

EXPRESIÓN DE TIMP-2 POR FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER DE MAMA: DISTRIBUCIÓN PRONÓSTICA MEDIANTE LA-ICP-TOF-MS

Sara Escudero-Cernuda¹, Raquel González de Vega², David Clases², Noemí Eiro³, María Fraile³, Luis O. González³, Francisco J. Vizoso³, María Luisa Fernández-Sánchez¹

¹Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

²Instituto de Química, Universidad de Graz, Graz, Austria.

³Unidad de Investigación, Fundación Hospital de Jove, Gijón, España.

sara.escudero-cernuda@uni-graz.at

Abstract

El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad oncológica en mujeres, en gran parte debido a su alta capacidad metastásica. Los fibroblastos asociados al cáncer (FAC) desempeñan un papel clave en este proceso, particularmente a través de la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas-2 (TIMP-2), considerado un biomarcador de mal pronóstico. En este estudio, se desarrolló una metodología mediante ablación láser acoplada a espectrometría de masas por acoplamiento inductivo (LA-ICP-MS) para cuantificar la distribución de TIMP-2 y FAC en tejidos mamarios. Se emplearon anticuerpos marcados con neodimio (α -SMA, fibroblastos) y europio (TIMP-2), calculándose la razón Nd/Eu como indicador de la expresión de TIMP-2 por FAC. Dicha expresión fue claramente superior en tumores metastásicos, tanto en el nicho tumoral como en el estroma. Estos hallazgos destacan el potencial de esta expresión como biomarcador pronóstico de metástasis, así como la utilidad de LA-ICP-MS como herramienta analítica en cáncer de mama.

1. Introducción

El cáncer de mama, con 2,3 millones de casos en 2022 y una incidencia creciente, constituye un grave problema de salud [1]. Para mejorar el pronóstico y limitar la diseminación metastásica, resulta esencial no solo un diagnóstico precoz, sino también la identificación de nuevos biomarcadores pronósticos.

Las investigaciones recientes muestran que el desarrollo tumoral depende tanto de las células cancerígenas como del microambiente tumoral (MT), formado por las células no tumorales que rodean la masa tumoral y la matriz extracelular [2]. En este contexto, las células tumorales, mediante la secreción de ciertas proteínas, pueden transformar los fibroblastos del MT en fibroblastos asociados al cáncer (FAC), que adquieren un papel pro-tumoral al favorecer la progresión y la metástasis [3]. Estudios de expresión genética revelan que los FAC sobreexpresan factores como el inhibidor tisular de metaloproteinasas-2 (TIMP-2), relacionado con mal pronóstico [4].

Los métodos diagnósticos habituales, como los inmunoensayos con enzimas o fluoróforos, ofrecen

información limitada por su baja sensibilidad y la subjetividad en la interpretación histopatológica. Como alternativa, la técnica de ablación láser acoplada a espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (LA-ICP-MS) permite obtener imágenes cuantitativas de biomarcadores en tejidos. Su integración con inmunohistoquímica, empleando anticuerpos marcados con metales, amplía el alcance hacia proteínas bioindicadoras [5]. Además, la incorporación de la espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS) permite altos niveles de multiplexación y análisis a alta velocidad [6].

Una ventaja adicional de esta metodología frente a los inmunoensayos es la posibilidad de cuantificación y estandarización, mediante calibraciones con gelatinas dopadas con metales, lo que garantiza comparabilidad y robustez en estudios biomédicos prolongados en el tiempo [7].

Estudios previos han aplicado esta técnica al análisis de biomarcadores como MUC-1, HER2 y MMP-11, confirmando su utilidad para diferenciar tumores metastásicos [8, 9]. En este trabajo, el objetivo fue desarrollar un ensayo multiplexado de inmunohistoquímica previo al análisis de LA-ICP-MS para investigar la presencia de FAC, a través de la proteína actina alfa de músculo liso, y la expresión de TIMP-2 en el microambiente del cáncer de mama, comparando muestras metastásicas, no metastásicas y controles sanos. Cabe destacar que este estudio es prospectivo. Las muestras fueron obtenidas a partir de biopsias sólidas de tumores no metastásicos. A continuación, los pacientes fueron monitorizados durante diez años para observar si el tumor producía metástasis o no. En caso de detectarse metástasis en ese período de tiempo, la muestra es categorizada como metastásica y si no, como no metastásica. De esta manera, en este trabajo se pretende desarrollar una metodología para predecir la metástasis en cáncer de mama.

