

Determinación y significancia pronóstica de la sialoproteína ósea como factor predictivo de metástasis óseas en cáncer de pulmón a células no pequeñas resecaos quirúrgicamente

Rodolfo Ávila (1), Martha V Zovak (1), María Kurpis (2), Vanesa Palla (2), Ana Lisa Basquiera (1), Juan José García (1), Emilio Palazzo (1), Mario EF Bustos (3), Carlos Brocca (1)

(1) Servicio de Hematología y Oncología, Hospital Privado Universitario de Córdoba, Argentina

(2) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Privado Universitario de Córdoba, Argentina

(3) Servicio de Cirugía Torácica, Hospital Privado Universitario de Córdoba, Argentina

RESUMEN:

Introducción: el hueso es uno de los sitios de presentación de metástasis en pacientes con cáncer de pulmón a células no pequeñas (CPCNP). Se ha publicado que la sobreexpresión de sialoproteína ósea (SPO) en muestras tumorales posee significancia pronóstica para la formación de metástasis óseas (MO) en cáncer de mama, próstata y pulmón. **Objetivo:** Nuestro objetivo fue evaluar si la expresión de SPO en el tumor primario se asocia a mayor riesgo de metástasis óseas en cáncer de pulmón resecao.

Materiales y Métodos: Estudio retrospectivo de pacientes CPCNP con estadios IA a IIIB que fueron completamente resecaos en el Hospital Privado Universitario de Córdoba luego del diagnóstico. Los tejidos del tumor primario fijados en formol y embebidos en parafina fueron procesados para evaluar la expresión de SPO. La SPO se evaluó por inmunohistoquímica (DAKO®). Se cuantificó su expresión de + a +++ y si la intensidad era homogénea o heterogénea (Waltregny y cols.). Se consideraron positivos los pacientes con intensidad ++ y +++ cruces.

Resultados: De los 56 casos resecaos entre enero de 2001 y diciembre de 2009, 47 fueron incluidos para el análisis. La media de edad fue 60,6 años; estadio I 57,4%, estadio II 21,3% y estadio III 21,3%; adenocarcinoma 53%. En el análisis histopatológico mostró: 34 casos SPO+ y SPO negativos 13 casos. El patrón de tinción mostró una alta variabilidad. En una mediana de seguimiento de 20,5 meses, 5 pacientes (10,6%) desarrollaron metástasis óseas (SPO+ 3 casos, SPO- 2 casos; $p=0,54$) y 22 pacientes (46%) otro tipo de metástasis.

No hubo diferencia en supervivencia libre de metástasis ni en supervivencia global entre los SPO+ y SPO-. Cuando sólo se consideraron positivos los casos con alta intensidad de marcación (+++) hubo diferencia significativa en supervivencia global, con menor supervivencia para los casos SPO +++ (15,4 meses versus 54,4 meses; $p=0,0086$).

Conclusiones: En nuestra serie, la expresión de SPO en el tumor primario no fue predictor de metástasis óseas. Sin embargo, la baja incidencia de metástasis óseas en esta serie podría explicar la diferencia con los hallazgos de otros estudios. Una alta intensidad de SPO podría asociarse a menor supervivencia global.

Palabras clave: sialoproteína ósea, metástasis óseas, cáncer de pulmón a células no pequeñas

ABSTRACT:

Background: Bone is one of the sites of metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). It has been reported that bone sialoprotein (BSP) overexpression in tumor samples has a prognostic significance for the formation of bone metastases (BM) in breast, prostate and lung cancers. **Objective:** Our objective was to evaluate whether BSP expression in the primary tumor is associated with an increased risk of BM in patients with complete resection of lung cancer.

Methods: Retrospective study of NSCLC patients with stages IA to IIIB with completely resection at the Hospital Privado Universitario de Córdoba after diagnosis. The formalin-fixed and paraffin embedded primary tumor tissues were processed to evaluate BSP expression. BSP was evaluated by immunohistochemistry (DAKO®). Their expression was quantified from + to +++ and intensity was evaluated as homogeneous or heterogeneous. Patients with expression ++ and +++ were considered positive.

