

Niveles séricos de la metaloproteinasa-9 en mujeres con patologías mamarias*

► Analía Soria de González¹, Elba Irma Díaz², Rosa Silvina Guber³, Nilda Noemí Arias⁴, Norma Ruiz de Martínez⁵

1. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Profesora Adjunta, Cátedra de Patología Molecular. Facultad de Bca., Qca. y Farmacia. U.N.T.
2. Bioquímica. Profesora Adjunta, Cátedra de Práctica Hospitalaria. Facultad de Bca., Qca. y Farmacia. U.N.T.
3. Bioquímica. Auxiliar Docente de 1ª Categoría, Cátedra de Patología Molecular. Facultad de Bca., Qca. y Farmacia. U.N.T.
4. Bioquímica. Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Patología Molecular. Facultad de Bca., Qca. y Farmacia. U.N.T.
5. Doctora en Bioquímica. Profesora Titular, Cátedra de Patología Molecular. Facultad de Bca., Qca. y Farmacia. U.N.T.

* Laboratorio de Patología Molecular "LAPAM", Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Hospital Centro de Salud "Zenón Santillán". Av. Avellaneda 750. 4000 Tucumán, República Argentina.
E-mail: gonzalez_stojan@uolsinectis.com.ar

Resumen

Las metaloproteinasas (MMP-s) pertenecen a una familia de endopeptidasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular que facilitan de esta forma la invasión tumoral y las metástasis. Las microcalcificaciones detectadas mamográficamente (MDM) constituyen uno de los marcadores de mayor importancia en el diagnóstico temprano del cáncer de mama (CM). El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles séricos de la metaloproteinasa-9 (MMP-9) en pacientes con CM y en pacientes con MDM. Se estudiaron 43 mujeres que fueron separadas en tres grupos: A) 21 pacientes que respondieron positivamente al tratamiento, B) 11 pacientes con CM avanzado sin tratamiento o sin respuesta al mismo y C) 11 pacientes con MDM sin lesiones malignas clínicamente detectables. Los valores promedios de MMP-9 fueron de: $328,0 \pm 123,3$ ng/mL; $929,1 \pm 103,9$ ng/mL; $870,4 \pm 120,98$ ng/mL, para los grupos A, B y C respectivamente. El análisis de los resultados mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupo A y B y A y C, no encontrándose diferencias entre el grupo B y C. Sobre la base de estos hallazgos podría sugerirse la importancia de la detección temprana de las MDM así como la posible utilidad de la MMP-9 como marcadora de diagnóstico, pronóstico y seguimiento en pacientes con CM.

Palabras clave: cáncer de mama * metaloproteinasa-9 * microcalcificaciones * factores pronósticos

Summary

METALLOPROTEINASE-9 ACTIVITY IN WOMEN WITH MAMMARY GLAND PATHOLOGIES

The metalloproteinases (MMP-s) are a family of endopeptidases implicated in the degradation of extra cellular matrix. They are also associated with malignant transformation processes such as tumor invasion and metastasis in breast cancer (BC). Likewise, the microcalcifications of the mammary tissues are one of the most important diagnostic markers of BC in the early stages. This work evaluates the MMP-9 sera levels in patients with BC clinically diagnosed, and mamographically detected microcalcifications (MDM). A population of 43 women was studied and they were separated into three groups: A) 21 BC patients showing a positive response to the treatment, B) 11 patients with advanced BC without treatment or with a

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

a negative response to it and C) 11 patients with MDM and without malignant lesions clinically diagnosed. The evaluation of the results obtained for groups A, B and C showed the existence of the average values of MMP-9 sera of 328.0 ± 123.3 ng/mL; 929.1 ± 103.97 ng/mL; 870.47 ± 120.98 ng/mL respectively. The MMP-9 sera levels, present in MDM carrier patients, similar to those observed in BC without a positive response could suggest the importance of early detection of this lesion and thus, the diagnostic, prognostic and follow-up importance of the MMP-9 markers in patients with breast cancer.

Key words: breast cancer * metalloproteinase-9 * microcalcifications * prognostic factors

