser LT, Qiagen) durante 2 minutos a 50 Hz. Seguidamente se centrifugaron los tubos 5 minutos a máxima velocidad y se añadió 30 µl de proteinasa K (RNeasy FFPE Kit, Qiagen). El tejido se incubó posteriormente con la proteinasa K en un termobloque (Thermomixer compact, Eppendorf) a 700 rpm a una temperatura de 55 °C. Tras la incubación de 2 horas, se procedió a la incubación durante toda la noche en un termobloque a la misma temperatura sin movimiento.

Al día siguiente, se incubaron las muestras a 80° C durante 15 minutos con el objetivo de inactivar la proteinasa K. Seguidamente, se retiró la esfera de acero, se centrifugaron los tubos y se procedió a la extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó empleando el kit comercial RNeasy FFPE Kit (Qiagen) de manera automatizada mediante el robot Qiacube (Qiagen). Por último, se añadieron 3 µl de inhibidor de RNasas (RNase inhibitor, Applied Biosystems) para evitar la degradación del ARN y se guardó el material obtenido a -80 °C.

2.2.2.- Extracción de ARN de células en cultivo

Las células se cultivaron en placas petri de 10 cm de diámetro (Sarstedt) hasta una confluencia del 70%, obteniéndose alrededor de 10 millones de células por placa. La extracción se llevó a cabo empleando el kit comercial de extracción de ARN RNeasy Mini Kit (Qiagen).

En primer lugar, se aspiró el medio de cultivo de las placas. Rápidamente, se añadieron 600 µl de tampón RLT sobre la capa de células. Las células se rasparon con una espátula de goma (Sarstedt) y el lisado celular se recogió por pipeteo en un tubo eppendorf. Posteriormente, el lisado celular se pasó 10 veces por una jeringuilla de insulina (Micro-Fine, Becton Dickinson) para asegurar la lisis total de las células.

La extracción de ARN se realizó de manera automatizada mediante el robot Qiacube (Qiagen), a partir del lisado celular. Por último, tras la extracción de ARN se añadieron 3 µl de inhibidor de RNasas (RNase inhibitor, Applied Biosystems) para evitar la degradación del ARN y se guardó a -80 °C.

2.2.3.- Medida de la concentración de ARN

La medida de la concentración de ARN se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). La concentración se obtuvo a partir de la absorbancia a 260 nm, longitud de onda de mayor absorbancia para los ácidos nucleicos. Además, se evaluó la pureza del ARN respecto a la cantidad de proteínas en la muestra, en base al ratio de las absorbancias 260 nm/280 nm, y respecto a la cantidad de solventes orgánicos en la muestra a partir del ratio 260 nm/230 nm. Se consideró una pureza elevada cuando los ratios estaban comprendidos entre 1,8-2 para 260 nm/280 nm, y 2-2,2 para el ratio 260 nm /230 nm.

2.3.- Reacción de retrotranscripción a ADN complementario

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo según el protocolo del kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). En este tipo de reacción se pretende transcribir toda la información contenida en el ARNm (transcriptoma) a ADN complementario (ADNc), de manera que a partir de cada molécula de ARNm se sintetiza una cadena de ADN complementaria. Este paso es imprescindible porque la molécula de ARN es muy inestable y por otro lado, no es molde de las polimerasas de ADN empleadas en la técnica de la qRT-PCR.

Para la síntesis de ADNc se tomaron 2 µg de ARN de cada una de las muestras. En cada tubo de reacción se añadieron 10 µl de ARN y 2 µl de “cebadores” de secuencia aleatoria (*random primers*) y se procedió a la incubación a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron el resto de reactivos (tampón, hexanucleótidos y enzima) según las indicaciones del protocolo del kit y se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción en un termociclador (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems) en las siguientes condiciones:

- 25°C, 10 minutos
- 37°C, 120 minutos
- 85°C, 5 segundos

Como producto final se obtuvieron 2 µg de ADNc de cada muestra en un volumen de total de 20 µl a una concentración de 100 ng/µl.

En conjunto, el ADNc sintetizado representa el contenido de ARNm en la célula en el momento de la exéresis del tumor, en el caso de muestras tumorales; y el ARNm en las condiciones de cultivo establecidas, en el caso de

líneas celulares. De este modo, se obtiene la información sobre todos los genes que se están expresando en un tejido o línea celular en unas determinadas condiciones, incluyendo los transcritos alternativos de los genes.

2.4.- PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Los productos de amplificación de PCR convencionales se analizan, por lo general, una vez finalizada la reacción. Sin embargo, con esta técnica, los productos de amplificación se analizan en el momento de fase exponencial de la PCR. Esto permite al investigador estimar la concentración relativa o absoluta del gen en estudio (Figura 20).

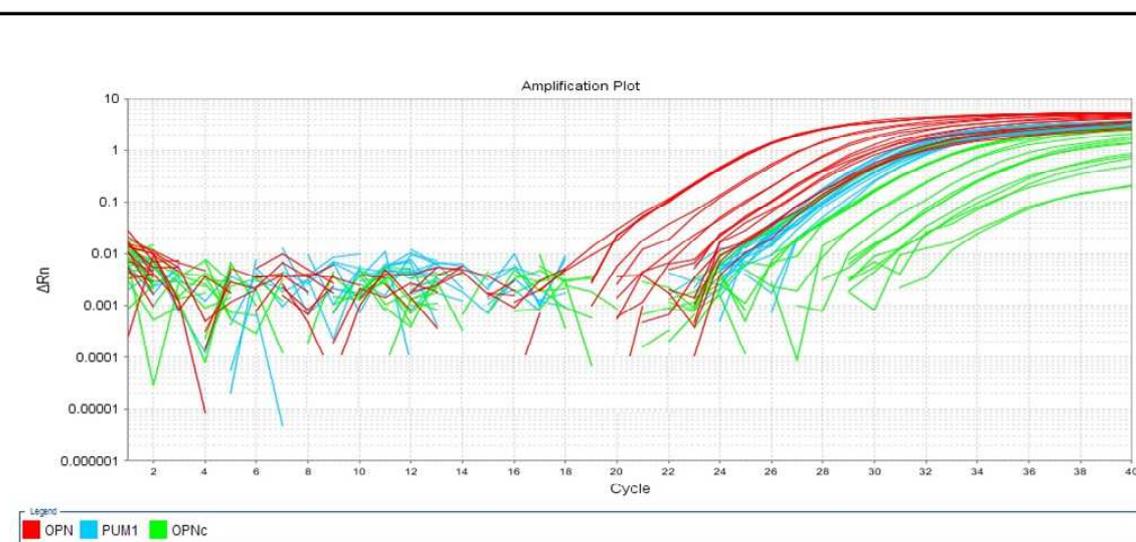


Figura 20.- Amplificación génica del ARNm de OPN-t, OPN-c y *PUM1* por qRT-PCR. En le eje vertical se indica en escala logarítmica la fluorescencia relativa emitida por los ensayos TaqMan® a medida que aumenta el número de copias. En le eje horizontal se indica el número de ciclo de PCR. Imagen tomada del programa 7500 Software V2.0.6 (Applied Biosystems).

En este estudio se emplearon ensayos TaqMan® (Applied Biosystems).

Este tipo de ensayos están compuestos por “cebadores”, acompañados de una

Materiales y métodos

sonda que contiene una molécula fluorescente (*reporter*) en su extremo 5' y una molécula atenuadora de la fluorescencia (*quencher*) en su extremo 3', de manera que la proximidad entre la molécula fluorescente y su atenuador impide la emisión de fluorescencia.

Al comienzo de la PCR, los “cebadores” y las sondas TaqMan® se unen al ADNc y la polimerasa inicia la síntesis, utilizando los “cebadores” como molde. Cuando la polimerasa alcanza la secuencia donde ha hibridado la sonda, mediante su actividad exonucleasa, hidroliza la sonda y se libera la molécula fluorescente. A lo largo de la reacción de PCR, la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de sonda hidrolizada y, por tanto, al número de moléculas sintetizadas en cada ciclo.

A medida que aumentan los ciclos, aumenta la intensidad de fluorescencia emitida, hasta superar un umbral de intensidad en un determinado ciclo de la reacción. Este ciclo se denomina “ciclo Ct” y representa el ciclo en el que la intensidad de fluorescencia emitida es notablemente superior a la fluorescencia basal del conjunto de moléculas presentes en la reacción (Figura 21).

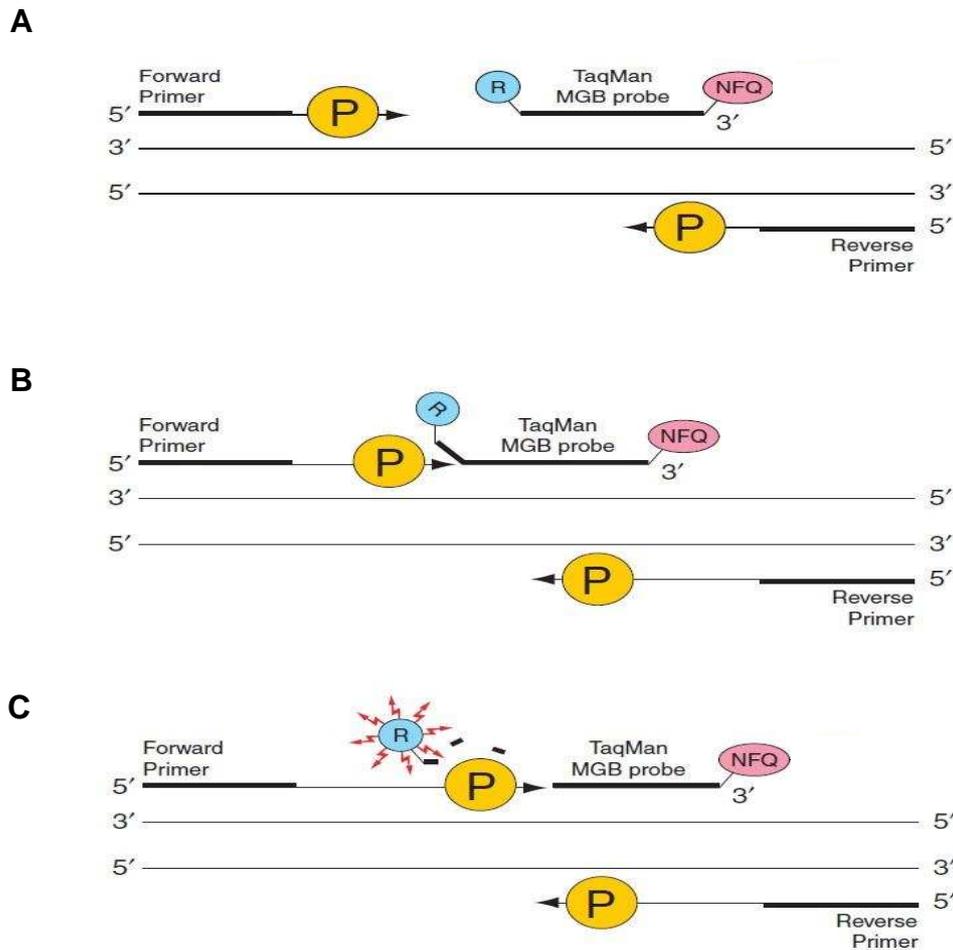


Figura 21.- Fases de la qRT-PCR empleando sondas TaqMan®. (A) Durante la PCR, la sonda TaqMan® se alinea específicamente con la secuencia complementaria comprendida entre los primers *forward* y *reverse*. (B) Comienzo de la polimerización. La fluorescencia se ve inhibida por la cercanía entre el *reporter* (R) y el *quencher* (NFQ). (C) Cuando la polimerasa de ADN (P) alcanza la sonda, ésta es hidrolizada y se libera la molécula fluorescente (R), incrementándose así la señal de fluorescencia. Figura tomada de *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) Protocol*.

Los ensayos escogidos en este estudio no amplifican ADN genómico. Estos cebadores están diseñados de tal modo que hibridan en secuencias correspondientes al empalme entre dos exones contiguos. Por lo tanto, únicamente hibridan en ADNc, ya que proviene de la secuencia del ARNm sin

intrones (Tabla 1). Así pues, la señal fluorescente procedente de la amplificación se dará únicamente a partir de ADNc y en ningún caso a partir de ADN genómico contaminante.

Tabla 1.- Ensayos TaqMan® empleados (TaqMan® Gene Expression Assay):

Nombre del gen	Símbolo del gen	ID Entrez del gen	Código de identificación del ensayo
secreted phosphoprotein 1 (OPN)	<i>SPP1</i>	6696	Hs00959010_m1
secreted phosphoprotein 1 (OPN-c)	<i>SPP1</i>	6696	Hs00960641_m1
pumilio homolog 1	<i>PUM1</i>	9698	Hs00472881_m1

La reacción de qRT-PCR se desarrolló según las instrucciones del protocolo indicado en la guía TaqMan® Array Plates (Applied Biosystems) y se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems), en un volumen total de 10 µl para cada reacción. El volumen total contenía 7,5 µl de tampón de reacción y 2,5 µl de ADNc. En el tampón de reacción se incluyeron los diferentes ensayos TaqMan para el estudio de cada uno de los genes.

En concreto, cada uno de los 7,5 µl de tampón de reacción, estaba compuesto por 5 µl de tampón (TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix-No AmpErase® UNG, Applied Biosystems), 2 µl de agua y 0,5 µl de ensayo TaqMan® de secuencia específica. Por otro lado, el ADNc se diluyó a una concentración de 20 ng/µl, de los cuales se tomaron 2,5 µl (50 ng de ADNc) para la reacción de qRT-PCR.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Real Time PCR System 7500-FAST (Applied Biosystems). Las condiciones del termociclado fueron las siguientes:

- 50°C, 2 minutos
- 95°C, 20 segundos
- 95°C, 3 segundos (40 ciclos)
- 60°C, 30 segundos (40 ciclos)

2.5.- Cálculo de la expresión génica por el método de $\Delta\Delta Ct$

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante el método de cuantificación relativa denominado “Método comparativo $\Delta\Delta Ct$ ”, publicado por Winer *et al.* en el año 1999 [102]. En este tipo de análisis es preciso el estudio de un gen control o “endógeno”, a parte del gen diana. Como genes de control endógeno deben escogerse aquellos genes cuya expresión no varíe en las diferentes condiciones experimentales, como pueden ser los genes que codifican la enzima glucolítica GAPDH, la proteína estructural β -actina o ARN ribosómico. Estos genes sirven para relativizar la expresión del gen diana respecto al gen control endógeno.

Además del control del gen endógeno, es necesaria una muestra control o calibrador. El calibrador es una muestra o conjunto de muestras unificadas, que representa el estado normal de expresión del gen diana y que por tanto, permite comparar la expresión del gen diana de una muestra experimental (tumoral) de una muestra normal (no tumoral). A partir del control del gen endógeno y la muestra calibrador se ha desarrollado la fórmula $\Delta\Delta Ct$ [103]:

Materiales y métodos

$$\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ Gen Diana (muestra experimental)} - Ct \text{ Gen Endógeno (muestra experimental)}] - [Ct \text{ Gen Diana (calibrador)} - Ct \text{ Gen Endógeno (calibrador)}]$$

A partir del $\Delta\Delta Ct$ es posible calcular cuántas veces se expresa de más o de menos un determinado gen, lo que se denomina comúnmente *fold change* (*FC*). El *FC* se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

El valor *FC* representa una sobreexpresión del gen cuando el valor es mayor a 1 y una inhibición del gen cuando el valor es menor de 1.

En el presente estudio se escogió el gen *PUM1* como gen de control endógeno. La muestra calibrador la obtuvimos a partir del ADNc de 10 muestras de mama normal de cirugías de reducciones mamarias en pacientes sin ninguna patología previa. La muestra calibrador para el análisis de expresión en líneas celulares fue la línea 184A1, de origen no tumoral.

En las reacciones de qRT-PCR se incluyeron varios controles para comprobar el buen desarrollo experimental. Para ello se incluyó como control positivo ADNc de mama normal, retrotranscrito a partir de ARN de mama normal comercial (Total Breast Female Human RNA, Agilent Technologies) en las mismas condiciones que el ARN extraído de muestras. Como control negativo se empleó agua en lugar de muestra, incluyendo el tampón de reacción y los ensayos TaqMan correspondientes. Además, se comprobó que los ensayos empleados no eran capaces de amplificar ADN genómico o ARN.

