

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS FORMAS
COMPLETA Y TRUNCADAS DEL ONCOGEN HER-2 EN
CÁNCER DE MAMA

MARÍA JOSÉ GARCÍA BARCHINO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 d'Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. José Manuel García Verdugo
- D. Joan Albanell Mestre
- D. José Ángel Martínez Climent
- D. Vicente José Miralles Fernández
- D. José Enrique O'Connor Blasco

Va ser dirigida per:

D^a. Ana Lluch Hernández

D^a. Rosana Sáez Pérez

©Copyright: Servei de Publicacions
María José García Barchino

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6071-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

*ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS FORMAS
COMPLETA Y TRUNCADAS DEL ONCOGÉN HER-2
EN CÁNCER DE MAMA*

TESIS DOCTORAL

María José García Barchino

Valencia, 2003

VNIVERSITAT  VALÈNCIA



Agradecimientos:

En primer lugar, quisiera agradecer toda la ayuda prestada a mis directoras de tesis.

A la Doctora Rosana Sáez Pérez, que ha dirigido los trabajos de investigación de esta Tesis Doctoral, aportando todos sus valiosos conocimientos científicos y técnicos. Asimismo quiero agradecerle de forma especial su participación en la redacción de esta Memoria.

A la Doctora Ana Lluch Hernández, que ha aportado sus conocimientos clínicos y, que mediante su previsor labor, llevó a cabo la recolección de las muestras de cáncer de mama y la recopilación de los datos clínicos en los que se basa este estudio.

A todos mis compañeros de laboratorio, los que en estos momentos están junto a mí y aquellos que lo estuvieron. Por su apoyo moral y porque fueron amigos además de compañeros.

A todo el Servicio de Oncología y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia en cuyas instalaciones se desarrolló este trabajo.

Quiero agradecer su colaboración al Laboratorio de Investigación Oncológica del Servicio de Oncología Médica del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona) y, de forma especial, al Dr. Federico Rojo por la colaboración prestada en la realización de las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas en nuestro estudio.

A todos mis amigos que aún sin entender demasiado a qué me dedicaba ni cuál era mi trabajo estuvieron siempre a mi lado.

A toda mi familia, sobre todo a mis padres que me apoyaron desde el primer momento, a mis hermanos que siempre me cuidaron por ser la menor y a mis sobrinos que saben que siempre me tendrán a su lado para cuidarles a su vez.

Por último, a aquél o aquello que me dio una segunda oportunidad.

María José

| | |
|----------------|---|
| ASCT | <i>Transplante autólogo de células progenitoras</i> |
| BSA | <i>Seroalbúmina bovina</i> |
| cDNA | <i>DNA complementario</i> |
| cm | <i>Centímetro</i> |
| dNTP | <i>Dinucleótidos trifosfato</i> |
| DTT | <i>Ditiotreitol</i> |
| EDTA | <i>Ácido etilen-diaminotetraacético</i> |
| FAC | <i>5-fluoracilo, adriamicina y ciclofosfamida</i> |
| FEC | <i>5-fluoracilo, epirubicina y ciclofosfamida</i> |
| GAPDH | <i>Gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa</i> |
| G-CSF | <i>Factor de crecimiento de granulocitos</i> |
| GM-CSF | <i>Factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos</i> |
| Kb | <i>Kilobase</i> |
| kDa | <i>Kilodaltons</i> |
| M | <i>Molar</i> |
| mA | <i>Miliamperios</i> |
| mM | <i>Milimolar</i> |
| NDF | <i>Factor de diferenciación Neu</i> |
| nm | <i>Nanómetro</i> |
| pb | <i>Pares de bases</i> |
| PBS | <i>Tampón fosfato sódico</i> |
| PCR | <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i> |
| PMSF | <i>Fenilmetilsulfonil fluoride</i> |
| r.p.m. | <i>Revoluciones por minuto</i> |
| RE | <i>Receptores de estrógenos</i> |
| RPG | <i>Receptores de progesterona</i> |
| RT | <i>Retrotranscripción</i> |
| RTK | <i>Receptor con actividad tirosina quinasa</i> |
| SDS | <i>Sodio dodecil sulfato</i> |
| SG | <i>Supervivencia global</i> |
| SLE | <i>Supervivencia libre de enfermedad</i> |
| STAMP-V | <i>ciclofosfamida, tiotepa y carboplatino</i> |
| TBE | <i>Tampón Tris-Bórico-EDTA</i> |

| | |
|--------------|--|
| TBP | <i>Proteína de unión a la caja TATA (TATA box binding protein)</i> |
| TBS | <i>Tampón Tris salino</i> |
| TBST | <i>Tampón Tris salino/Tween 20</i> |
| TEMED | <i>N,N,N',N',-Tetra-metiletilendiamina</i> |
| Tris | <i>Tris-hidroximetil-aminometano</i> |
| V | <i>Voltio</i> |
| µg | <i>Microgramo</i> |
| µl | <i>Microlitro</i> |

Índice

| | |
|--|----|
| <i>A. Introducción</i> | 7 |
| 1. <u><i>Evolución de la mama</i></u> | 7 |
| 1.1 <i>Fases del desarrollo embrionario de la mama</i> | |
| 1.2 <i>Desarrollo y anatomía normal de la glándula mamaria</i> | |
| 1.3 <i>Estructura anatómica y funcional de la glándula mamaria</i> | |
| 2. <u><i>Patología de la glándula mamaria</i></u> | 15 |
| 2.1 <i>Etiopatología del cáncer de mama</i> | 17 |
| 2.1.1 <i>Niveles de estrógenos</i> | |
| 2.1.2 <i>Edad de la menarquia</i> | |
| 2.1.3 <i>Menopausia</i> | |
| 2.1.4 <i>El peso</i> | |
| 2.1.5 <i>Actividad física</i> | |
| 2.1.6 <i>Lactancia</i> | |
| 2.1.7 <i>Embarazo</i> | |
| 2.1.8 <i>Terapias hormonales sustitutivas</i> | |
| 2.1.9 <i>Uso de anticonceptivos orales</i> | |
| 2.1.10 <i>Historia familiar y predisposición hereditaria</i> | |
| 2.1.11 <i>Dieta</i> | |
| 2.1.12 <i>Pesticidas xenobióticos</i> | |
| 3. <u><i>Patología molecular del cáncer de mama</i></u> | 22 |
| 3.1 <i>Cáncer de mama hereditario</i> | 22 |
| 3.1.1 <i>BRCA1</i> | |
| 3.1.2 <i>BRCA2</i> | |
| 3.1.3 <i>p53</i> | |
| 3.1.4 <i>ATM</i> | |
| 3.1.5 <i>PTEN</i> | |
| 3.1.6 <i>Polimorfismos génicos</i> | |
| 3.2 <i>Cáncer de mama esporádico</i> | 26 |
| 3.3 <i>Regulación del ciclo celular y cáncer de mama</i> | 27 |
| 3.4 <i>Factores de crecimiento y cáncer de mama</i> | 29 |

| | | |
|------------------------------|---|----|
| 3.4.1 | <i>Receptores de membrana con actividad tirosina quinasa: la familia HER</i> | |
| 3.4.2 | <i>El papel de la familia HER en el desarrollo embrionario</i> | |
| 3.4.3 | <i>La activación de los receptores de la familia HER</i> | |
| 3.4.4 | <i>La unión del ligando a los receptores HER</i> | |
| 3.4.5 | <i>La señalización activada por HER-2</i> | |
| 3.4.6 | <i>La importancia de HER-2 en el tratamiento del cáncer por inmunoterapia</i> | |
| 3.4.7 | <i>La degradación de HER-2</i> | |
| 3.4.8 | <i>Implicaciones terapéuticas derivadas de la biología de HER-2 en cáncer de mama</i> | |
| 3.5 | <i>Formas truncadas de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa.</i> | 39 |
| 3.6 | <i>Vías de transducción de señal</i> | 42 |
| 3.6.1 | <i>Receptores proteicos con actividad tirosina quinasa</i> | |
| 3.6.2 | <i>Etapas de la activación</i> | |
| 3.6.3 | <i>La vía de transducción de señal MAP quinasa</i> | |
| 3.6.4 | <i>La vía de transducción de señal PI3K/AKT</i> | |
| 3.6.4.1 | <i>Implicaciones de AKT en carcinogénesis</i> | |
| 3.6.4.2 | <i>AKT promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis</i> | |
| B. Objetivos | | 55 |
| C. Material y métodos | | 59 |
| 1. | <u>Muestras biológicas</u> | 59 |
| 1.1 | <i>Muestras tumorales</i> | 59 |
| 1.2 | <i>Líneas celulares</i> | 65 |
| 2. | <u>Metodología</u> | 66 |
| 2.1 | <i>Estudio de la expresión génica mediante experimentos de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)</i> | 66 |
| 2.1.1 | <i>Extracción de RNA total</i> | |
| 2.1.2 | <i>Experimentos de RT-PCR</i> | |
| 2.2 | <i>Determinación de la expresión proteica mediante transferencia Western</i> | 71 |
| 2.2.1 | <i>Obtención del extracto proteico de las líneas celulares empleadas como control de expresión</i> | |
| 2.2.1 | <i>Obtención del extracto proteico de los tumores primarios</i> | |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2.2 | Electroforesis en geles de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) | |
| 2.2.3 | Transferencia electroforética e inmunodetección ("Western blotting") | |
| 2.2.4 | Análisis densitométrico | |
| 2.3 | Determinación de la expresión proteica y localización subcelular mediante técnicas inmunohistoquímica | 79 |
| 2.4 | Análisis estadísticos | 83 |
| 2.4.1 | Recogida de datos | |
| 2.4.2 | Análisis de datos | |

D. Resultados87

1. Caracterización de la expresión de $HER-2$ en tumores primarios87

- 1.1. Estudio del nivel de expresión del receptor $HER-2$ en tumores primarios de mama
- 1.2. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ y $p185^{HER-2}$ con el grado de afectación ganglionar
- 1.3. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ y la afectación ganglionar en el grupo de pacientes con sobreexpresión de $p185^{HER-2}$
- 1.4. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ y $p185^{HER-2}$ con otros factores pronósticos en cáncer de mama
- 1.5. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ y la sobreexpresión de $p185^{HER-2}$ en las metástasis ganglionares

2. Estudio del valor pronóstico de $p95^{HER-2}$ en cáncer de mama102

- 2.1. Características de las pacientes
- 2.2. Estudio de la asociación de $p95^{HER-2}$ y $p185^{HER-2}$ con otros factores de riesgo en cáncer de mama
- 2.3. Estudio de la asociación/relación de $p95^{HER-2}$, $p185^{HER-2}$ y otros factores pronósticos con la evolución clínica de las pacientes
 - 2.3.1. Análisis univariado
- 2.4. Estudio de la asociación entre la expresión de $p95^{HER-2}$ y $p185^{HER-2}$ con la evolución clínica del grupo de pacientes con menos de cuatro ganglios metastatizados
 - 2.4.1. Análisis multivariado

3. Estudio de la expresión de la forma truncada de HER-2 , $\text{p100}^{\text{HER-2}}$, en cáncer de mama114
 - 3.1. Estudio de la expresión de la forma completa del receptor HER-2 , $\text{p185}^{\text{HER-2}}$, y de la forma truncada, $\text{p100}^{\text{HER-2}}$, en tumores primarios de mama
 - 3.2. Estudio de la relación entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 , $\text{p100}^{\text{HER-2}}$, con la afectación ganglionar en cáncer de mama
 - 3.3. Estudio de la relación entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 , $\text{p100}^{\text{HER-2}}$, con otros factores pronósticos implicados en cáncer de mama

4. Estudio del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina en tumores primarios de mama125
 - 4.1. Análisis del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama mediante técnicas de RT-PCR
 - 4.2. Estudio del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina y su localización subcelular en cáncer de mama
 - 4.3. Estudio de la asociación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y del receptor HER-2 en cáncer de mama
 - 4.4. Estudio de la relación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina con factores pronósticos en cáncer de mama

5. Estudio del estado de activación del receptor HER-2 en cáncer de mama..136
 - 5.1. Estudio del nivel de fosforilación del receptor HER-2 en tumores primarios de mama mediante técnicas inmunohistoquímicas
 - 5.2. Estudio del estado de activación de las formas completa, $\text{p185}^{\text{HER-2}}$ y truncada, $\text{p95}^{\text{HER-2}}$, del receptor HER-2 mediante técnicas de Western blot en cáncer de mama
 - 5.3. Estudio de la relación entre la fosforilación de las formas completa y truncada del receptor HER-2 con la expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama
 - 5.4. Estudio de la relación entre los niveles de fosforilación de $\text{p185}^{\text{HER-2}}$ y $\text{p95}^{\text{HER-2}}$ con el grado de afectación ganglionar en cáncer de mama
 - 5.5. Estudio de la relación existente entre los niveles de fosforilación de la forma completa, $\text{p185}^{\text{HER-2}}$ y truncada, $\text{p95}^{\text{HER-2}}$, del receptor HER-2 con factores pronósticos en cáncer de mama

| | |
|---|-----|
| 6. <u>Estudio de la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama</u> | 149 |
| 6.1. Estudio de los niveles de activación de MAPK en cáncer de mama | |
| 6.2. Estudio de la relación existente entre la activación de MAPK y la fosforilación del receptor HER-2 en cáncer de mama | |
| 6.3. Estudio de la relación entre la activación de MAPK y los niveles de expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama | |
| 6.4. Estudio de la relación entre la activación de MAPK y el grado de afectación ganglionar en cáncer de mama | |
| 6.5. Estudio de la relación entre la activación de MAPK y otros factores pronósticos en cáncer de mama | |
| 7. <u>Estudio de la activación de la vía de señalización PI3-K/Akt en cáncer de mama</u> | 163 |
| 7.1. Estudio de la expresión de Akt en cáncer de mama | |
| 7.2. Estudio del estado de activación de Akt en cáncer de mama | |
| 7.3. Estudio de la relación entre la expresión y estado de activación de Akt con la activación de HER-2 en cáncer de mama | |
| 7.4. Relación entre la activación de Akt y la expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama | |
| 7.5. Estudio de la relación entre la activación de Akt y el grado de afectación ganglionar en cáncer de mama | |
| 7.6. Estudio de la relación entre la activación de Akt y otros factores pronósticos en cáncer de mama | |
| 8. <u>Caracterización de la expresión de HER-2 y su implicación en la activación de las vías de transducción de señal mitógena en cáncer de mama de alto riesgo</u> | 181 |
| 8.1. Estudio de la expresión de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo | |
| 8.2. Estudio del estado de activación de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo | |
| 8.3. Estudio de la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama de alto riesgo | |

8.4. *Estudio de la activación de la vía de señalización PI-3K/Akt en cáncer de mama de alto riesgo*

8.5. *Estudio comparativo de los niveles de activación de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo y cáncer de mama en pacientes sin afectación ganglionar*

E. Discusión.....205

1. *Caracterización de la expresión de HER-2 en tumores primarios de mama*
2. *Estudio del valor pronóstico de p95^{HER-2} en cáncer de mama*
3. *Estudio de la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, en cáncer de mama*
4. *Estudio del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina en tumores primarios de mama*
5. *Estudio del estado de activación del receptor HER-2 en cáncer de mama*
6. *Estudio de la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama*
7. *Estudio de la activación de la vía de señalización PI-3K/Akt en cáncer de mama*
8. *Caracterización de la expresión de HER-2 y su implicación en la activación de las vías de transducción de la señal mitógena en cáncer de mama de alto riesgo*

F. Conclusiones251

G. Referencias261

A. Introducción

A. Introducción

1. Evolución de la glándula mamaria

Los cambios estructurales y morfológicos que experimenta la glándula mamaria a lo largo de la vida se extienden desde el nacimiento hasta el envejecimiento, siendo su razón básica las variaciones en las acciones hormonales sobre la glándula.

Las hormonas responsables del desarrollo mamario y de sus continuas modificaciones funcionales son los estrógenos, progesterona, prolactina y somatotropina hipofisaria. El desarrollo normal de este órgano depende directamente de la acción sinérgica de tres grandes grupos hormonales, estrógenos, somatotropina y las hormonas adrenales. Por su parte, prolactina y progesterona son esenciales para el desarrollo funcional y la secreción láctea.

El efecto de los estrógenos sobre su órgano diana está mediatizado por los receptores hormonales, siendo de gran trascendencia conocer los niveles de los mismos en el tejido mamario. Estos niveles varían enormemente en cada mujer, siendo esencial en sus variaciones el factor paridad y el tiempo que ha transcurrido desde el embarazo hasta su determinación.

La glándula mamaria es un órgano reproductor de carácter dinámico y activo, cuyos elementos responden cíclicamente. En su evolución se pueden distinguir diferentes momentos:

1. Desarrollo mamario o etapa mamotrófica
2. Iniciación de la secreción láctea o lactogénesis
3. Mantenimiento de la secreción láctea o galactogénesis
4. Eyección láctea

1.1 Fases del desarrollo embrionario de la glándula mamaria

El desarrollo de la glándula mamaria es el resultado de la participación de numerosos factores, entre los que destacan los determinantes genéticos, los elementos dietarios o nutricionales, los factores hormonales y las influencias del sistema nervioso.

La glándula mamaria deriva embriológicamente del ectodermo. El primordio mamario aparece hacia la cuarta semana de vida intrauterina de un embrión de 8 mm. En la sexta semana, varios engrosamientos mamarios, aproximadamente 8, se sitúan a ambos lados de la línea media extendiéndose desde la región axilar hasta la línea inguinal. Son los primordios mamarios. Al quinto mes de vida fetal, solo el primordio torácico, el cuarto, permanece mientras que el resto sufre una involución desapareciendo posteriormente. En la superficie profunda de la cresta mamaria se originan de 15 a 25 crecimientos epiteliales que se colocan a su alrededor ramificándose y formando los más primitivos conductos lactíferos.