Introducción

Las metaloproteinasas (MMPs) son una familia de al menos 19 endopeptidasas Zn dependientes que contribuyen con la remodelación de los tejidos normales y patológicos y con la migración de células normales y malignas (1). A esta familia pertenecen las colagenasas tipo IV o gelatinasas que incluyen la MMP-2 (gelatinasa A), MMP-9 (gelatinasa B) y un activador potente de la MMP-2 llamado metaloproteinasa 1 asociada a membrana (MT1-MMP). Las gelatinasas han sido implicadas como mediadoras en los procesos de invasión y metástasis ya que degradan la membrana basal y los componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo IV, V, VII, X, XIV, la elastina y la fibronectina (2). La MMP-9 ha sido estudiada en el carcinoma de mama humano y experimental con el objeto de establecer su importancia en los procesos de invasión y metástasis (3-5). Asimismo, las MMP-s podrían comportarse como marcadores biológicos capaces de detectar la presencia de un proceso maligno tal como lo propusieron Lin y col (6) quienes demostraron que el dosaje de la actividad sérica de MMP-9 podría constituir un método complementario útil tanto como factor pronóstico como para realizar el seguimiento de pacientes con leucemia mieloide aguda. Por otra parte, las microcalcificaciones del tejido mamario detectadas mamográficamente (MDM) constituyen uno de los marcadores de mayor importancia en el diagnóstico del cáncer de mama (CM) en estadios tempranos, ya que ha sido demostrado que las mismas están frecuentemente asociadas con lesiones malignas (7).

El objetivo de este trabajo fue analizar los niveles séricos de la MMP-9 en pacientes con CM con respuesta positiva o negativa al tratamiento y en pacientes portadoras de MDM en las cuales no fue observada la presencia de lesiones malignas, con el propósito de establecer la importancia de la expresión de esta endopeptidasa en estas patologías.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 43 mujeres que fueron separadas en tres grupos: A) 21 pacientes con cáncer de mama en estadio I y II que fueron sometidas a terapia quirúrgica respondiendo favorablemente al tratamiento; B) 11 pacientes con CM primario sin tratamiento o con enfermedad progresiva después de la terapia; C) 11 pacientes con MDM sin lesiones mamarias clínicamente detectables. En la Tabla I se presentan las principales características de las pacientes de los grupos A y B.

A todas las pacientes se les efectuó una punción venosa. Las muestras de sangre se colectaron en tubos libres de anticoagulantes y se dejaron coagular 30 minutos a 37 °C separándose el suero por centrifugación. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

La MMP-9 se dosó empleando una técnica de ELISA en fase sólida (R & D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Los estándares y las muestras fueron pipeteados dentro de los pozos de la microplaca recubiertos con anticuerpos monoclonales específicos y la MMP-9 total (MMP-9 activa más pro MMP-9) se unió al mencionado anticuerpo. Después del lavado se agregó el anticuerpo policlonal contra MMP-9 conjugado con peroxidasa. Luego del lavado se adicionó una solución de sustrato. El color desarrollado fue proporcional a la cantidad de MMP-9 total unida en el primer paso.

El análisis estadístico incluyó el Wilcoxon Run Sum test, considerándose un valor "p" menor a 0,05 como estadísticamente significativo.

Resultados

En la Figura 1 se observan los niveles medios e individuales de MMP-9 sérica en las pacientes con cáncer de mama que respondieron positivamente a la terapia (grupo A). El valor promedio fue de $328,0 \pm$

Tabla I. Características principales de los grupos A y B.

Principales características	GRUPO	
	A	B
Edad en años		
$\bar{x} \pm DE$	52,3 \pm 12,0	53,7 \pm 11,2
Estado menopáusico	%	%
Pre y perimenopáusico	28,6	45,5
Postmenopáusico	71,4	54,5
Tipo tumoral	%	%
ADI	66,6	63,6
ALI	23,8	27,3
ADI+ALI	0,0	9,1
CA-MU	4,8	0,0
CA-ME	4,8	0,0
Tamaño tumoral	%	%
< 10 mm	31,8	—
10-20 mm	47,6	—
> 20 mm	14,3	—
Metástasis	%	%
Ósea	0,0	18,2
Hepática	0,0	9,1
Pulmonar	0,0	9,1
Locorregional	0,0	9,1
Múltiple	0,0	54,5
Intervalo libre de enfermedad (meses)		
$\bar{x} \pm DE$	—	39,0 \pm 30,6

ADI: Adenocarcinoma Ductal Infiltrante - ALI: Adenocarcinoma lobulillar Infiltrante - CA-MU: Carcinoma Mucinoso - CA-ME: Carcinoma Medular.

123,3 ng/mL. Ninguna de las pacientes superó el valor de referencia recomendado por los fabricantes (169-705 ng/mL).

Los niveles séricos de MMP-9 para las pacientes con cáncer de mama avanzado sin tratamiento o con res-

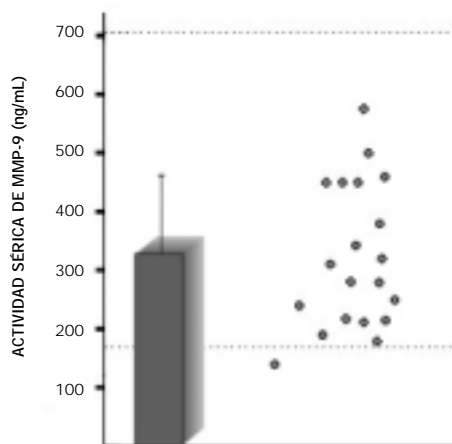


Figura 1. Niveles medios e individuales de MMP-9 circulante en las pacientes con cáncer de mama que respondieron positivamente a la terapia.

puesta negativa al mismo (grupo B) se muestran en la Figura 2, observándose un valor promedio de 929,1 \pm 104,0 ng/mL. El 100% de las pacientes de este grupo presentaron valores anormales de este marcador.

