

❖ ASPECTOS MOLECULARES DE LA PROGRESIÓN TEMPRANA EN CARCINOMAS MAMARIOS. TRANSICIÓN DE UN ESTADIO *in situ* A UN ESTADIO INVASOR

Lic. Marianela Sciacca*

Dra. Catalina Lodillinsky**

*Becaria Instituto Nacional del Cáncer. Área Investigación

** Investigadora CONICET. Área de Investigación.

El ducto mamario está formado principalmente por dos tipos celulares: una capa interna de células luminales polarizadas que expresan los receptores hormonales y una capa externa de células mioepiteliales. Desde hace varios años se ha identificado una población celular minoritaria con capacidad de célula madre o *stem* que darían origen tanto a las células epiteliales luminales como a las mioepiteliales (1,2). Las células mioepiteliales están especializadas en la actividad contráctil (necesaria para la expulsión de la leche durante la lactancia) y en la producción y secreción de los componentes de la membrana basal, matriz extracelular especializada que limita el epitelio del estroma (Figura 1).

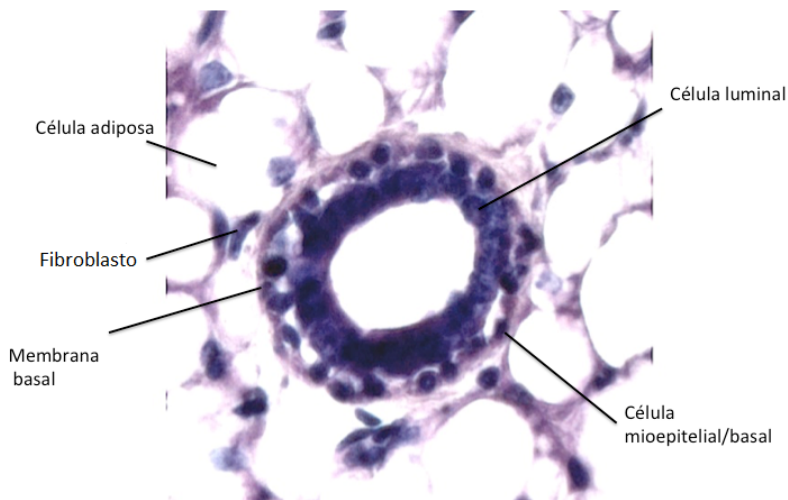


Figura 1. Corte histológico de glándula mamaria de ratón. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Las membranas basales son láminas delgadas de matriz extracelular autoensambladas de un espesor entre 50 y 800 nanómetros, encontrándose en casi todos los tejidos y con una amplia gama de funciones. Proporcionan soporte estructural y de adhesión a las células, cubriendo el lado basal de las células epiteliales y endoteliales, los adipocitos y los axones de los nervios periféricos. También sirven como reservorio para factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante de tipo β (TGF β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFb), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de

crecimiento epidérmico de heparina (HB-EGF), que participan en la supervivencia celular, la migración y la proliferación (3).

La membrana basal se compone de dos redes poliméricas interconectadas de colágeno IV y laminina que tienen un tamaño de poro del orden de 10 nm (4). Contiene también otros componentes fundamentales como glicoproteínas, nidogenos y heparan sulfato y proteoglicanos como el perlecan.

Esta membrana basal es un elemento esencial en el proceso de transformación maligna. Los carcinomas mamarios se clasifican según el grado de invasión, en carcinomas ductales *in situ* (DCIS) o invasores. Los DCIS están definidos como una proliferación “pre maligna” de las células epiteliales neoplásicas contenidas dentro del lumen del ducto mamario, rodeados por las células mioepiteliales y por la membrana basal (5).

La mayoría de las mujeres diagnosticadas sólo con DCIS son tratadas con cirugía conservadora. El riesgo de recurrencia local luego de la cirugía conservadora es mayor al 30%, siendo la mitad diagnosticadas en un estadio invasor (6). Por otro lado, los DCIS se encuentran generalmente asociados a carcinomas ductales invasores (IDC) (7). El DCIS se considera entonces el precursor de los tumores invasores (7,8), donde la transición entre los dos estadios depende de la capacidad de las células tumorales de perforar y cruzar el cinturón de células mioepiteliales y la membrana basal para luego invadir el estroma Figura 2 (9).