Para tal fin, se añadieron 50 ng de ARN extraído (con ADN contaminante del proceso de extracción), como muestra, donde no se observó amplificación alguna.

2.6.- Análisis estadístico

Los datos clínico-patológicos y los datos de expresión génica obtenidos por la técnica de qRT-PCR se recogieron en una base de datos anonimizada para posteriormente analizarlos con el programa SPSS (SPSS Inc V.19, Chicago, IL) para Windows.

A partir de los datos de expresión génica obtenidos de las líneas celulares se calculó la media y la desviación típica. Se realizaron al menos tres réplicas biológicas de cada línea celular. Las diferencias entre las medias de los valores de expresión génica se compararon por el test estadístico t de Student.

En cuanto a las muestras tumorales, se realizó un análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas mostrando la media (\pm desviación típica) o mediana (rango, percentil 25 y percentil 75), según eran o no paramétricas, en el caso de las variables cuantitativas. En cuanto a las variables cualitativas, se mostraron los porcentajes de cada subgrupo o categoría.

Las variables cuantitativas obtenidas de la expresión de OPN se categorizaron en dos grupos, como variables cualitativas, a partir del valor de expresión determinado por el percentil 75 (P_{75}) del total de casos analizados (*fold change* \leq / $>$ 32 para OPN-t, y *fold change* \leq / $>$ 4 para OPN-c). Con el fin de explorar la correlación entre las variables cualitativas se construyeron tablas de

Materiales y métodos

contingencia y se aplicaron los test de Chi-cuadrado o de Fisher, dependiendo de los resultados.

Para estudiar las posibles diferencias entre las variables de la SLE y SG según los subtipos moleculares y según la expresión de OPN se empleó la prueba de las medianas y el test U-Mann Whitney.

Para determinar el valor pronóstico de cada una de las variables con respecto a la SLE y la SG se realizó un estudio univariado aplicándose el método de Kaplan-Meier y las curvas de supervivencia se compararon mediante el test log-rank.

Por último, se realizó un análisis multivariado de Cox para determinar cómo influyen de manera independiente las diferentes variables sobre la SLE y la SG.

V.- RESULTADOS

RESULTADOS

La serie estudiada incluye 309 cánceres de mama no consecutivos, cuyas pacientes fueron diagnosticadas y tratadas en el HGUA durante el período 1988-2008. Se incluyeron aquellas con las que contamos con un seguimiento mínimo de 1 año tras el diagnóstico. Los datos del seguimiento clínico se recogieron hasta diciembre de 2011.

1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

La mediana de la edad de las pacientes en el momento del diagnóstico fue de 57 años (rango 23-89 años), predominando las de ≥ 50 años (66,3%; 205/309).

El tamaño tumoral se determinó en la pieza quirúrgica, siendo un 50,5% ≤ 20 mm. Los tumores fueron más frecuentemente de grado histológico 3 (62,7%); en el 48,1% se observó invasión vascular y el 47,3% tenían focos de necrosis. Los ganglios linfáticos fueron positivos en el 36,6% de los casos, predominando el grupo con afectación de 1 a 3 (N1) (23,1%).

Tras el estudio inmunohistoquímico con RE, RP, HER2, Ki67 y p53, los tumores seleccionados fueron clasificados en 4 inmunofenotipos, siendo el grupo HER2-positivo el más frecuente (39,5%) analizado, seguido del TN/Basal (31,7%) (Tabla 2). La proporción de tumores clasificados como HER2-positivo y TN/Basal es superior a la esperable debido a que la línea de investigación de nuestro grupo se centra principalmente en el estudio de estos dos subtipos.

Tabla 2.- Características clínico-patológicas de los tumores analizados

	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
Edad		
<50 años	104	33,7
≥50 años	205	66,3
Tamaño		
≤20 mm	156	50,5
>20 mm	153	49,5
Grado histológico		
1	23	9,4
2	86	27,9
3	193	62,7
Invasión vascular		
ausente	135	51,9
presente	125	48,1
Necrosis		
ausente	137	52,7
presente	123	47,3
Fenotipo		
Luminal A	61	19,7
Luminal B	28	9,1
HER2	122	39,5
TN/Basal	98	31,7
Status ganglionar		
Negativo	187	63,4
Positivo	108	36,6
Status ganglionar (N)		
N0	187	63,4
N1 (1-3)	68	23,1
N2 (3-10)	30	10,2
N3 (>10)	10	3,4

2.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES MOLECULARES

2.1.- Expresión de ARNm de OPN-t

En términos de expresión génica, un valor FC $<0,5$ suele considerarse inhibición del gen, ya que la expresión de éste sería la mitad del valor que en condiciones normales, mientras que un valor FC >2 puede considerarse sobreexpresión, ya que sería un incremento de más de dos veces en comparación con el tejido mamario normal.

De acuerdo con este concepto, en nuestra serie predominaron los tumores con sobreexpresión (FC >2) de OPN-t (n=276; 89%) (Tabla 3).

Tabla 3.- Expresión de OPN-t en los CM

FC ARNm OPN-t	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
≤ 2	34	11
> 2	276	89
Total	309	100

El análisis estadístico de los niveles de expresión de OPN-t demostró que esta variable sigue una distribución no paramétrica (test de Kolmogorov-Smirnov -K-S-) (Tabla 4), por lo que se obtuvo el dato de la mediana de FC, el percentil 25-75 y el rango (Tablas 5 y 8).

Tabla 4.- Test de K-S para la variable OPN-t.

Prueba K-S para FC OPN-t	
Número de casos	309
Z de Kolmogorov-Smirnov	5,70
Sig. asintó. (bilateral)	$<0,01$

2.1.1.- Mediana de la expresión de ARNm de OPN-t en inmunofenotipos

Los tumores HER2-positivo y TN/Basal presentaron una mediana de expresión mayor a los subtipos luminales, siendo de 14,71 y de 14,70 respectivamente (Tabla 5) (Figura 22).

Tabla 5.- Mediana del FC de ARNm OPN-t en inmunofenotipos

FC de la expresión de ARNm de OPN-t					
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mínimo	Máximo
Pacientes (n=309)	12,45	4,43	31,70	0,02	925,44
Fenotipo:					
- Luminal A	9,63	3,55	29,42	0,18	384,36
- Luminal B	4,72	1,43	13,45	0,02	237,09
- HER2	14,71	6,52	44,35	0,21	925,44
- TN/ Basal	14,70	5,20	27,70	0,06	254,04

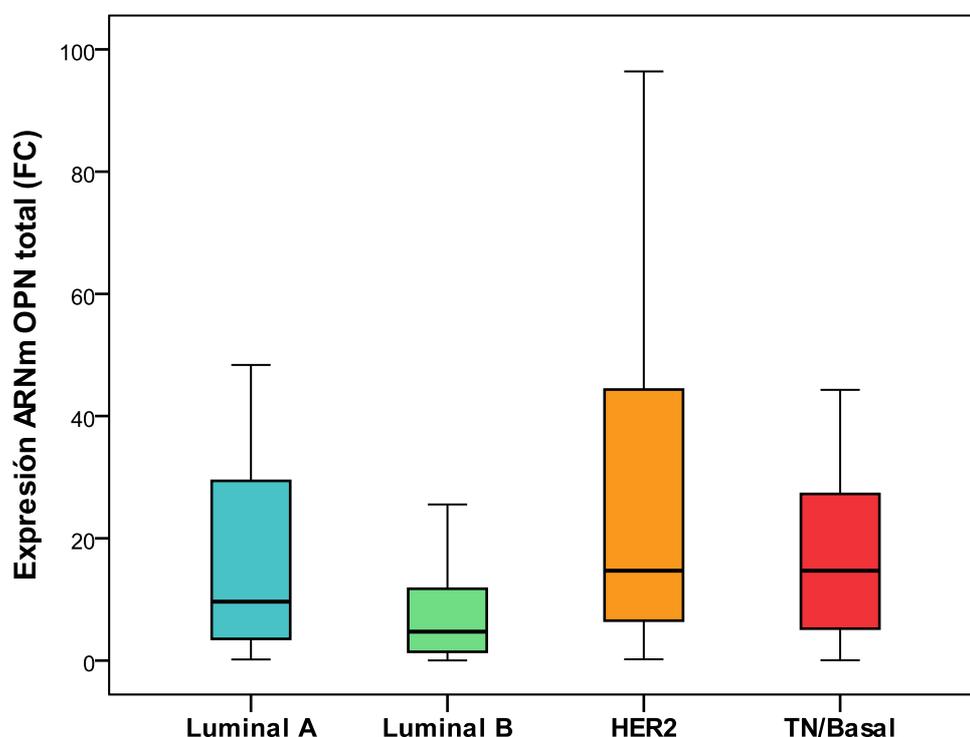


Figura 22.- Mediana del FC de ARNm de OPN-t en inmunofenotipos (p=0,007, test de las medianas).

La variable FC se categorizó en dos grupos, en función del nivel de expresión de ARNm de OPN-t, estableciendo el punto de corte $FC \leq / > 32$, valor aproximado al percentil 75 (P_{75}), que permitía definir mejor diferentes grupos de riesgo. De esta manera, consideramos que el 25% de los tumores presentaban una elevada expresión (Tabla 6).

Tabla 6.- Categorización de la expresión de OPN-t

FC ARNm OPN-t	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
≤ 32	232	75
> 32	77	25
Total	309	100

En nuestra serie, los tumores HER2-positivo presentaron más frecuentemente sobreexpresión de OPN-t (35%), comparados con los de tipo Luminal B (7%) ($p=0,004$; test Chi-cuadrado) (Figura 23).

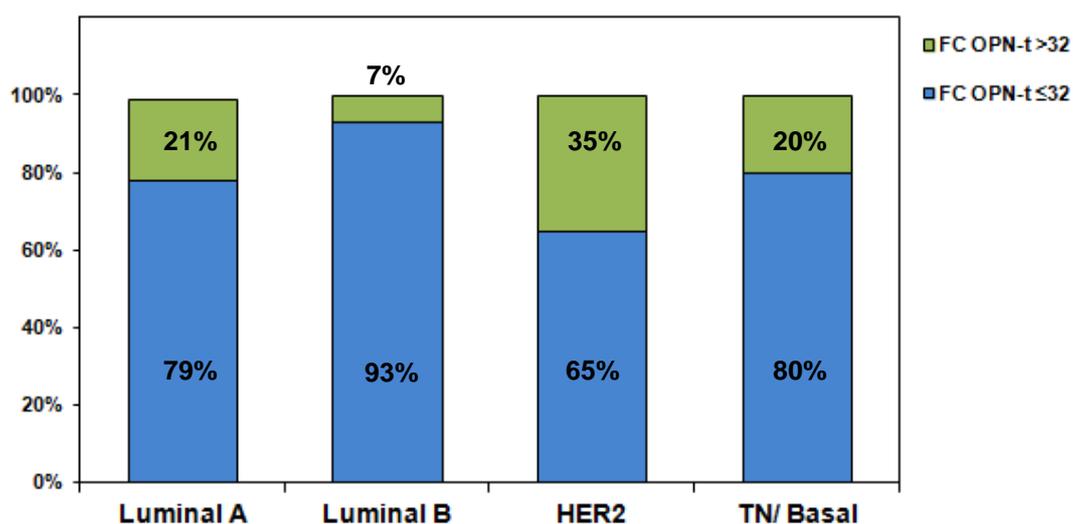


Figura 23.- Niveles de expresión de OPN-t en inmunofenotipos ($p=0,004$; test de Chi-cuadrado).

2.2.- Expresión de ARNm de OPN-c

Se analizó sólo en el grupo de tumores con demostrada sobreexpresión ($FC > 2$) de OPN-t ($n=276$), ya que la probabilidad de que OPN-c se sobreexpresara en ausencia de la de OPN-t es prácticamente nula. Para verificar la no expresión de OPN-c en ausencia de OPN-t analizamos OPN-c en 10 muestras de cánceres de mama con expresión normal ($FC \leq 2$) de OPN-t, comprobando que en ninguno de los casos OPN-c se sobreexpresaba ($FC > 2$). De este modo, detectamos sobreexpresión de OPN-c en el 38% de los tumores (Tabla 7).

Tabla 7.- Expresión de OPN-c

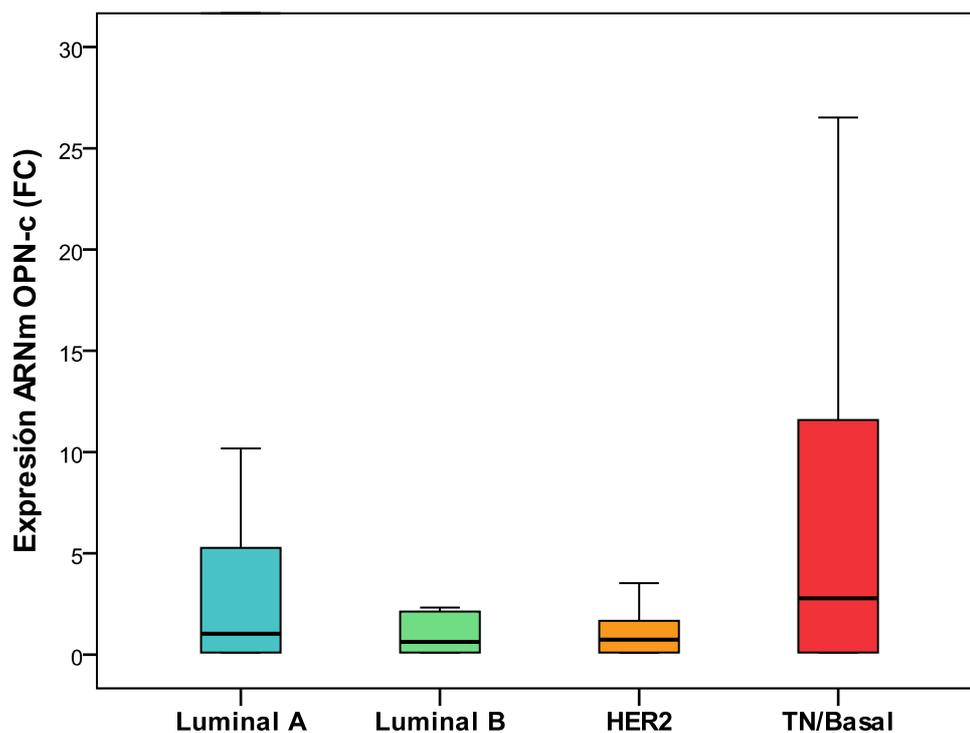
FC ARNm OPN-c	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
≤ 2	170	62
> 2	106	38
Total	276	100

2.2.1.- Mediana de la expresión de ARNm de OPN-c en inmunofenotipos

La mediana del FC del ARNm de OPN-c en todos los tumores fue de 0,95 (rango 0,09-109), siendo menor en los tumores Luminales B (0,62), y más elevada (2,78) en los TN/Basal ($p=0,001$; test de las medianas) (Tabla 8) (Figura 24).

Tabla 8.- Mediana del FC de la expresión de OPN-c en los diferentes subtipos

FC de la expresión de ARNm OPN-c					
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mínimo	Máximo
Pacientes (n=276)	0,95	0,10	4,06	0,09	109,28
Fenotipo:					
- Luminal A	1,32	0,11	6,50	0,10	109,28
- Luminal B	0,62	0,12	2,13	0,10	21,76
- HER2	0,73	0,11	1,71	0,09	69,37
- TN/ Basal	2,78	0,13	11,63	0,11	78,27

**Figura 24.-** Mediana del FC de ARNm de OPN-c según inmunofenotipos (p=0,001; test de las medianas).

Resultados

En el caso de la variante OPN-c se escogió el valor de FC del P₇₅, que fue FC \leq / $>$ 4, para distinguir grupos de pacientes con diferente riesgo. Considerando este valor, el 25% de los tumores mostraron una elevada expresión de OPN-c (Tabla 9).