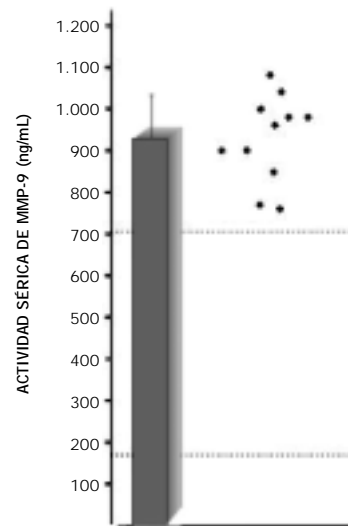


Figura 2. Niveles medios e individuales de MMP-9 circulante en las pacientes con cáncer de mama avanzado con respuesta negativa al tratamiento.

En la Figura 3 se ilustran los niveles séricos medios e individuales de la MMP-9 en las pacientes con microcalcificaciones detectadas mamográficamente en las cuales no fue observada la presencia de lesiones malignas (grupo C). El valor promedio calculado fue de 870 \pm 121,0 ng/mL observándose que el 82% de las pacientes de este grupo superaron el valor máximo normal.

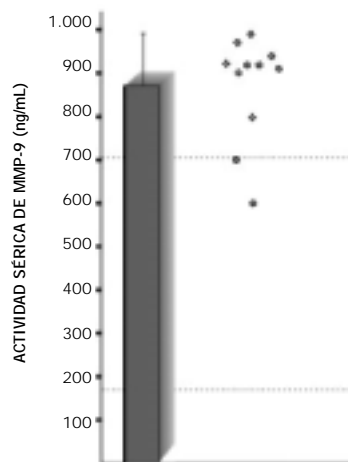


Figura 3. Niveles medios e individuales de MMP-9 circulante en las pacientes con microcalcificaciones detectables mamográficamente sin lesiones malignas clínicamente diagnosticadas.

Los niveles séricos de MMP-9 para los diferentes grupos se muestran en la Tabla II, junto a otros parámetros calculados, como asimismo los resultados del análisis estadístico, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para el grupo B cuando se comparó con el grupo C.

Discusión y Conclusiones

La endopeptidasa MMP-9 participa activamente en los procesos de degradación de la membrana basal y matriz extracelular durante la invasión de la célula tumoral así como en otros eventos de la remodelación tisular. Por ello, se ha sugerido que la sobreexpresión de la MMP-9 y el desequilibrio entre ésta y su inhibidor aumentaría la capacidad invasiva y metastásica de las células neoplásicas del cáncer de mama (7). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una actividad significativamente aumentada de la MMP-9 en las pacientes portadoras de cáncer de mama avanzado o con respuesta negativa al tratamiento, lo que corroboraría estos hallazgos, sugiriendo su posible relación con la existencia de los procesos de invasión y metástasis en las mismas. En contraposición, la actividad sérica de la MMP-9 total en el grupo de pacientes con cáncer de mama que respondieron positivamente a la terapia, no superó el valor máximo normal, coincidiendo estos resultados con el estado clínico de las pacientes.

Las microcalcificaciones detectables mamográficamente constituyen uno de los marcadores más importantes para el diagnóstico temprano del cáncer de mama habiendo postulado Yunus y col (8) que las mismas podrían estar asociadas tanto a procesos benignos como malignos. Asimismo, ha sido demostrado que alrededor del 40% de los tumores de glándula mamaria presentan procesos de mineralización ectópica la cual generalmente está constituida por hidroxiapatita, un mineral específico del hueso (9). Estos resultados fueron confirmados por Haka y col (10) quienes, en estudios realizados aplicando técnicas de espectroscopia

Ramman, han dilucidado la estructura de las microcalcificaciones mamarias de hidroxiapatita logrando diferenciar dos tipos. Estos corresponderían estructuralmente a microcalcificaciones benignas y a otras altamente sospechosas, encontrándose estas últimas asociadas de manera significativa a procesos malignos de la glándula mamaria, no detectables clínicamente. Es así que la incidencia del carcinoma ductal *in situ* podría incrementarse en mujeres mayores de 25 años como consecuencia de la identificación mamográfica de microcalcificaciones mamarias (11).