Results: Of the 56 cases with complete resection between January 2001 and December 2009, 47 were included in the analysis. The mean age was 60.6 years; Stage I 57.4%,

Recibido: 07/11/2016 Aceptado: 06/06/2017

Correspondencia:

Rodolfo Ávila
Servicio de Hematología y Oncología
Hospital Privado Universitario de Córdoba
Av. Naciones Unidas 346, CP 5016
Te: 4688200
Correo electrónico: rodolfoaavila@hotmail.com

stage II 21.3% and stage III 21.3%; and 53% of tumors were adenocarcinoma. In the pathology evaluation 34 cases were BSP positive and 13 cases were BSP negative. The staining pattern showed high variability. After a median follow-up of 20.5 months, 5 patients (10.6%) developed BM(3 cases BSP positive, 2 cases BSP negative, $P=0.54$) and 22 patients (46%) presented another type of metastasis. There was no difference in metastasis-free survival or overall survival between BSP positive and BSP negative patients. When the subgroup of positive cases with high-intensity marking (+++) were considered, there was a significant difference in overall survival, with lower survival rates for SPO +++ cases (15.4 months) compared to BSP negative patients (54.4 months, $P=0.009$).

Conclusions: In our series, BSP expression in the primary tumor was not a predictor of bone metastases. However, the low incidence of bone metastases in this series could explain the difference with findings from other studies. A high SPO intensity could be associated with lower overall survival.

Keywords: bone sialoprotein, bone metastases, non-small cell lung cancer.

INTRODUCCIÓN

La presencia de metástasis óseas (MO) es frecuente en el carcinoma de pulmón a células no pequeñas (CPCNP), estas pueden presentarse al diagnóstico o desarrollarse durante la progresión tumoral y comprenden cerca del 35 % de las MO reportadas (1).

En el proceso de diseminación tumoral sitio específica, la interacción que se produce entre la célula invasora y el órgano huésped es crítica (2). Varios estudios han tratado de poner en evidencia los mecanismos involucrados en la invasión tumoral y la formación de metástasis óseas específicamente, se sabe que la interacción entre algunas proteínas expresadas en la membrana celular y la matriz extracelular representan un importante paso (3, 4).

Si bien se analizaron muchos marcadores involucrados en la colonización y desarrollo de metástasis esqueléticas con técnica de inmunohistoquímica como la catepsina K, osteopontin (OPN), matrix metaloproteinase-2 (MMP-2) y el inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1), entre otros, el único que demostró una relación significativa con la diseminación ósea e independientemente con una menor supervivencia global en cáncer de mama, próstata y más recientemente cáncer de pulmón fue la sialoproteína ósea (SPO) (5-9).

La SPO es una proteína de la matriz ósea, producida por los osteoblastos y osteoclastos, que tiene función en el metabolismo óseo normal, en la mineralización de la matriz extracelular y en el remodelado óseo (10,11), esta se expresaría en algunos tumores osteotróficos jugando un rol importante en el desarrollo de MO (5,6,12-14). Por lo tanto, existiría una subpoblación de CPCNP con predisposición al desarrollo de metástasis óseas que expresaría un patrón inmunohistoquímico diferente al de aquellos que no metastatizan en hueso. Por otro lado, se han publicado diversos estudios que demostraron que el uso de bisfosfonatos podría disminuir y retrasar la aparición de eventos óseos en algunos tumores sólidos (15-18).

Es por esto que creemos de importancia la identificación

de este subgrupo de pacientes con diagnóstico de CPCNP y sobreexpresión de SPO, que presentaría mayor predisposición al desarrollo de metástasis óseas y menor supervivencia, ya que podría beneficiarse de una intervención terapéutica preventiva con el propósito de bloquear o demorar el desarrollo de MO.

En este estudio retrospectivo nuestro propósito fue correlacionar la relación entre la expresión de SPO y la diseminación ósea, como así también su impacto en la supervivencia en pacientes con CPCNP resecaos quirúrgicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se recolectaron de manera retrospectiva, en el período comprendido entre enero del año 2000 a diciembre del año 2009, los datos de pacientes con diagnóstico de CPCNP.

De todos ellos, fueron incluidos en este estudio aquellos con diagnóstico de CPCNP histológicamente confirmado, en estadios IA a IIIB, que hubieran sido resecaos quirúrgicamente en forma completa en el Hospital Privado Universitario de Córdoba y cuyo seguimiento haya estado a cargo del equipo de médicos de dicha institución.

En los 56 casos que cumplieron los requisitos para ingresar en nuestro estudio, se registraron los datos provenientes de las historias clínicas referentes a edad, sexo, antecedentes de tabaquismo, estadio, tipo histológico y evolución. En 9 casos no fue posible realizar la marcación inmunohistoquímica para SPO debido a las siguientes razones: un caso recibió quimioterapia neoadyuvante y no se encontró tumor viable en los tacos de biopsia, 2 tacos no pudieron ser recuperados y en los 6 restantes el material guardado se encontraba no apto para la marcación. En total fueron incluidos para el análisis 47 casos.

TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA Y SCORE

Los 47 tacos de muestras de tejidos fueron fijados en formol al 10% y embebidos en parafina. Se les realizaron cortes de 5 μ m y se procedió a la desparafinización y rehidratación de los mismos. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 min. Se incubaron con el anticuerpo primario contra sialoproteína ósea (BSP) (policlonal de conejo, MILIPORE,) por 1 hora 30 minutos en una dilución 1/1000, se enjuagaron con buffer PBS. Se incubaron con anticuerpo secundario por 15 min. y luego con el reactivo terciario por 15 min. (LSAB+, DAKO®) lavando entre cada paso con buffer PBS. Por último se reveló la reacción inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB+, DAKO®). Los cortes se contracoloraron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron para su visualización. El proceso de la inmunohistoquímica fue realizada por una técnica de laboratorio (VP) y todos los cortes fueron revisados por la misma patóloga, que no conocía la evolución de los pacientes. Como control positivo de la técnica se utilizaron cortes de una metástasis ósea de un tumor de mama como lo indica el inserto del anticuerpo primario. Para informar los resultados se los clasificó según la distribución de la marcación en homogénea/heterogénea y según la intensidad en cruces. Los casos se clasificaron como positivos (++ y +++) o negativos (0 y +) de acuerdo a lo publicado por Waltregny y cols (5,6). Además se analizaron en forma separada los casos con +++ para SPO.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La expresión de la SPO entre paciente con y sin metástasis óseas se comparó por chi-cuadrado. La supervivencia libre de metástasis óseas y la supervivencia global se calcularon por Kaplan-Meier. La diferencia en supervivencia se calculó por logrank test.

RESULTADOS

La edad media de los 47 pacientes en los que se realizó la marcación inmunohistoquímica para SPO fue 60,6 años (rango de 45-85), el 72,4% fueron varones, y el 93,6% presentó antecedente de tabaquismo. Los estadios de presentación más frecuente fueron IA y IB en el 57,4% de los pacientes. La histología predominante fue adenocarcinoma, seguido por carcinoma epidermoide. En la Tabla 1 se pueden ver las principales características clínicas e histológicas de los 47 pacientes analizados.

De los 47 pacientes analizados, 34 (72,4%) presentaron tinción positiva para SPO (Grupo A). En 13 (27,6%) la tinción fue considerada negativa (Grupo B).

En la Tabla 2 se puede observar el resultado de los patrones de tinción para sialoproteína ósea (SPO).

En la Figura 1 se puede ver la expresión de SPO con patrón homogéneo +++, en un carcinoma escamoso. En la figura 2 se puede ver la expresión de SPO con patrón heterogéneo +++, en un adenocarcinoma.

MENOR A MAYOR AUMENTO

La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 20,5 meses. De los 47 pacientes en los que se pudo obtener la marcación para SPO, veintitrés presentaron desarrollo de metástasis en diferentes sitios, pero sólo cinco de ellos progresó a nivel óseo. Veinticuatro pacientes no desarrollaron metástasis.

En la Tabla 3 se puede observar el número de pacientes con desarrollo de metástasis óseas y los que no presentaron metástasis. De los 5 pacientes que desarrollaron metástasis óseas, 3 casos fueron positivos para SPO y 2 casos negativos ($p=0,54$).

La supervivencia global para todo el grupo (mediana) fue 40,9 meses (IC 95% 6,543644 to 75,256356); la supervivencia global de acuerdo a la positividad para SPO fue para el grupo A, SPO positiva 50,2 meses (IC 95% 21,7 a 78,8) y para el grupo B, SPO negativa 22,63 meses (IC 95% 19,13 a 72,83); $p=0,6519$ (Fig. 3)

La supervivencia libre de metástasis óseas fue en el grupo A SPO positiva de 48,7 meses (IC 95% 17,97 a 78,77; en el grupo B SPO negativa de 11,03 meses (IC 95% 4,3 a 42,93). $P=0,5257$ (Fig. 4).