Tabla 9.- Expresión de OPN-c en todos los tumores

FC ARNm OPN-c	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
\leq4	206	75
$>$4	70	25
TOTAL	276	100

El análisis de la expresión del ARNm de OPN-c según el inmunofenotipo demostró que los tumores HER2-positivo y los TN/Basal tenían unos niveles de expresión bastante distintos, a diferencia de los resultados de OPN-t. Observamos sobreexpresión de OPN-c en sólo el 13% de los HER2-positivo comparado con el 42% en los TN/Basal ($p < 0,001$; test Chi-cuadrado) (Figura 25).

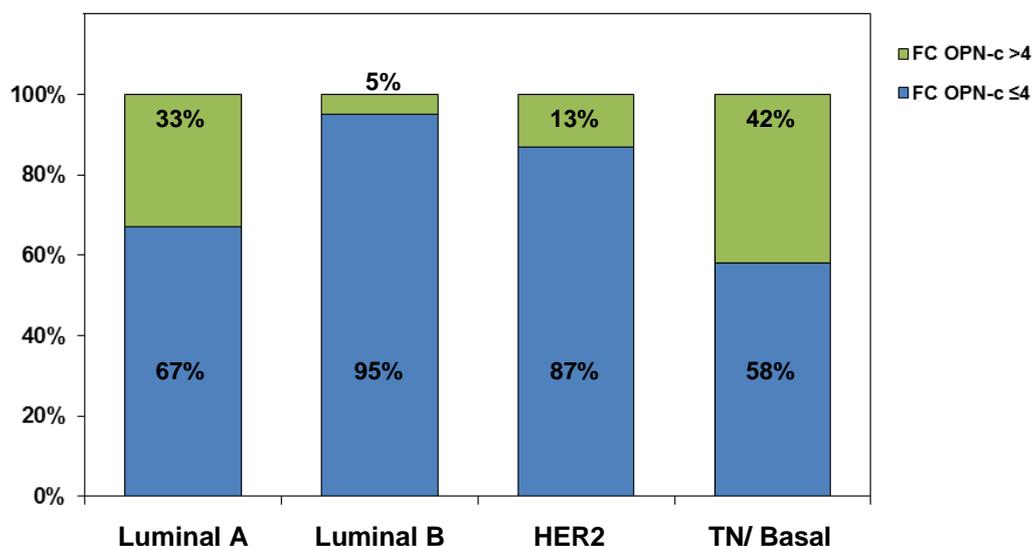


Figura 25.- Niveles de expresión de OPN-c en inmunofenotipos ($p < 0,001$; test de Chi-cuadrado).

3.- CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y MOLECULARES

3.1.- Asociación entre OPN-t y variables clínico-patológicas

Los tumores de las pacientes de mayor edad (≥ 50 años) presentaron altos niveles de expresión génica de OPN-t (27%) comparado con los de las pacientes más jóvenes (20%), pero sólo observamos una tendencia a la significación ($p = 0,170$).

Hubo asociación significativa entre la sobreexpresión de OPN-t y la presencia de metástasis ganglionares (32%; $p = 0,02$), pero no encontramos asociación con el resto de variables clínico-patológicas ($p = ns$) (test de Chi-cuadrado) (Tabla 10).

Tabla 10.- Correlación entre expresión de OPN-t y variables clínico-patológicas

	Pacientes (n=309)	FC ARNm OPN-t (% casos)		p*
		≤32	>32	
Edad				
<50 años	104	80	20	0,17
≥50 años	205	73	27	
Tamaño tumoral				
≤20 mm	156	76	24	ns
>20 mm	153	74	26	
Grado histológico				
1	29	76	24	ns
2+3	279	75	25	
Invasión vascular				
ausente	135	80	20	ns
presente	125	77	23	
Necrosis				
ausente	137	80	20	ns
presente	123	76	24	
Status ganglionar				
negativo	187	80	20	0,02
positivo	108	68	32	

*Test de Chi-cuadrado

3.2.- Asociación entre OPN-c y variables clínico-patológicas

Tampoco hubo asociación significativa entre los niveles de ARNm de OPN-c con ninguna de las variables clínico-patológicas analizadas. Sólo observamos una tendencia con los tumores de alto grado histológico (G2+G3; 27%; p=0,067; test Chi-cuadrado) (Tabla 11).

Tabla 11.- Correlación entre ARNm de OPN-c y variables clínico-patológicas

	Pacientes (n=276)	FC ARNm OPN-c (% casos)		p*
		≤4	>4	
Edad				
<50 años	89	76	24	
≥50 años	185	75	25	ns
Tamaño tumoral				
≤20 mm	137	77	23	
>20 mm	137	74	26	ns
Grado histológico				
1	28	89	11	
2+3	245	73	27	0,067
Invasión vascular				
ausente	119	84	16	
presente	111	83	17	ns
Necrosis				
ausente	117	85	15	
presente	113	80	20	ns
Status ganglionar				
negativo	160	75	25	
positivo	101	75	25	ns

*Test de Chi-cuadrado

4.- ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

4.1.- Análisis Univariado (Kaplan-Meier; test de log-rank)

4.1.1.- Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)

4.1.1.1.- Variables clínico-patológicas y SLE

Nuestros resultados mostraron que las pacientes más jóvenes (<50 años) (65%), con tumores de >20 mm (63%), de grado 3 (65%), con presencia de invasión vascular (61%), necrosis (63%), inmunofenotipo HER2-positivo (63%) (Figura 26) y con metástasis ganglionares (60%), presentaron más frecuentemente recidivas (local y/o a distancia) y por tanto la SLE era más corta (todas $p < 0,05$; método de Kaplan-Meier; test de log-rank) (Tabla 12).

Tabla 12.- Correlación de las variables clínico-patológicas con la SLE

	Pacientes (n)	% sin enfermedad	p*
Edad			
<50 años	104	65	
≥50 años	205	75	0,015
Tamaño			
≤20 mm	156	81	
>20 mm	153	63	<0,001
Grado de diferenciación			
1	23	90	
2	86	80	
3	193	65	<0,001
Invasión vascular			
ausente	135	77	
presente	125	61	<0,001
Necrosis			
ausente	137	75	
presente	123	63	0,019
Fenotipo			
Luminal A	60	78	
Luminal B	28	79	
HER2	122	63	
TN/Basal	90	75	0,032
Status ganglionar			
negativo	187	78	
positivo	108	60	<0,001

* Test de log-rank

Resultados

La mediana de meses de la SLE fue mayor en las pacientes con tumores de subtipos Luminal A y B, siendo de 107 y 128 meses, respectivamente. Sin embargo, en los HER2-positivo y TN/Basal, ésta fue prácticamente la mitad ($p=0,01$; prueba de las medianas) (Tabla 13).

Tabla 13.- Mediana de la SLE en los diferentes subtipos.

Fenotipo	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
Luminal A	60	107	10	259	
Luminal B	28	128	18	193	
HER2	122	65	0	302	
TN/Basal	90	54	1	297	0,01

*Prueba de las medianas

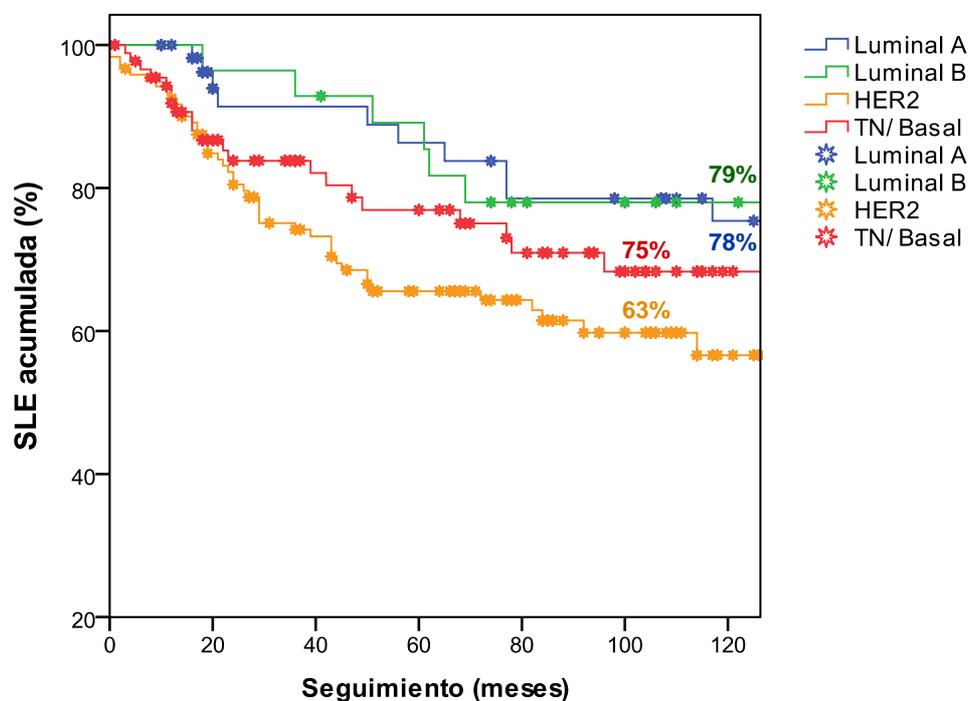


Figura 26.- Curvas de Kaplan-Meier para la SLE según inmunofenotipos ($p=0,032$; test de log-rank).

4.1.1.2.- Expresión de OPN y SLE

Nuestros resultados mostraron que las pacientes tenían medianas de SLE más largas cuando no había sobreexpresión tumoral tanto de OPN-t (84 meses) como de OPN-c (84 meses) (ambas, $p < 0,001$) (test de Mann-Whitney) (Tabla 14).

Tabla 14.- Mediana de la SLE según la expresión de OPN-t y OPN-c

FC ARNm	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
OPN-t					
≤32	230	84	1	302	
>32	77	39	0	297	<0,001
OPN-c					
≤4	204	84	0	302	
>4	69	21	4	297	<0,001

* Test de Mann-Whitney

Observamos que sólo el 67% de las pacientes con tumores con niveles elevados de ARNm de OPN-t estaban libres de enfermedad, comparado con el 73% en los casos sin sobreexpresión ($p=0,045$) (Figura 27). De modo similar, altos niveles de OPN-c se correlacionaron con un mayor riesgo de recidivas (71% vs 73%; $p=0,02$; Kaplan-Meier-test de log-rank) (Figura 28).

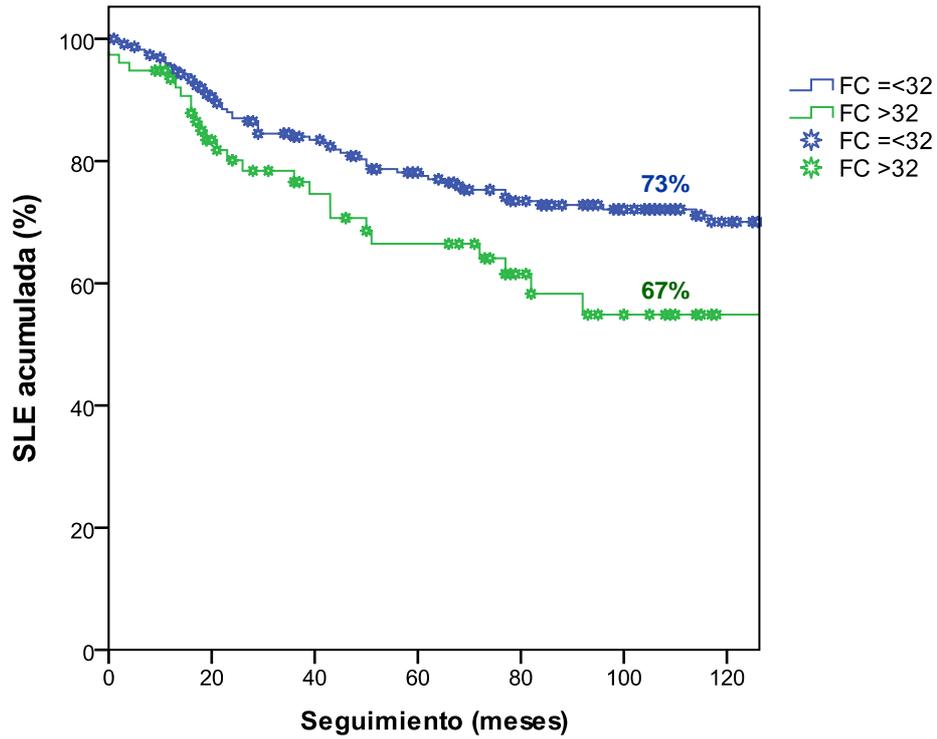


Figura 27.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t (p=0,045; test de log-rank).

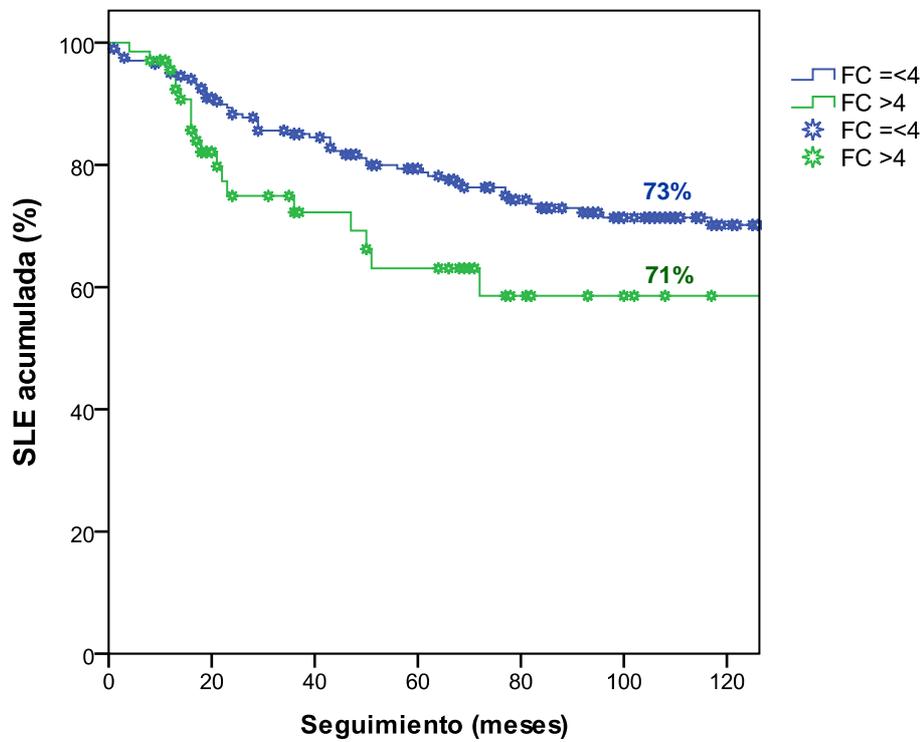


Figura 28.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c (p=0,02; test de log-rank).

4.1.1.3.- Inmunofenotipos estratificados por los niveles de expresión de ARNm de OPN

Las pacientes con tumores de subtipo Luminal A sin sobreexpresión de OPN-t tenían una mejor SLE (mediana de 135 meses), comparada con aquellas cuyos tumores sobreexpresaban OPN-t (mediana de 18 meses). Observamos una tendencia similar en el grupo de pacientes con tumores TN/Basal (68 meses vs 22 meses). Sin embargo no hubo diferencias significativas para aquellas con tumores de subtipos Luminal B y HER2 (Tabla 15).

Tabla 15.- Mediana de la SLE según la expresión de OPN-t en inmunofenotipos

Fenotipo / FC ARNm OPN-t	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
Luminal A					
≤32	47	135	10	259	
>32	13	18	10	115	<0,001
Luminal B					
≤32	26	136	18	193	
>32	2	94	78	110	ns
HER2					
≤32	79	67	2	302	
>32	43	50	0	174	ns
TN/Basal					
≤32	72	68	1	197	
>32	18	22	9	297	0,109

*Test U de Mann-Whitney

Con respecto a la OPN-c, la mediana en meses de la SLE fue mayor en pacientes con tumores de tipo Luminal A (138 meses; p<0,001) y TN/Basal (90

Resultados

meses; $p < 0,001$) sin sobreexpresión. Observamos una tendencia para el subgrupo de HER2-positivo (68 meses; $p = 0,154$) y no fue significativa la diferencia en el de Luminales B, probablemente debido a que sólo en un tumor pudimos demostrar sobreexpresión de OPN-c (test U de Mann-Whitney) (Tabla 16).