1.2 Desarrollo y anatomía normal de la glándula mamaria

La mama adulta normal se compone de una mezcla de elementos de carácter epitelial y otros elementos que forman el estroma. Por una parte, los elementos considerados epiteliales constituyen una serie de conductos de aspecto arbóreo denominados ductos que conectan entre sí las unidades estructurales y funcionales de la mama, es decir, conectan los lobulillos con el pezón.

Por otra, parte el estroma se compone de cantidades variables de tejido adiposo y de tejido conectivo, y comporta la mayor parte del volumen mamario en la etapa de no lactancia.

Las fases del desarrollo de la glándula mamaria son las siguientes:

1. En el momento del nacimiento la fracción epitelial de la mama se compone de unas escasas y rudimentarias estructuras ductales poco ramificadas.

2. Durante la etapa previa a la pubertad, se produce un crecimiento lento pero progresivo de estas ramificaciones. En el varón el desarrollo mamario se detiene en esta etapa.
3. En la pubertad, se produce un desarrollo de la ramificación y el crecimiento de los elementos ductales y tiene lugar simultáneamente un aumento del estroma.
4. En la etapa posterior a la pubertad las estructuras ductales terminales dan lugar a unos sáculos denominados acinos, mientras que el volumen mamario sigue aumentando debido al incremento del estroma.
5. Durante el embarazo, a partir de cada uno de los acinos, se desarrollan multitud de glándulas secretoras. Al finalizar el embarazo la fracción glandular se ha incrementado, hasta el punto de que el componente mayoritario de la mama sea ahora el epitelial, mientras que el estroma ha quedado relegado a un segundo término. Este cambio persiste durante la etapa de lactancia.
6. En la etapa posterior al amamantamiento se produce una atrofia de la glándula mamaria con la consiguiente disminución de su tamaño. El estroma incrementa su presencia y la fracción epitelial no revierte por completo, sino que el componente glandular sigue predominando, si lo comparamos con la mama previa al embarazo.
7. Después de la menopausia se produce la atrofia de la fracción glandular y una disminución del número de lobulillos, llegando éstos a desaparecer por completo en algunas áreas de la mama. También disminuye el tejido conectivo fibroso, que forma parte del estroma mientras que la fracción adiposa se incrementa.

1.3 Estructura anatómica y funcional de la glándula mamaria

La glándula mamaria ocupa el tercio medio de cada hemipared anterior del tórax. La forma, dimensión y tamaño glandular varía enormemente en cada mujer, edad y raza. Está constituida, fundamentalmente, por tejido conectivo-epitelial que se comporta esencialmente como un receptor hormonal. Así, es exquisitamente sensible a las variaciones de los niveles hormonales circulantes en el organismo femenino, no está solamente supeditada a los esteroides más importantes, fundamentalmente estrógenos y progesterona, sino que responde a muchas otras sustancias tales como factores locales de crecimiento y hormonas andrógenas.

Empleando animales de experimentación se ha demostrado que los estrógenos son responsables de la proliferación de los ductos lactíferos, con crecimiento de los túbulos y estimulación de los alvéolos. Sin embargo, a grandes dosis, esta hormona produce dilatación tubular, formación quística y marcada hiperplasia epitelial. La inyección de estrógenos aumenta la concentración de muco polisacáridos ácidos en el tejido conectivo, particularmente de ácido hialurónico. Esta sustancia juega un importante papel en la constitución de las distrofias mamarias y, además, produce alteraciones de la permeabilidad capilar del tejido mamario.

Los elementos internos que constituyen la glándula mamaria son esencialmente tejido conectivo, aparentemente de soporte pero biológicamente activo, tejido glandular epitelial, la estructura más dinámica del órgano y tejido graso.

El cuerpo glandular está rodeado por una cápsula de tejido conectivo, llamado ligamento suspensor de Cooper, que rodea la parte anterior. Este ligamento se sitúa entre la fascia superficial que separa la glándula mamaria del tejido subcutáneo y el tejido glandular. Dependencias fibrosas del mismo ligamento de Cooper se orientan de forma perpendicular a la piel formando las crestas mamarias de Duret.

El tejido adiposo es abundante y forma dos estratos. Una capa anterior, preglandular, interrumpida en la zona retroalveolar por el paso de los conductos y una capa de grasa posterior más fina.

La superficie posterior es plana, la anterior convexa-cónica e irregular donde emerge el pezón centralmente. Los ductos mamarios se ramifican hasta terminar en los acinos secretores. A cada conducto lactífero principal corresponde un lóbulo mamario que a su vez se subdivide en lobulillos. La estructura básica se compone de 15-25 lobulillos rodeados de tejido graso y conectivo. Por su parte posterior la glándula mamaria descansa sobre la fascia superficial. La bolsa retromamaria de Chassaignac, de tejido graso, es el estrato celular situado entre la fascia superficial y el pectoral mamario y serrato anterior.

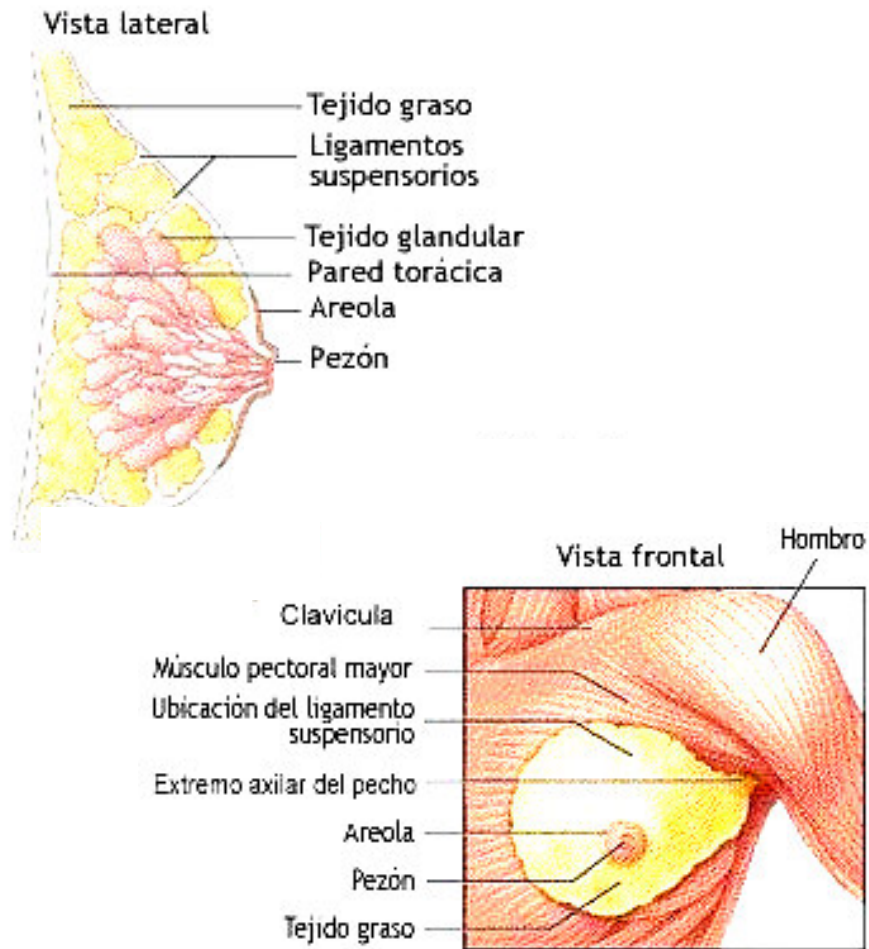
La glándula mamaria propiamente dicha corresponde a la estructura de acinos y conductos, elementos secretores y excretores. La unidad histológica es el conducto galactóforo epitelial o el ducto terminal del lóbulo. Está formado por una capa epitelial simple cilíndrico-cúbica formada por las células ductales galactofóricas situadas en la luz interna y que descansan sobre una membrana basal. De su constitución también forma parte la capa externa de las células mioepiteliales.

Este sistema canicular está rodeado de tejido conectivo en el que puede diferenciarse el tejido intersticial y el tejido conjuntivo interlobulillar o específico que responde a los mensajes hormonales.

En la siguiente Figura se ilustra la estructura interna de la glándula mamaria.

FIGURA 1. Estructura anatómica de la glándula mamaria

La glándula mamaria



Esta ilustración muestra un corte anatómico transversal, lateral y frontal de la glándula mamaria femenina.

Por otra parte, la irrigación arterial de la glándula es compleja y se distribuye de la siguiente forma:

1. Arteria mamaria interna, es el aporte arterial más importante
2. Arterias intercostales
3. Arteria axilar

El drenaje venoso de la glándula es paralelo a la red arterial. Es importante conocer su distribución por ser la vía más frecuente de metástasis.

I. Red subcutánea superficial.

II. Red profunda:

1. ramos venosos perforantes
2. venas tributarias de la vena axilar
3. venas intercostales

El drenaje linfático forma en este caso dos planos:

1. Plano profundo o plexo aponeurótico o linfáticos principales del parénquima mamario. Drena la zona lateral mamaria de los músculos pectorales y ganglio interpectoral de Rotter para dirigirse a continuación a la axila.

En la axila existen de 10 a 30 nódulos linfáticos distribuidos en 5 grupos:

- lateral o de la vena axilar
- pectoral o grupo lateral torácico
- subescapular
- central
- subclavicular o apical

Existe un drenaje inferior o submamario que llega a los ganglios infraclaviculares y linfáticos de la mama opuesta. Al confluir estos conductos linfáticos llegan a determinar un retículo periférico a los lobulillo de los que nacen troncos linfáticos que van a drenar los colectores principales de la glándula que son los siguientes:

1.1. Sistema axilar: es el principal colector linfático de la glándula. Los trayectos linfáticos, en forma de troncos, se dirigen a la axila recorriendo la mama en dirección a su prolongación axilar, allí rodean el pectoral mayor y desembocan en los grupos ganglionares de la axila.

1.2. Cadena mamaria interna: drena los cuadrantes internos de la glándula, pero no de manera exclusiva. Los troncos linfáticos penetran a través de la aponeurosis pectoral y músculo pectoral mayor y hacía la línea media hasta alcanzar los espacios intercostales y, posteriormente, los ganglios mamarios internos. Estos últimos ganglios se extienden desde el quinto espacio intercostal hasta la confluente yugulo-subclavio hacia arriba.

1.3. Vías accesorias:

- vía interpectoral
- drenaje contralateral: puede hacerse evidente en caso de neoplasias avanzadas
- drenaje supraclavicular directo
- drenaje linfático hacia los ganglios intercostales posteriores

2. Plexo areolar. Recoge el drenaje linfático procedente de la parte central de la glándula, piel, pezón y areola. Drena a los ganglios axilares inferiores, hacia fuera y a los nódulos paraesternales hacia dentro.

2. Patología de la glándula mamaria

Más del 95% de las neoplasias mamarias derivan de los componentes epiteliales de la mama. Se consideran carcinomas y se denominan, específicamente, adenocarcinomas. Sin embargo, dentro de este término se engloban diversos tipos de lesiones que poseen diferentes aspectos microscópicos y comportamientos (Rosen et al., 1979).

Siguiendo estos criterios los carcinomas mamarios pueden subdividirse en dos grandes grupos:

- El cáncer de mama no invasivo (*in situ*). Cuando las células tumorales permanecen confinadas en la estructura ductal, en el lóbulo o no presenta una imagen microscópica que induzca a pensar en una invasión del estroma. Este tipo de lesiones se subdividen, a su vez, en:
 - carcinoma ductal *in situ* o carcinoma intraductal
 - carcinoma lobular *in situ*

Ambos tipos de lesiones difieren en sus características clínicas, morfología y en su comportamiento biológico. Por ejemplo, mientras la apariencia microscópica del carcinoma lobular es estereotípica, el aspecto histológico de las lesiones de tipo ductal es muy heterogéneo. Esta heterogeneidad no se debe solamente a la morfología, sino también respecto a los marcadores biológicos presentes en los carcinomas ductales *in situ*.

- El cáncer de mama invasivo. Éste también comprende un amplio número de lesiones muy heterogéneas entre las que cabe destacar, por ser la más frecuente, el carcinoma ductal infiltrante. Se trata, con frecuencia, de tumores sólidos, de color grisáceo, constituyendo masas areniscas que invaden el tejido circundante. Desde el punto de vista microscópico, y basándose en una serie de características morfo-citológicas, los carcinomas ductales infiltrantes se dividen en tres categorías:

- bien diferenciado o grado I
- moderadamente diferenciado o grado II
- poco diferenciado o grado III

El significado pronóstico de esta gradación está ampliamente documentado por diversos estudios clínicos. Aproximadamente un 20% de los carcinomas mamarios invasivos se consideran de características especiales.

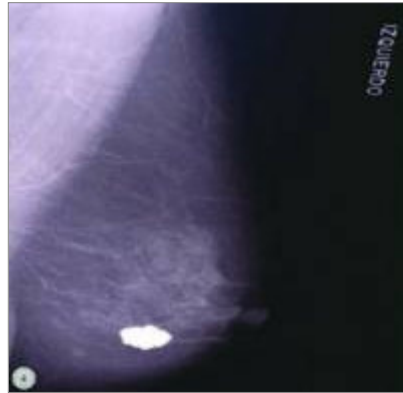
Por otra parte, los carcinomas lobulares de tipo infiltrante son menos frecuentes que los de tipo ductal. Estos tumores se presentan con frecuencia de forma bilateral y son a menudo multicéntricos. Mientras algunos autores postulan que el pronóstico de ambos tipos de lesiones invasivas es similar, otros especulan que los casos de carcinoma lobular infiltrante poseen un pronóstico más favorable (Rosen et al., 1979).

Otras variantes de carcinoma de mama invasivo, entre las que se ubican el mucinoso (coloidal), el tubular y, por último, el papilar poseen mejor pronóstico que los carcinomas ductales infiltrantes. Los carcinomas medulares son pronósticamente más favorables que los carcinomas ductales infiltrantes con escasa diferenciación (grado III). Las variantes más inusuales de cáncer de mama invasivo son los carcinomas metaplásicos y los carcinomas quísticos adenoides.

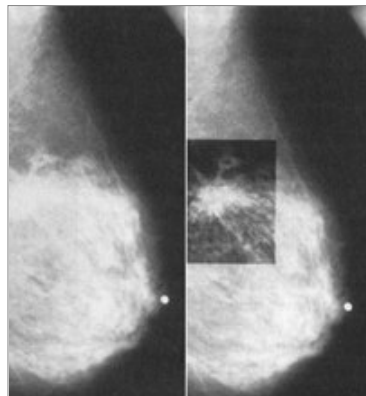
Existen algunas características histológicas del cáncer de mama que han sido relacionadas con un peor pronóstico. Entre éstas destacan el grado histológico y la afectación ganglionar.

En la siguiente Figura se representan algunas imágenes mamográficas de alteraciones benignas y patológicas de la glándula mamaria.

FIGURA 2. Imágenes mamográficas de alteraciones de la glándula mamaria



**Fibroadenoma de mama
calcificado**



Cáncer de mama



Ejemplos de estudios mamográficos de la glándula mamaria

2.1. Etiopatología del cáncer de mama

El cáncer se caracteriza por el desarrollo de procesos tumorales malignos y se ha convertido en una de las causas más frecuentes de mortalidad. Posee una perspectiva global de curación del 50% que depende de múltiples factores. En la última década la incidencia del cáncer ha crecido hasta convertirse en la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades coronarias (Parkin et al., 1984).

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en la mujer y supone en sí mismo el 20% de todos los cánceres de la mujer, tiene además una alta prevalencia ya que se estima que en España se detectan unos 16.000 nuevos casos al año, siendo así la causa de muerte más frecuente en mujeres de entre 25 a 45 años (Wingo et al., 1995).

Tradicionalmente el desarrollo del cáncer se ha asociado a la exposición a agentes químicos o víricos. Sin embargo, también los factores de crecimiento o las hormonas, ya sean estas endógenas o exógenas, actúan promoviendo la división celular lo que incrementa la posibilidad de que aparezcan mutaciones debidas al azar. Este es el caso de algunos tipos de cáncer de mama, del cáncer de tiroides, ovario, próstata, endometrio, testículo y algún sarcoma óseo (Bitnner et al., 1947; Rosen et al., 1979)

En general, la aparición de un fenotipo maligno depende de una serie de mutaciones somáticas que tienen lugar durante la división celular. En el caso del cáncer de mama existen multitud de genes susceptibles de sufrir estas alteraciones. Entre éstos se identifican los genes que participan en la regulación endocrina, aquellos implicados en la reparación del DNA, genes supresores de tumores y, por último, los oncogenes. Existen, además, factores de riesgo y, en contraposición, factores preventivos que deben ser tenidos en cuenta en la valoración del cáncer de mama (Spencer y Henderson, 2001)

2.1.1. Niveles de estrógenos

Son muchos los estudios llevados a cabo que han permitido correlacionar los elevados niveles de estrógenos en sangre con el desarrollo de cáncer de mama. Esta correlación se encuentra, además, asociada con la edad de manera que el riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa con la edad. A mayor edad el epitelio mamario ha estado expuesto durante más tiempo a las hormonas. Estos niveles hormonales caen radicalmente tras la menopausia pero, aún así, se ha comprobado que aquellas mujeres que padecen cáncer de mama después de la menopausia poseen unos niveles de estrógenos superiores a los de la media de su edad (Henderson et al., 1982,1988; Key et al., 1988).

2.1.2. Edad de la menarquia

Los estudios llevados a cabo en adolescentes han demostrado que el riesgo de padecer cáncer de mama decrece en un 20% por cada uno de los años en que se retrasa la menarquia. Ésta es más tardía si se practica deporte y es más temprana en las sociedades occidentales que en las orientales (Ferguson et al., 1981; Frisch et al., 1981; Kaprio et al., 1995).