Figura 2. Estadio temprano del cáncer de mama

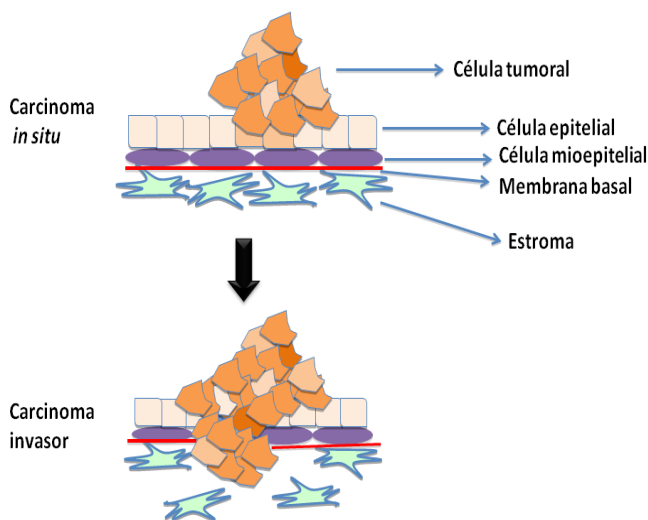


Figura 2. En el esquema se ilustra un carcinoma *in situ*, rodeado por la capa de células mioepiteliales y la membrana basal. Este tumor progresa hacia un estadio invasor luego de la degradación de la membrana basal.

La principal causa de muerte asociada al cáncer se debe a la adquisición por parte de las células tumorales de su capacidad de éstas de invadir el tejido circundante. Un incremento en la capacidad migratoria de las células, el cual le permite traspasar las barreras del

tumor primario es fundamental para llevar a cabo un programa invasivo y metastásico. En el estadio *in situ* las células tumorales todavía mantienen sus características de estirpe epitelial, incluyendo interacciones estrechas con las células vecinas y la adhesión de las células del borde de la masa tumoral con la membrana basal subyacente. A medida que el tumor progresa, las interacciones célula-célula se van perdiendo, y las células tumorales adoptan un fenotipo móvil mesenquimático, similar al característico de los fibroblastos. Estas células eventualmente rompen la membrana basal e invaden hacia el entorno estromal adyacente. Figura 2 (10).

➤ ROL DEL ESTROMA EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

Entre los factores que regulan el comportamiento de una célula tumoral están aquellos que son producto de la propia célula maligna y los que son producto del tejido no tumoral, donde se desarrolla la neoplasia, denominado estroma. El microambiente tumoral, en los tumores sólidos, está formado por diferentes células como fibroblastos, células del sistema inmune y matriz extracelular. El vínculo entre las células tumorales y el estroma está dado tanto por las interacciones célula-célula y/o célula-matriz extracelular, como por factores solubles que interactúan con receptores específicos y activan respuestas que inducen la expresión de proteínas relacionadas con el control de la proliferación, la modulación de la síntesis de componentes de la matriz extracelular (MEC) y/o la producción de enzimas proteolíticas para su degradación (11, 12).

Una serie de cambios drásticos se llevan a cabo en paralelo a la progresión tumoral desde un estadio *in situ* a invasor. La desmoplasia y el infiltrado inflamatorio son características principalmente asociadas a los estadios microinvasores o invasores (13,14). La presencia de infiltrado inflamatorio se observa tan pronto como un grupo de pocas células logra traspasar la membrana basal (estado microinvasor, figura 1) (15).

En la actualidad no existe un biomarcador capaz de predecir cuales lesiones DCIS progresarán a invasoras. La comprensión de estos cambios en el microambiente tumoral durante las etapas tempranas de la tumorigénesis mamaria permitiría el diseño de terapias antitumorales más efectivas.