Tabla 16.- Mediana de la SLE según la expresión de OPN-c en inmunofenotipos

Fenotipo / FC ARNm OPN-c	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
Luminal A					
≤4	35	138	16	259	
>4	18	18	10	135	<0,001
Luminal B					
≤4	19	122	18	193	
>4	1	-	-	-	NV**
HER2					
≤4	99	68	0	302	
>4	15	50	13	117	0,154
TN/Basal					
≤4	46	90	1	197	
>4	33	22	4	297	<0,001

*Test U de Mann-Whitney; **NV= no valorable

La posterior subestratificación de los fenotipos tumorales dependiendo de los niveles de OPN permitió identificar grupos de pacientes con diferente riesgo dentro de cada subtipo, excepto en el grupo de pacientes con tumores de tipo Luminal B. Ello probablemente es atribuible al escaso número de pacientes con recidivas en este subgrupo. En el caso de la OPN-t observamos

sólo una tendencia a la significación ($p=0,195$) (Figura 29), mientras que para la OPN-c, las diferencias sí que fueron significativas ($p=0,029$; método de Kaplan-Meier, test de log-rank) (Figura 30).

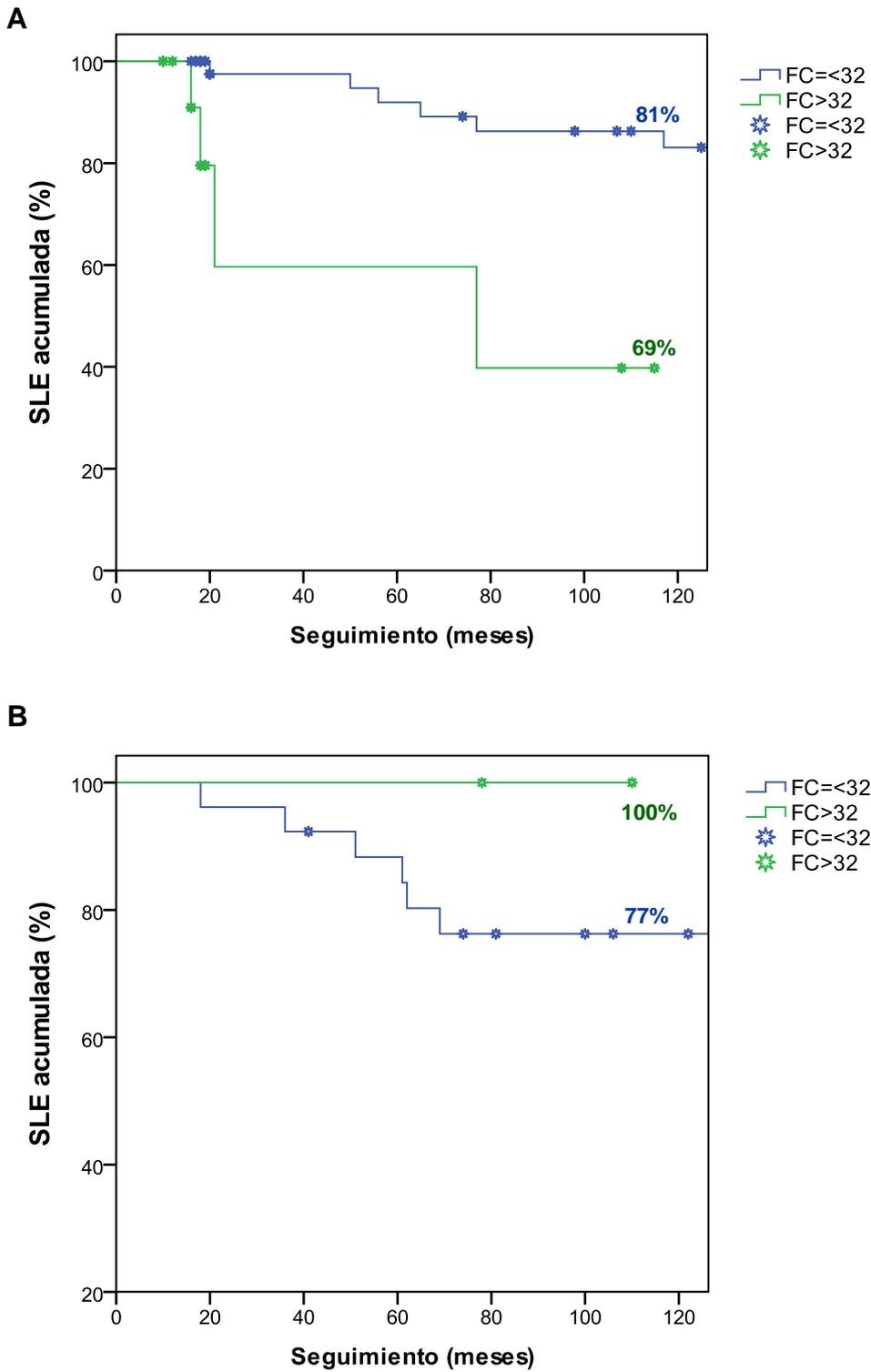


Figura 29.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t en los diferentes subtipos. (A) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t en fenotipo Luminal A. (B) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t en fenotipo Luminal B ($p=0,195$; test de log-rank conjunto para la subestratificación de los 4 inmunofenotipos).

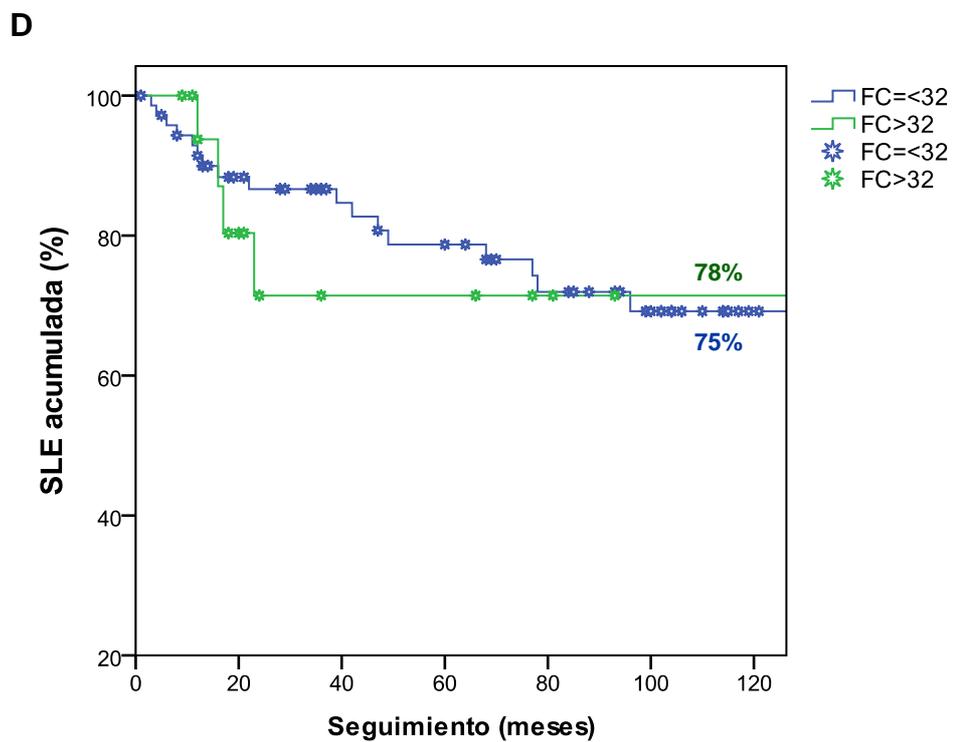
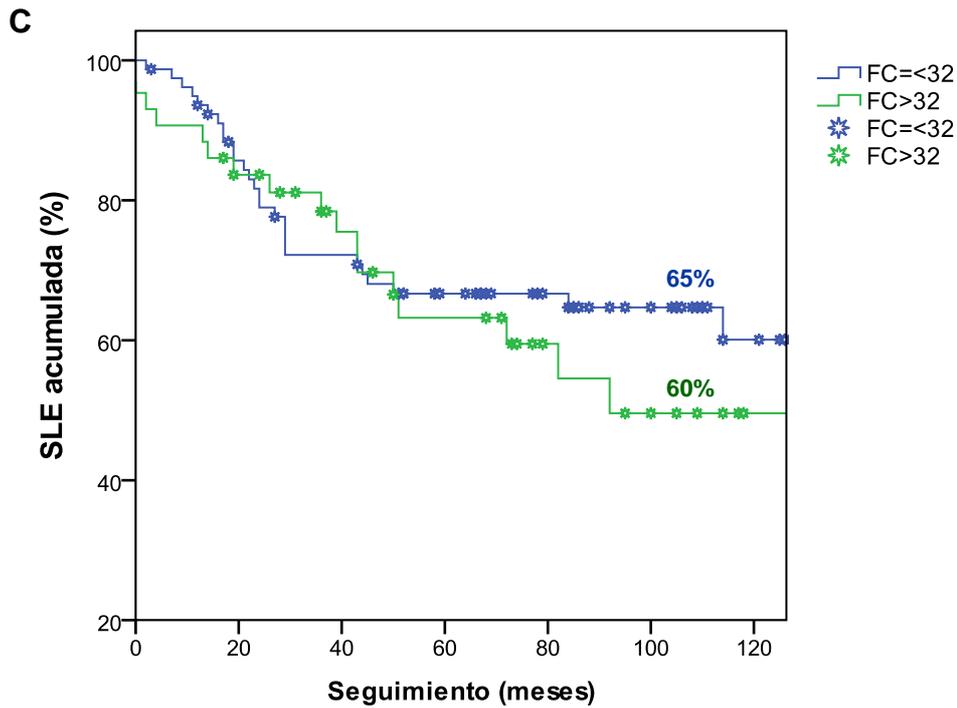


Figura 29 (continuación).- (C) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t en fenotipo HER2. (D) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-t en fenotipo TN/Basal ($p=0,195$; test de log-rank conjunto para la subestratificación de los 4 inmunofenotipos).

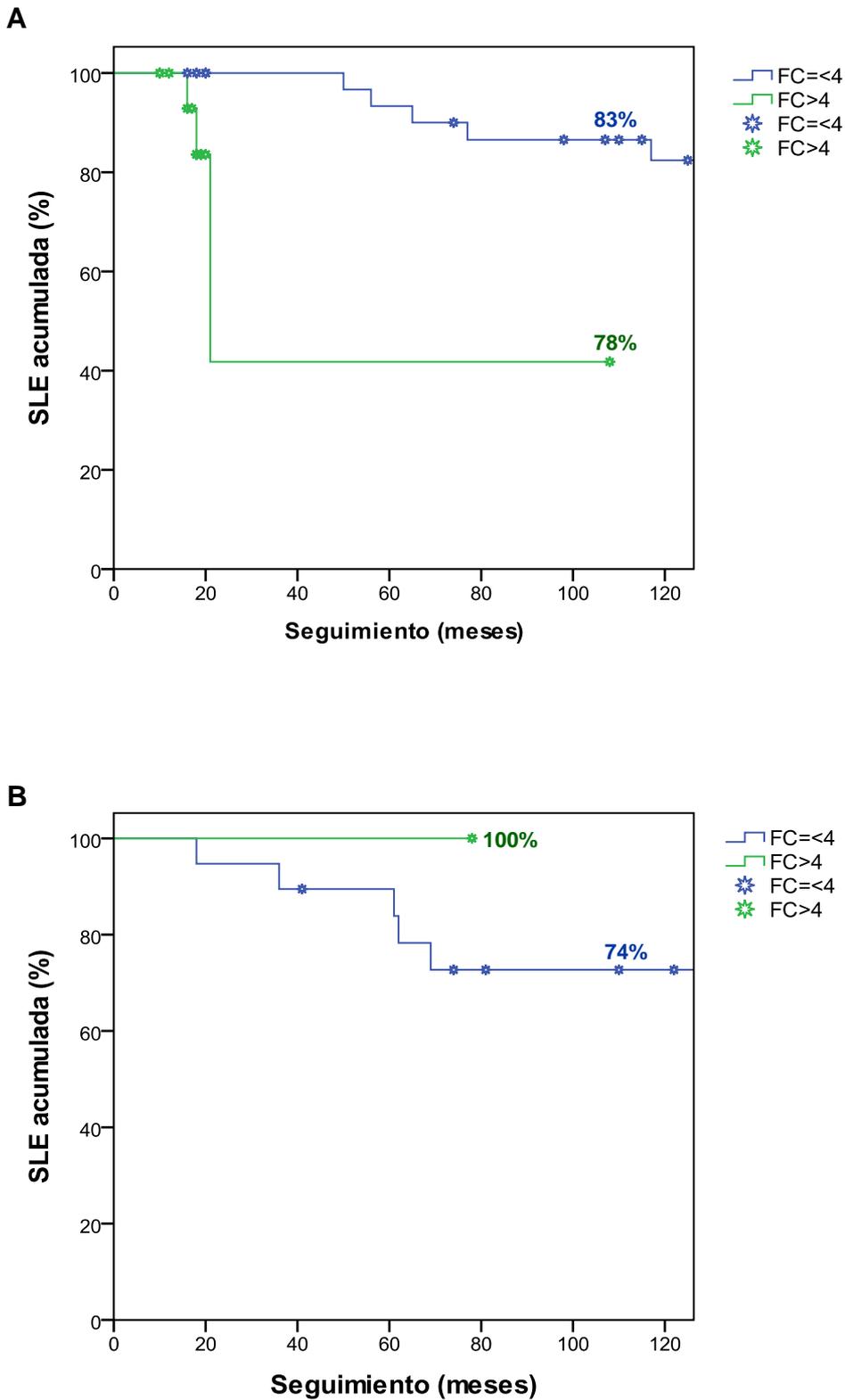


Figura 30.- Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c en los diferentes subtipos. (A) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c en fenotipo Luminal A. (B) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c en fenotipo Luminal B ($p=0,029$; test de log-rank conjunto para la subestratificación de los 4 inmunofenotipos).