Además se analizaron los casos con positividad +++ (heterogénea y homogénea) para supervivencia global y sobrevida libre de metástasis. No hubo diferencias en la supervivencia para metástasis óseas pero encontramos diferencia para supervivencia global con peor supervivencia para los pacientes SPO positiva (Fig. 5) mediana 15,43 meses (IC 95% 10,7 a 20,11 meses) versus 54,46 meses (IC 95% 46,96 a 61,97 meses); $p=0,0086$.

Tabla 1. Características clínicas e histológicas de los pacientes (n=47)

Variable	Nº	%
Edad media (rango)	60,6 (45-85 años)	72,4/27,6
Sexo, varones/mujeres	34/13	
Antecedentes de tabaquismo		
Si	44	93,6
No	3	6,4
Estadio al diagnóstico		
IA	10	21,2
IB	17	36,2
IIA	2	4,3
IIB	8	17
IIIA	8	17
IIIB	2	4,3
Histología		
Adenocarcinoma	23	49
Adenocarcinoma con diferenciación escamosa	1	2,1
Adenocarcinoma con diferenciación neuroendócrina	1	2,1
Carcinoma Adenoescamoso	2	4,3
Carcinoma Epidermoide	14	29,8
Carcinoma Poco Diferenciado	1	2,1
Carcinoma de Células Grandes	5	10,6

Tabla 2. Patrones de tinción inmunohistoquímica para sialoproteína ósea (n=47)

Patrón IHQ	Nº de pacientes	Porcentaje (%)
Positivos	34	72,4
Heterogéneo++	22	46,8
Heterogéneo+++	5	10,7
Homogéneo++	1	2,1
Homogéneo+++	6	12,8
Negativos	13	27,6

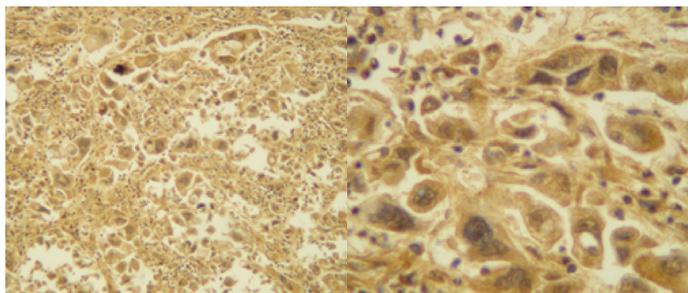


Figura 1. Expresión de sialoproteína ósea (SPO). Patrón homogéneo +++ en carcinoma escamoso. Menor y mayor aumento.

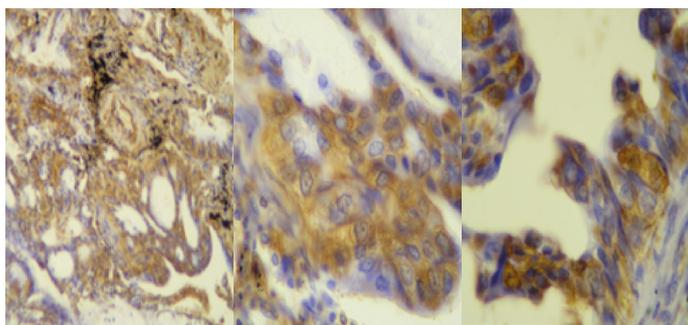


Figura 2. Expresión de sialoproteína ósea (SPO). Patrón heterogéneo +++ en adenocarcinoma. Menor a mayor aumento

Tabla 3. Pacientes con desarrollo de metástasis (n=47)

Variable	Nº	%
Metástasis No Óseas		
Sí	23	48,9
No	24	51,1
Metástasis Óseas		
Sí	5	10,6
No	42	89,4

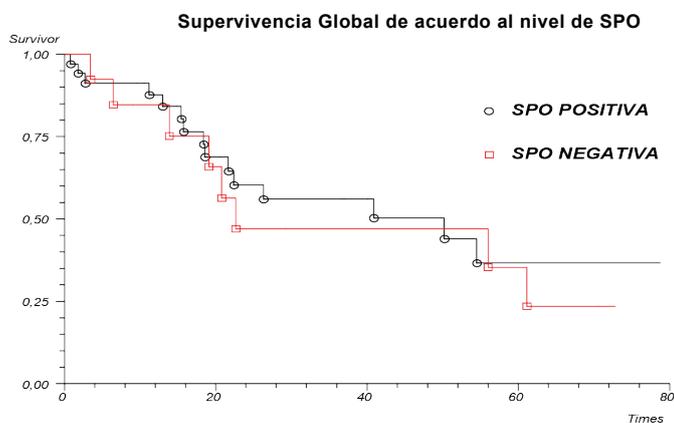


Figura 3. Supervivencia global agrupada de acuerdo a la expresión de SPO.