2. Optimización de la metodología

El procedimiento de inmunohistoquímica se optimizó inicialmente para determinar la concentración adecuada de anticuerpos. Para ello, se analizaron secciones

paralelas del mismo tejido mediante LA-ICP-MS, variando la concentración de anticuerpos utilizados. Las concentraciones óptimas de ambos anticuerpos fueron elucidadas y además se demostró la reproducibilidad del protocolo de inmunohistoquímica (IHC). A continuación, el análisis multiplexado, cuyo objetivo era detectar simultáneamente TIMP-2 y α -SMA en una misma sección de tejido, se evaluó comparando imágenes obtenidas con incubación de un solo anticuerpo (para fibroblastos o para TIMP-2) frente a aquellas obtenidas con incubación doble. Las imágenes mostraron señales consistentes y distribuciones espaciales similares, lo que confirmó que el ensayo multiplexado podía realizarse de forma efectiva.

Tras la optimización del protocolo, se procedió al análisis de las muestras de tejido mamario. Sin embargo, debido a la compleja morfología de estos tejidos, fue necesario aplicar un tratamiento adicional a los datos. Con frecuencia aparecen huecos, áreas vacías, artefactos de corte o regiones irrelevantes como tejido adiposo, que deben excluirse del análisis. Para ello, se utilizó un algoritmo de segmentación *k-means* que seleccionó únicamente las áreas de alta concentración relevantes para el estudio. Los valores por debajo del umbral calculado fueron enmascarados y no se incluyeron en las calibraciones ni comparaciones. Siguiendo la metodología de Castellanos-García *et al.* [10], se aplicó *k-means* segmentando el tejido en tres categorías: fondo, baja concentración y alta concentración. En la **Figura 1**, se muestra el canal de ^{151}Eu de una muestra metastásica: se distinguen claramente el tejido epitelial (1), el portaobjetos de vidrio (2) y el tejido adiposo (3).

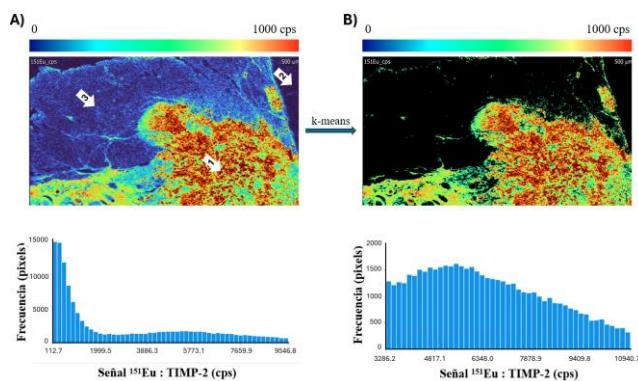


Fig. 1. Cálculo del valor umbral mediante *k-means*. A) Biodistribución cuantitativa de ^{151}Eu : TIMP-2 y su histograma. B) Biodistribución cuantitativa de ^{151}Eu : TIMP-2 y su histograma tras la segmentación. Las flechas blancas numeradas como 1, 2 y 3 corresponden al tejido epitelial, el portaobjetos de vidrio y el tejido adiposo, respectivamente.

Finalmente, para las comparaciones entre nicho tumoral y estroma, se recurrió a la tinción histológica de hematoxilina y eosina, que permitió identificar estas regiones de interés. Una vez delimitadas, se aplicó nuevamente la segmentación *k-means* solo a dichas áreas.

3. Distribución cuantitativa de fibroblastos y TIMP-2 en tejidos de mama

Se evaluó primero la distribución cualitativa de los biomarcadores en los tejidos mamarios, mostrando diferencias claras entre ellos. Los fibroblastos se identificaron mediante la expresión de α -SMA, presente tanto en fibroblastos asociados al cáncer (FAC) como en fibroblastos normales, lo que explica la señal de neodimio observada en tejidos sanos y cancerosos. Los análisis mediante LA-ICP-ToF-MS mostraron que el número de fibroblastos aumentaba de tejidos sanos a cancerosos (tanto metastásicos como no metastásicos), aunque no se encontró un cambio en la expresión de α -SMA. Este resultado sugiere que el pronóstico del cáncer no depende solo de la mayor o menor presencia de fibroblastos, sino de la expresión de ciertas proteínas por estas células.