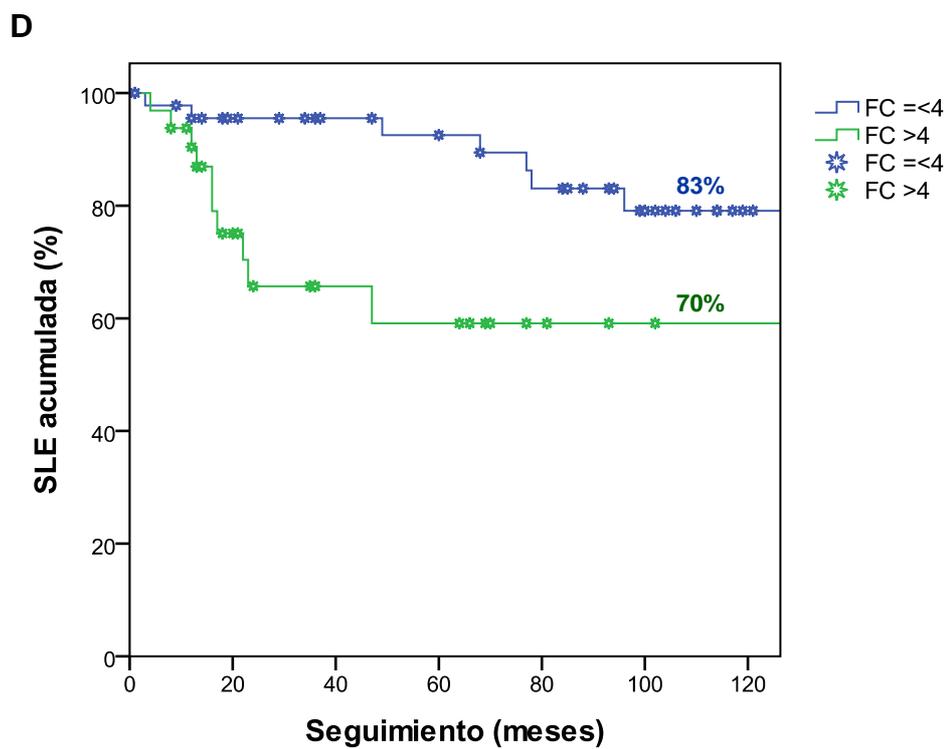
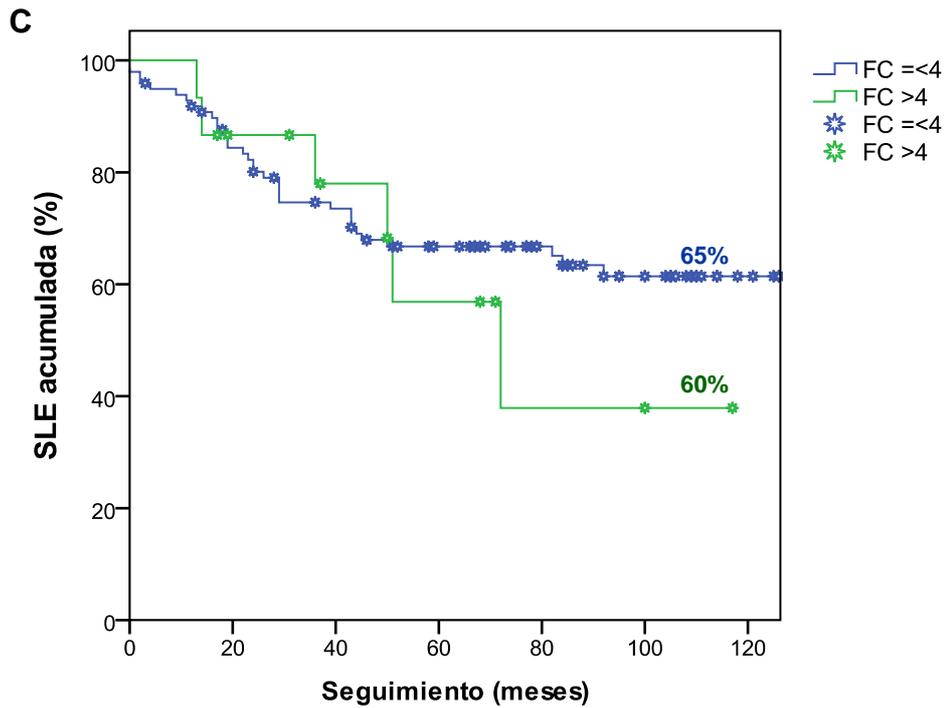


Figura 30 (continuación).- (C) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c en fenotipo HER2. (D) Curva de Kaplan-Meier para la SLE según la expresión de OPN-c en fenotipo TN/Basal ($p=0,029$; test de log-rank conjunto para la subestratificación de los 4 inmunofenotipos).

4.1.2.- Supervivencia Global (SG)

4.1.2.1.- Variables clínico-patológicas y SG

El análisis demostró que las pacientes con tumores de ≤ 2 cm (89%), bajo grado histológico (97%), sin invasión linfática (86%) ni necrosis (85%), ganglios linfáticos negativos (84%) y con fenotipo Luminal A (91%) (Figura 31) tenían SG estadísticamente significativas más largas (todas las $p < 0,05$). Sin embargo, no encontramos correlación con la edad de las pacientes al diagnóstico ($p = ns$; método de Kaplan-Meier; test de log-rank) (Tabla 17).

La mediana en meses de la SG fue superior en las pacientes con tumores de fenotipos Luminal A y B comparada con las de fenotipos HER2 y TN/Basal, siendo en este último grupo la más corta ($p = 0,020$, test de las medianas) (Tabla 18).

Tabla 17.- Correlación de las variables clínico-patológicas con la SG

	Pacientes (n)	Supervivencia (%)	p*
Edad			
<50 años	104	79	
≥50 años	205	79	ns
Tamaño			
≤20 mm	156	89	
>20 mm	153	70	<0,001
Grado histológico			
1	23	97	
2	86	85	
3	193	73	0,001
Invasión vascular			
ausente	135	86	
presente	125	65	<0,001
Necrosis			
ausente	137	85	
presente	123	67	0,001
Fenotipo			
Luminal A	61	91	
Luminal B	28	78	
HER2	122	72	
TN/Basal	98	78	0,019
Status ganglionar			
negativo	187	84	
positivo	108	69	<0,001

*Test de Chi-cuadrado

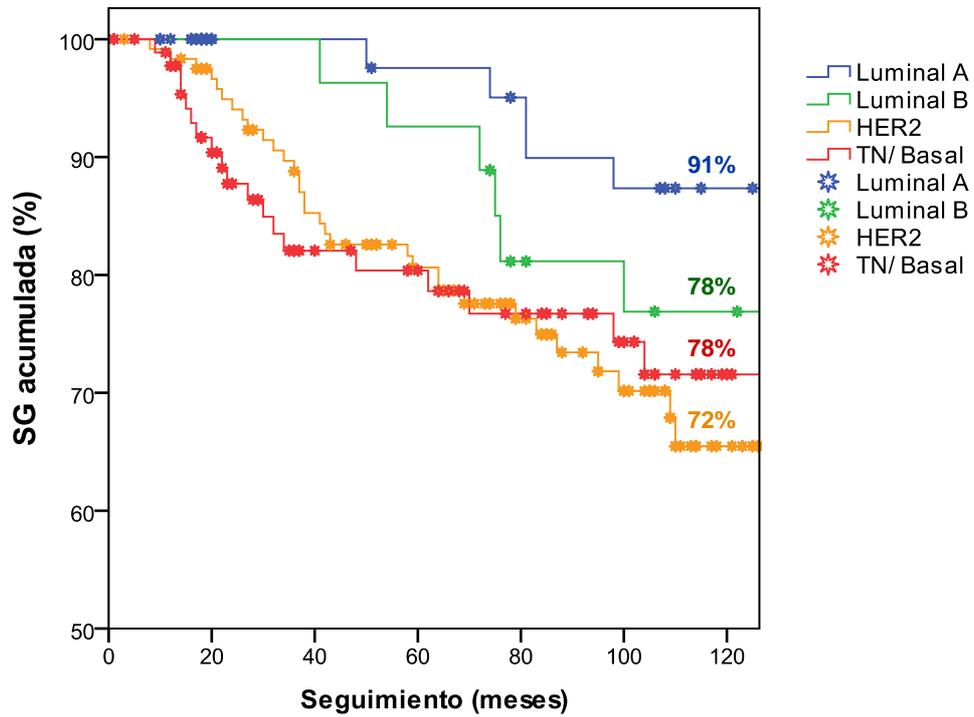


Figura 31.- Curvas de Kaplan-Meier para la SG según inmunofenotipos (p=0,019; test de log-rank).

Tabla 18.- Mediana de la SG en inmunofenotipos

Fenotipo	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
Luminal A	61	120	10	267	
Luminal B	28	136	41	202	
HER2	122	78	3	302	
TN/Basal	98	65	1	297	0,02

*Test de las medianas

4.1.2.2- Expresión de OPN y SG

La mediana de la SG (en meses) fue menor en las pacientes cuyos tumores sobreexpresaban OPN-t (64 meses) ($p < 0,001$). Los resultados fueron similares en cuanto a la sobreexpresión de OPN-c (32 meses) ($p < 0,001$) (test U de Mann-Whitney) (Tabla 19).

Tabla 19.- Mediana de la SG según la expresión de OPN-t y OPN-c

FC ARNm	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
OPN-t					
≤32	231	94	1	302	
>32	77	64	8	297	<0,001
OPN-c					
≤4	205	98	1	302	
>4	69	32	10	297	<0,001

*Test U de Mann-Whitney

Las pacientes tenían mejor pronóstico cuando los tumores no sobreexpresaban OPN-t, estando 79% vivas en el último seguimiento, comparadas con el 77% en el subgrupo con sobreexpresión ($p=0,13$) (Figura 32). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas con los niveles de expresión de OPN-c (78% vs 82%) ($p=ns$) (método de Kaplan-Meier; test de log-rank).

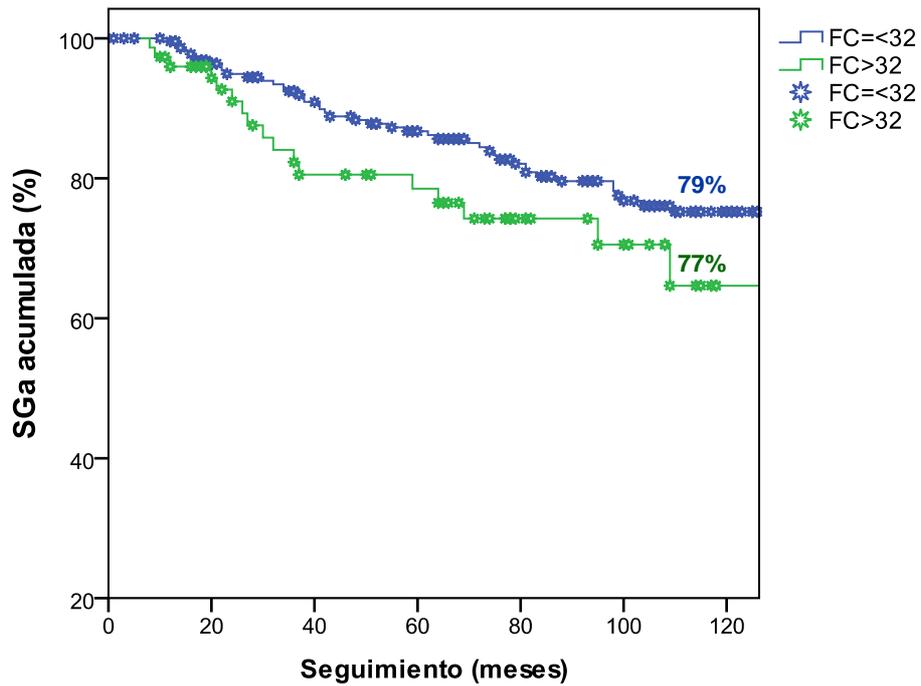


Figura 32.- Curva de Kaplan-Meier para la SG según la expresión de OPN-t ($p=0,13$; test de log-rank).

4.1.2.3- Inmunofenotipos estratificados por los niveles de expresión de ARNm de OPN

La SG fue significativamente mayor entre las pacientes con CM del subtipo Luminal A sin sobreexpresión de OPN-t, con una mediana de 138 meses ($p=0,002$), mientras que observamos una tendencia para los subtipos HER2-positivo y TN/Basal (test U de Mann-Whitney) (Tabla 20).

Tabla 20.- Mediana de la SG según la expresión de OPN-t en inmunofenotipos

Fenotipo / FC ARNm OPN-t	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
Luminal A					
≤32	47	138	10	267	
>32	13	19	10	219	0,002
Luminal B					
≤32	26	138	41	202	
>32	2	-	-	-	NV**
HER2					
≤32	79	84	3	302	
>32	43	71	8	174	0,114
TN/Basal					
≤32	73	69	1	197	
>32	18	28	9	297	0,069

*Test U de Mann-Whitney; **NV= no valorable

Además, aquellas pacientes con tumores con sobreexpresión de OPN-c presentaron medianas de SG más cortas para los subtipos Luminal A (144 vs 18 meses) y TN/Basal (99 vs 30 meses) (ambas $p < 0,001$; test U de Mann-Whitney) (Tabla 21).

Tabla 21.- Mediana de la SG según la expresión de OPN-c en inmunofenotipos

Fenotipo / FC ARNm OPN-c	Pacientes (n)	Mediana (meses)	Mínimo	Máximo	p*
Luminal A					
≤4	35	144	16	267	
>4	18	18	10	181	<0,001
Luminal B					
≤4	19	135	41	202	
>4	1	-	-	-	**NV
HER2					
≤4	99	79	3	302	
>4	15	65	17	117	ns
TN/Basal					
≤4	47	99	1	197	
>4	33	30	11	297	<0,001

*Test U de Mann-Whitney; **NV= no valorable

El análisis de la SG en las pacientes según el inmunofenotipo tumoral dependiendo de los niveles de expresión de OPN no nos permitió identificar subgrupos de riesgo (p=ns).

4.2.- Análisis Multivariado (Regresión de Cox)

4.2.1.- Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)

En el análisis multivariado decidimos incluir la expresión génica de OPN-t y OPN-c por separado debido a que no son variables independientes, ya que la OPN-c es parte de la OPN-t. Así pues, realizamos dos análisis por separado, en primer lugar incluyendo la OPN-t y en segundo lugar la OPN-c.

El análisis multivariado para la SLE demostró que el grado histológico ($p=0,035$) y el status ganglionar ($p=0,024$) presentaban valor pronóstico independiente. Sin embargo, observamos sólo una tendencia con el tamaño del tumor y la expresión de OPN-t (modelo de regresión de Cox) (Tabla 22).

Tabla 22.- Resultados del análisis multivariado para la SLE incluyendo OPN-t

Variables	β	Odds ratio	95% IC	p*
Edad	-0,30	0,8	0,5-1,2	ns
Tamaño	0,45	1,6	0,9-2,7	0,094
Grado histológico	0,70	2,0	1,0-3,8	0,035
Invasión vascular	0,04	1,0	0,6-1,7	ns
Necrosis	0,10	1,1	0,7-1,8	ns
Fenotipo	-0,03	0,9	0,7-1,2	ns
Ganglios (+/-)	0,63	1,9	1,1-3,3	0,024
OPN-t (FC >32)	0,46	1,6	0,9-2,7	0,079

*Regresión de Cox

Por otro lado, incluimos como variable la expresión de la variante OPN-c. En este caso fueron el grado histológico ($p=0,004$), el status de los ganglios linfáticos ($p=0,014$) y la expresión de OPN-c ($p=0,006$; regresión de Cox) las variables con valor pronóstico independiente en cuanto a la recidiva de la enfermedad. En este caso también observamos una tendencia con el tamaño e inmunofenotipo tumorales (Tabla 23).

Tabla 23.- Resultados del análisis multivariado para la SLE incluyendo OPN-c

Variables	β	Odds ratio	95% IC	p*
Edad	-0,01	1,0	0,9-1,0	ns
Tamaño	0,56	1,7	1,0-3,2	0,062
Grado histológico	0,83	2,3	1,3-4,1	0,004
Invasión vascular	-0,16	0,9	0,5-1,7	ns
Necrosis	0,05	1,0	0,6-1,8	ns
Fenotipo	-0,27	0,8	0,6-1,0	0,074
Ganglios (+/-)	0,75	2,1	1,2-3,8	0,014
OPN-c (FC >4)	0,88	2,4	1,9-4,5	0,006

*Regresión de Cox

4.2.2.- Supervivencia Global (SG)

Observamos que únicamente la presencia de metástasis ganglionares ($p=0,043$; regresión de Cox) fue un factor independiente en cuanto a predecir la muerte de las pacientes. Para las variables del tamaño, la invasión vascular, la presencia de necrosis, el inmunofenotipo tumoral y la expresión de OPN-t sólo se observó una tendencia a la significación estadística (Tabla 24).

Tabla 24.- Resultados del análisis multivariado para la SG

Variables	β	Odds ratio	95% IC	p*
Tamaño	0,76	2,1	0,9-4,8	<i>0,070</i>
Grado histológico	0,30	1,3	0,7-2,5	ns
Invasión vascular	0,54	1,8	0,8-3,7	<i>0,180</i>
Necrosis	0,67	1,9	0,9-4,1	<i>0,070</i>
Fenotipo	0,18	1,2	0,9-1,7	0,260
Ganglios	0,32	4,0	1,0-1,8	0,043
OPN-t (FC >32)	0,33	1,4	0,7-2,5	0,270

*Regresión de Cox

6.- EXPRESIÓN DE OPN EN LÍNEAS CELULARES

Detectamos sobreexpresión de OPN-t y OPN-c en las líneas MDA-MB-468 y SK-BR-3. Sin embargo en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 la expresión de OPN-t fue baja y ausente para OPN-c, mientras que no observamos expresión de OPN-t ni OPN-c en las líneas T-47D y BT-474 (Figura 33).