➤ PAPEL DE LAS METALOPROTEASAS DURANTE LA PROGRESIÓN TUMORAL

Las etapas iniciales de la diseminación tumoral requieren una remodelación proteolítica de matriz extracelular. Esta remodelación se da por parte de las células cancerosas, pero también se sugiere que las propias células del tejido circundante, como fibroblastos, puedan contribuir (16).

Existe abundante literatura que indica un rol esencial de las metaloproteasas (MMP) secretadas al medio extracelular en la invasión tumoral (17). Sin embargo, es evidente el papel clave de las MMP ancladas a membrana, en particular la MMP de tipo 1, MT1-MMP (también conocida como MMP-14), clave en la invasión regional en etapas tempranas de progresión tumoral (18,19).

Las MMP asociadas a membrana plasmática han sido descritas como enzimas importantes en la degradación de la matriz extracelular durante el proceso de invasión tumoral y la metástasis en modelos tumorales experimentales. Actualmente, en base a trabajos *in vitro*, usando matrices nativas o reconstituidas se propone que la actividad de MT1-MMP sería esencial para la degradación de la membrana basal, posterior invasión

local y migración a través del colágeno fibrilar (20, 21, 22, 23) y estaría aumentada su expresión en diferentes tipos de carcinoma.

En el cáncer de mama la expresión de MT1-MMP está aumentada en la membrana plasmática de células tumorales tanto de carcinomas *in situ* como de invasores comparado con el epitelio adyacente no tumoral. A su vez dicha expresión se encuentra incrementada en tumores microinvasores e invasores con respecto a tumores en estadios *in situ* (9).

El cáncer de mama es la patología tumoral más común en la mujer a nivel mundial (24) y se han identificado cuatro subtipos moleculares principales: 1-Tipo basal/triple negativo; 2-HER2+; 3-Luminal A y 4- Luminal B (25) cada uno caracterizado por un comportamiento clínico particular. Esta clasificación ha permitido la aplicación de terapias blanco específico para cada uno de estos grupos. Por ejemplo, los tumores luminales responden a terapias basadas en receptores hormonales y los tumores clasificados como HER2+ reciben *Herceptin* y otros agentes bloqueantes de la vía erbB2. Los pacientes cuyos tumores son clasificados como triple negativo son el subgrupo con peor pronóstico ya que estos tumores no expresan receptores hormonales ni presentan amplificación de HER2+ y no reciben tratamiento adyuvante a la quimioterapia. Esto pone en evidencia la necesidad de invertir esfuerzos en comprender esta patología con el objetivo de mejorar los tratamientos.

Al segregar tumores según los diferentes subtipos moleculares, se observó que la expresión de MT1-MMP fue más alta en tumores invasores con receptores hormonales negativos, particularmente en el triple negativo.

Los modelos animales son de gran utilidad para el estudio de la progresión tumoral y/o diseño de nuevas modalidades diagnósticas y terapéuticas. Para que sean útiles es necesario que presenten la mayor similitud posible con la patología en humanos. La membrana basal es la primera barrera con la que se encuentran las células tumorales para invadir el tejido estromal circundante. Si bien existen actualmente varios modelos murinos, cada uno con sus propias características para el estudio de la patología mamaria, no han sido del todo exitosos en comprender la progresión tumoral en particular en los estadios tempranos de la transición de un estadio *in situ* hacia otro invasor.

El sitio de inoculación tumoral también es un punto importante. La mayoría de los estudios se realizan utilizando la inoculación subcutánea o en el caso particular del estudio del cáncer de mama, inoculación en el *fatpad* (tejido mayormente graso que rodea y sostiene al árbol galactóforo). El crecimiento en el *fatpad* presenta la ventaja de ser fácil de inocular y de evaluar el crecimiento. Sin embargo, la inoculación ortotópica intraductal es la única capaz de generar tumores *in situ* cuando se trabaja con líneas celulares y la que permite evaluar más correctamente las interacciones huésped-tumor ya que los tumores quedan contenidos por el epitelio mamario del hospedador y deben degradar y traspasar la membrana basal para colonizar el estroma (26, 9). Sobre la base de este modelo intraductal se pudo demostrar que las células tumorales que no expresaban la enzima MT1-MMP tenían no podían generar tumores invasivos. Estos datos, proporcionan así la evidencia de que MT1-MMP es esencial para la transición de los carcinomas *in situ* hacia uno invasor (9). Por lo tanto, la expresión de MT1-MMP se correlaciona con un peor pronóstico y mayor riesgo de metástasis, sugiriendo que MT1-MMP está involucrado en primeras etapas de la invasión locorregional en tumores de mama negativos para los receptores hormonales.