2.1.3. Menopausia

Una menarquia temprana asociada a una menopausia tardía incrementa el número de ciclos ovulatorios y por lo tanto el tiempo en el que la mujer está expuesta a elevados niveles de estrógenos. Siguiendo este criterio, las mujeres cuya menopausia tiene lugar a una edad inferior a 45 años poseen un 50% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas cuya menopausia tiene lugar después de los 55 años (Trichopoulos et al., 1972).

2.1.4. El peso

Este es un factor cuyo efecto varía en función del estado menopáusico de la mujer. En este sentido, en la mujer postmenopáusica un incremento de 10 kilos sobre su peso óptimo, calculado en función de su edad, estatura y constitución física, incrementa en un 80% el riesgo de padecer cáncer de mama. Se estima que ello se debe a las transformaciones químicas que sufren los lípidos endógenos, dando lugar a un aumento de los niveles de estrógenos circulantes. En cambio, en las mujeres premenopáusicas el efecto del sobrepeso es más contradictorio. En ocasiones se ha llegado a considerar este factor como beneficioso. Así, el sobrepeso se asocia con frecuencia a ciclos anaovulatorios, por lo que los niveles de estrógenos son menores a los correspondientes a su media de edad, con lo que se reduce la posibilidad de desarrollar cáncer de mama (Willett et al., 1985).

2.1.5. Actividad física

En general, los estudios realizados indican que el ejercicio físico reduce el riesgo de padecer cáncer de mama, sobre todo en adolescentes y en la mujer postmenopáusica. Sin embargo, es este un factor difícil de tener en cuenta, ya que el tipo de actividad física y el grado de desarrollo de la misma son aspectos que alteran la respuesta. Por otra parte, en el grupo de edad intermedia no se ha podido encontrar ningún beneficio en el desarrollo de alguna actividad física con el fin de reducir el riesgo de padecer cáncer de mama (Bullen et al., 1985).

2.1.6. Lactancia

Una lactancia más duradera acarrea un menor riesgo de padecer cáncer de mama debido a que ésta es una etapa anaovulatoria en la que los niveles de estrógenos son reducidos y por lo tanto el desarrollo tumoral no está favorecido (Romieu et al., 1996).

2.1.7. Embarazo

También la edad del primer embarazo, así como el tiempo que transcurre entre embarazos altera la susceptibilidad de padecer cáncer de mama. En este sentido, se ha observado que las madres primerizas a una edad inferior a 20 años tienen la mitad de riesgo de padecer una patología mamaria que las primerizas a edades más tardías. El riesgo es aún mayor en las primíparas mayores de 30 años. Las probabilidades de padecer cáncer de mama se triplican en las mujeres cuyos embarazos son muy sucesivos, al igual que ocurre con las mujeres que sufren sucesivos abortos durante el primer trimestre de gestación, debido a las frecuentes oscilaciones hormonales (Wingo et al., 1997).

2.1.8. Terapias hormonales sustitutivas

Estos tratamientos, aplicados con el fin de reducir los efectos de la menopausia, han demostrado poseer efectos secundarios que incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama. Los tratamientos hormonales suministrados hasta ahora trataban de restablecer

los niveles de estrógenos. Debido a ello, el riesgo de padecer cáncer de mama se incrementaba 2,5 veces por cada uno de los años en que se había seguido este tratamiento. En la actualidad se emplean tratamientos hormonales combinados, de manera que se ha logrado disminuir el riesgo ocasionado por los estrógenos (Laya et al., 1996).

2.1.9. Uso de anticonceptivos orales

Los macroestudios llevados a cabo sobre este tipo de anticonceptivos no han demostrado que exista una correlación entre el desarrollo de una patología mamaria y la edad en la cual se inicia la toma de anticonceptivos. Tampoco existe relación con el tiempo durante el que se toman éstos (Feigelson et al., 1999).

2.1.10. Historia familiar y predisposición hereditaria

Una historia familiar en la que exista un caso de cáncer de mama incrementa el riesgo de padecer la enfermedad. Éste es aún mayor en el caso de que esta pariente sea de primer grado, haya sufrido la enfermedad muy joven, además de haberla padecido de forma bilateral (Feigelson et al., 1996).

En muy pocas ocasiones este tipo de cánceres hereditarios está ocasionado por una única mutación génica. Sin embargo, las mutaciones germinales de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, junto con las de *p53* y las del gen *ATM*, han demostrado ser frecuentes en este tipo de patología. El cáncer hereditario representa el 10% de los cánceres de mama y se ha especulado que es la combinación de factores genéticos y ambientales la que altera la penetrancia y expresión de este tipo de genes, que se estudian con más detalle con posterioridad (Easton et al., 1993).

2.1.11. Dieta

Los múltiples estudios llevados a cabo sobre este aspecto han demostrado la existencia de una relación entre la alimentación y el desarrollo del cáncer. En el caso del cáncer de mama se ha observado que existe una correlación positiva entre la ingesta de grasas y la

predisposición a padecer la enfermedad. También se correlaciona con el consumo de alcohol, ya que éste incrementa los niveles plasmáticos de estrógenos. Por el contrario, el consumo de fibra resulta beneficioso al reducir la reabsorción de los estrógenos liberados por la vesícula biliar. En la actualidad, se están valorando los beneficios del consumo de soja, y más concretamente de los fitoestrógenos que contiene, se especula que actúan como antagonistas de los estrógenos endógenos (Armstrong et al., 1975; Heber et al., 1991).

2.1.12. Pesticidas xenobióticos

En contraposición a lo que ocurre con los fitoestrógenos, los xenobióticos, o estrógenos ambientales (pesticidas), se consideran agonistas de los estrógenos endógenos, por lo que incrementan el riesgo de padecer patologías mamarias (Ramamoorthy et al., 1997).

3. Patología molecular del cáncer de mama

Al estudiar la patología molecular del cáncer de mama hay que diferenciar claramente dos tipos de causas. Así, podemos distinguir entre el cáncer de mama en cuyo origen subyace una predisposición genética y aquellos que se desarrollan de forma esporádica (Hibshoosh y Lattes , 1997).

3.1. Cáncer de mama hereditario

El cáncer de mama hereditario representa aproximadamente un 10% del total de las patologías de mama. Éste engloba el síndrome de cáncer de mama y ovario, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Cowden y la ataxia telangiectasia (AT) (Dillon et al., 1998).

Los genes más comúnmente asociados a este tipo de síndromes son las alteraciones de *BRCA1* y *BRCA2*, las mutaciones germinales de *p53*, las del gen *ATM* y *PTEN* además de múltiples polimorfismos.

3.1.1. *BRCA1*

Se trata de un gen mapeado en el cromosoma 17 (17q21). Está compuesto por 24 exones que codifican para una proteína de 1863 aminoácidos. El hecho de que el dominio N-terminal de la proteína posea una estructura en dedos de zinc hace suponer que es un factor transcripcional. Por el contrario, el dominio C-terminal de la proteína contiene, por una parte, una región con carga negativa que participa en la regulación de la expresión génica y otra región de unión a Rad51, una proteína de reparación del DNA.

En estado nativo *BRCA1* es una proteína nuclear cuya expresión es frecuente en tejidos con respuesta hormonal como es el caso de ovario, timo, testículo y mama. La proteína *BRCA1* inhibe la progresión del ciclo celular inhibiendo la quinasa dependiente de ciclinas p21^{waf1} e interaccionando con *BRCA2*, c-Myc, γ -tubulina y la RNA helicasa A.

Se han descrito más de 500 mutaciones diferentes del gen *BRCA1* que en un 80% de los casos suponen la aparición de un codón de parada, lo que da lugar a una proteína de menor tamaño, no funcional (Claus et al., 1991).

3.1.2. *BRCA2*

Este gen está localizado en el cromosoma 13 (13q12-q13). Su secuencia fue conocida por completo en 1996 y se trata de un gen de 70kb, compuesto de 27 exones, que codifica una proteína de 3418 aminoácidos. Esta proteína nuclear se une a Rad51 junto con *BRCA1* y una acetiltransferasa de histonas, capaz de relajar la cromatina, facilitando la transcripción. De estas observaciones se deduce que ambos genes participan en fenómenos de reparación de los posibles errores presentes en el DNA de doble cadena. La expresión del gen *BRCA2* es muy elevada en la mama y el timo, siendo ésta menor en el ovario, pulmón y bazo.

En el caso de *BRCA2* también se han encontrado multitud de mutaciones y el 90% de éstas dan lugar a una proteína de menor peso molecular, al igual que ocurría con *BRCA1*. Las mutaciones de *BRCA2* se encuentran con frecuencia asociadas con mutaciones somáticas de *p53*, mientras que no suelen coexistir con la sobreexpresión de la proteína HER-2. Algunas mutaciones de estos genes se asocian a determinados grupos étnicos como es el caso de los judíos ashkenazi (Phillips et al., 1999).

3.1.3. *p53*

Aproximadamente el 50% de las mutaciones germinales de *p53* se asocian con el síndrome de Li-Fraumeni. Se trata de un extraño tipo de alteración de carácter autosómico dominante caracterizada por el desarrollo de multitud de masas tumorales a muy temprana edad. Éstas suelen ubicarse en hueso, mama y cerebro, además de dar lugar a leucemias y carcinomas adrenocorticales. Sin embargo, menos del 1% de los tumores de mama presentan mutaciones germinales de *p53* (Borresen et al., 1992).

3.1.4. *ATM*

En el gen *ATM*, localizado en 11q22-23, se han encontrado más de 300 mutaciones distribuidas a lo largo de sus 150 kb y 66 exones. Aproximadamente el 85% de éstas dan lugar a una proteína truncada y defectiva. La proteína *ATM* es un miembro de la familia de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K). Su función es detectar los daños existentes en el DNA y activar los mecanismos de control del ciclo celular (Gatti et al., 1999).

La ataxia telangiectasia es el clásico síndrome, hereditario, asociado a la mutación de *ATM*. Se trata de un síndrome de carácter autosómico recesivo en el que los heterocigotos para *ATM* manifiestan neurodegeneración, inmunodeficiencias, sensibilidad a la radiación ionizante, alteraciones de la regulación del ciclo celular y predisposición a determinados tipos de cáncer. Esta predisposición da lugar al desarrollo de linfomas primarios, leucemias y en menor medida a la aparición de

tumores sólidos. En mama, las típicas alteraciones de *ATM* encontradas son mutaciones “missense” y aquellas que originan una proteína truncada.

3.1.5. *PTEN*

PTEN/MMMAC1/TEP1 es un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 10 (10q23.3). Este gen codifica para una proteína con actividad fosfatasa que actúa tanto sobre el propio fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP_3) como sobre sus sustratos proteicos. Las mutaciones identificadas en este gen pueden ser homocigóticas o heterocigóticas, siendo éstas últimas frecuentes en pacientes con cáncer de mama bilateral.

Las alteraciones germinales del gen dan lugar al síndrome de Cowden, de carácter autosómico dominante, al que se asocian multitud de cánceres como los de mama, tiroides y cerebro, además de otras lesiones benignas. Este síndrome también lleva implícito una alteración del desarrollo denominado síndrome Bannayan-Zonana.

Entre un 30-50% de las mujeres que poseen la mutación en la línea germinal desarrollan cáncer de mama. Estas alteraciones no se correlacionan con el cáncer de mama esporádico ni tampoco se presentan en tumores de mama de tipo familiar generados por otras mutaciones germinales como son las de *BRCA1*, *BRCA2*, *p53* o *ATM* (Chen et al., 1998; Dunning et al., 1999).

3.1.6. *Polimorfismos génicos*

Se define polimorfismo como la presencia de múltiples alelos de un gen en una población. Así, existen lo que se denominan marcadores polimórficos que se transmiten a la siguiente generación y que se utilizan para caracterizar el riesgo que posee un individuo de sufrir una enfermedad. En el caso del cáncer de mama se ha encontrado una correlación positiva entre el desarrollo del mismo y ciertos polimorfismos como pueden ser los del gen *CYP19*(TTA)_n, los del gen *GSTP1* Ile105Val y los de *p53*

Arg72Pro. Los polimorfismos de *GSTM1* se correlacionan con el cáncer de mama postmenopáusico (Dunning et al., 1999).

3.2. Cáncer de mama esporádico

Se han identificado multitud de loci potencialmente implicados en el cáncer de mama esporádico de los que, en muchas ocasiones, no se conoce con exactitud la función del gen en el que se encuentran estas mutaciones.

Se incluyen entre éstos la delección de 3p (*FHIT*, 34-45% de los casos), delecciones de 10q (*PTEN*), delecciones de 13q (*BRCA2* y *Rb*, 35-75% de los casos), amplificaciones de 8q (*c-myc*, 15%), amplificaciones de 11q (*CCND1*, 15-20%), delecciones 16q (*CDH1*, 57-85%); delecciones de 17p (*p53*, 41-73%), y la delección de 17q (*BRCA1*) y sus amplificaciones (*HER-2/neu*, 30-70%) (Ingvarsson et al., 1999).

También se ha establecido una correlación entre la presencia de determinadas alteraciones génicas y el grado histológico del cáncer. Siguiendo este criterio podemos encontrar lesiones no neoplásicas y que, sin embargo, tienen pérdida de heterocigosidad (LOH) en algunos loci (3p22, 11p15, 17p13). En las hiperplasias epiteliales nos encontramos con pérdidas de heterocigosidad (LOH de 16q, 17p y 17q) que también se encuentran en el caso de las hiperplasias atípicas (AH) (LOH de 11q13, 16q, 17p, y 17q).

Por otra parte, los carcinomas *in situ* se asocian con alteraciones de *p53*, del gen *Rb* y *HER-2/neu*, y pérdidas de heterocigosidad (LOH en 11q13 y en 16q). El desarrollo del carcinoma invasivo se asocia con múltiples alteraciones, tales como las del gen *c-myc*, las ciclinas D1 y E, la de p27, además de la alteración de la actividad telomerasa. Por último, se ha demostrado que los carcinomas metastásicos se encuentran asociados con alteraciones de *nm23*, el gen *maspín*, a las de la E-caderina y de *MMP/TIMPs* (Dillon et al., 1998).

3.3. Regulación del ciclo celular y cáncer de mama

La progresión normal del ciclo celular se encuentra altamente regulada por multitud de elementos coordinados entre sí. Por ejemplo, el balance entre los niveles de ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (cdks) y quinasas activadoras de cdk, se encuentra estrechamente regulado. Lo mismo ocurre con los procesos que, a su vez, regulan su activación, por fosforilación, así como su inhibición, mediada por INK4 (p15, p16, p18, y p19) y por las proteínas KIP/CIP (p21, p27, y p57). Por último, el control transcripcional ejercido por pRb, p53 y otras proteínas asegura que la progresión del ciclo celular transcurra sin errores y que tenga lugar únicamente en presencia de los estímulos fisiológicos necesarios.

En presencia de algún estímulo que promueva el crecimiento, la ciclina D1 forma un complejo con las quinasas dependientes de ciclinas, cdk4 ó cdk6. Una vez formado, este complejo es capaz de fosforilar la proteína del retinoblastoma (pRB). Este proceso libera el factor transcripcional E2F que permanecía inactivo unido a pRB. E2F promueve la transcripción de la ciclina E, lo que se traduce en la progresión del ciclo celular de la fase G₁ a la fase S.

Sin embargo, se han descrito un gran número de alteraciones que desestabilizan esta estricta regulación y que acaban dando lugar al desarrollo de neoplasias. Así, se han identificado amplificaciones del gen regulador de la ciclina D1, *CCND1*, en aproximadamente el 15-20% de los casos de cáncer de mama. También se ha observado sobreexpresión de la ciclina D1 en el 40% de los casos de cáncer de mama (hasta en un 70% en los carcinomas ductales no invasivos) que coincide, con frecuencia, con la sobreexpresión de la proteína HER-2 (Wang et al., 1994).

La sobreexpresión de la ciclina D1 se correlaciona con la presencia de receptores de estrógenos (RE), lo que se asocia a buen pronóstico y óptima respuesta a tratamientos con tamoxifeno. Por el contrario, la sobreexpresión de la ciclina E es una

alteración poco frecuente y los tumores que la presentan carecen de expresión de receptores de estrógenos y no responden a quimioterapia.

En cuanto a la expresión de la proteína p27, ésta es regulada negativamente en presencia de estímulos mitógenos. La proteína p27 es miembro de la familia cip/kip, inhibidores de cdk. Sus niveles permanecen elevados en células que no se dividen y su sobreexpresión se traduce en la parada del ciclo celular en la fase G1. Sin embargo, en el 56% de los casos de cáncer de mama su expresión está disminuida, por lo que el normal funcionamiento del ciclo celular está alterado (Catzavelos et al., 1997).

Otra proteína, imprescindible en la normal regulación del ciclo celular, es la fosfoproteína de 53 kDa p53. Ésta se expresa y activa en respuesta a daños en el DNA, mecanismo que pretende prevenir la acumulación de células con daños en su material genético. Se ha demostrado que p53 media en la respuesta de las células cancerígenas a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia. En células de cáncer de mama las mutaciones del gen que codifica para p53 ocurren con frecuencia (30-40%) (Falette et al., 1998).

En general, se trata de mutaciones que dan lugar a una proteína defectiva que se acumula en las células. El 80% de estas mutaciones tienen lugar entre los exones 5 y 8, con mayor frecuencia en los codones 175, 248, y 273.

Las mutaciones de *p53* se asocian con tumores de alto grado, más concretamente con carcinomas *in situ*, que ofrecen resistencia a quimioterapia y radioterapia, dan lugar a recaídas tempranas y al desarrollo de metástasis ganglionares. Se estima así que, en pacientes en los que no existe afectación ganglionar, la supervivencia esperada es de un 56% en ausencia de mutación de *p53*, mientras que ésta se reduce a un 28% si existe mutación. Cuando existe afectación ganglionar la supervivencia se estima en un 33% con la mutación de *p53* y de 71% en su ausencia (Blaszyk et al., 2000).