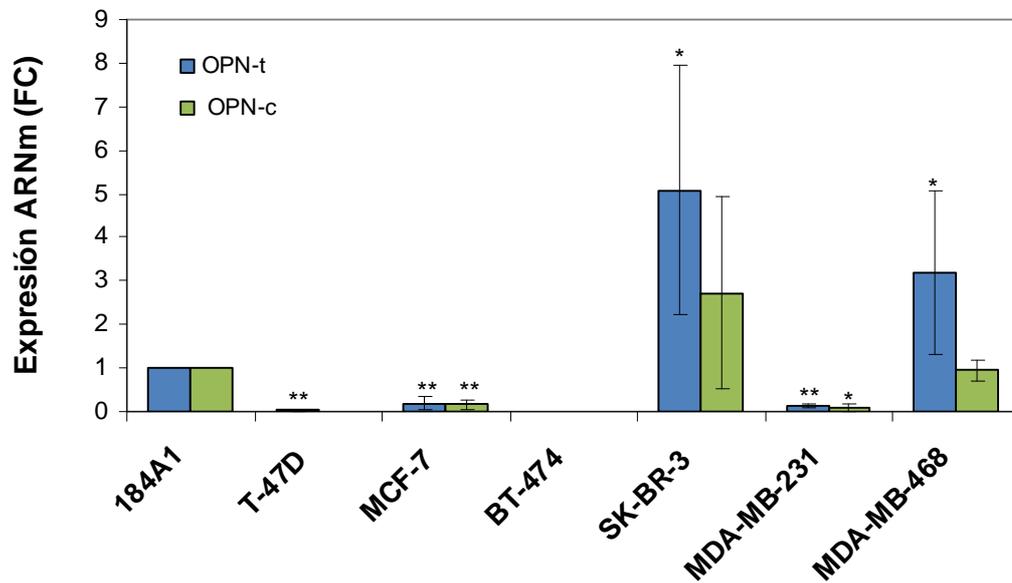


Figura 33.- Expresión de ARNm de OPN-t y OPN-c en líneas celulares de cáncer de mama representativas de los distintos subtipos moleculares (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; prueba t de Student).

VI.- DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más común en los países occidentales, lo que suscita un gran interés en investigar la etiopatogenia de la enfermedad y su tratamiento. La alta incidencia de esta neoplasia conlleva un gran número de muertes [3] y en ocasiones una menor calidad de vida en las pacientes que superan la enfermedad [104].

El cáncer de mama se clasifica basándose en una serie de criterios clínicopatológicos y de biomarcadores obtenidos por métodos de inmunohistoquímica, para así determinar el pronóstico y tratamiento de las pacientes [105]. Sin embargo, hace poco más de una década, Perou *et al.* [10] publicaron sus resultados sugiriendo una nueva clasificación en subtipos “intrínsecos” moleculares, que representan diferentes entidades tumorales. Estos subtipos moleculares se caracterizan por un determinado perfil genético y un pronóstico distinto [14]. Por tanto, esta neoplasia ha pasado de considerarse una única enfermedad a ser percibida como un grupo de enfermedades heterogéneas caracterizadas por diferentes aberraciones moleculares [106].

Debido a que esta nueva clasificación molecular está cobrando una gran relevancia del mismo modo que la clasificación clásica, en el presente estudio clasificamos en un primer lugar los tumores de mama basándonos en biomarcadores determinados por inmunohistoquímica como son RE/RP, HER2, p53, Bcl2 y Ki67, que se aplican en la rutina del diagnóstico histológico. Actualmente, la clasificación molecular está siendo revisada y ampliada, ya que se han descrito nuevos subtipos, como los tumores *claudin-low* [13, 107-108], que por el momento no son contemplados en la clasificación inmunofenotípica.

Discusión

En segundo lugar, el estudio de los niveles de expresión de ARNm de OPN se realizó para determinar el papel que podría tener este oncogén en la etiopatogenia de los distintos fenotipos y su potencial aplicabilidad como factor pronóstico y/o de diana terapéutica.

En la serie analizada de 309 cánceres de mama no consecutivos, predominaron las pacientes de ≥ 50 años, con tumores ≤ 20 mm, de alto grado histológico, sin invasión vascular ni necrosis tumoral y con ganglios axilares negativos. La clasificación por inmunofenotipos de los tumores seleccionados mostró que el grupo HER2-positivo fue el más frecuentemente analizado (39,5%), seguido del TN/Basal (31,7%), una proporción atípica como consecuencia de los criterios de selección en nuestro grupo de investigación.

Los primeros estudios publicados sobre los niveles de expresión de OPN por métodos inmunohistoquímicos datan de 1995, en los que demuestran niveles altos de expresión en cáncer de mama [109], lo que ha sido corroborado por estudios más recientes [85-88]. El análisis de sangre de pacientes también reveló un aumento de la concentración de OPN en estadios más avanzados de la enfermedad [83].

Sin embargo, el análisis de los niveles de expresión de ARNm de OPN por qRT-PCR ha sido objeto de muy pocos estudios en neoplasias humanas, y concretamente en el cáncer de mama, donde por lo general el número de tumores incluidos es reducido (40-181 casos) [89-91, 93].

El 89% de nuestros casos presentaron un incremento de dos veces o mayor en los niveles de ARNm de OPN en comparación con los controles de mama normales, lo que sugiere un papel fundamental de la OPN en la etiopatogenia del cáncer de mama.

Reseñar que los escasos resultados publicados en el tema presentado, además de su variabilidad, hacen que no se tenga un punto de referencia orientativo, ya que cada autor considera un punto de corte diferente para definir la presencia o no de sobreexpresión de OPN. Por ello, para el propósito de nuestro estudio, consideramos como punto de corte el FC del P₇₅ para definir la sobreexpresión de OPN, siendo FC ≥ 32 .

En nuestra serie, la mediana del FC de OPN-t fue de 12,45. De modo similar, Reinholz *et al.* [89] observaron un aumento de ARNm de OPN de 6 veces en DCIS mientras que en los tumores primarios y en las metástasis fue de hasta 12 veces, comparados con el tejido normal. El 60% de los carcinomas infiltrantes analizados sobreexpresaban OPN-t. De modo similar, los estudios de expresión de OPN por inmunohistoquímica demuestran positividad entre el 49-87% [85-88, 92, 110].

En nuestra serie observamos que la mediana de FC de OPN-t era mayor en los subtipos HER2-positivo y TN/Basal, lo que sugiere su asociación a tumores con un comportamiento clínico más agresivo, y que por tanto puede ser considerado un biomarcador con potencial valor pronóstico.

Los estudios de correlación con los receptores hormonales realizados por el grupo de Rudland *et al.* de la Universidad de Liverpool no demostraron inicialmente asociación de OPN con RE, RP ni HER2 [87], pero en un estudio posterior describieron una correlación positiva con RE- α [88]. Contrariamente, para Ribeiro-Silva *et al.* [85] esta correlación fue negativa con el subtipo luminal, positiva con el subtipo HER2-positivo y no observaron ninguna correlación con el subtipo TN/Basal, aunque este último subgrupo incluía sólo

Discusión

17 tumores. Sin embargo, Wang *et al.* [92, 111] demostraron sobreexpresión de OPN en el 86% de los TN comparado con el 60% de los clasificados como no TN.

Aunque nuestros resultados pueden no ser comparables debido a que el método de estudio es diferente, hay una correlación parcial con algunos de los resultados de los estudios previos, ya que pudimos demostrar que los niveles de expresión de ARNm de OPN fueron más elevados en los TN/Basal [92, 111] y en los HER2-positivo [85]. También Bane *et al.* [93] en su análisis de la expresión de ARNm de OPN en cáncer de mama con mutaciones de *BRCA1*, frecuentemente de subtipo TN/Basal, observaron mayor expresión e OPN en comparación con un subgrupo de tumores luminales. Para Ihnen *et al.* [91] la mediana de expresión de ARNm de OPN fue mayor en los tumores TN/Basal en comparación con los luminales y HER2-positivo.

Nuestro estudio confirma pues el papel relevante de OPN en un subgrupo de CM de subtipo TN/Basal. Sin embargo, la discordancia de resultados con respecto al subtipo HER2-positivo podemos atribuirla al reducido número de casos incluidos en las series anteriores [85, 87, 91].

Más recientemente, de las tres “*splice variants*” de OPN, OPN-c se ha sugerido como un marcador específico de células neoplásicas de mama, ya que no se suele expresar en la mama normal [112]. Nosotros detectamos expresión de OPN-c en nuestros controles sanos y en el ARN comercial de mama normal, aunque los niveles siempre fueron inferiores a los de las neoplasias analizadas.

De los tumores con sobreexpresión de OPN-t, el 38% presentaron también niveles elevados de OPN-c. Nuestros resultados son comparables al

único estudio publicado al respecto por Patani *et al.* [90]. En una serie de 127 cánceres de mama analizaron la expresión de los tres transcritos de ARNm por qRT-PCR, observando un aumento de la media, siendo de 1,5 en OPN-a, 3,5 en OPN-b y el doble en OPN-c. El cálculo de la media de nuestros datos de OPN-c fue incluso mayor (FC=2,42). Sin embargo, teniendo en cuenta que esta variable seguía una distribución no paramétrica, el dato que utilizamos fue el de la mediana de OPN-c. Estos autores vieron que la expresión de OPN-a fue menor en tumores de alto grado y estadio (TNM), de alto NPI (Nottingham prognostic index) y en tumores cuyas pacientes fallecieron antes, por lo que consideraron que la sobreexpresión de OPN-a es un factor positivo. Por otro lado, observaron que la expresión de OPN-b se incrementaba con el grado tumoral, el NPI y las recidivas, siendo la supervivencia global de las pacientes menor. Por último, observaron un incremento de la expresión de OPN-c en tumores de alto grado y en estadios avanzados. Además, OPN-c se correlacionó con el desarrollo de recidivas locales, metástasis a distancia fundamentalmente óseas y con una menor supervivencia global de las pacientes.

En nuestra serie, la mediana del FC de la variante OPN-c fue 0,95, lo que significa que la expresión de OPN-c en el 50% de los tumores es similar a la mama normal. Para el propósito de este estudio y tal como hicimos con la variable de la expresión de OPN-t, consideramos como punto de corte para definir la sobreexpresión de OPN-c el FC del P₇₅, siendo FC>4. Según este criterio, los tumores con alta expresión de ARNm de OPN-c solían ser de alto grado y las pacientes presentaron más frecuentemente recidiva local y/o metástasis a distancia.

Discusión

Tras la estratificación de los resultados de ARNm de OPN-c en los diferentes inmunofenotipos, observamos que los carcinomas de los subtipos Luminal A y B, y los HER2-positivo presentaban expresión sin gran variación. Por el contrario, los tumores del subtipo TN/Basal tenían una mediana más elevada (FC=2,78). Según nuestro punto de corte, observamos que el 42% de los carcinomas TN/Basal sobreexpresaban OPN-c, lo que se asoció a un peor pronóstico en este subgrupo de pacientes. No podemos contrastar nuestros resultados con otros estudios, ya que no existe literatura publicada al respecto. Sin embargo, existen datos que apoyarían nuestras observaciones, como la demostrada correlación con alto grado histológico [112], la presencia de metástasis a distancia y a SLE más cortas [90].

La sobreexpresión de OPN-c también se ha demostrado en otros tipos de neoplasias, correlacionada en ocasiones con características de agresividad. Por ejemplo, en páncreas se ha descrito en adenocarcinomas ductales [74] y en líneas celulares de glioma se ha asociado a la capacidad de invasión celular [113]. Similar a lo demostrado en cáncer de mama, un estudio reciente en pacientes con cáncer de próstata demuestra un aumento de las tres variantes transcripcionales de OPN, siendo OPN-c la más sobreexpresada y con mejor especificidad y sensibilidad para distinguir pacientes de riesgo [114].

De acuerdo con los datos de la literatura, observamos sólo una tendencia de los niveles de expresión de OPN-t en los tumores de las mujeres de mayor edad [92], no asociación con el tamaño tumoral y tampoco para la OPN-c [87, 89]. En nuestra serie, los niveles elevados de OPN-c se correlacionaron sólo con un alto grado histológico [90, 112], mientras que OPN-

t con el status ganglionar positivo. Resultados similares han sido observados en estudios inmunohistoquímicos de OPN-t [85, 87, 92].

Un metaanálisis publicado recientemente sobre la expresión de OPN en diferentes tipos de cáncer demuestra que el aumento de los niveles de OPN a su vez incrementa la probabilidad de que el tumor sea de alto grado [115].

En conjunto, nuestros datos están apoyados por la literatura, que sugieren que la OPN-t y/o variante OPN-c se sobreexpresan en tumores de alto grado, con metástasis ganglionares y por tanto, son marcadores potenciales de un comportamiento biológico más agresivo en el cáncer de mama [45, 68].

El análisis de supervivencia confirmó que las variables clínico-patológicas como la edad joven, el tamaño (>20 mm), un alto grado de histológico, la presencia de invasión vascular y de necrosis así como un status ganglionar positivo se correlacionan con peor supervivencia [116-118].

Nuestras pacientes con tumores de fenotipos HER2 y TN/Basal también tuvieron supervivencias libres de enfermedad más cortas [107-108]. A pesar de que la supervivencia libre de enfermedad suele ser intermedia en pacientes con tumores Luminal B, en nuestra serie fue similar a las pacientes con tumores de fenotipo Luminal A. Esto podemos atribuirlo a que este grupo incluía pocas pacientes (n=28) del tipo Luminal B, ya que fueron excluidas aquellas con tumores RH/HER2-positivos [119]. Sin embargo, las últimas recomendaciones de Sant Gallen [120] recomiendan la subclasificación de este subgrupo como “Luminal B/HER2-positivo”, que obviamente son tumores más agresivos.

La mediana de meses de supervivencia libre de enfermedad fue menor en pacientes cuyos tumores presentaban alta expresión de OPN-t (84 vs 39 meses) y de OPN-c (84 vs 21 meses). El análisis de supervivencia nos permitió

Discusión

distinguir un subgrupo de pacientes con mayor riesgo de recidiva cuando sus tumores sobreexpresaban OPN-t (67% vs 73%) u OPN-c (71% vs 73%), similar a estudios previos de expresión de ARNm de OPN [90-91] y su proteína [86, 111], lo que corrobora el papel de *SPP1* como gen asociado a metástasis [44, 48-49, 61].

Es interesante destacar que la mediana de meses de supervivencia libre de enfermedad fue mayor en pacientes con tumores con baja expresión de OPN-t y OPN-c, además entre los diferentes subtipos moleculares. Esto fue más evidente en aquellas con tumores del subtipo TN/Basal, donde observamos una mayor expresión tanto de OPN-t como de OPN-c entre las que desarrollaron más frecuentemente recidiva.

En cuanto al análisis de la supervivencia global, nuestras pacientes con tumores de subtipo Luminal A seguido de Luminal B, vivían más tiempo comparadas con las portadoras de tumores HER2 positivo y TN/Basal, de acuerdo con la literatura [11, 14, 107]. La mediana de meses fue notablemente menor en pacientes con tumores con alta expresión, tanto de OPN-t (64 vs 94 meses) como de la variante OPN-c (32 vs 98 meses). Pudimos detectar además un subgrupo de pacientes con mayor riesgo de muerte cuando los niveles de OPN-t eran elevados (77% vs 79%) [86-87, 111], pero no con la OPN-c. Sin embargo, Patani *et al.* [90] sí que observaron correlación significativa entre la expresión de OPN-b y OPN-c y peores supervivencias globales.

Tras estratificar a las pacientes por subtipos moleculares y niveles de expresión de OPN-t y OPN-c, también observamos una disminución de la mediana de meses en todos los grupos cuando había sobreexpresión.

Nuestros datos son comparables con los de Ihnen *et al.* [91] que observan que las pacientes con tumores TN/Basal y alta expresión de ARNm de OPN presentan menores supervivencias globales que aquellas con tumores Luminales y HER2-positivo. Por lo tanto, aunque OPN tiene un papel relevante en un subgrupo de tumores dentro de cada fenotipo, es fundamentalmente en el subtipo TN/Basal donde confiere especial agresividad, lo que podría contribuir, al menos en parte a que estas pacientes tengan un peor pronóstico. Esto tiene una gran importancia debido al desarrollo de nuevas “dianas terapéuticas”, entre las que se podría incluir OPN, considerando las pocas opciones de tratamiento en este grupo de pacientes.