Debido a que la expresión de α -SMA no varió entre los distintos grupos, se centró la atención en TIMP-2. La cuantificación de TIMP-2 mostró diferencias significativas entre tejidos sanos y cancerosos, aunque sin encontrarse diferencias entre el grupo no metastásico y metastásico. Al analizar los distintos estadios del cáncer, se observó una correlación positiva entre el estadio y la concentración de TIMP-2, con un aumento significativo en los estadios 2-3 respecto a los tejidos sanos. Estos hallazgos, resumidos en la **Figura 2**, coinciden con la literatura previa, que muestra que el estadio tumoral se relaciona con el pronóstico de la enfermedad.

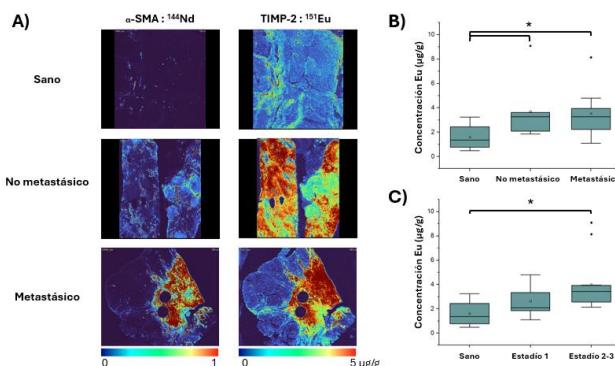


Fig. 2. Imagen de biomarcadores proteicos mediante la medida de su marcaje con lantánidos gracias a LA-ICP-MS. A) Biodistribución cuantitativa de α -SMA (^{144}Nd) y TIMP-2 (^{151}Eu) y comparación entre grupos de pacientes. B) Diferencias de concentración de TIMP-2 en grupos sanos, no metastásicos y metastásicos. C) Diferencias de concentración de TIMP-2 por estadio tumoral (1-3) frente al grupo control.

4. Sobrexpresión de TIMP-2 por FAC como nuevo biomarcador de metástasis en cáncer de mama

Para evaluar la expresión de TIMP-2 por los FAC (a través de α -SMA), las distribuciones cuantitativas obtenidas para ambas proteínas se dividieron para

generar una nueva imagen, **Figura 3A** que representa la relación α -SMA/TIMP-2 ($^{144}\text{Nd}/^{151}\text{Eu}$). La correlación entre la localización α -SMA/TIMP-2 y la presencia de fibroblastos en tejidos de cáncer de mama indica que la metodología propuesta fue efectiva para este propósito.

Como se observa en la **Figura 3B**, las muestras sanas muestran una relación de señales superior, mientras que las muestras metastásicas presentan una relación menor en comparación con las muestras no metastásicas. La cuantificación reveló que las muestras sanas (0,79 (0,43–1,38)) y no metastásicas (0,48 (0,38–0,78)) no difirieron significativamente ($p = 0,195$). Sin embargo, la relación α -SMA/TIMP-2 es significativamente menor en las muestras metastásicas (0,34 (0,29–0,57)) en comparación con las muestras sanas ($p = 0,045$) y no metastásicas ($p = 0,048$).

Como se discutió previamente, α -SMA fue similar en todos los grupos, lo que indica que la expresión de TIMP-2 por FAC es significativamente mayor en las muestras metastásicas. Aunque la disminución de esta relación fue significativa, no fue muy pronunciada. Esto puede deberse al pequeño tamaño de muestra (10 o menos, dependiendo del grupo) y al hecho de que se analizó todo el tejido en lugar de centrarse únicamente en el estroma y nicho tumoral. Estos hallazgos coinciden con la literatura existente, que ha identificado la expresión de TIMP-2 por FAC como un biomarcador de mal pronóstico en cáncer de mama. De manera similar, se ha demostrado que la expresión de TIMP-1 por FAC promueve el crecimiento y la migración de células de cáncer de mama.

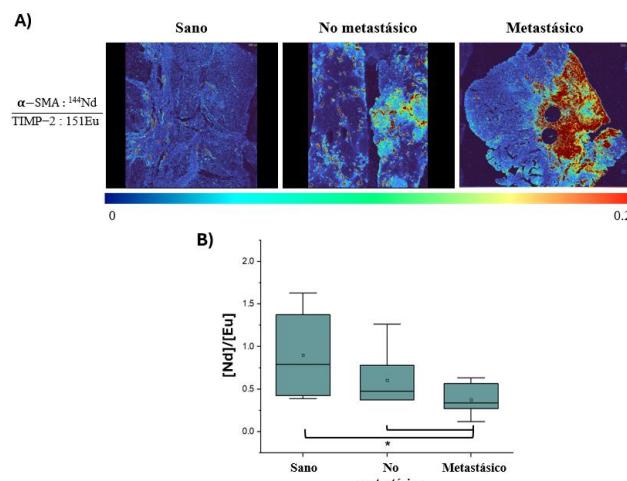


Fig. 3.Imagen de la expresión de TIMP-2 por FAC. A) Distribución de la relación α -SMA/TIMP-2 ($^{144}\text{Nd}/^{151}\text{Eu}$) en una muestra sana, no metastásica y metastásica. B) Diferencias en la relación $^{144}\text{Nd}/^{151}\text{Eu}$ en grupos sano, no metastásico y metastásico.