3.4. Factores de crecimiento y cáncer de mama

Tanto el desarrollo normal de la mama como el crecimiento de las células cancerosas mamarias recibe una clara influencia hormonal. Distintos estudios han demostrado que este tipo de tejido posee una serie de moléculas de membrana, comúnmente denominadas receptores de membrana, que se caracterizan por ser los sitios de unión de distintos factores de crecimiento. Este es el caso de la familia de receptores HER (Yarden, Y., 2001).

3.4.1. Receptores de membrana con actividad tirosina quinasa: la familia HER

La evolución de la vía de señalización mediada por los miembros de la familia HER se ha producido en paralelo a la evolución de las formas de vida compleja. Se han localizado, así, receptores de semejantes características a HER en formas de vida sencilla. Se han encontrado, además, formas ancestrales de la molécula con actividad tirosina quinasa en invertebrados. Este es el caso del gusano *Caenorhabditis elegans*, que posee un único receptor, semejante a HER, capaz de unir un único tipo de ligando (Aroian et al., 1999).

Un caso más evolucionado es el del la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, cuyo organismo posee receptores con estructura semejante a HER y en este caso capaces de unir hasta 4 ligandos distintos (Wasserman et al., 1997).

En cambio, los mamíferos se caracterizan por poseer una familia de receptores formada por cuatro miembros, HER-1 (EGFR), HER-2, HER-3, HER-4, todos ellos estrechamente relacionados entre sí, capaces de unir una amplia variedad de ligandos (Stein et al., 2000). Estos cuatro miembros son codificados por cuatro genes homólogos. Estos receptores de membrana se han localizado en multitud de tejidos e interaccionan con ligandos que actúan como factores de crecimiento.

Todos los receptores de la familia HER se ubican en la membrana y comparten una estructura semejante. Poseen un dominio extracelular de unión a ligando rico en

cisteínas, una fracción transmembrana de carácter lipofílico y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. A diferencia de los restantes componentes de la familia HER, HER-3 carece de algunos residuos pertenecientes al dominio catalítico, habitualmente invariables en las proteínas con actividad quinasa. Este hecho nos indica que este miembro de la familia posee una débil actividad quinasa.

3.4.2. *El papel de la familia HER en el desarrollo*

Esta familia de receptores de factores de crecimiento desempeña un importante papel en el desarrollo humano. En el feto humano HER-2, uno de los miembros de dicha familia, se ha detectado en el sistema nervioso, en los huesos en desarrollo, en piel, músculo, corazón, pulmón y epitelio intestinal (Morris et al., 1999). La secreción, por parte del endocardio, de factores de crecimiento activa el receptor HER-4 que, junto a HER-2, participa en el desarrollo del ventrículo (Meyer et al., 1995). La ausencia de HER-2 en los embriones de ratón en desarrollo supone la muerte de los animales en el útero materno.

Después del nacimiento, HER-2 está implicado en el crecimiento y desarrollo normal de la mama. Se ha comprobado que los ligandos del tipo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y neuregulinas, que se unen a los receptores de esta familia, estimulan el desarrollo de la fracción lóbulo-alveolar de la glándula mamaria del ratón (Henninghausen et al., 1998).

El gen de rata *neu* se aisló de un neuroblastoma de rata, mientras que su homólogo normal se aisló de una librería de cDNA de rata y humano. La variabilidad de nombres que le han asignado son el producto del descubrimiento de genes homólogos, implicados en la patogenicidad del eritroblastoma de pollo (*erbB*) y de los genes codificantes para receptores de factores de crecimiento en el hombre (HER).

La denominación más común es la de HER. *HER-2* es un proto-oncogén ubicado en el cromosoma 17q21. Este gen codifica para una glicoproteína transmembrana de

1255 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 185 kDa denominada p185^{HER-2} que, en muchas ocasiones, se denomina simplemente HER-2.

3.4.3. *La activación de los receptores de la familia HER*

Los receptores proteicos de la familia HER se encuentran en forma de monómeros en la membrana plasmática. La activación de estos receptores requiere normalmente de la presencia de pequeñas moléculas, denominadas ligandos, y de otros receptores pertenecientes a la misma familia.

Tras la unión del ligando a su respectivo receptor se produce la dimerización de los receptores. Los cuatro miembros de la familia pueden asociarse entre sí para formar hasta diez diferentes dímeros, ya sean homodímeros o heterodímeros. La estructura formada por el dímero unido a su ligando es mucho más estable que la forma monomérica. Todos los ligandos de esta familia poseen un dominio de 50 a 55 aminoácidos cuya estructura es semejante a la del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y en la que existen seis residuos de cisteína altamente conservados entre las distintas isoformas (Alroy y Yarden, 1997).

HER-1 es capaz de unir varios ligandos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), la anfiregulina (AR), el factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), la betacelulina (β -cel) y la epiregulina. Tanto HER-3 como HER-4 se unen a multitud de neuregulinas, también denominadas factores de diferenciación de *neu* (NDFs), todos ellos péptidos de diferente estructura. HER-2, en cambio, es conocido como el receptor huérfano por carecer de ligando conocido.

3.4.4. *La unión del ligando a los receptores HER*

Como hemos señalado anteriormente, en la actualidad no se conoce el ligando de HER-2. Sin embargo, se ha observado que HER-2 es capaz de unir ligando, de forma indirecta, al interaccionar formando heterodímeros con los restantes miembros de la

familia HER. Así, actuaría como co-receptor favoreciendo la formación de los heterodímeros y participando en la transducción de señal.

Estudios llevados a cabo recientemente han demostrado que los ligandos de la familia HER son en realidad moléculas bivalentes, es decir, poseen dos lugares de unión para los receptores HER. Así, la neuregulina-1 posee un sitio de unión de alta afinidad, próximo al extremo N-terminal y otro de baja afinidad, próximo, en este caso, al extremo C-terminal.

Estos estudios sugieren que se produciría unión de HER-1, HER-3, o HER-4 al lugar de elevada afinidad del ligando, y otra unión de baja afinidad al otro componente del homo- o heterodímero, que con frecuencia es HER-2. En efecto, la interacción entre los miembros de la familia HER no ocurre al azar sino que existe una clara jerarquía que hace que HER-2 sea el co-receptor de elección para la formación de estos dímeros (Tzahar et al., 1996; Olayioye et al., 1999).

De esta manera HER-2 actúa como co-receptor y participa en la transducción de señal, pese a ser un receptor carente de ligando específico. Por este motivo, en las líneas celulares de cáncer que sobreexpresan HER-2 se fomenta la formación de los heterodímeros de los restantes miembros de la familia HER con HER-2, dando como resultado la transducción de señal al núcleo y que en último lugar conduce a la activación de genes nucleares y a la división celular (Beerli et al., 1995; Graus-Porta et al., 1995).

La transfección de los distintos miembros de la familia HER en líneas celulares que no expresan ninguno de estos receptores permitió elucidar cual era el papel fisiológico de cada uno de éstos. En presencia de EGF o TGF las células transfectadas con HER-1 crecían normalmente. Sin embargo, las células transfectadas con HER-2 no sobrevivían en presencia de estos ligandos, hecho que confirma que no existe una interacción directa entre HER-2 y el ligando.

Tampoco sobreviven las células transfectadas con HER-3 y es que este receptor carece de actividad quinasa propia. Cuando se co-transfectaban dos de los miembros de la familia de forma conjunta se obtuvieron resultados que variaron en función de los dímeros introducidos (Graus-Porta et al., 1997).

En general, los homodímeros no poseen tanta eficiencia señalizadora como los heterodímeros. En cualquier caso, existen diferencias en esta eficiencia y así, mientras la eficiencia para la señalización de los homodímeros HER-1 es escasa, la de los homodímeros HER-3 es nula, como ocurría con los receptores aislados. Los heterodímeros formados por HER-2 y HER-3 demostraron ser los más eficientes, ya que poseían el mayor potencial mitótico, motivo por el que se ha especulado que éste debe de ser el dímero HER más frecuente en los cánceres en los que se encuentran implicadas células epiteliales. En efecto, se ha observado que este es el heterodímero dominante en las células de carcinoma.

En general, los heterodímeros se caracterizan por poseer una menor tasa de disociación del ligando si los comparamos con los homodímeros, lo que explica que generen una mayor señal mitógena que éstos últimos. Sin embargo, son los heterodímeros en los que participa HER-2 los que mayor tasa de unión del ligando presentan.

La heterodímeros en los que participa HER-2 poseen, además, una menor tasa de endocitosis inducida por ligando, si son comparados con los restantes. Por este motivo, la señal iniciada por los heterodímeros en los que participa HER-2 es más prolongada y tiene como resultado la activación de varias vías de señalización, como es la de Ras-Raf-MAPK (Carpenter et al., 1999; Hackel et al., 1999; Luteerell et al., 1999).

Los heterodímeros formados por HER-2 y HER-3 han demostrado ser los más eficientes, pese a que HER-3 posee una escasa actividad quinasa y que los homodímeros HER-3 sean mitogénicamente inactivos. HER-3 posee multitud de sitios de anclaje destinados a otras tantas moléculas de señalización. Se ha especulado que la falta de

actividad quinasa por parte de HER-3 tiene como objetivo evitar la hiperactivación de la célula. La unión del ligando a HER-3 y su heterodimerización con otro miembro de la familia HER, con una actividad quinasa normal, le proporcionaría el control suficiente de la actividad señalizadora.

Para confirmar esta hipótesis se empleó un receptor quimérico formado por el dominio de unión a ligando de HER-3 y el dominio con actividad quinasa de HER-1. Este receptor quimérico mostró ser el receptor más activo, lo que demostró que HER-3 es el receptor potencialmente más activo de la familia HER. Por este motivo, se piensa que los heterodímeros HER-2/HER-3 son los más eficientes desde el punto de vista mitógeno y sugiere que la carencia de actividad quinasa de HER-3 permite el control de su potencial mitógeno (Olayioye et al., 1999).

3.4.5. La señalización activada por HER-2

Considerando el gran número de interacciones que existen entre los diferentes miembros de la familia HER, es imposible pensar que las vías de señalización iniciadas por los mismos sean de tipo lineal. Por el contrario, se trata de un sistema de señalización muy interactivo en el que los ligandos pueden dar lugar a la formación de diferentes homodímeros y heterodímeros que interaccionan estimulando varias vías de señalización.

Realmente el patrón de transducción de señal se puede subdividir en varios pasos. Una primera etapa en la que se produce la llegada de la señal iniciadora, el factor de crecimiento. Una segunda etapa en donde se produce el procesamiento de la información, en la que intervienen los receptores, proteínas con grupos SH2 y factores transcripcionales. Por último, surge el resultado, es decir, la división, diferenciación o migración celular.

La dimerización de los receptores de la familia HER permite la difusión de diferentes tipos de mensajes a la célula (Olayioye et al., 1999). Para que esto ocurra

debe existir un estricto mecanismo de coordinación y se ha especulado que HER-2 desempeña este papel y la ausencia de ligando conocido para HER-2 ha reforzado esta hipótesis.

3.4.6. La importancia de HER-2 en el tratamiento del cáncer por inmunoterapia

Como señalamos con anterioridad, la combinación de los distintos miembros de la familia HER origina hasta diez posibles homo- y heterodímeros en la membrana celular. La participación de HER-2 en los heterodímeros permite una unión más estable con el ligando, motivo por el que ésta combinación posee una mayor potencia biológica.

Los otros dímeros HER envían las señales necesarias para el crecimiento celular y no participan en el desarrollo tumoral. A raíz de estos datos, en los últimos tiempos se están desarrollando anticuerpos específicos para HER-2 destinados a inhibir el crecimiento tumoral promovido por este receptor. Éstos han demostrado tener una efectividad variable, ya que mientras algunos consiguen una inhibición casi completa del crecimiento tumoral, otros solamente son antagonistas parciales e, incluso, algunos promueven este crecimiento. Al parecer, éstos últimos no serían procesados por las células tumorales (Klapper et al., 2000).

Por el contrario, los anticuerpos que más efectividad han demostrado son aquellos rápidamente internalizados y metabolizados por las células cancerígenas que sobreexpresan HER-2, interacción que da lugar a una endocitosis del receptor. Una vez internalizado el receptor ya no puede interaccionar con los restantes miembros de la familia HER. De esta manera, HER-2 no puede formar heterodímero y su potencial señalizador y, consecuentemente, el crecimiento tumoral, se ven mermados (Kasprzyk et al., 1992).

3.4.7. *La degradación de HER-2*

En general, el mecanismo habitual de degradación del receptor unido a su ligando implica la endocitosis del complejo, de manera que la vesícula formada constituye el endosoma temprano. En este endosoma el ligando puede separarse del receptor para que éste último sea reciclado a la membrana celular, o bien acabar en el lisosoma para ser degradado.

Esto es lo que ocurre, por ejemplo, con el homodímero formado por HER-1 que es degradado por vía lisosomal (Levkowitz et al., 1999). Sin embargo, cuando se forman heterodímeros constituidos por HER-1 y HER-2, HER-1 no es degradado sino que es reciclado a la membrana celular. Esto permite que también la transducción de señal mediada por HER-1 se prolongue desempeñando, sin duda, un papel en la oncogénesis.

El proceso de selección de los endosomas tempranos es crítico puesto que permite que determinados receptores sean degradados, mientras que otros sean devueltos a la membrana celular en donde continúan su función de señalización. En este sentido, las investigaciones llevadas a cabo han permitido identificar una proteína adaptadora, denominada c-Cbl, que se encarga del control del proceso de reciclaje o degradación.

La unión de esta proteína adaptadora, junto con la del ligando, conduce al receptor a su degradación por la vía lisosomal. La interacción que se produce entre HER-1 y c-Cbl es fuerte, en cambio, la unión de la proteína adaptadora con HER-2 es muy laxa, mientras que no interacciona con HER-3.

Como su nombre indica, se trata de una proteína que sirve de adaptador entre los receptores y un enzima con actividad ubiquitinadora denominada E2. Este enzima se une a un dominio específico de c-Cbl, defectivo en formas potencialmente oncogénicas de la proteína adaptadora. La proteína c-Cbl se une, a su vez, al receptor HER en

residuos de tirosina fosforilados, lo que favorece su ubiquitinación y permite que éste sea degradado bien por la vía proteasoma o bien por la vía lisosomal (Waterman et al., 2000).

HER-3, que no posee un dominio de unión para c-Cbl, es reciclado continuamente a la membrana celular. Se ha especulado que los anticuerpos dirigidos contra HER-2 refuerzan la unión, normalmente laxa, existente entre el receptor y c-Cbl, promoviendo su degradación.

El componente epitelial del tumor responde a un gran número de factores procedentes del estroma. Cuando existe una sobreexpresión de HER-2 la transducción de señal tiene lugar principalmente por los heterodímeros formados con este miembro de la familia HER. Estos heterodímeros se unen fuertemente al ligando, emitiendo señales de proliferación al núcleo y poseen una elevada tasa de reciclaje a la membrana después de sufrir endocitosis. Este eficiente poder de señalización promueve la división celular y da lugar a la aparición de malignidad (Levkowitz et al., 1999).

Los anticuerpos dirigidos contra HER-2 promueven la destrucción del receptor en el lisosoma, con lo que se reduce la concentración de este tipo de receptor en la membrana celular. Esto obliga a los restantes miembros de la familia HER a formar homodímeros y/o heterodímeros entre ellos, sin la participación de HER-2.

3.4.8. Implicaciones terapéuticas derivadas de la biología de HER2

Los niveles de proteína HER-2 pueden ser hasta cien veces mayores en una célula cancerígena si la comparamos con una célula normal. Este fenómeno se debe, con frecuencia, a amplificaciones del gen codificante para la proteína HER-2 pero, en ocasiones, se debe a alteraciones del normal proceso de transcripción. Las amplificaciones del gen conducen a una mayor transcripción de RNA mensajero y síntesis de proteína HER-2.

En cáncer de mama, el 92% de los casos de sobreexpresión de la proteína son debidos a la presencia de amplificación del gen. La sobreexpresión de HER-2 se ha identificado en todos los estadios de evolución de la enfermedad aunque no se ha encontrado en lesiones benignas de la mama, lo que sugiere que *HER-2/neu* no está amplificado hasta la aparición de una forma maligna de la enfermedad. La sobreexpresión de HER-2 se mantiene en la etapa de metástasis, lo que indicaría un funcionamiento permanente (Salomon et al., 1989).

Los heterodímeros HER-2/HER-3 confieren una mayor actividad transformante, predisponiendo al desarrollo de neoplasias, por lo que la detección de ambos receptores podría tener una mayor significación clínica y pronóstica que la de cualquiera de ellos de forma aislada.

Debido a su, en ocasiones, elevada expresión, su localización celular que le hace fácilmente accesible y su ya confirmado papel en la aparición de carcinogénesis, HER-2 se ha convertido en una de las principales dianas terapéuticas en cáncer de mama. A todo ello se suma el hecho de que la expresión de HER-2 en las células normales es baja, con lo que se esperan pocos efectos secundarios en estas últimas como consecuencia de los tratamientos aplicados (Zheng et al., 2000).

La proteína HER-2 interacciona, a su vez, de forma directa o indirecta, con un gran número de proteínas celulares que pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo del cáncer. Por este motivo, muchas de estas proteínas pueden convertirse en futuras dianas terapéuticas, con el fin de bloquear la transducción de señal mitógena. Sin embargo, este bloqueo podría no ser suficiente para inhibir la capacidad oncogénica de HER-2 en su totalidad, ya que la señal podría discurrir a través de una vía alternativa. Por tanto, y con el fin de lograr un bloqueo completo la estrategia más efectiva es la de reprimir la expresión de HER-2 o bien inhibir la acción de aquellas moléculas situadas en los inicios de la cascada de señalización.