En nuestra serie pudimos demostrar el valor pronóstico independiente en cuanto al riesgo de recidiva local y/o metástasis a distancia de factores clásicos, como el grado histológico y el status ganglionar, con una tendencia para el subtipo y el tamaño del tumor. Confirmamos además el valor pronóstico de los niveles de ARNm de OPN-c, mientras que sólo encontramos tendencia a la significación para la OPN-t [91]. Este dato refuerza el papel relevante de esta variante en los mecanismos de progresión de la enfermedad, también sugerida por otros investigadores [54, 89-90, 112]. Estudios previos demuestran además el papel relevante de la expresión proteica de OPN-t [111], o de su concentración en plasma [83] .

Finalmente, el status ganglionar tuvo un valor pronóstico independiente en cuanto a predecir la muerte de nuestras pacientes, mostrando sólo una tendencia a la significación el tamaño, la invasión vascular y la necrosis tumorales. Aunque en nuestra serie no pudimos demostrar el valor pronóstico independiente de OPN, otros autores lo demuestran para los niveles de la

Discusión

proteína de OPN en tumores [86-87] o en sangre [83] de pacientes con cáncer de mama y en otras neoplasias [115].

Para validar los resultados obtenidos en la serie clínica de pacientes, cuantificamos el ARNm de OPN en líneas celulares representativas de los diferentes subtipos de cáncer de mama. A pesar de que la qRT-PCR es una técnica molecular ampliamente extendida, existen pocos estudios de expresión de ARNm de OPN en líneas celulares de mama [121]. Existen más datos publicados sobre la expresión de OPN por métodos de hibridación *in situ* [122], RT-PCR [54, 123-124], *Western blot* [125-129] e inmunohistoquímica [122, 130].

En la línea celular de mama no tumoral (184A1) observamos expresión génica tanto de OPN-t como de OPN-c, así como en nuestro control de tejido de mama normal y en control de ARN de mama comercial. Estos valores se utilizaron como referencia, de manera que relativizamos la expresión del resto de líneas tumorales frente a la línea no tumoral.

En las líneas representativas del subtipo Luminal A, los niveles de expresión fueron muy bajos, incluso prácticamente indetectables en la línea T-47D. Tampoco en la línea celular BT-474, representativa del subtipo Luminal con HER2-positivo, pudimos demostrar expresión. Otros investigadores han detectado un aumento de la expresión de OPN en MCF-7 cuando las células están formando mamosferas. En comparación con el crecimiento en monocapa, el crecimiento de mamosferas presenta mayor similitud a los tumores *in vivo* respecto a la arquitectura y a la fisiología celular [131], lo que podría justificar al menos en parte nuestros resultados.

Por otra parte, en SK-BR-3, modelo de los tumores HER2-positivo puro (RE/RP-negativo, HER2-positivo) observamos la mayor expresión de OPN-t y OPN-c, lo que se correlaciona con nuestros resultados de la serie clínica analizada.

En cuanto a las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, representativas del subtipo TN/Basal, mostraron resultados contradictorios, ya que sólo detectamos sobreexpresión de OPN-t en MDA-MB-468. Es posible que la línea celular MDA-MB-231 presente una expresión más baja por sus propiedades de células madre, ya que recientemente ha sido clasificada como línea del subtipo *claudin-low* [13]. Además, otros investigadores han detectado expresión de OPN en la línea celular MDA-MB-435, similar a las dos líneas del subtipo TN/Basal empleadas en nuestro estudio [130, 132].

Los estudios por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* de OPN en líneas celulares tampoco demuestran expresión en MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 [122, 130], ni en la línea SK-BR-3. Sin embargo, sí se observó expresión en xenotransplantes de ratones [130], hecho que los autores justifican por la inducción de la expresión debido al microambiente tumoral. Estos resultados estarían en parte de acuerdo con nuestros datos, ya que en las líneas MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 [130] demostramos una baja expresión génica, mientras que en la línea SK-BR-3 sí encontramos una alta expresión.

Por otro lado, con técnicas de *Western blot* también se demostró expresión proteica de OPN, tanto en la línea MDA-MB-468 [126-127] donde observamos expresión por qRT-PCR, como en MCF-7 y MDA-MB-231, e incluso en T47D [125], donde nosotros detectamos muy baja expresión, o no expresión en el caso de T47D.

Discusión

Los datos sobre la expresión de las variantes transcripcionales de OPN en líneas celulares también son muy escasos. He *et al.* [54] observaron en geles de agarosa los productos de RT-PCR del ARNm de OPN-a, OPN-b y OPN-c en la línea MDA-MB-231, siendo indetectables en la línea MCF-7, lo que según estos autores apoyaría el papel relevante de OPN en líneas celulares de cáncer de mama con mayor potencial metastático. Estos resultados son en parte cuestionables debido a que en este estudio no se incluyó suero bovino fetal en el medio de cultivo, el cual se suele añadir de forma habitual en el cultivo de líneas celulares eucariotas.

Analizando nuestros resultados de una forma global, entre las 6 líneas tumorales analizadas, demostramos mayor expresión de OPN-t y OPN-c en SK-BR-3 y MDA-MB-468, de los subtipos HER2 y TN/Basal, respectivamente, lo que se correlaciona con los datos de nuestra serie clínica de pacientes con CM con estos fenotipos más agresivos.

Por otro lado, nuestros resultados apoyan los datos recientemente publicados por otros investigadores en cuanto a que la sobreexpresión de OPN es un factor de mal pronóstico, aunque las series de pacientes son muy cortas y con escaso seguimiento clínico.

El papel de OPN, además de ser relevante en la etiopatogenia de un subgrupo de cánceres de mama, aporta nueva información pronóstica en los diferentes subtipos moleculares, lo que justificaría su utilidad potencial como factor pronóstico [115, 133].

Finalmente, los estudios experimentales recientes en líneas celulares y ratones [134] apoyan a OPN como potencial “diana terapéutica”. La inhibición de OPN con anticuerpos anti-OPN es capaz de bloquear los mecanismos de

angiogénesis tumoral [71]. Por otro lado, la inhibición de la expresión de OPN por ARN de interferencia parece aumentar la quimiosensibilidad [135] y la radiosensibilidad [136-137] de las células de cáncer de mama, mientras que en otros estudios han observado una disminución de la progresión tumoral [138]. Aparentemente, algunas sustancias orgánicas naturales también tienen la capacidad de inhibir la expresión de OPN, como los alcaloides de una esponja marina [139], polifenoles del té verde [140] o la curcumina [70].

Así pues, los datos experimentales recientemente publicados al respecto parecen ser muy prometedores para el desarrollo de nuevas terapias. En un futuro podrían realizarse ensayos clínicos de pacientes con tumores que sobreexpresen OPN y en las que existen pocas opciones terapéuticas, como es el caso de aquellas con tumores de fenotipos TN/Basal.

VII.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1 - El análisis de la expresión de ARNm de OPN-t y OPN-c por la técnica de qRT-PCR que se ha aplicado en este trabajo permite cuantificar de forma objetiva los niveles de expresión de OPN. El ARNm de OPN-t se expresa mayormente en los subtipos de cáncer de mama HER2-positivo y TN/Basal, mientras que la OPN-c se sobreexpresa en el TN/Basal

2 - Una elevada expresión de ARNm de OPN se asocia a factores de mal pronóstico como son alto grado histológico y ganglios linfáticos positivos.

3 - Una elevada expresión de ARNm de OPN-t y OPN-c se asocia a un mayor riesgo de desarrollar recidiva y/o metástasis a distancia de la enfermedad, lo que apoya su papel relevante como “gen asociado a metástasis”. La OPN-c, además, define grupos de riesgo entre los inmunofenotipos.

4 - El ARNm de OPN-t se expresa mayormente en líneas celulares representativas de los subtipos de cáncer de mama HER2-positivo y TN/Basal.

5 - La sobreexpresión de OPN parece conferir características más agresivas a los tumores y un peor pronóstico a las pacientes, como ocurre en tumores de inmunofenotipo TN/Basal. La ausencia de terapias específicas para tratar a pacientes con tumores de este subtipo hace de OPN una potencial diana terapéutica en un futuro próximo, aunque se hacen necesarios más estudios, sobretodo dentro del contexto de ensayos clínicos que corroboren nuestros resultados.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Global cancer statistics, 2002.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2005, **55**(2):74-108.
2. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM: **Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**(8):1893-1907.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ: **Cancer statistics, 2006.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2006, **56**(2):106-130.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2011, **61**(2):69-90.
5. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E: **Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.** *European journal of cancer* 2010, **46**(4):765-781.
6. Pollan M, Michelena MJ, Ardanaz E, Izquierdo A, Sanchez-Perez MJ, Torrella A: **Breast cancer incidence in Spain before, during and after the implementation of screening programmes.** *Ann Oncol* 2010, **21 Suppl 3**:iii97-102.
7. Kerlikowske K, Miglioretti DL, Buist DS, Walker R, Carney PA: **Declines in invasive breast cancer and use of postmenopausal hormone therapy in a screening mammography population.** *Journal of the National Cancer Institute* 2007, **99**(17):1335-1339.
8. Han W, Kang SY: **Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **119**(1):193-200.
9. Pollan M: **Epidemiology of breast cancer in young women.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **123 Suppl 1**:3-6.
10. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA *et al*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(19):10869-10874.
12. Moriya T, Kanomata N, Kozuka Y, Hirakawa H, Kimijima I, Kimura M, Watanabe M, Sasano H, Ishida T, Ohuchi N *et al*: **Molecular**

- morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer.** *Med Mol Morphol* 2010, **43**(2):67-73.
13. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**(5):R68.
 14. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S *et al*: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(14):8418-8423.
 15. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ: **Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization.** *Oncogene* 1996, **13**(1):63-72.
 16. Berns EM, Foekens JA, Vossen R, Look MP, Devilee P, Henzen-Logmans SC, van Staveren IL, van Putten WL, Inganas M, Meijer-van Gelder ME *et al*: **Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer.** *Cancer Res* 2000, **60**(8):2155-2162.
 17. Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, Hagos FG, Adeyanju MO, Feldman MD, Sanders MO, Weber BL, Olopade OI: **Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers.** *Cancer Res* 2002, **62**(5):1481-1488.
 18. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, Macgrogan G, Lerebours F, Finetti P, Longy M *et al*: **A refined molecular taxonomy of breast cancer.** *Oncogene* 2012, **31**(9):1196-1206.
 19. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC *et al*: **Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy.** *Journal of the National Cancer Institute* 2008, **100**(9):672-679.
 20. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, Alexandrov LB, Greenman CD, Lau KW, Raine K, Jones D, Marshall J, Ramakrishna M *et al*: **The life history of 21 breast cancers.** *Cell* 2012, **149**(5):994-1007.
 21. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, Asselin-Labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A *et al*: **Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers.** *Nat Med* 2009, **15**(8):907-913.

22. Prat A, Perou CM: **Mammary development meets cancer genomics.** *Nat Med* 2009, **15**(8):842-844.
23. Raouf A, Zhao Y, To K, Stingl J, Delaney A, Barbara M, Iscove N, Jones S, McKinney S, Emerman J *et al*: **Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**(1):109-118.
24. Sotiriou C, Piccart MJ: **Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care?** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(7):545-553.
25. Layfield LJ, Goldstein N, Perkinson KR, Proia AD: **Interlaboratory variation in results from immunohistochemical assessment of estrogen receptor status.** *Breast J* 2003, **9**(3):257-259.
26. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD: **Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems.** *J Clin Pathol* 2000, **53**(2):125-130.
27. Chiang AC, Massague J: **Molecular basis of metastasis.** *N Engl J Med* 2008, **359**(26):2814-2823.
28. Croker AK, Allan AL: **Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease.** *J Cell Mol Med* 2008, **12**(2):374-390.
29. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB: **Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction.** *Mol Cell* 2006, **24**(6):841-851.
30. Bristow RG, Hill RP: **Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(3):180-192.
31. Li DM, Feng YM: **Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **128**(1):7-21.
32. Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, Syrigos K: **Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer.** *Cancer Invest* 2009, **27**(10):1023-1037.
33. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: **A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.** *Nature* 1998, **392**(6672):190-193.

Bibliografia

34. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ: **Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**(3):295-305.
35. Koch AW, Manzur KL, Shan W: **Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: the evolution continues.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**(15):1884-1895.
36. Mousa SA: **Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications.** *Mol Biotechnol* 2008, **38**(1):33-40.
37. Mauro L, Sisci D, Bartucci M, Salerno M, Kim J, Tam T, Guvakova MA, Ando S, Surmacz E: **SHC-alpha5beta1 integrin interactions regulate breast cancer cell adhesion and motility.** *Exp Cell Res* 1999, **252**(2):439-448.
38. Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Kuo PC: **Integrin-linked kinase regulates osteopontin-dependent MMP-2 and uPA expression to convey metastatic function in murine mammary epithelial cancer cells.** *Carcinogenesis* 2006, **27**(6):1134-1145.
39. Rys J, Kruczak A, Lackowska B, Jaszcz-Gruchala A, Brandys A, Stelmach A, Reinfuss M: **The role of CD44v3 expression in female breast carcinomas.** *Pol J Pathol* 2003, **54**(4):243-247.
40. Mundy GR: **Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(8):584-593.
41. Paget S: **The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889.** *Cancer Metastasis Rev* 1989, **8**(2):98-101.
42. Martin TJ, Moseley JM: **Mechanisms in the skeletal complications of breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2000, **7**(4):271-284.
43. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J: **A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone.** *Cancer Cell* 2003, **3**(6):537-549.
44. Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS: **Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(3):212-226.
45. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC: **Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression.** *Trends Cell Biol* 2006, **16**(2):79-87.
46. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L: **Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells.** *Nat Immunol* 2007, **8**(1):74-83.

47. Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR: **Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces.** *Mol Biol Cell* 1992, **3**(10):1169-1180.
48. Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Mansson H: **The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**(6):1087-1097.
49. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW: **Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases.** *Faseb J* 2004, **18**(6):734-736.
50. Chakraborty G, Jain S, Kundu GC: **Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms.** *Cancer Res* 2008, **68**(1):152-161.
51. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D: **Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, **83**(23):8819-8823.
52. Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW: **cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN).** *Genomics* 1990, **7**(4):491-502.
53. Kiefer MC, Bauer DM, Barr PJ: **The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin.** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**(8):3306.
54. He B, Mirza M, Weber GF: **An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells.** *Oncogene* 2006, **25**(15):2192-2202.
55. Wai PY, Kuo PC: **Osteopontin: regulation in tumor metastasis.** *Cancer Metastasis Rev* 2008, **27**(1):103-118.
56. Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF, Petersen TE, Sorensen ES: **Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications.** *Biochem J* 2005, **390**(Pt 1):285-292.
57. Teramoto H, Castellone MD, Malek RL, Letwin N, Frank B, Gutkind JS, Lee NH: **Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12.** *Oncogene* 2005, **24**(3):489-501.

Bibliografia

58. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR: **Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001, **41**:723-749.
59. Liapis H, Flath A, Kitazawa S: **Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases.** *Diagn Mol Pathol* 1996, **5**(2):127-135.
60. Goodison S, Urquidi V, Tarin D: **CD44 cell adhesion molecules.** *Mol Pathol* 1999, **52**(4):189-196.
61. Cook AC, Tuck AB, McCarthy S, Turner JG, Irby RB, Bloom GC, Yeatman TJ, Chambers AF: **Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six "hallmarks of cancer" in a model of breast cancer progression.** *Molecular carcinogenesis* 2005, **43**(4):225-236.
62. Mi Z, Guo H, Kuo PC: **Identification of osteopontin-dependent signaling pathways in a mouse model of human breast cancer.** *BMC research notes* 2009, **2**:119.
63. Jiang BH, Liu LZ: **PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis.** *Advances in cancer research* 2009, **102**:19-65.
64. Lin YH, Yang-Yen HF: **The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(49):46024-46030.
65. Zhang G, He B, Weber GF: **Growth factor signaling induces metastasis genes in transformed cells: molecular connection between Akt kinase and osteopontin in breast cancer.** *Molecular and cellular biology* 2003, **23**(18):6507-6519.
66. Ahmed M, Kundu GC: **Osteopontin selectively regulates p70S6K/mTOR phosphorylation leading to NF-kappaB dependent AP-1-mediated ICAM-1 expression in breast cancer cells.** *Molecular cancer* 2010, **9**:101.
67. Akiyama T: **Wnt/beta-catenin signaling.** *Cytokine & growth factor reviews* 2000, **11**(4):273-282.
68. Ravindranath A, Yuen HF, Chan KK, Grills C, Fennell DA, Lappin TR, El-Tanani M: **Wnt-beta-catenin-Tcf-4 signalling-modulated invasiveness is dependent on osteopontin expression in breast cancer.** *British journal of cancer* 2011, **105**(4):542-551.
69. McMahon G: **VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis.** *The oncologist* 2000, **5 Suppl 1**:3-10.