5. Importancia del estroma y del nicho tumoral

Se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina para identificar áreas de estroma y nicho tumoral, diferenciando regiones con alta y baja presencia de FAC.

Mediante un tratamiento de *k-means* para aislar las zonas con señal alta de FAC, se comparó la mediana de la relación α -SMA/TIMP-2 entre muestras metastásicas y no metastásicas. Los resultados mostraron que la relación es significativamente menor en las muestras metastásicas, tanto en estroma como en el nicho tumoral, lo que indica una mayor sobreexpresión de TIMP-2 por FAC en tejidos metastásicos. Los resultados se encuentran reflejados en la **Figura 4**.

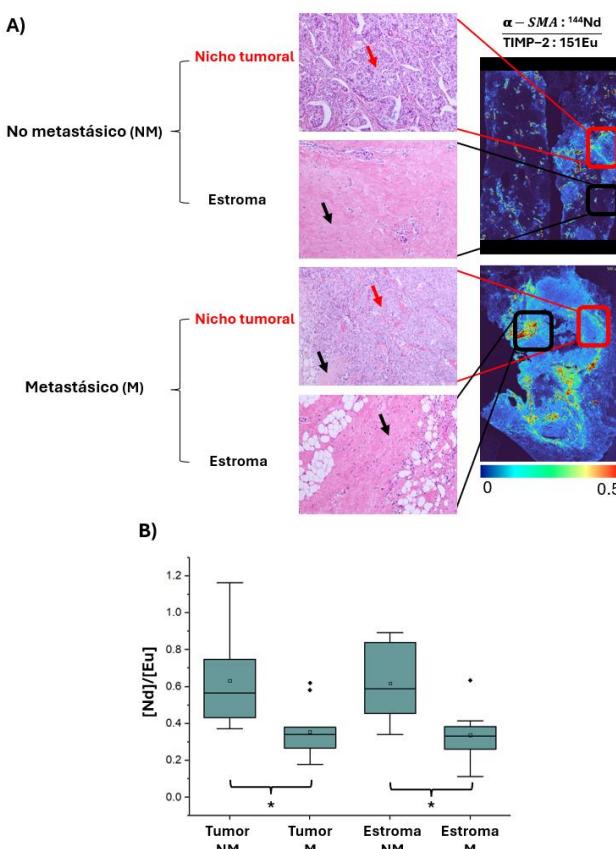


Fig. 4.Imagen de la expresión de TIMP-2 por FAC en el nicho tumoral y estroma. A) Biodistribución de la relación α -SMA/TIMP-2 ($^{144}\text{Nd}/^{151}\text{Eu}$) de una muestra no metastásica y metastásica en las zonas del nicho tumoral y del estroma. B) Diferencias en la relación α -SMA/TIMP-2 en los grupos no metastásico y metastásico, diferenciando las áreas del nicho tumoral y el estroma. Las flechas negras señalan el estroma y las flechas rojas el nicho tumoral.

Estos hallazgos refuerzan la utilidad de la sobreexpresión de TIMP-2 por FAC como biomarcador pronóstico de metástasis en cáncer de mama. También destacan la importancia de estudiar el microambiente tumoral completo y no solo las células cancerosas, lo que podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas, pronósticas y terapéuticas, como dirigir tratamientos contra FAC, macrófagos asociados al tumor o la matriz extracelular.

El estudio demuestra la efectividad de combinar LA-ICP-MS con IHC para cuantificar y predecir metástasis, incluso con un tamaño de muestra limitado, aunque

ampliarlo podría mejorar la robustez estadística de los resultados.

5. Conclusiones

Se aplicó una metodología de IHC multiplexada asistida por LA-ICP-MS para visualizar y comparar la distribución de TIMP-2 y α -SMA en tejidos de cáncer de mama y controles sanos. Este enfoque consistió en unir polímeros de lantánidos a anticuerpos específicos, incubar los tejidos con estos conjugados y analizarlos mediante LA-ICP-MS. La calibración con gelatina enriquecida y el uso de *k-means* aseguraron cuantificaciones precisas de los biomarcadores.