En este sentido, se han producido diversos avances terapéuticos. Por una parte, han surgido los métodos destinados a inhibir la expresión o la función de la proteína. Para ello se han desarrollado elementos que inhiben la expresión del gen, otros que alteran el promotor del gen y, por último, se ha intentado bloquear la actividad tirosina quinasa del receptor.

Otra área terapéutica pretende desestabilizar la proteína de la membrana celular favoreciendo su degradación. Pero, sin duda, son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de HER-2 los que más eficacia han demostrado, en el caso de tumores que sobreexpresan este receptor. Este es el caso del trastuzumab, comercialmente denominado Herceptin, que ha resultado muy efectivo en el tratamiento de estos tumores, sobre todo en combinación con quimioterapia convencional (Baselga y Mendelson, 1994).

3.5. Formas truncadas de los receptores de la familia HER

Además de las formas completas de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, se ha descrito la existencia de formas alternativas de los mismos, consistentes en formas truncadas de la proteína. En efecto, son muchos los receptores de factores de crecimiento o de citoquinas que dan lugar a formas solubles (Gearing et al., 1994). Estas formas se han aislado del medio de cultivo de líneas celulares y en algunos fluidos, procedentes de pacientes, como pueden ser el suero o la orina.

Un ejemplo característico es el receptor de interleuquina 2, también el del receptor de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-receptor) y algunos miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, la familia HER. Entre éstos cabe destacar el de EGFR o HER-1, HER-4 y también HER-2 (Gearing et al., 1994).

Este fenómeno es muy frecuente en la naturaleza, motivo por el que se piensa que, sin duda, debe ser importante desde el punto de vista fisiológico. Entre los

miembros de la familia HER, HER-4 fue el primero para el que se identificaron formas truncadas del receptor. Así, se ha descrito que HER-4 pierde su dominio extracelular por la acción de un miembro de la familia ADAM, familia de desintegrinas y metaloproteasas (Black et al., 1998; Blobel et al., 1997). En el caso de HER-4 es TACE, uno de los miembros de esta familia, activada por ésteres de forbol, la que lleva a cabo el corte proteolítico. El fragmento resultante, que permanece unido a membrana, posee un peso molecular de 80 kDa y se corresponde con el dominio transmembrana y el dominio catalítico intracelular del receptor. Esta forma truncada conserva la actividad tirosina quinasa del receptor completo (Christianson et al., 1998; Codony-Servat et al., 1999).

El corte proteolítico puede ser promovido por multitud de sustancias que incrementan la actividad de la proteína quinasa C (PKC) o inhiben la actividad tirosina fosfatasa. Estas sustancias alteran el estado de fosforilación de las proteínas. El fragmento resultante de este procesamiento permanece unido a membrana, está fosforilado y su actividad tirosina quinasa está intacta, pudiendo incluso ser mayor que la del receptor completo. Este fragmento puede ser activo incluso en ausencia de ligando exógeno, puesto que el contenido de fosfotirosina del fragmento truncado es mayor que el de los receptores completos. Este fragmento permanece frecuentemente unido de forma constitutiva a moléculas de señalización celular como pueden ser la proteína adaptadora Shc o la fosfolipasa C- γ (Izumi et al., 1998).

En el caso de HER-2 se ha propuesto la existencia de dos tipos de mecanismos por los que estarían apareciendo formas truncadas del receptor. Por una parte, se ha demostrado la existencia de un procesamiento alternativo (“splicing” alternativo) del RNA mensajero, dando lugar a un mensajero más corto de unas 2.3 Kb, que origina una proteína correspondiente a los 633 primeros aminoácidos del receptor (Scott et al., 1993).

Algunos estudios han postulado que la sobreexpresión de esta forma truncada con un peso molecular de 100 kDa podría inhibir la proliferación y diferenciación de las células de cáncer de mama incluso en presencia de factores de crecimiento. Esta forma soluble, presente en el medio de cultivo de ciertas líneas celulares, ejercería una inhibición de carácter paracrino sobre las células vecinas, interfiriendo en la formación de los heterodímeros de HER-2 con los restantes miembros de su familia (Aigner et al., 2001).

Por otra parte, también se ha observado una modificación post-traducciona del receptor, por la que sufre la acción de una proteasa que actúa a nivel del dominio transmembrana del receptor.

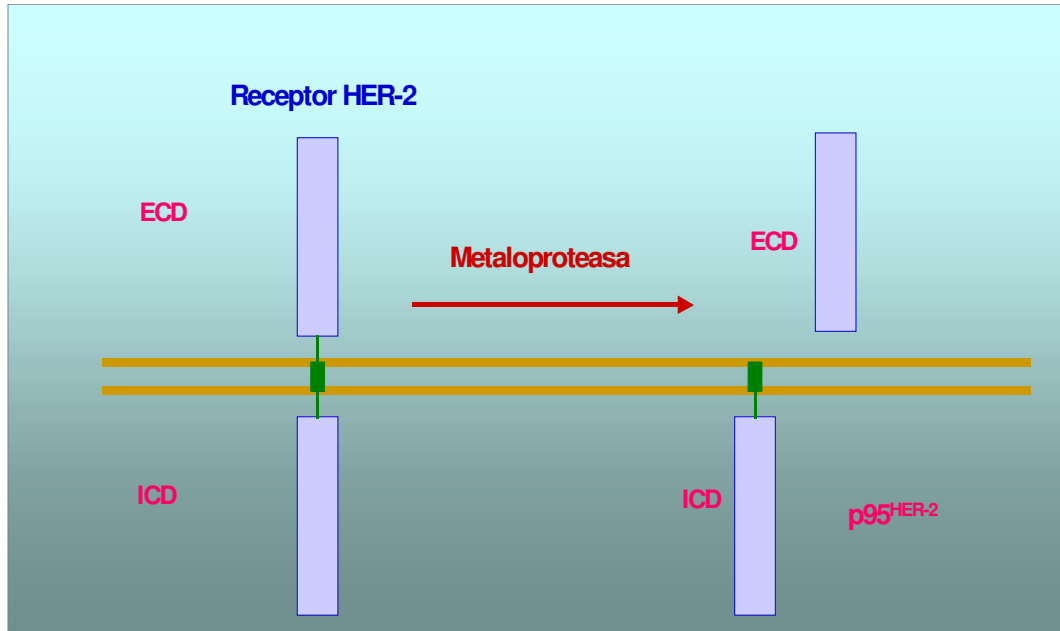
Este corte proteolítico del receptor HER-2 ha permitido aislar del medio de cultivo de células de cáncer de mama y del suero de pacientes una forma truncada, correspondiente al dominio extracelular del receptor (ECD-HER-2) (Mosley et al., 1989; Petch et al., 1990; Zabrecky et al., 1991). Algunos estudios han demostrado una correlación inversa entre la presencia de un elevado nivel de la forma extracelular de HER-2 (ECD-HER-2) con la respuesta a quimioterapia. Las pacientes que presentaron elevados niveles de esta forma truncada de HER-2 mostraron una respuesta significativamente menor a la quimioterapia que aquellas pacientes con bajos niveles de la misma. A este respecto, se observó que la supervivencia libre de enfermedad de las primeras fue significativamente menor (7.5 meses frente a 11 meses) (Zabrecky et al., 1991).

El corte proteolítico de HER-2 genera, además del ECD-HER-2, un fragmento que, como ocurría con HER-4, permanece unido a membrana y que posee un peso molecular de 95 kDa. Esta forma truncada p95^{HER-2} se generaría por la acción de una metaloproteasa perteneciente a un miembro de la familia ADAM que aún no se ha identificado (Molina et al., 2001). Este fragmento corresponde a la fracción C-terminal de la proteína completa y se caracteriza por conservar el dominio catalítico del receptor

completo y por tanto la actividad tirosina quinasa, lo cual se traduce en la posibilidad de transducir señal (Christianson et al., 1998; Molina et al., 2001).

En la siguiente Figura se ilustra el hipotético mecanismo de corte proteolítico implicado en la producción de p95^{HER-2}.

FIGURA 3. Mecanismo de producción de p95^{HER-2}



Corte proteolítico de HER-2

3.6. Vías de transducción de señal

La mayoría de los ligandos responsables de la señalización célula-célula, incluyendo neurotransmisores, hormonas peptídicas y factores de crecimiento, se unen a receptores localizados en la superficie de sus células diana.

Estos receptores, entre los que encontramos los receptores de hormonas peptídicas y factores de crecimiento, actúan regulando la actividad de una serie de proteínas intracelulares. Estas proteínas transmiten entonces señales desde el receptor a una serie de dianas intracelulares adicionales, que incluyen con frecuencia factores de transcripción. La unión de un ligando a un receptor de la superficie de la célula inicia

así una cadena de reacciones intracelulares que alcanzan finalmente al núcleo de la célula diana y dan lugar a cambios programados de la expresión génica.

3.6.1. Receptores proteicos con actividad tirosina quinasa

Se trata de receptores de superficie celular relacionados directamente con enzimas intracelulares. La familia más importante de estos receptores son los receptores proteicos con actividad tirosina quinasa, que fosforilan sus proteínas sustrato en residuos de tirosina. Esta familia incluye los receptores para la mayor parte de los factores de crecimiento polipeptídicos, como es el caso de la familia HER.

El receptor HER funciona como una proteína tirosina quinasa, estableciendo claramente la fosforilación de los residuos tirosina de las proteínas como un mecanismo de señalización clave en la respuesta de las células a la estimulación de los factores de crecimiento. Se trata de una familia de proteínas con actividad tirosina quinasa formada por cuatro miembros, todos ellos estrechamente relacionados entre sí y capaces de unir una amplia variedad de ligandos. Estos miembros son codificados por cuatro genes homólogos cuyos productos han sido identificados en multitud de tejidos, en donde interaccionan con factores de crecimiento.

Todos los receptores de la familia HER se ubican en la membrana y comparten una estructura semejante. Poseen un dominio extracelular de unión a ligando, rico en cisteínas, una fracción transmembrana de carácter lipofílico, y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. La unión de los ligandos al dominio extracelular de estos receptores, activa sus dominios citosólicos con actividad quinasa resultando en la fosforilación de los propios receptores y de proteínas diana intracelulares, que propagan la señal iniciada por la unión de los factores de crecimiento.

3.6.2. Etapas de la activación

El primer paso en la señalización de la mayoría de los receptores con actividad tirosina quinasa es la dimerización del receptor inducida por el ligando. En efecto, los receptores

proteicos se encuentran en forma de monómeros en la membrana plasmática. La activación de estos receptores requiere normalmente de la presencia de pequeñas moléculas, denominadas ligandos, y de otros receptores pertenecientes a la misma familia. Los ligandos de la familia HER son en realidad moléculas bivalentes, es decir, poseen dos lugares de unión para los receptores HER. Tras la unión del ligando a su respectivo receptor, los cuatro miembros de la familia pueden asociarse entre sí para formar hasta diez diferentes dímeros, ya sean homo- o heterodímeros.

La dimerización inducida por el ligando conduce a la transfosforilación del receptor, puesto que las cadenas polipeptídicas dimerizadas se fosforilan de forma cruzada. Esta transfosforilación tiene más de una repercusión en la señalización de estos receptores (Segatto et al., 1988; Akiyama et al., 1991). Por una parte, la fosforilación de los residuos de tirosina presentes en el dominio catalítico incrementa la actividad tirosina quinasa del receptor. Por otro lado, la fosforilación de los residuos de tirosina no pertenecientes al dominio catalítico crea diversos puntos de acoplamiento específicos para otras moléculas que intervienen en la transducción de señal mediada por receptores activados. Se trata de proteínas adaptadoras que poseen dominios SH2 y que, como su nombre indica, acoplan los receptores activados a otros componentes de la vía de transducción de señal, pero no poseen capacidad señalizadora intrínseca (Mikami et al., 1992).

3.6.3. La vía de transducción de señal MAP quinasa

En el caso de los receptores de la familia HER, la proteína adaptadora mejor caracterizada es GRB-2. El dominio SH2 de esta pequeña molécula se une a un resto específico de fosfotirosina del receptor activado. Pero GRB-2 posee, además, dos dominios SH3 que se unen a SOS. SOS es una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina que favorece la disociación entre GDP y RAS para que ésta una GTP, lo que se traduce en la activación de RAS (Carpenter et al., 1999).

Esta activación induce una cascada de quinasas que incluye Raf, MEK y MAPK. GTP-RAS, interacciona con la primera de las quinasas de la ruta, Raf-1, una serina/treonina quinasa. Ésta es reclutada hacia la membrana en donde es fosforilada de manera que se activa su función quinasa lo que, a su vez, le permite unirse y activar por fosforilación el siguiente componente de la cascada de señalización, es decir, MEK. Por su parte, ésta es una proteína con actividad quinasa pero que posee una actividad dual, ya que fosforila residuos de serina y tirosina (Hackel et al., 1999).

El sustrato de esta actividad es MAPK, una serina/treonina quinasa. Esta quinasa es, a su vez, capaz de fosforilar multitud de proteínas, entre ellas factores de transcripción nucleares que median en la respuesta celular. La activación de MAPK solamente se produce si se fosforilan los residuos de treonina 202 y tirosina 204 y ello ocurre únicamente si la señal iniciadora es la adecuada. Se ha observado que debe producirse la fosforilación de ambos residuos para que la quinasa sea completamente activa y así una señal insuficiente, que no induzca la fosforilación del segundo residuo, no originará ningún efecto biológico. La fosforilación de MAPK, además de estimular su actividad, promueve su dimerización. La forma dimerizada de la quinasa es la que se transloca al núcleo, ya que las formas monoméricas no pueden hacerlo (Luteerell et al., 1999).

En general, se ha observado que las vías de transducción de señal logran un efecto amplificador de la señal biológica inicial. Es decir, a medida que esta vía progresa la señal va siendo cada vez mayor, ya que el número de moléculas que reciben la señal se va incrementando. Por ejemplo, el número de moléculas de MEK que reciben la señal es mucho más elevado que el de Raf-1, y lo mismo ocurre con la proporción de moléculas de MAPK.

MAPK también denominado ERK, se encuentra en el citosol celular pero se transloca al núcleo cuando el estímulo que llega a la célula es el adecuado. Es en el núcleo donde, bien de forma directa o indirecta a través de otras quinasas, ERK fosforila

y activa los factores de transcripción específicos para genes implicados en proliferación y diferenciación celular (Adeyinka et al., 2002). También interviene en la condensación de la cromatina, al fosforilar determinadas moléculas implicadas en este proceso, de manera que se facilita la accesibilidad de determinados factores de transcripción al DNA. De esta manera, participa en la remodelación de la cromatina y promueve la expresión de genes (Ben-Levy et al., 1994).

El crecimiento y división de las células de cáncer de mama es estimulado por la presencia de factores de crecimiento. En efecto, los factores de crecimiento, tales como el EGF, IGF-1, insulina, prolactina o TGF- α o - β , incrementan la activación de MAPK. Así se ha observado que, en células de cáncer de mama, la sobreexpresión de los miembros de la familia HER, HER-1 o HER-2, incrementa la expresión de MAPK (Thor et al., 2000).

3.6.4. La vía de transducción de señal PI3-K/AKT

Los extensos estudios llevados a cabo sobre RAS, el primero de los oncogenes identificados, en la transformación neoplásica, permitió establecer la existencia de un modelo de señalización mitogénica. Este modelo, iniciado por la unión de factores de crecimiento a receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (RTKs), se transmite a través del propio RAS y acaba confluyendo en MAPK. La función de ésta, al igual que la de otras moléculas, es la activación de factores transcripcionales, que promueven la expresión de genes implicados en progresión celular. Esta vía conservada a través de la evolución desde las moscas hasta los mamíferos, poseen una importancia fundamental en la proliferación de las células neoplásicas.

Sin embargo, existen otras vías de transducción de señal que, al igual que ocurre con la vía Ras-Raf-MAPK, necesitan de la presencia de factores de crecimiento y son iniciadas igualmente por los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (RTKs), en ocasiones también a través de RAS (Diehl et al., 1998).

Este es el caso de la vía PI3-K/Akt que ha pasado a escena situándose en un estatus de similar importancia en lo que se refiere a la regulación de los procesos de proliferación y supervivencia de las células de mamífero. Se ha observado que en una gran variedad de alteraciones neoplásicas humanas algunos de los componentes de ésta se encuentran desregulados. Este es el caso de neoplasias tales como el glioblastoma, el cáncer de ovario, mama, endometrio, carcinoma hepatocelular, melanoma, tracto digestivo, pulmón, carcinoma renal, tiroides y de tipo linfocítico (Cantley et al., 1999).

PI3-K se convirtió en el foco de atención de la investigación en cáncer a mediados de los 80, cuando empezó a ser evidente que su activación y función se encontraba ligada a la capacidad de transformación de algunos oncogenes virales, como puede ser la actividad tirosina quinasa de SRC.

La presencia de factores de crecimiento en el medio y la activación de la actividad tirosina quinasa de los RTKs, por la unión del ligando, es lo que promueve la activación de PI3-K. PI3-K es en realidad un heterodímero, formado por una subunidad reguladora (p85) y otra catalítica (p110) (Liu et al., 1999). Con la unión del ligando adecuado y la consiguiente transfosforilación de los receptores con actividad tirosina quinasa, quedan expuestos residuos de tirosina pertenecientes al dominio citoplásmico de los mismos. Al igual que ocurría con Ras, PI3-K y, más concretamente su subunidad reguladora, se une a esos residuos a través de dominios SH2 (Cantley y Neel, 1999).

Esto ocasiona cambios conformacionales que hacen que PI3-K quede asociada a la cara interna de la membrana celular y que sea activa. La subunidad catalítica p110 se encuentra ahora cerca de los lípidos de membrana a los que fosforila. Los anillos de fosfatidilinositol son modificados dando lugar a derivados lipídicos que actúan como segundos mensajeros. Este es el caso del fosfatidilinositol-3, 4, 5-fosfato (PIP₃) que, a su vez, promueve la activación de otras moléculas, entre las que se encuentran AKT que es crítica en la señalización de la supervivencia celular (Lane et al., 2000; Lenferink et al., 2001).