70. Chakraborty G, Jain S, Kale S, Raja R, Kumar S, Mishra R, Kundu GC: **Curcumin suppresses breast tumor angiogenesis by abrogating osteopontin-induced VEGF expression.** *Molecular medicine reports* 2008, **1**(5):641-646.
71. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, Ji G, Cai J, Lu B, Li B, Zhang D *et al*: **Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells.** *Oncogene* 2009, **28**(38):3412-3422.
72. Behera R, Kumar V, Lohite K, Karnik S, Kundu GC: **Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(2):192-200.
73. Sedivy R, Peters K, Kloppel G: **Osteopontin expression in ductal adenocarcinomas and undifferentiated carcinomas of the pancreas.** *Virchows Arch* 2005, **446**(1):41-45.
74. Sullivan J, Blair L, Alnajar A, Aziz T, Ng CY, Chipitsyna G, Gong Q, Witkiewicz A, Weber GF, Denhardt DT *et al*: **Expression of a prometastatic splice variant of osteopontin, OPNC, in human pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Surgery* 2009, **146**(2):232-240.
75. Forootan SS, Foster CS, Aachi VR, Adamson J, Smith PH, Lin K, Ke Y: **Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer.** *International journal of cancer* 2006, **118**(9):2255-2261.
76. Zhao B, Sun T, Meng F, Qu A, Li C, Shen H, Jin Y, Li W: **Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 2011, **137**(7):1061-1070.
77. Lin F, Li Y, Cao J, Fan S, Wen J, Zhu G, Du H, Liang Y: **Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma and its relationships with metastasis, invasion of tumor cells.** *Molecular biology reports* 2011, **38**(8):5205-5210.
78. Chen RX, Xia YH, Xue TC, Ye SL: **Osteopontin promotes hepatocellular carcinoma invasion by up-regulating MMP-2 and uPA expression.** *Molecular biology reports* 2011, **38**(6):3671-3677.
79. Likui W, Hong W, Shuwen Z: **Clinical significance of the upregulated osteopontin mRNA expression in human colorectal cancer.** *J Gastrointest Surg* 2010, **14**(1):74-81.
80. Valcz G, Sipos F, Krenacs T, Molnar J, Patai AV, Leiszter K, Toth K, Solymosi N, Galamb O, Molnar B *et al*: **Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal**

- adenoma-dysplasia-carcinoma sequence.** *Pathol Oncol Res* 2010, **16**(4):541-545.
81. Bramwell VH, Tuck AB, Wilson SM, Stitt LW, Cherian AK, Rorke SC, Al-Katib W, Postenka CO, Chambers AF: **Expression of osteopontin and HGF/met in adult soft tissue tumors.** *Cancer biology & therapy* 2005, **4**(12):1336-1341.
82. Bache M, Kappler M, Wichmann H, Rot S, Hahnel A, Greither T, Said HM, Kotzsch M, Wurl P, Taubert H *et al*: **Elevated tumor and serum levels of the hypoxia-associated protein osteopontin are associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients.** *BMC cancer* 2010, **10**:132.
83. Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB, Wilson SM, Tonkin KS, Tomiak A, Perera F, Vandenberg TA, Chambers AF: **Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(11 Pt 1):3337-3343.
84. McAllister SS, Gifford AM, Greiner AL, Kelleher SP, Saelzler MP, Ince TA, Reinhardt F, Harris LN, Hylander BL, Repasky EA *et al*: **Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin.** *Cell* 2008, **133**(6):994-1005.
85. Ribeiro-Silva A, Oliveira da Costa JP: **Osteopontin expression according to molecular profile of invasive breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study.** *The International journal of biological markers* 2008, **23**(3):154-160.
86. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF: **Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients.** *International journal of cancer* 1998, **79**(5):502-508.
87. Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, De Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley JH, Howitt R, West CR: **Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer.** *Cancer research* 2002, **62**(12):3417-3427.
88. de Silva Rudland S, Martin L, Roshanlall C, Winstanley J, Leinster S, Platt-Higgins A, Carroll J, West C, Barraclough R, Rudland P: **Association of S100A4 and osteopontin with specific prognostic factors and survival of patients with minimally invasive breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(4):1192-1200.
89. Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC: **Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR.** *Breast Cancer Res Treat* 2002, **74**(3):255-269.

90. Patani N, Jouhra F, Jiang W, Mokbel K: **Osteopontin expression profiles predict pathological and clinical outcome in breast cancer.** *Anticancer Res* 2008, **28**(6B):4105-4110.
91. Ihnen M, Wirtz RM, Kalogeras KT, Milde-Langosch K, Schmidt M, Witzel I, Eleftheraki AG, Papadimitriou C, Janicke F, Briassoulis E *et al*: **Combination of osteopontin and activated leukocyte cell adhesion molecule as potent prognostic discriminators in HER2- and ER-negative breast cancer.** *British journal of cancer* 2010, **103**(7):1048-1056.
92. Wang X, Chao L, Ma G, Chen L, Jin G, Hua M, Liu H, Ouyang A, Zhang X: **Primary breast carcinoma: association of mammographic calcifications with osteopontin expression.** *Radiology* 2010, **254**(1):69-78.
93. Bane AL, Pinnaduwege D, Colby S, Reedijk M, Egan SE, Bull SB, O'Malley FP, Andrulis IL: **Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **117**(1):183-191.
94. Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO: **Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma.** *Histopathology* 1995, **27**(3):219-226.
95. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M: **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.** *Journal of the National Cancer Institute* 1973, **51**(5):1409-1416.
96. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ: **Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin.** *European journal of cancer* 1979, **15**(5):659-670.
97. Lasfargues EY, Coutinho WG, Redfield ES: **Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas.** *Journal of the National Cancer Institute* 1978, **61**(4):967-978.
98. Trempe GL: **Human breast cancer in culture.** *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung* 1976(57):33-41.
99. Pathak S, Siciliano MJ, Cailleau R, Wiseman CL, Hsu TC: **A human breast adenocarcinoma with chromosome and isoenzyme markers similar to those of the HeLa line.** *Journal of the National Cancer Institute* 1979, **62**(2):263-271.

Bibliografia

100. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr.: **Breast tumor cell lines from pleural effusions.** *Journal of the National Cancer Institute* 1974, **53**(3):661-674.
101. Stampfer MR, Bartley JC: **Induction of transformation and continuous cell lines from normal human mammary epithelial cells after exposure to benzo[a]pyrene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(8):2394-2398.
102. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM: **Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro.** *Analytical biochemistry* 1999, **270**(1):41-49.
103. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods (San Diego, Calif)* 2001, **25**(4):402-408.
104. Delgado-Sanz MC, Garcia-Mendizabal MJ, Pollan M, Forjaz MJ, Lopez-Abente G, Aragonés N, Perez-Gomez B: **Health-related quality of life in Spanish breast cancer patients: a systematic review.** *Health and quality of life outcomes* 2011, **9**:3.
105. Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RV: **Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. Cancer Committee of the College of American Pathologists.** *Archives of pathology & laboratory medicine* 1998, **122**(12):1053-1055.
106. Reis-Filho JS, Pusztai L: **Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction.** *Lancet* 2011, **378**(9805):1812-1823.
107. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, Macgrogan G, Lerebours F, Finetti P, Longy M *et al*: **A refined molecular taxonomy of breast cancer.** *Oncogene* 2011, **31**(9):1196-1206.
108. Haibe-Kains B, Desmedt C, Loi S, Culhane AC, Bontempi G, Quackenbush J, Sotiriou C: **A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes.** *Journal of the National Cancer Institute* 2012, **104**(4):311-325.
109. Bellahcene A, Castronovo V: **Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer.** *The American journal of pathology* 1995, **146**(1):95-100.
110. Kim YW, Park YK, Lee J, Ko SW, Yang MH: **Expression of osteopontin and osteonectin in breast cancer.** *J Korean Med Sci* 1998, **13**(6):652-657.

111. Wang X, Chao L, Ma G, Chen L, Tian B, Zang Y, Sun J: **Increased expression of osteopontin in patients with triple-negative breast cancer.** *Eur J Clin Invest* 2008, **38**(6):438-446.
112. Mirza M, Shaughnessy E, Hurley JK, Vanpatten KA, Pestano GA, He B, Weber GF: **Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer.** *International journal of cancer* 2008, **122**(4):889-897.
113. Yan W, Qian C, Zhao P, Zhang J, Shi L, Qian J, Liu N, Fu Z, Kang C, Pu P *et al*: **Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis and invasion in glioma cells.** *Neuro Oncol* 2010, **12**(8):765-775.
114. Tilli TM, Thuler LC, Matos AR, Coutinho-Camillo CM, Soares FA, da Silva EA, Neves AF, Goulart LR, Gimba ER: **Expression analysis of osteopontin mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia.** *Exp Mol Pathol* 2012, **92**(1):13-19.
115. Weber GF, Lett GS, Haubein NC: **Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival.** *Br J Cancer* 2010, **103**(6):861-869.
116. Ewertz M, Duffy SW, Adami HO, Kvale G, Lund E, Meirik O, Møller A, Soini I, Tulinius H: **Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries.** *International journal of cancer* 1990, **46**(4):597-603.
117. Kelsey JL, Gammon MD, John EM: **Reproductive factors and breast cancer.** *Epidemiologic reviews* 1993, **15**(1):36-47.
118. Martin M, Mahillo E, Llombart-Cussac A, Lluch A, Munarriz B, Pastor M, Alba E, Ruiz A, Anton A, Bermejo B: **The "El Alamo" project (1990-1997): two consecutive hospital-based studies of breast cancer outcomes in Spain.** *Clin Transl Oncol* 2006, **8**(7):508-518.
119. Peiro G, Adrover E, Sanchez-Tejada L, Lerma E, Planelles M, Sanchez-Paya J, Aranda FI, Giner D, Gutierrez-Avino FJ: **Increased insulin-like growth factor-1 receptor mRNA expression predicts poor survival in immunophenotypes of early breast carcinoma.** *Mod Pathol* 2011, **24**(2):201-208.
120. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ: **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Ann Oncol* 2011, **22**(8):1736-1747.
121. Suzuki M, Mose E, Galloy C, Tarin D: **Osteopontin gene expression determines spontaneous metastatic performance of orthotopic**

- human breast cancer xenografts.** *The American journal of pathology* 2007, **171**(2):682-692.
122. Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Sodek J, Tenenbaum HC, Ganss B, Cheifetz S: **Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases.** *Clin Exp Metastasis* 2000, **18**(3):253-260.
123. Ling LJ, Wang S, Liu XA, Shen EC, Ding Q, Lu C, Xu J, Cao QH, Zhu HQ, Wang F: **A novel mouse model of human breast cancer stem-like cells with high CD44+CD24-/lower phenotype metastasis to human bone.** *Chinese medical journal* 2008, **121**(20):1980-1986.
124. Mi Z, Bhattacharya SD, Kim VM, Guo H, Talbot LJ, Kuo PC: **Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis.** *Carcinogenesis* 2011, **32**(4):477-487.
125. Adwan H, Bauerle TJ, Berger MR: **Downregulation of osteopontin and bone sialoprotein II is related to reduced colony formation and metastasis formation of MDA-MB-231 human breast cancer cells.** *Cancer Gene Ther* 2004, **11**(2):109-120.
126. Vantyghem SA, Allan AL, Postenka CO, Al-Katib W, Keeney M, Tuck AB, Chambers AF: **A new model for lymphatic metastasis: development of a variant of the MDA-MB-468 human breast cancer cell line that aggressively metastasizes to lymph nodes.** *Clin Exp Metastasis* 2005, **22**(4):351-361.
127. Schulze EB, Hedley BD, Goodale D, Postenka CO, Al-Katib W, Tuck AB, Chambers AF, Allan AL: **The thrombin inhibitor Argatroban reduces breast cancer malignancy and metastasis via osteopontin-dependent and osteopontin-independent mechanisms.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **112**(2):243-254.
128. El-Tanani MK, Yuen HF, Shi Z, Platt-Higgins A, Buckley NE, Mullan PB, Harkin DP, Johnston PG, Rudland PS: **Osteopontin can act as an effector for a germline mutation of BRCA1 in malignant transformation of breast cancer-related cells.** *Cancer science* 2010, **101**(6):1354-1360.
129. Beausoleil MS, Schulze EB, Goodale D, Postenka CO, Allan AL: **Deletion of the thrombin cleavage domain of osteopontin mediates breast cancer cell adhesion, proteolytic activity, tumorigenicity, and metastasis.** *BMC cancer* 2011, **11**:25.
130. Sharp JA, Sung V, Slavin J, Thompson EW, Henderson MA: **Tumor cells are the source of osteopontin and bone sialoprotein expression in human breast cancer.** *Lab Invest* 1999, **79**(7):869-877.

131. Shevde LA, Metge BJ, Mitra A, Xi Y, Ju J, King JA, Samant RS: **Spheroid-forming subpopulation of breast cancer cells demonstrates vasculogenic mimicry via hsa-miR-299-5p regulated de novo expression of osteopontin.** *J Cell Mol Med* 2010, **14**(6B):1693-1706.
132. Sung V, Gilles C, Murray A, Clarke R, Aaron AD, Azumi N, Thompson EW: **The LCC15-MB human breast cancer cell line expresses osteopontin and exhibits an invasive and metastatic phenotype.** *Exp Cell Res* 1998, **241**(2):273-284.
133. Weber GF, Lett GS, Haubein NC: **Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker.** *Oncol Rep* 2011, **25**(2):433-441.
134. Shevde LA, Das S, Clark DW, Samant RS: **Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis.** *Curr Mol Med* 2010, **10**(1):71-81.
135. Pang H, Cai L, Yang Y, Chen X, Sui G, Zhao C: **Knockdown of osteopontin chemosensitizes MDA-MB-231 cells to cyclophosphamide by enhancing apoptosis through activating p38 MAPK pathway.** *Cancer Biother Radiopharm* 2011, **26**(2):165-173.
136. Hahnel A, Wichmann H, Kappler M, Kotsch M, Vordermark D, Taubert H, Bache M: **Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells.** *Radiat Oncol* 2010, **5**:82.
137. Yang L, Zhao W, Zuo WS, Wei L, Song XR, Wang XW, Zheng G, Zheng MZ: **Silencing of osteopontin promotes the radiosensitivity of breast cancer cells by reducing the expression of hypoxia inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor.** *Chin Med J (Engl)* 2012, **125**(2):293-299.
138. Chakraborty G, Jain S, Patil TV, Kundu GC: **Down-regulation of osteopontin attenuates breast tumour progression in vivo.** *J Cell Mol Med* 2008, **12**(6A):2305-2318.
139. Mason CK, McFarlane S, Johnston PG, Crowe P, Erwin PJ, Domostoj MM, Campbell FC, Manaviazar S, Hale KJ, El-Tanani M: **Agelastatin A: a novel inhibitor of osteopontin-mediated adhesion, invasion, and colony formation.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(3):548-558.
140. Siddiqui IA, Shukla Y, Adhami VM, Sarfaraz S, Asim M, Hafeez BB, Mukhtar H: **Suppression of NFkappaB and its regulated gene products by oral administration of green tea polyphenols in an autochthonous mouse prostate cancer model.** *Pharm Res* 2008, **25**(9):2135-2142.