Conocer los mecanismos involucrados en la progresión tumoral desde un estado precoz es un primer paso para proponer la generación de drogas complementarias al tratamiento del tumor primario y más aún para prevenir su evolución. Los fármacos diseñados para inhibir la actividad enzimática de las MMPs, no permiten distinguir entre todos los miembros de esta familia de enzimas y el uso de los mismos tuvo consecuencias negativas en los ensayos clínicos. En la actualidad, se está trabajando en el diseño de inhibidores selectivos que tendrían mejores resultados. Es imprescindible continuar con mayores esfuerzos para poder avanzar en el estudio de los factores determinantes de la progresión de tumor *in situ* a tumor invasor y permitir así la identificación de nuevos blancos terapéuticos que resuelvan la enfermedad.

Bibliografía

- 1-Pechoux C, Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol* 1999; 206:88–99.
- 2-Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 2002; 16:693–706.
- 3- Iozzo RV, Zoeller JJ, Nyström A. Basement membrane proteoglycans: modulators of cancer growth and angiogenesis. *Mol Cells* 2009; 27:503- 13.
- 4- Yurchenco PD, Ruben GC. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol* 1987; 105:2559-68;
- 5- Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 422–433.
- 6-Wapnir I, Dignam J, Fisher B et al. Long term outcomes of invasive ipsilateral breast tumor recurrences after lumpectomy in NSABP B-17 and B-24 randomized clinical trials for DCIS. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:478–488.
- 7- Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CK, Hicks J, King TA, Reis-Filho JS. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. *Mol Oncol*. 2013, 7(5):859-69.
- 8-Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst*. 1973, 50(5):1111-8.
- 9- Lodillinsky Catalina, Infante Elvira, Fuhrmann Laetitia, Guichard Alan, Cyta Joanna, Marie Irondelle, Emilie Lagoutte, Sophie Vacher, Hélène Bonsang-Kitzis, Marina Glukhova, Fabien Reyat, Ivan Bièche, Anne Vincent-Salomon and Philippe Chavrier. p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition in basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2016, 21;35(3):344-57.
- 10- Rowe RG, Weiss SJ. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol*. 18:560–74.
- 11- Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 2011, 147: 992-1009.
- 12- Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 15: 166-179, 2010.

- 13-Conklin MW, Keely PJ. Why the stroma matters in breast cancer: insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. *Cell Adh Migr.* 2012 , 6(3):249-60.
- 14- Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13:228–41.
- 15- Man YG, Sang QX. The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the "protease-centered" hypothesis. *Exp Cell Res.* 2004,10;301(2):103-18.
- 16- Glentis A, Gurchenkov V, Vignjevic D Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes. *Cell Adhesion & Migration* 8:3, 236–245; 2014.
- 17- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumormicroenvironment. *Cell* 141:52–6, 2010.
- 18- Hotary K, Li XY, Allen E, Stevens SL, Weiss SJ. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev.* 20:2673–86. 2006
- 19-Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW, Weiss SJ. 2003. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114:33–45.
- 20- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M et al. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004; 167: 769–781.
- 21- Hotary K, Li XY, Allen E, Stevens SL, Weiss SJ. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 2006; 20: 2673–2686.
- 22- Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 893–904.
- 23- Monteiro P, Rosse C, Castro-Castro A, Ironelle M, Lagoutte E, Paul-Gilloteaux P et al. Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *J Cell Biol* 2013; 203: 1063–1079.
- 24- GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
- 25-Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 406: 747-752, 2000.
- 26-Behbod F, Kittrell FS, LaMarca H, Edwards D, Kerbawy S, et al. An intraductal human-in-mouse transplantation model mimics the subtypes of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res* 11: R66. 2009.