Aunque la expresión de PIP₃ es constitutiva, sus niveles celulares en ausencia de estímulos son reducidos y se encuentran estrechamente regulados. De esta regulación se encargan distintas fosfatasa entre las destaca PTEN y, de hecho, las alteraciones de esta fosfatasa son las más comúnmente implicadas en oncogénesis. Se trata de una fosfatasa específica que reconvierte PIP₃ en PIP₂, siendo este un mecanismo de control análogo al de la regulación de la unión de GDP o GTP a RAS.

PIP₃ tiene especificidad de unión por dominios con homología a plectrina, denominados dominios PH. Estos dominios, identificados en un principio en la proteína del citoesqueleto plectrina, se han identificado en multitud de quinasas citoplásmicas. Una de las mejor caracterizadas es Akt, el homólogo celular del oncogén v-Akt. El dominio catalítico de esta serina/treonina quinasa también posee un dominio PH, y es en este lugar en donde se produce la interacción lípido-proteína con PIP₃ (PIP₃-Akt).

Con el término Akt designamos toda una familia de moléculas caracterizadas por poseer una elevada homología entre distintas especies. En el ser humano encontramos tres genes localizados en 14q32, 19q13 y 1q44 que dan lugar, respectivamente, a tres isoformas denominadas Akt1, Akt2, y Akt3, también denominadas PKB α , PKB β y PKB γ . Se han encontrado amplificaciones de estos genes en algunos tipos tumorales y en algunos tejidos también se ha encontrado sobreexpresión de la proteína (Liu et al., 1999)

PIP₃ se une al dominio de homología a plectrina (PH) de Akt. Esta interacción recluta a Akt a la cara interna de la membrana plasmática, lo que le ocasiona cambios conformacionales cuya consecuencia directa es que quedan expuestos determinados residuos de aminoácidos susceptibles de sufrir fosforilación.

Las PDKs, otras proteínas quinasas citoplásmicas, son las encargadas de la activación de Akt. Estas moléculas también poseen dominios PH que sirven de lugar de unión de PIP₃. Así, la formación de PIP₃ resulta en la asociación de Akt y PDKs con la membrana plasmática, conduciendo a la fosforilación y activación de Akt (Daly et al., 1999; Altioek et al., 1999).

3.6.4.1. Implicaciones de Akt en carcinogénesis

En el desarrollo de un cáncer se ven alterados varios procesos cuyo control es imprescindible. Se diferencian así la supervivencia celular (apoptosis), la proliferación (siendo éste el aumento del número de células) y el crecimiento celular (el aumento del tamaño celular). En general, el desarrollo del cáncer se podría definir como una pérdida del equilibrio crítico proliferación/apoptosis. Uno de los artífices de este desequilibrio es Akt, ya que la expresión de multitud de oncogenes implicados en la progresión del cáncer es regulada por la vía PI3-K/Akt (Weng et al., 1999; Nakatani et al., 1999).

3.6.4.2. Akt promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis

Akt es una quinasa citoplásmica cuya función es fosforilar las moléculas con las que interacciona. Las dianas de Akt son numerosas y de carácter muy diverso, sin embargo, todas poseen una secuencia de aminoácidos común y que se ha especulado podría ser un lugar de reconocimiento para Akt.

La fosforilación de Akt puede traducirse en una activación de la molécula diana, este es el caso de un miembro de la familia de Bcl-2, Bad. Esta es una proteína que permanece inactiva, en células quiescentes, unido a Bcl-X, otro miembro de la misma familia. Akt fosforila el dominio BH3 de Bad, lo que le ocasiona un cambio conformacional que libera Bcl-X. De esta manera, es libre y activo para promover la progresión celular (Page et al., 2000).

Por el contrario, la función de Akt puede ser inhibitoria. En el caso de la caspasa 9, la fosforilación por la acción de Akt se traduce en una pérdida de función, ya que se impide la formación del apoptosoma, con lo que se inhibe el proceso de apoptosis.

Otras proteínas que sufren una alteración por la interacción con Akt pertenecen a la familia de proteínas “forkhead”. Los miembros de esta familia, identificados en humanos, son denominados FKHR, FKHRL1/AF6q21 y AFX. Estas proteínas se encuentran habitualmente en el citoplasma y en presencia de estímulos proapoptóticos

migran al núcleo en donde reconocen en el DNA secuencias de respuesta a insulina (IRS). Estas secuencias de reconocimiento son muy comunes en genes implicados en apoptosis, tales como el gen para la fosfoenol piruvato quinasa, el de la glucosa 6 fosfatasa, el codificante para la proteína Bax, y por último genes cuya expresión da lugar a la liberación de citocromo c. También sucede con genes codificantes para citoquinas, como es el ligando del receptor Fas (Busse et al., 2000).

Akt fosforila las proteínas “forkhead”, lo que impide la interacción con la región IRS. La fosforilación por parte de Akt altera su capacidad de migración al núcleo y produce silenciamiento de los genes pro-apoptóticos. Akt también interviene en la regulación del ciclo celular, ya que controla la estabilidad de la ciclina D e inhibe p27^{Kip}.

Sin embargo, de forma indirecta, Akt promueve la expresión de genes implicados en la progresión celular. En realidad es NF- κ B, un factor de transcripción que no se expresa en células quiescentes, quien promueve la transcripción de estos genes.

En condiciones normales, NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma por I κ B. Esta unión se rompe por la acción de IKK α e IKK β , unas quinasas citoplásmicas activadas por Akt. El factor de transcripción migra al núcleo en donde promueve la expresión de Bfl-1/A1, otro miembro de la familia de Bcl-2, y de los inhibidores de caspasas c-IAP1 y c-IAP2, todos ellos genes implicados en proliferación celular.

Por otra parte, Akt activa la enzima oxido nítrico sintasa endotelial que participa activamente en los procesos de angiogénesis y neovascularización, procesos imprescindibles en la progresión, invasión y metastatización tumorales (Zhou et al., 2000; Neve et al., 2000).

Akt también activa la subunidad con actividad transcriptasa reversa de la telomerasa humana promoviendo la actividad telomerasa, una alteración común a las células tumorales.

B. Objetivos

B. Objetivos

Nuestro objetivo principal en este trabajo ha sido la caracterización de la biología del receptor p185^{HER-2} y sus formas truncadas p95^{HER-2} y p100^{HER-2} en cáncer de mama, así como el estudio de su vía de transducción de señales y su relación con eventos clinicopatológicos.

1. *Caracterizar el nivel de expresión del receptor HER-2 en cáncer de mama*
 - 1.1. Determinar el nivel de expresión del receptor p185^{HER-2} en un grupo de tumores de distintos estadios de evolución obtenidos de un banco de tumores de mama humanos de los que se dispone de seguimiento clínico completo.
 - 1.2. Analizar el nivel de expresión de las formas truncadas de HER-2, p95^{HER-2} y p100^{HER-2}, en un grupo de tumores de distintos estadios de evolución.
 - 1.3. Explorar sus asociaciones clínico-patológicas (receptores hormonales, estadio tumoral y supervivencia).
2. *Determinar el nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama*
 - 2.1. Analizar el nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama y su relación con el receptor HER-2 y otros factores biológicos.
 - 2.2. Explorar sus asociaciones clínico-patológicas (receptores hormonales, estadio tumoral y supervivencia).
3. *Estudiar el nivel de activación del receptor HER-2 en cáncer de mama*
 - 3.1. Determinar el grado de fosforilación de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} en el grupo de cánceres de mama analizados en el punto 1.
 - 3.2. Establecer sus asociaciones clínico-patológicas.

4. *Determinar la asociación in vivo entre HER-2 y la vía Ras-Raf-MAPK*
 - 4.1. Estudiar el nivel de expresión de MAPK basal y fosforilada en cáncer de mama.
 - 4.2. Caracterizar *in vivo* la asociación entre p185^{HER-2}, p95^{HER-2} y MAPK en cáncer de mama humano en las muestras analizadas en el punto 1.
 - 4.3. Establecer las asociaciones de HER-2 y MAPK con eventos clinicopatológicos.
5. *Caracterizar la expresión y activación de la vía PI3-K/Akt en cáncer de mama y explorar sus asociaciones clinicopatológicas*
 - 5.1. Caracterizar los niveles de expresión de las tres isoformas de Akt (Akt-1, Akt-2 y Akt-3) y su nivel de activación en cáncer de mama humano en el grupo de cánceres de mama analizados.
 - 5.2. Determinar la asociación *in vivo* entre p185^{HER-2} y p95^{HER-2} con Akt en cáncer de mama humano en el banco de tumores.
 - 5.3. Determinar las asociaciones de Akt con eventos clinicopatológicos.
6. *Caracterizar el nivel de expresión y activación del receptor HER-2 y su forma truncada p95^{HER-2}, y estudiar los componentes de su vía de señalización en el cáncer de mama de alto riesgo*
 - 6.1. Determinar los niveles de expresión y activación de la forma completa, p185^{HER-2} y p95^{HER-2} en cáncer de mama de alto riesgo.
 - 6.2. Estudiar los niveles de expresión y activación de MAPK en cáncer de mama de alto riesgo.
 - 6.3. Analizar los niveles de expresión y activación de PI3-K/Akt en cáncer de mama de alto riesgo.
 - 6.4. Determinar la asociación de estos parámetros biológicos con eventos clínico-patológicos.

C. Material y Métodos

C. Material y métodos

1. Muestras biológicas

1.1. Muestras tumorales

El conjunto de muestras empleadas en nuestro estudio procedió de la resección quirúrgica de tumores de mama y pertenecieron al Banco de Tumores del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, que incluye muestras tumorales recogidas entre 1982 y 2003 de las que se dispone de seguimiento clínico completo. Dichas muestras fueron obtenidas siguiendo los procedimientos institucionales de este centro y previo consentimiento informado de las pacientes. En algunos casos se utilizaron, asimismo, muestras del Oregon Health Sciences University Hospital (Portland, OR, EEUU), siguiendo el procedimiento aprobado por el Institutional Review Board Committee on Human Research de dicho hospital y del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, siguiendo los procedimientos institucionales de este centro.

En el estudio general se utilizaron muestras pertenecientes a pacientes cuyo tratamiento se basó en el uso de antraciclinas, para asegurar la uniformidad de los diferentes grupos analizados. Entre estos agentes quimioterápicos, de tipo adyuvante, encontramos la doxorubicina (adriamicina), la epirubicina y la ciclofosfamida. Existen, además, combinaciones de las mismas con otros compuestos de carácter adyuvante como son el 5-fluoracilo (5-FU), resultanto los compuestos denominados FAC (5-fluoracilo, adriamicina y ciclofosfamida) o FEC (5-fluoracilo, epirubicina y ciclofosfamida). En el caso de los estudios realizados en el grupo de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama de alto riesgo de estadios II, III ó IV los tratamientos empleados antes de la resección de la mama se basaron en el uso de una combinación de antraciclinas, del tipo FAC o FEC, y de un régimen de acondicionamiento de tipo quimioterápico (STAMP-V [ciclofosfamida, tiotepa, y carboplatino] o CEM) previo al trasplante autólogo de células progenitoras (ASCT).

En este último caso, para la movilización de las células progenitoras se empleó una combinación de quimioterapia mielosupresora y un factor de crecimiento hematopoyético, como puede ser el factor de crecimiento de granulocitos (G-CSF) o el factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). El típico régimen de movilización consistió en un protocolo estándar de FAC seguido de una inyección subcutánea diaria de GM-CSF (10 µg/kg peso por día). Cuando el recuento de células blancas sanguíneas superaba los $3.0 \times 10^9/l$ se llevaba a cabo una leucoaféresis diaria hasta que el número de células progenitoras fuese el suficiente. Después de la terapia mieloablativa la rápida reinfusión de los progenitores hematopoyéticos permitió la recuperación de la médula ósea.

En el diseño experimental seguido en nuestro estudio se consideraron los siguientes tipos de variables:

➤ Anatomopatológicas:

- Tipo histológico
- Grado histológico
- Receptores de estrógenos y progesterona

➤ Clínicas:

- Estadio: tamaño del tumor primario, metástasis ganglionares regionales y metástasis a distancia
- Respuesta al tratamiento administrado
- Demográficas: edad, estado menopáusico
- Tasa de recidivas a 5 años
- Supervivencia libre de recidiva (pacientes sometidas a cirugía)
- Supervivencia libre de progresión (pacientes con enfermedad metastásica o loco-regional irresectable)
- Supervivencia global (todas las pacientes).

Las muestras se clasificaron bajo el criterio general de su pertenencia a los estadios I, II, III, y IV que se resumen en la siguiente Tabla:

Tabla 1. Estadios del cáncer de mama

| Estadios del cáncer de mama | |
|-----------------------------|---|
| Estadio I | Tumores invasivos sin metástasis ganglionares |
| Estadio II | Este estadio engloba tanto los tumores de gran tamaño que sin embargo no presentan afectación ganglionar, como los de pequeño tamaño con metástasis ganglionares loco-regionales. |
| Estadio III | En este estadio se incluyen los tumores de mayor tamaño en los que existe una afectación de los ganglios loco-regionales y periféricos. |
| Estadio IV | Este estadio se caracteriza por la presencia documentada de metástasis distantes y/o de la cadena ganglionar supraclavicular. |

Esquema del estadiaje en cáncer de mama

Es importante constatar que, a efecto de establecer el valor pronóstico de algunos de los parámetros clínicos y/o moleculares determinados en el estudio, todas las muestras que se incluyeron en nuestro análisis pertenecieron a pacientes diagnosticadas con anterioridad a 1995, con lo que se aseguró que el seguimiento clínico tuviese un mínimo de cinco años. Como controles se utilizaron muestras procedentes de pacientes con patología mamaria benigna sometidas a resección de sus lesiones no tumorales y/o de tejido mamario normal.

Asimismo, y para preservar la integridad de los tumores y la correcta conservación del material biológico, el procedimiento seguido fue el que se describe a continuación. Tras su extracción durante el acto quirúrgico, una fracción de las muestras de tejido fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a

- 80° C hasta el momento de su utilización. Otra parte del tumor fue procesado para estudios histológicos, como se describe a continuación.

En primer lugar y tras recibir la pieza de tejido completa, se procedió al tallado de la muestra, proceso consistente en hacer secciones del mismo con el fin de localizar y aislar los nódulos sospechosos. Una vez aislados, éstos fueron fijados por inmersión en un baño de formol tamponado al 4%. La fijación consigue interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, lo que pretende conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo.

A continuación, las muestras se sometieron a sucesivos tratamientos necesarios para su inclusión en parafina y posterior procesamiento. En primer lugar, las muestras fueron sometidas a un progresivo proceso de deshidratación que permitió eliminar el agua existente en el espécimen. Esta operación se llevo a cabo empleando baños sucesivos, de 2 ó 3 horas de duración cada uno, en alcoholes de graduación creciente 50%, 70%, 80%, 95% y, por último, alcohol absoluto.

Tras la deshidratación las muestras se sometieron a un “aclarado”, proceso en el que se sustituye el agente deshidratante por una sustancia miscible en el medio de inclusión, en este caso se utilizó xileno. Se procedió a sumergir las muestras tisulares en baños sucesivos, 3 de 30 minutos cada uno, en distintos recipientes con xileno. Una vez completado este proceso, se procedió a la infiltración o impregnación de la muestra, que consiste en rellenar o infiltrar completamente la muestra histopatológica con el medio que se va a utilizar para la inclusión en el bloque final.

En el estudio de la histopatología de la mama la sustancia de infiltración empleada es la parafina líquida a una temperatura de 58° a 65° C, dependiendo del punto de fusión de la misma. En este punto, las muestras se pasaron directamente desde el último baño de xilol a un recipiente con parafina líquida. Para facilitar la completa impregnación y eliminar totalmente los restos de xilol se realizaron dos baños sucesivos

en diferentes recipientes con parafina líquida de 2 horas de duración cada uno de ellos y un último baño de 4 horas de duración que permite que la impregnación sea perfecta.

En ocasiones se llevó a cabo una infiltración automatizada, técnica en la que se utiliza un sistema generador de vacío con lo que se aumenta la velocidad y la eficiencia de la infiltración. Una vez completada la infiltración de la muestra, ésta fue encastrada en un molde metálico para la confección del bloque característico. Los tejidos infiltrados fueron orientados de forma adecuada, en función de la superficie de interés, en el molde metálico y se recubrieron con la misma parafina líquida con la que habían sido infiltrados. El material metálico del molde junto con un enfriamiento lento a 10°-15° C confirieron una dureza homogénea al bloque. Estas muestras se conservaron en el Servicio de Anatomía Patológica de los correspondientes hospitales.

En este punto la muestra en el bloque de parafina se sometió al corte con microtomo. Los cortes, de 5 µm de grosor, se realizaron sobre un recipiente con agua caliente (40-50° C) en donde quedaron flotando, para recogerse posteriormente introduciendo un portaobjetos de forma vertical en el agua de manera que el corte quedó depositado sobre dicho portaobjetos. El recubrimiento de polilisina de los portaobjetos junto con un secado en estufa a 60° C durante 10-20 minutos (o a 37° C durante 14-16 horas), permitió que el corte quedase perfectamente adherido antes de proceder a su tinción.

Esta primera tinción tuvo como objeto identificar los nódulos de carácter tumoral y conocer el tipo histológico de los mismos. En primer lugar se eliminó la parafina del corte siguiendo un proceso de desparafinización. Para ello, los cortes histológicos se dejaron en estufa a 60° C durante 14 horas, de manera que la parafina volvió de nuevo a un estado líquido.