El estudio mostró un aumento progresivo en la dispersión de fibroblastos de tejidos sanos a no metastásicos y finalmente metastásicos, aunque no se encontraron diferencias cuantitativas tras aplicar la segmentación *k-means*. TIMP-2 se sobreexpresó significativamente en los tejidos cancerosos, incrementando su concentración con el avance del estadio tumoral.

La alta resolución espacial y la capacidad multiplex de LA-ICP-ToF-MS combinada con IHC permitieron determinar con precisión la colocalización de biomarcadores. La expresión de TIMP-2 por FAC se evaluó mediante la relación $^{144}\text{Nd}/^{151}\text{Eu}$, observándose un descenso significativo en muestras metastásicas respecto a no metastásicas y sanas. Al centrar el análisis en áreas específicas de nicho tumoral y estroma, también se confirmó que la relación α -SMA/TIMP-2 era significativamente menor en tejidos metastásicos.

Estos hallazgos sugieren que la expresión de TIMP-2 por FAC podría ser un biomarcador potencial para el pronóstico del cáncer de mama, especialmente para detectar riesgo de metástasis futura. La alta sensibilidad y resolución de LA-ICP-MS permitió una visualización detallada del microambiente tumoral y facilitó la comparación objetiva de los niveles proteicos entre grupos mediante modelos estadísticos.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad de Graz por su apoyo financiero. Este estudio contó con el apoyo del Instituto de Salud Carlos III (DTS19/00109 y PI24/01713) y cofinanciado por la Unión Europea (FEDER/FSE, "Investing in your future"), así como por el proyecto Ref. PID2022-142323NB-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por "FEDER, A way of making Europe". S.E.C. agradece al gobierno regional de Asturias la beca Severo Ochoa (PA-21-PF-BP20-067).

Referencias

- [1] L. Geneva, (2024), Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services> (Acceso noviembre 2025).
- [2] N. Eiro, L.O. González, M. Fraile, S. Cid, J. Schneider, F.J. Vizoso, Breast cancer tumor stroma: cellular components, phenotypic heterogeneity, intercellular communication, prognostic implications and therapeutic opportunities, *Cancers*, 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11050664>
- [3] A. Sadlonova, D.B. Bowe, Z. Novak, S. Mukherjee, V.E. Duncan, G.P. Page, A.R. Frost, Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron.*, 2 (2009). <https://doi.org/10.1007/s12307-008-0017-0>
- [4] N. Eiro, L. González, A. Martínez-Ordoñez, B. Fernández-García, L.O. González, S. Cid, F. Dominguez, R. Pérez-Fernández, F.J. Vizoso, Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis, *Cell. Oncol.*, 41 (2018) 369-378. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0371-y>
- [5] R. González de Vega, D. Clases D, M.L. Fernández-Sánchez, N. Eiro, L.O. González, F.J. Vizoso, P.A. Doble, A. Sanz-Medel, MMP-11 as a biomarker for metastatic breast cancer by immunohistochemical-assisted imaging mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 411 (2019) 639-646. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1365-3>
- [6] D. Clases, R. González de Vega, Facets of ICP-MS and their potential in the medical sciences—Part 2: nanomedicine, immunochemistry, mass cytometry, and bioassays, *Anal. Bioanal. Chem.*, 414 (2022) 7363-7386. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04260-8>
- [7] M.T. Westerhausen, T.E. Lockwood, R. Gonzalez de Vega, A. Röhnel, D.P. Bishop, N. Cole, P.A. Doble and D. Clases, Low background mould-prepared gelatine standards for reproducible quantification in elemental bio-imaging, *Analyst*, 144 (2019) 6881-6888. <https://doi.org/10.1039/c9an01580a>
- [8] J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, C. Murray, Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers, *Proteomics*, 8 (2008) 3775-3784. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800167>
- [9] R.G. de Vega, M.L. Fernández-Sánchez, N. Eiro, F.J. Vizoso, M. Sperling, U. Karst, A. Sanz-Medel, Multimodal laser ablation/desorption imaging analysis of Zn and MMP-11 in breast tissues, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410 (2018) 913-922. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0537-x>
- [10] L.J. Castellanos-García, S. Gokhan Elci, R.W. Vachet Reconstruction, analysis, and segmentation of LA-ICP-MS imaging data using Python for the identification of sub-organ regions in tissues, *Analyst*, 145 (2020) 3705-3712. <https://doi.org/10.1039/C9AN02472G>