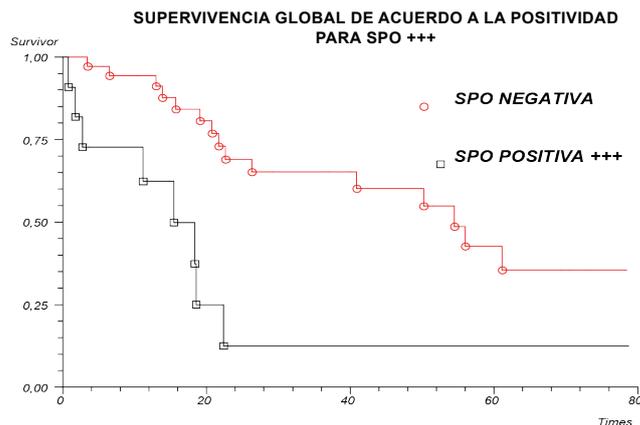


Figura 4. Supervivencia libre de metástasis óseas de acuerdo a SPO

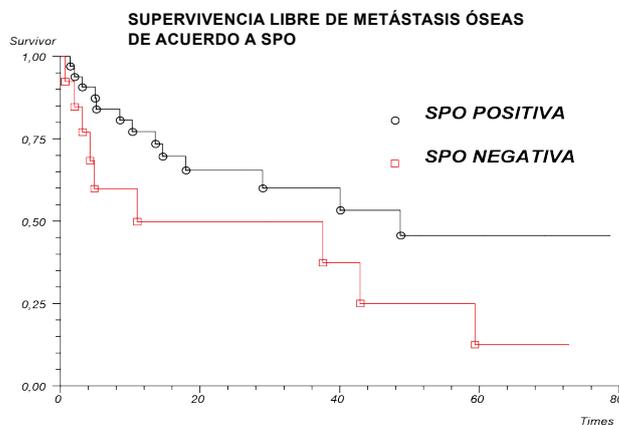


Figura 5. Supervivencia Global de acuerdo a la expresión para SPO +++

DISCUSIÓN

El crecimiento de la evidencia actual en relación al rol pronóstico que jugaría la expresión de SPO en el desarrollo de MO en diferentes tumores sólidos, entre ellos el CPCNP, podría tener un rol importante en el manejo futuro de estos pacientes, ya que identificar un grupo con alto riesgo para el desarrollo de metástasis óseas podría ayudar a mejorar la modalidad de tratamiento con el uso de medicamentos útiles en esta situación como los bifosfonatos. Estudios con estos medicamentos han demostrado su eficacia en reducir y retrasar los eventos óseos en pacientes con MO (17) y también retrasar la diseminación ósea en pacientes con tumores sólidos recurrentes o metastásicos (15,18), lo que sugeriría su aplicación como preventivo a la formación de MO.

Dos estudios recientes, uno de origen italiano publicado por Papotti y cols. (8) y otro de origen chino publicado por Li Zhang y cols. (9), han podido demostrar que la sobreexpresión de SPO en pacientes con diagnóstico de CPCNP resecados quirúrgicamente se correlaciona con una mayor predisposición al desarrollo de MO y con un peor pronóstico que aquellos que no la sobreexpresan. Ambos estudios utilizaron un método similar para la marcación inmunohistoquímica de SPO.

En su trabajo, Papotti y cols. presentaron sobreexpresión de SPO el 40% de los pacientes y la positividad fue considerada independiente del porcentaje de células tumorales marcadas; solo las muestras que no presentaron ningún tipo de marcación (0%) fueron interpretadas negativas. En este trabajo la positividad fue similar en los distintos tipos histológicos (adenocarcinoma vs no adenocarcinoma) y no se realizó correlación con otras variables clínico patológicas.

En el trabajo de Li Zhang y cols. la sobreexpresión de SPO estuvo presente en el 70% de los pacientes y se consideraron positivos aquellos pacientes que tuvieron más del 50% de células tumorales marcadas. En el estudio se vio que aquellos con adenocarcinoma presentaron mayor porcentaje de positividad para SPO que los no adenocarcinoma (39,1% vs 6,2%), lo que llamo la atención ya que el adenocarcinoma es más propenso al desarrollo de metástasis a distancia y que el grupo de pacientes con estadios más avanzados presentaron menor supervivencia libre de metástasis.