Posteriormente, las muestras se hidrataron de forma progresiva para lo que se realizó una primera incubación en xilol durante 20 minutos, seguido de 5 lavados sucesivos de 2 minutos de duración cada uno de ellos en distintas cubetas que contenían

xilol. A continuación, se realizaron lavados sucesivos de los cortes con alcoholes de concentración decreciente, cuya proporción va disminuyendo desde el alcohol absoluto hasta el 70% etanol, seguido de sucesivos lavados que se efectuaron empleando agua bidestilada. De esta manera, la muestra va adquiriendo el nivel de hidratación óptimo para la tinción, ya que los colorantes son miscibles en agua.

La primera tinción a los cortes de tejido fue con Henatoxilina de Harris: 0.5% Hematoxilina, 5% alcohol absoluto, 10% alúmina potásica, 0.25% óxido de mercurio. Antes de ser aplicada a la muestra, la solución se suplementó con 0.8% ácido acético y fue filtrada. Este colorante tiñe específicamente los núcleos celulares. Los cortes se lavaron tres veces sucesivas con agua destilada durante 2 minutos. A continuación se tiñeron durante 3 ó 4 minutos con una solución de 0.5% eosina, que marca el componente citoplásmico, y posteriormente las preparaciones se lavaron tres veces sucesivas con agua destilada durante 2 minutos.

En este punto y antes de proceder a su montaje y posterior observación, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación. Con este fin, los cortes se pasaron por gradientes crecientes de etanol. El primer baño, de 2 minutos, se realizó con 70% etanol para posteriormente pasarlos a un recipiente que contenía 80% etanol, en donde permanecieron 2 minutos más. En este momento las preparaciones se pasaron a un baño de 95% etanol, donde se incubaron 2 minutos antes de ser transferidas a un recipiente con xilol, en donde permanecieron durante un período de 10 minutos.

A continuación, se llevaron a cabo varias inmersiones de un minuto de duración de las preparaciones en diferentes recipientes con xilol con el fin de lograr la perfecta deshidratación de los cortes. Por último, las preparaciones fueron recubiertas con un cubreobjetos impregnado en medio de montaje para histología (Entellan®, Merck KG, Darmstad, Alemania) para asegurar su correcta conservación. Mediante este tipo de tinción se identificaron los nódulos tumorales que fueron posteriormente utilizados para las siguientes investigaciones.

1.2. Líneas celulares

Las líneas celulares continuas empleadas en nuestro estudio fueron adquiridas en la “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Rockville, MD, EEUU) y fueron las siguientes:

- ◆ BT-474: Línea celular procedente de un tumor sólido de tipo ductal invasivo originario de una paciente de 60 años de edad. Estas células demostraron tener capacidad generadora de tumores en ratones atímicos, en los que estas células habían sido inyectadas (Lasfargues et al., 1978).
- ◆ SK-BR3: Línea celular procedente de la efusión pleural del adenocarcinoma mamario de una paciente de 43 años. Estas células demostraron tener capacidad para generar tumores en ratones atímicos en los que estas células habían sido inyectadas (Trempe et al., 1976).
- ◆ MCF-7: Línea celular establecida en 1970 y procedente de la efusión pleural de una mujer de 69 años con carcinoma mamario metastático (después de recibir tratamiento con radioterapia y hormonoterapia). Estas células expresaron receptores de estrógenos y fueron capaces de formar focos de transformación (Soule et al., 1973).
- ◆ MDA-MB-231: Línea celular procedente de la efusión pleural de una paciente de 51 años con adenocarcinoma mamario. Estas células demostraron tener capacidad para formar metástasis *in vivo* (Higuchi et al., 1980).

Las células se sembraron en placas de 6 ó 10 cm de diámetro (IWAKI Brand, Chiba, Japón) o bien en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EEUU) y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2 mM glutamina. En el caso del cultivo de la línea celular BT-747 se requirió la adición de un suplemento de 10 µg/ml insulina (Life Technologies, Inc. Ltd., Paisley, Reino Unido).

Las células se incubaron en una estufa húmeda de CO₂/O₂ (5%/95%) a 37° C durante todo el período de cultivo. El medio de cultivo se substituyó por medio fresco cada tres días. Cuando las células alcanzaron un grado de confluencia del 70-80% se lavaron dos veces con 10 ml de PBS estéril seguido de tratamiento con tripsina, diluyéndose a continuación a distintas concentraciones en nuevas placas de cultivo con medio fresco.

2. Metodología

2.1. Estudio de la expresión génica mediante experimentos de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para el análisis diferencial del nivel de expresión del RNA mensajero del factor de crecimiento heregulina, el receptor de membrana HER-2 y la proteína serina/treonina quinasa Akt, se realizaron experimentos de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para ello, en primer lugar se procedió a la extracción del RNA de las muestras tumorales y de las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas como control en nuestros experimentos.

2.1.1 Extracción de RNA total

La cantidad de tumor empleado para la extracción del RNA total varió en función de la disponibilidad de tejido. Generalmente, se empleó 0.1 g de tejido, previamente congelado in fresco en nitrógeno líquido tras la resección quirúrgica del tumor y conservado a -80° C para preservar su integridad hasta el momento de su utilización y almacenado en el Banco de Tumores. Manteniendo la masa tumoral en hielo seco, se aisló un fragmento de la misma y se transfirió a un tubo eppendorf autoclavado al que se añadió 1 ml de TriPure™ Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

A continuación, las muestras se procesaron siguiendo el protocolo adjunto. En primer lugar se procedió a la homogeneización del tejido en TriPure™ Isolation Reagent empleando un disgregador de tejido (Kontes, Vineland, NJ, EE UU). Posteriormente, el homogenado se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, para facilitar la disgregación de los complejos proteicos que podrían existir en el núcleo. Seguidamente, se añadieron 200 µl de cloroformo, lo que originó dos fases que se mezclaron de forma enérgica empleando un vórtex.

El siguiente paso consistió en una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de la centrifugación de las muestras a 14.000 r.p.m. en centrífuga refrigerada a 4° C. Tras esta centrifugación, se visualizaron tres fases, procediéndose a recoger la fase acuosa superior. Esta fase, que contiene el RNA, se trasladó a un nuevo tubo eppendorf autoclavado al que se añadió 500 µl de isopropanol frío. A continuación, se mezclaron por inversión la fase que contenía el RNA y el isopropanol, manteniéndose a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, lo que permitió la precipitación del RNA.

Seguidamente, las muestras se centrifugaron de nuevo a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos manteniendo una temperatura de 4° C. En este punto se eliminó el sobrenadante y el precipitado resultante se lavó con 1 ml de 70% etanol, mezclando por inversión. Posteriormente, las muestras se centrifugaron de nuevo a 10.000 r.p.m. a 4° C durante 5 minutos. Una vez lavado el RNA y eliminado el etanol, el precipitado presente en el fondo del tubo se secó, al aire o empleando una bomba de vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de agua de elevada pureza y libre de RNasas.

Una vez extraído el RNA de las muestras tumorales, se conservó a -80° C para preservarlo de su degradación. Durante todos los procedimientos empleados en nuestro estudio, se eludieron los procesos de descongelación y congelación sucesivas del RNA que afectan en gran medida a su estabilidad.

La concentración del RNA se determinó mediante técnicas espectrofotométricas (Shimadzu CL720 V3, Kyoto, Japón), a 260 nm, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos, y a 280 nm, longitud de onda a la que absorben las proteínas. La concentración de RNA de la muestra se determinó a partir de la absorbancia a 260 nm y el grado de pureza del mismo al hacer la relación entre la absorbancia obtenida a 260 nm y a 280 nm (A260/A280). Consideramos que la pureza era elevada si la relación de absorbancias se situaba entre 1.8 y 2.0. La calidad del RNA se comprobó, así mismo, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE (89 mM trizma base, 89 mM ácido bórico, 1 mM EDTA), con 0.5 µg/ml bromuro de etidio, observándose las dos bandas correspondientes al RNA ribosómico.

2.1.2 Experimentos de RT-PCR

Una vez comprobada la pureza del RNA y conociendo la concentración de las diferentes muestras, se retrotranscribió 1 µgr de RNA mediante el kit de retrotranscripción Super Script II Rnase H Reverse Transcriptase (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido). Para la realización de este procedimiento se empleó como cebador el “*random hexamers*” (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido), consistente en una mezcla de todas las posibles secuencias hexaméricas.

El protocolo seguido para la síntesis del DNA complementario (cDNA) consistió en una primera incubación en tubos de PCR autoclavados de 1 µgr de RNA junto con 1 µl de *random hexamers* y agua tratada con RNasas hasta alcanzar un volumen final de 13,5 µl. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 70° C con el fin de disociar los heterodúplex de RNA presentes y a continuación se enfrió inmediatamente en hielo. Posteriormente, a la mezcla de reacción se añadió 4 µl 5x *Buffer First Strand*, 2 µl 0.1 M DTT y 0.5 µl de 100 mM de una mezcla de dinucleótidos trifosfato (dNTPs), incubándose a 25° C durante 10 minutos para la activación de los *random hexamers*. Seguidamente se añadió 1 µl del enzima Super Script II Rnase H Reverse Transcriptase llevándose a cabo la reacción de retrotranscripción a 42° C durante 1 hora.

La inactivación de la retrotranscriptasa requirió de una posterior incubación a 70° C durante 15 minutos de la totalidad del volumen de reacción.

Todas las incubaciones realizadas a lo largo del proceso se llevaron a cabo en un termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystem, Bedford, MA, EEUU), lo que aseguró que las distintas temperaturas requeridas en cada uno de los pasos, así como los tiempos de incubación pertinentes, fuesen los adecuados en cada momento.

El conjunto de los DNAs complementarios sintetizados durante este proceso representan, teóricamente, todos los mensajeros existentes en la célula en el momento de su extracción. Por este motivo, a partir de estos cDNAs podemos amplificar por PCR cualquier gen que se estuviese expresando en ese momento en la célula. A partir de este cDNA amplificamos los mensajeros correspondientes al factor de crecimiento heregulina, así como a la forma completa del receptor de membrana HER-2 y a una forma truncada del mismo resultado de un procesamiento alternativo (*splicing* alternativo). Asimismo, mediante este procedimiento se estudió el nivel de expresión de las diferentes isoformas de la proteína serina/treonina quinasa Akt. De forma complementaria se amplificaron dos genes cuya expresión es constitutiva, la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la proteína de unión a la caja TATA (TBP). Para ello se emplearon cebadores específicos para cada uno de los genes a amplificar en nuestro estudio y que se describen a continuación.

| HER-2 completo | Secuencia de los cebadores |
|-------------------|---------------------------------|
| HER-2 sentido | 5'-TCAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACC-3' |
| HER-2 antisentido | 5'-CATAAGCTGTGTCACCAGCTGCACC-3' |

| HER-2 truncado | Secuencia de los cebadores |
|----------------------------|---------------------------------|
| HER-2 truncado sentido | 5'-TCAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACC-3' |
| HER-2 truncado antisentido | 5'-CCCCTTTTATAGTAAGAGCCCCAGA-3' |

| Heregulina | Secuencia de los cebadores |
|------------------------|-----------------------------|
| Heregulina sentido | 5'-AGTCCTTCGGTGTGAAACCA -3' |
| Heregulina antisentido | 5'-GGCATAACCAGTGATGATCTC-3' |

| Akt1 | Secuencia de los cebadores |
|------------------|--------------------------------|
| Akt1 sentido | 5'-ATGAGCGACGTGGCTATTGTGAAG-3' |
| Akt1 antisentido | 5'-GAGGCCGTCAGCCACAGTCTGGATG3' |

| Akt2 | Secuencia de los cebadores |
|------------------|-----------------------------|
| Akt2 sentido | 5'-ATGAATGAGGTGTCTGTCAT-3' |
| Akt2 antisentido | 5'-TGCTTGAGGCTGTTGGCGACC-3' |

| Akt3 | Secuencia de los cebadores |
|------------------|---------------------------------|
| Akt3 sentido | 5'-ATGAGCGATGTTACCATTGT-3' |
| Akt3 antisentido | 5'-CAGTCTGTCTGCTACAGCCTGGATA-3' |

| GAPDH | Secuencia de los cebadores |
|-------------------|----------------------------|
| GAPDH sentido | 5'-GGGCTGCCTTCTCTTGAC-3' |
| GAPDH antisentido | 5'-CGACAGTAGACTCCACGACA-3' |

| TBP | Secuencia de los cebadores |
|-----------------|------------------------------|
| TBP sentido | 5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3' |
| TBP antisentido | 5'-TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC-3' |

2.2 *Determinación de la expresión proteica mediante transferencia Western*

Para la determinación del nivel de expresión de las distintas proteínas analizadas en nuestro estudio, se procedió a la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS seguido de una posterior transferencia Western e incubación con anticuerpos específicos

2.2.1 *Obtención del extracto proteico de las líneas celulares empleadas como control de expresión*

Las células se mantuvieron en una estufa húmeda de CO₂/O₂ (5%/95%) a 37° C durante todo el período de cultivo. El medio de cultivo se substituyó por medio fresco cada tres días. Cuando las células alcanzaron un grado de confluencia del 70-80% se lavaron dos veces con 10 ml de PBS estéril seguido de tratamiento con tripsina recogiéndose a continuación en tubos de 10 ml para su centrifugación a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos. De forma sucesiva y tras eliminar el sobrenadante, las células se lavaron de nuevo empleando 10 ml de PBS y se centrifugaron a 1.500 r.p.m. durante un periodo de 5 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y las células se mantuvieron en

hielo en donde se les añadió 200 µl de tampón de homogeneización RIPA, cuya composición es la siguiente: 20 mM fosfato sódico pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100. En el momento de su utilización se añadieron al tampón inhibidores de proteasas, tales como 1% aprotinina, 2 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptina, e inhibidores de fosfatasas tales como 2 mM Na₃VO₄ y 50 mM NaF (SIGMA-Aldrich, Saint Louis, MI, EE UU).

Las células se homogeneizaron en este tampón empleando una pipeta manteniendo el tubo en hielo en todo momento. Posteriormente el lisado celular fue transferido a un tubo eppendorf para a continuación centrifugarse a 14.000 r.p.m., en centrífuga refrigerada a 4° C, durante un período de 15 minutos. El sobrenadante obtenido tras este paso se transfirió a un nuevo tubo debidamente identificado. La concentración de proteína de cada una de las líneas celulares se determinó mediante el método colorimétrico *BCA Protein Assay* (Pierce, Rockford, IL, EE UU), empleando una curva patrón de proteína de concentración conocida (1mg/ml BSA). A una dilución 1: 50 de la muestra de proteína se añadió un volumen de una mezcla (50:1) de ácido bicinónico (tartrato sódico, carbonato sódico y bicarbonato sódico, pH 11.25) y 4% sulfato de cobre pentahidratado. La reacción transcurrió a 37° C durante 30 minutos y la detección colorimétrica se realizó a una longitud de onda de 540 nM en el espectrofotómetro (Shimadzu CL720 V3, Kyoto, Japón).

2.2.2 *Obtención del extracto proteico de los tumores primarios*

La cantidad de tumor empleado para la extracción de proteína total de cada una de las muestras varió en cada caso en función de la disponibilidad de tejido. En general, se empleó 0.1 g de tejido, previamente congelado in fresco en nitrógeno líquido tras la resección quirúrgica del tumor y conservado a -80° C en el Banco de Tumores para preservar su integridad.

Manteniendo la masa tumoral en hielo seco, se aisló un fragmento de la misma que se transfirió a un tubo eppendorf junto con 200 µl de tampón de homogeneización

RIPA, cuya composición es la siguiente: 20 mM fosfato sódico pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100. En el momento de su utilización se añadieron al tampón inhibidores de proteasas, tales como 1% aprotinina, 2 mM fenilmetilsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptina, e inhibidores de fosfatasa tales como 2 mM Na₃VO₄ y 50 mM NaF (SIGMA-Aldrich, Saint Louis, MI, EE UU).

Las muestras se homogeneizaron en este tampón empleando un disgregador de tejido (Kontes, Vineland, NJ, EE UU) y posteriormente se centrifugaron a 14.000 r.p.m., en centrífuga refrigerada a 4° C, durante un período de 15 minutos. El sobrenadante obtenido tras este paso se transfirió a un nuevo tubo debidamente identificado. La concentración de proteína de cada una de las muestras se determinó mediante el método colorimétrico *BCA Protein Assay* (Pierce, Rockford, IL, EE UU), empleando una curva patrón de proteína de concentración conocida (1mg/ml BSA). A una dilución 1: 50 de la muestra de proteína se añadió un volumen de una mezcla (50:1) de ácido bicinónico (tartrato sódico, carbonato sódico y bicarbonato sódico, pH 11.25) y 4% sulfato de cobre pentahidratado. La reacción transcurrió a 37° C durante 30 minutos y la detección colorimétrica se realizó a una longitud de onda de 540 nm en el espectrofotómetro (Shimadzu CL720 V3, Kyoto, Japón).

2.2.3 *Electroforesis en geles de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE)*

Para la separación de las distintas proteínas que componen el total del homogenado tumoral y/o línea celular, se procedió a la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) siguiendo el procedimiento de geles discontinuos y sistema de tampones de Laemmli (Laemmli et al., 1970).

Para la preparación de estos geles se utilizaron cristales de 8.5 x 6 cm, separados entre sí por unos espaciadores de 1.5 mm de espesor (Mini-protean III, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE UU). Los geles constaban de dos fases, una superior de mayor tamaño de poro, denominado gel concentrador, que tiene como función la concentración de las muestras, de manera que todas ellas entren en el mismo momento

en la fase de resolución y una inferior de tamaño de poro variable en función del peso molecular de la proteína a analizar, denominado gel de resolución.

La composición del gel superior o concentrador es invariable y consiste en: 125 mM Tris-HCl pH 6.5, 0.1% SDS, 4% acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.1% persulfato amónico, 26 μ M TEMED. Por su parte, la composición de la porción inferior o gel separador es la siguiente: 38 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% persulfato amónico, 8.6 μ M TEMED y una concentración variable de acrilamida/bisacrilamida (29:1).