En el presente estudio se demuestra que los niveles séricos de la MMP-9 en pacientes con MDM son similares a los de las portadoras de cáncer de mama avanzado sin tratamiento o con respuesta negativa al mismo, observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de pacientes con cáncer de mama que respondieron positivamente a la terapia. Es importante remarcar que el 82% de las pacientes con MDM sin lesiones malignas clínicamente detectables presentaron niveles séricos patológicos de MMP-9. En trabajos realizados por otros autores fue demostrado que la calcificación del tejido mamario en la forma de hidroxiapatita está frecuentemente asociada con la patología maligna. Morgan y col (12) y Cooke y col (13) observaron al trabajar con líneas celulares de cáncer de mama humano, que la hidroxiapatita promueve la mitogénesis así como la expresión de una serie de metaloproteinasas incluida la MMP-9, hecho que sugiere que los cristales de hidroxiapatita jugarían un papel activo en la amplificación de los procesos patológicos involucrados en la evolución del cáncer de mama. Los resultados presentados en este trabajo parecen indicar que la sobreexpresión de MMP-9 sérica observada en el grupo de pacientes portadoras de microcalcificaciones podría estar involucrada, junto con las MDM, en la génesis de las diferentes etapas relacionadas con el desarrollo de la patología mamaria maligna.

Sobre la base de estos hallazgos se podría sugerir la importancia de la detección mamográfica de las microcalcificaciones de la glándula mamaria así como el dosaje de la MMP-9 sérica para su posible utilización

Tabla II. Valores comparativos de los parámetros analizados en los diferentes grupos de pacientes estudiadas.

Parámetros analizados	Pacientes con respuesta positiva a la terapia (A)	Pacientes con respuesta negativa a la terapia (B)	Pacientes con microcalcificaciones (C)
Edad (años) ($\bar{x} \pm DE$)	52,28 \pm 12,0	53,73 \pm 11,21	50,64 \pm 6,55
MMP-9 circulante (ng/mL) ($\bar{x} \pm DE$)	328,0 \pm 123,3	929,09 \pm 103,97	870,36 \pm 120,98
Valor mínimo	140	760	600
Valor máximo	575	1080	990
Percentilo 95	549,9	1116,1	1088,2
Significancia (p)	-	2,57 x 10 ⁻¹³	8,90 x 10 ⁻¹³

como marcador de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las pacientes portadoras de lesiones mamarias.

Sin embargo, será necesario realizar otros estudios que permitan analizar con mayor profundidad la estructura de las MDM así como la relación de las mismas con los niveles séricos de la MMP-9.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al Sr. Miguel A. Martínez por la preparación del trabajo y el diseño gráfico de las figuras.

Este trabajo fue realizado con aportes provenientes de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT) Código 26/D234.

CORRESPONDENCIA

DRA. ANALÍA SORIA DE GONZÁLEZ
Santiago del Estero 1316
4000 SAN MIGUEL DE TUCUMÁN - Argentina
E-mail: gonzalez_stojan@uolsinectis.com.ar

Referencias bibliográficas

1. Wossner J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-54.
2. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-36.
3. Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* 2000; 157: 1777-83.
4. Bartsch JE, Staren ED, Appert NE. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res* 2003; 110: 383-92.
5. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *Pathol* 1999; 189: 161-8.
6. Lin LI, Lin DT, Chang CJ, Lee CY, Tang JL, Tien HF. Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukaemic status in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 117: 835-41.
7. Fan SQ, Wei QY, Li MR, Zhang LQ, Liang QC. Expression and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in breast carcinoma. *Ai Zheng* 2003; 22: 968-73.
8. Yunus M, Ahmed N, Masroor I, Yaqoob J. Mammographic criteria for determining the diagnostic value of microcalcifications in the detection of early breast cancer. *J Pak Med Assoc* 2004; 54(1): 24-9.
9. Castronovo V, Bellahcene A. Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells. *Int J Oncol* 1998; 12: 305-8.
10. Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasori RR, Feld MS. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. *Cancer Res* 2002; 62: 5375-80.
11. Khan A, Newman LA. Diagnosis and management of ductal carcinoma in situ. *Curr Treat Options Oncol* 2004; 5(2): 131-44.
12. Morgan MP, Cook MM, Christopherson PA, Westfall PR, Mc Carthy GM. Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines. *Mol Carcinog* 2001; 32: 111-7.
13. Cooke MM, Mc Carthy GM, Sallis JD, Morgan MP. Phosphocitrate inhibits calcium hydroxyapatite induced mitogenesis and upregulation of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1 beta and cyclo-oxygenase-2 mRNA in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79: 253-63.

Aceptado para su publicación el 3 de mayo de 2005