Ambos estudios han podido demostrar la fuerte relación entre la positividad de SPO con el desarrollo de metástasis óseas, el peor pronóstico y la menor supervivencia libre de progresión ósea. Estos datos sugieren que la SPO podría ser utilizada como en marcador predictivo de alto riesgo en pacientes con CPCNP al momento de la cirugía.

En nuestro trabajo intentamos reproducir estos resultados para evaluar la posibilidad de utilizar este marcador como factor pronóstico en este grupo de pacientes y obtuvimos una sobreexpresión en el 79,2 % de las muestras, consideramos negativos aquellos que presentaron intensidad de marcación en + y como positivos los que presentaron ++ y +++ cruces. No encontramos relación entre el tipo histológico y la expresión de SPO. No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en supervivencia libre de metástasis ni en supervivencia global entre los SPO+ y SPO-, pero si pudimos ver que aquellos que tuvieron una fuerte marcación (+++) presentaron diferencia en supervivencia global. Sin embargo en nuestra serie solo 5 pacientes presentaron desarrollo de metástasis óseas, lo que creemos podría explicar esta falta de significancia estadística en nuestros resultados.

CONCLUSIÓN

En nuestro grupo de pacientes, la expresión de SPO en el tumor primario no fue predictor de metástasis óseas. Sin embargo, la baja incidencia de metástasis óseas en esta serie podría explicar la diferencia con los hallazgos de otros estudios. Una alta intensidad de SPO podría asociarse a menor supervivencia global.

BIBLIOGRAFÍA

- Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997; 80:1588-94.
- Horak CE, Steeg PS. Metastasis gets site specific. *Cancer Cell* 2005;8: 93-5.
- Cho NH, Hong KP, Hong SH, Kangs S, Chung KY, Cho SH. MMP expression profiling in recurrent stage IB lung cancer. *Oncogene* 2004; 23: 845-51.
- Brubaker KD, Vassella RI, True LD, Thomas R, Corey E. Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 222-30.
- Waltregny D, Bellahcène A, Van Riet I, Fisher LW, Young M, Fernandez P, et al. Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1000-8.
- Waltregny D, Bellahcène A, de Leval X, Florin B, Weidle U, Castronovo V. Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers. *J Bone Miner Res*. 2000;15:834-43.
- Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KUE, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(3):212-26.
- Papotti M, Kalebic T, Volante M, Chiusa L, Bacillo E, Cappia S, et al. Bone sialoprotein is predictive of bone metastasis in resectable non-small-cell lung cancer: a retrospective case-control study. *J Clin Oncol* 2007;24:4818-24.
- Li Zhang, Xue Hou. Predictive significance of bone sialoprotein and osteopontin for bone metastases in resected Chinese non-small-cell lung cancer patients: A large cohort retrospective study. *Lung Cancer*. 2010 Jan;67(1):114-119.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10: 79-98.
- Hunter G, Goldberg H. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *J Biol Chem* 1994;302:175-9.
- Bellahcène A, Kroll M, Liebens F, Castronovo V. Bone sialoprotein expression in primary human breast cancer is associated with bone metastases development. *J Bone Miner Res* 1996;11:665-70
- Bellahcène A, Maloujahnoum N, Fisher LW. Expression of bone sialoprotein in human lung cancer. *Calcif Tissue Int* 1997;61:183-8.
- Diel IJ, Solomayer EF, Seibel MJ, Pfeilschifter J, Maisenbacher H, Gollan C, et al. Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis. *Clin Cancer Res* 1999;5:3914-9.
- Michaelson MD, Smith MR. Bisphosphonates for treatment and prevention of bone metastases. *J Clin Oncol* 2005;23:8219-24.
- Smith MR, Eastham J, Gleason DM, Shasha D, Tchekmedyian S, Zinner N. Randomized controlled trial of zoledronic acid to prevent bone loss in men receiving androgen deprivation therapy for nonmetastatic prostate cancer. *J Urol* 2003;169:2008-12.
- Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian S, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with non small cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer*. 2004;100:2613-21.
- Mystakidou K, Katsouda E, Parpa E, Kelekis A, Galanos A, Vlahos L. Randomized, open label, prospective study on the effect of zoledronic acid on the prevention of bone metastases in patients with recurrent solid tumors that did not present with bone metastases at baseline. *Med Oncol* 2005;22:195-201.
- Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Scarpa S, Baldi A. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:2893-7.