En el caso del análisis del nivel de expresión del receptor HER-2 total y de su estado de fosforilación, se utilizó una concentración del 8% poliacrilamida en el gel de resolución; en el estudio de la expresión del factor de crecimiento heregulina se emplearon geles con un porcentaje del 15% poliacrilamida. Para estudiar la expresión basal de MAPK y su estado de activación se emplearon geles con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida del 12%, y en el estudio del nivel de expresión de las isoformas de Akt y de su estado de fosforilación se requirieron geles del 9% poliacrilamida.

En cada experimento se resolvieron en cada uno de los pocillos de los geles cantidades similares de proteína procedente de cada una de las muestras tumorales a analizar. Como control de expresión se utilizó una muestra procedente de un lisado de línea celular continua en cada experimento, cuya cantidad varió dependiendo de la proteína a analizar en cada caso. Al volumen de lisado conteniendo la cantidad de proteína necesaria en cada caso se le añadió la proporción adecuada de tampón de carga de electroforesis 4x, cuya composición es la siguiente: 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% glicerol, 8.2% SDS, 64 mM β -mercaptoetanol, azul de bromofenol.

La coloración de las muestras, proporcionada por el azul de bromofenol del tampón de carga, permitió seguir la migración de las muestras a lo largo del gel de resolución y el uso simultáneo de un marcador de peso molecular preteñido (Prestained

Low-Molecular Weight Marker, Prestained High-Molecular Weight Marker, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE UU) nos permitió seguir la resolución de las muestras. Antes de ser aplicadas al gel, las muestras fueron hervidas en un baño a 95-100° C durante 5 minutos con el fin de disociar los complejos poli-proteicos.

La electroforesis se llevó a cabo en condiciones de voltaje constante (200 voltios durante aproximadamente 1 hora). La composición del tampón de electroforesis es la siguiente: 25 mM Trizma base, 192 mM Glicina, 0.1 % SDS, empleando una cubeta de electroforesis (Mini-protean III, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE UU).

2.2.4. Transferencia electroforética e inmunodetección (“Western blotting”)

Una vez completada la electroforesis y tras eliminar el gel concentrador se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel de resolución a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE UU) empleando para ello el Mini-Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE UU), siguiendo el protocolo estándar. El gel y la membrana de nitrocelulosa se equilibraron previamente en el tampón de transferencia, compuesto por 50 mM Trizma base, 384 mM glicina, 0.1 % SDS, 20 % metanol, durante 10 minutos. La transferencia se llevó a cabo en condiciones de amperaje constante a 300 mA durante un período de 4 horas, en ambiente refrigerado a 4° C, con lo que se evita un calentamiento excesivo de la solución, lo que interferiría en la estabilidad de las proteínas.

Una vez completada la transferencia electroforética, la membrana de nitrocelulosa se lavó con una solución compuesta de 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl pH 7.4, 0.1 % Tween-20 (TBST) para eliminar los restos de sales presentes en el tampón y equilibrar la membrana para los sucesivos pasos del procedimiento. Los lavados se desarrollaron con agitación constante y a temperatura ambiente.

Tras este paso, la membrana se incubó con una solución de bloqueo, la cual evita las uniones inespecíficas del anticuerpo a la misma. La composición de la solución de

bloqueo varió dependiendo del anticuerpo empleado. Así, para el estudio de expresión del factor de crecimiento heregulina se empleó una solución de bloqueo compuesta por un 5% de caseína (Tropix Applied Biosystems, Bedford, MA, EEUU), en TBST. En el caso del análisis del nivel de expresión de HER-2, forma total y fosforilada de MAPK y del estado de fosforilación de Akt, se utilizó una solución de bloqueo compuesta de 5% leche desnatada en TBST. En el caso del estudio del estado de activación de HER-2, así como en el análisis de la expresión de las isoformas de Akt, la solución de bloqueo se componía de 3% leche desnatada en TBST. El bloqueo transcurrió durante 1 hora a temperatura ambiente o bien a 4° C en el caso de que se realizara durante toda la noche (14-16 horas).

Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo específico para cada una de las proteínas consideradas en nuestro estudio, y que fueron los siguientes:

- Para la caracterización de la forma completa del receptor HER-2 (p185^{HER-2}), así como de una forma truncada del mismo producida por un mecanismo de proteólisis (p95^{HER-2}), se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-HER-2, clon CB11 (BioGenex, San Ramon CA, EE UU), dirigido contra el dominio intracelular del receptor, es decir, contra la porción C-terminal del mismo a una dilución 1:200 en leche desnatada al 5% en TBST durante 3 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.
- Para el estudio de la forma completa del receptor HER-2 (p185^{HER-2}) y una forma truncada de éste obtenida mediante un mecanismo de procesamiento alternativo del RNA que codifica para el fragmento extracelular del receptor HER-2 (p100^{HER-2}), se emplearon dos anticuerpos diferentes dirigidos contra el dominio N-terminal del receptor y que fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal anti-HER-2, clon 10A7 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, Reino Unido), a una dilución 1:500 en 3% leche desnatada en TBST, y el

anticuerpo monoclonal anti-HER-2, clon L87 (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, EE UU), a una dilución 1:200 en 5% leche desnatada en TBST. Las condiciones de incubación en ambos casos fueron de 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.

- Para el análisis de expresión del factor de crecimiento heregulina, se empleó un anticuerpo monoclonal anti-heregulina, clon 7D5 (NeoMarkers, Fremont CA, EE UU), que reconoce específicamente el dominio extracelular de esta glicoproteína. El anticuerpo fue empleado en dilución 1:200 en un 5% caseína (Tropix Applied Biosystems, Bedford, MA, EE UU) en TBST, durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.
- Para la detección del nivel de fosforilación de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra la forma activa del receptor (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EE UU), que reconocía exclusivamente el residuo de tirosina 1248 cuando éste se encontraba fosforilado. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:2000 en 3% leche desnatada en TBST durante 14-16 horas a 4° C y en agitación constante.
- Para estimar los niveles totales de MAPK se empleó un anticuerpo policlonal cuya dilución fue 1:1000 en 5% leche desnatada en TBST. Para el estudio de la forma activada de MAPK p42/p44, se empleó un anticuerpo monoclonal, clon E10, que detecta p42 y p44 (Erk1 y Erk2) únicamente cuando se encuentran fosforiladas de forma simultánea la treonina 202 y la tirosina 204 de la proteína Erk humana (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE UU), a una dilución 1:2000 en la misma solución. Las condiciones de incubación en ambos casos fueron de 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.
- Para el estudio de los niveles de expresión de las isoformas de Akt, Akt1 y Akt2, se utilizaron anticuerpos policlonales dirigidos contra una secuencia específica de cada isoforma localizada en sus respectivos dominios carboxi-terminales

(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE UU). Estos anticuerpos se emplearon a una dilución 1:500 en 5% leche desnatada en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.

- El estudio de los niveles de expresión de la forma activa de Akt en las distintas muestras, se realizó mediante la utilización de un anticuerpo policlonal que reconoce únicamente las moléculas de Akt cuya serina 473 se encuentra fosforilada (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE UU). Este anticuerpo se empleó a una dilución 1:1000 en 5% leche desnatada en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.

Tras la incubación de la membrana con los anticuerpos específicos correspondientes a cada caso y en las condiciones reseñadas, se realizaron tres lavados de la membrana de nitrocelulosa, de 10 minutos de duración cada uno de ellos, con TBST. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de agitación constante con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham Pharmacia Biotech., Little Chafont, Reino Unido) en el caso de que los anticuerpos primarios fueran monoclonales y con un anticuerpo secundario anti-conejo (Amersham Pharmacia Biotech., Little Chafont, Reino Unido), o anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE UU), dependiendo de los distintos casos, conjugados asimismo con peroxidasa de rábano, en el caso de que los anticuerpos primarios fueran policlonales .

La detección de la presencia de las respectivas proteínas se completó mediante un método quimioluminiscente, incubando la membrana con el reactivo SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Rockford, IL, EE UU), siguiendo el protocolo estándar. Finalmente la membrana se expuso a un film fotográfico (MIN-R Mammography film, Kodak, Rochester, NY, EE UU), realizándose distintos tiempos de exposición del mismo, que en general variaron entre 10 segundos y quince minutos.

2.2.5. Análisis densitométrico

El análisis densitométrico de las bandas correspondientes a los distintos niveles de expresión de las diferentes proteínas analizadas a lo largo del estudio se realizó tras escanear el gel con el escáner A4 EPP (Kodak, Rochester, NY, EE UU) y densitometrarlo con el GS-700 Imaging Densitometer mediante el software Molecular Analysis, versión 1.5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE UU).

2.3 Determinación de la expresión proteica y localización subcelular mediante técnicas inmunohistoquímicas

El nivel de expresión y la localización subcelular de las distintas proteínas analizadas en nuestro estudio se llevó a cabo mediante experimentos de inmunohistoquímica, realizados en paralelo a las transferencias Western. Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron en colaboración con el Dr. Federico Rojo del Laboratorio de Investigación Oncológica del Servicio de Oncología Médica del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona).

En primer lugar se procedió a la obtención de cortes histológicos de las muestras tumorales que, tras su extracción durante el acto quirúrgico, habían sido inmediatamente fijadas en 4% formol tamponado e incluidas en parafina en los Servicios de Anatomía Patológica de los respectivos hospitales de origen de las muestras. Mediante la utilización de un microtomo de parafina se realizaron cortes del tejido de un espesor de 5 μm , se adhirieron a portaobjetos recubiertos de polilisina y, seguidamente, se procedió a su desparafinización para la realización de la posterior técnica inmunohistoquímica.

Para ello, en primer lugar, los cortes histológicos se incubaron en estufa a 60° C durante 14 horas, de manera que la parafina volvió de nuevo a un estado líquido. Posteriormente, las muestras se hidrataron de forma progresiva para lo que se realizó una primera incubación en xilol durante 20 minutos, seguido de 5 lavados sucesivos de 2 minutos de duración cada uno de ellos en distintas cubetas que contenían xilol. A continuación, se realizaron lavados sucesivos de los cortes con alcoholes de concentración decreciente cuya proporción va disminuyendo desde el alcohol absoluto

hasta el 70% etanol seguido de lavados sucesivos que se efectuaron empleando agua bidestilada. De esta manera, la muestra va adquiriendo el nivel de hidratación óptimo para la tinción inmunohistoquímica.

En este momento, dependiendo de las especificaciones del anticuerpo y en determinados casos, tal como sucede para la detección del receptor HER-2, puede ser necesario proceder a una reacción que favorezca la exposición del antígeno al anticuerpo. Este proceso se llevó a cabo en un microondas a media potencia durante 2 ó 3 minutos, pero el procedimiento demostró ser más eficaz cuando se desarrolló en autoclave a 110° C durante 3 minutos.

Durante este proceso los portaobjetos con los cortes histológicos deben estar sumergidos en 10 mM tampón citrato pH 6.6 (*Buffer for Antigen Retrieval*, DAKO Corporation, Carpintería, CA, EE UU). La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su eliminación y, posteriormente, se realizaron varios lavados de los cortes con agua destilada y de 2 minutos de duración cada uno de ellos, con el objeto de eliminar del tejido los restos de tampón citrato.

El siguiente paso del proceso tenía como finalidad eliminar la actividad peroxidasa endógena del tejido, que podría interferir en la detección inmunohistoquímica de la proteína de interés. Para ello, las muestras se incubaron en un recipiente de vidrio con una solución de 3% H₂O₂ en metanol, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se procedió a la eliminación de esta solución lavando de forma repetida las muestras con agua bidestilada. Finalmente, y para el manejo de las muestras durante el resto del proceso, la preparación de tejido se rodeó con Sigmacote (SIGMA-Aldrich, Saint Louis, MI, EE UU).

Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron con una solución de bloqueo compuesta por 20% suero de caballo en suero fisiológico durante 20 minutos a temperatura ambiente, lo que evita ulteriores uniones inespecíficas del anticuerpo. Seguidamente, la solución de bloqueo se eliminó del corte histológico y tras determinar

en experimentos iniciales las concentraciones de anticuerpo más adecuadas a emplear en cada caso, se procedió a la incubación de los cortes histológicos con los correspondientes anticuerpos específicos. A continuación, detallamos las condiciones experimentales utilizadas en cada caso.

- La detección del nivel de expresión y localización subcelular del receptor HER-2 en las muestras tumorales se realizó mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-HER-2, clon CB11, dirigido contra el dominio intracelular del receptor (BioGenex, San Ramón, CA, EE UU). La incubación se realizó a una dilución 1:50 en 10 % suero de caballo en suero fisiológico durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Para el análisis de la expresión y localización subcelular del factor de crecimiento heregulina, se empleó un anticuerpo monoclonal anti-heregulina, clon 7D5 dirigido contra el dominio extracelular. Las condiciones experimentales consistieron en la incubación de los cortes histológicos con dicho anticuerpo a una dilución de 3 µg/ml en 10% suero de caballo en suero fisiológico durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Para el estudio de los niveles de activación de MAPK p42/p44 así como de su ubicación en la célula, se empleó el anticuerpo monoclonal anti-MAPK clon E10, a una dilución 1:100 en 10% suero de caballo en suero fisiológico (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE UU). La incubación con el anticuerpo se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente.
- El estudio del nivel de activación de Akt y su localización subcelular se desarrolló empleando un anticuerpo policlonal anti-Akt fosforilado (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EEUU) en dilución 1:100 en 10% suero de caballo en suero fisiológico. La incubación con el anticuerpo se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras la incubación de los cortes histológicos con los correspondientes anticuerpos primarios específicos, dichos cortes fueron lavados 2 veces con PBS durante 2 minutos vertiendo el tampón sobre la preparación. A continuación, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario durante quince minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se eliminó el anticuerpo secundario y se realizaron dos lavados de los cortes histológicos con PBS durante dos minutos cada uno de ellos. En este momento las muestras se incubaron con una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano durante quince minutos y a temperatura ambiente.

Seguidamente se procedió a la realización de dos lavados con PBS siguiendo el protocolo anterior, tras lo cual los cortes se incubaron con una solución de diaminobenzamida (DAB) a temperatura de 37° C y en oscuridad, durante 5 minutos. Posteriormente los cortes fueron lavados 2 veces con agua bidestilada durante 2 minutos (DAKO LSAB[®]2 System Peroxidase, DAKO Corporation, Carpintería, CA, EE UU).

Las muestras fueron entonces contrastadas durante algunos segundos con hematoxilina de Harris: 0.5% Hematoxilina, 5% alcohol absoluto, 10% alúmina potásica, 0.25% óxido de mercurio. Antes de ser aplicada a la muestra, la solución se suplementó con 0.8% ácido acético y fue filtrada.

Con el fin de observar las preparaciones, proceso que requiere de un óptimo montaje y facilitar su conservación, éstas fueron progresivamente deshidratadas. Con este fin, y después de eliminar el exceso de colorante de contraste lavando en sucesivas ocasiones las preparaciones con agua destilada, los cortes se pasaron por gradientes crecientes de etanol.

El primer baño, de 2 minutos, se realizó con 70% etanol para posteriormente pasarlos a un recipiente que contenía 80% etanol, en donde permanecieron 2 minutos más. En este momento las preparaciones se pasaron a un baño de 95% etanol, donde se

incubaron 2 minutos antes de ser transferidas a un recipiente con xilol, en donde permanecieron durante un período de 10 minutos.

A continuación, se llevaron a cabo varias inmersiones de un minuto de duración de las preparaciones en diferentes recipientes con xilol, con el fin de lograr la perfecta deshidratación de los cortes. Por último, las preparaciones fueron recubiertas con un cubreobjetos impregnado en medio de montaje para histología (Entellan®, Merck KG, Darmstad, Alemania) para asegurar su correcta conservación.

2.4 Análisis estadísticos

2.4.1 Recogida de datos

Los datos clínico-patológicos de interés se recogieron en una base de datos diseñada para su posterior transferencia al programa “SPSS” para análisis estadísticos. En esta base se hacía constar: la fecha de diagnóstico y cirugía, la edad de las pacientes, el estado menopáusico, el número de ganglios afectos y el número total de analizados, el TNM, el estadio de la enfermedad, el nivel de expresión de los receptores hormonales (receptores de estrógenos y de progesterona), el tipo histológico del tumor, la ubicación de las posibles metástasis a distancia, las fechas de la última revisión y/o de la recaída y las fechas de exitus debido a la enfermedad o a otras causas en el caso de que haberse producido.

2.4.2 Análisis de datos

Todos los estudios moleculares y anatomopatológicos se realizaron a ciegas con relación a la información clínica. Los datos se analizaron mediante técnicas estadísticas simples, que se basaron en técnicas no paramétricas. Éstas incluyeron comparaciones cuantitativas como son las tablas de contingencia, calculando el estadístico Chi cuadrado según el método de Pearson. En el caso de que el número de observaciones no fuese el adecuado se empleaba el estadístico exacto de Fisher. Se hicieron también

correlaciones simples (Spearman) entre los distintos parámetros analizados que permiten medir cómo se relacionan las variables.

Todos los análisis realizados fueron de dos colas. La supervivencia libre de enfermedad y global se calculó por el método de Kaplan-Meier y las curvas de supervivencia se compararon por el log-rank test. El análisis multivariado se llevó a cabo solamente en las variables que en el análisis univariado dieron $P < 0.05$. Todas las variables clínicas incluidas en el estudio fueron dicotomizadas, a excepción del estadio de la enfermedad. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SPSS 10.0 para Windows.

D. Resultados

D. Resultados

1. Caracterización de la expresión de HER-2 en tumores primarios de mama

1.1. Estudio del nivel de expresión del receptor HER-2 en tumores primarios de mama

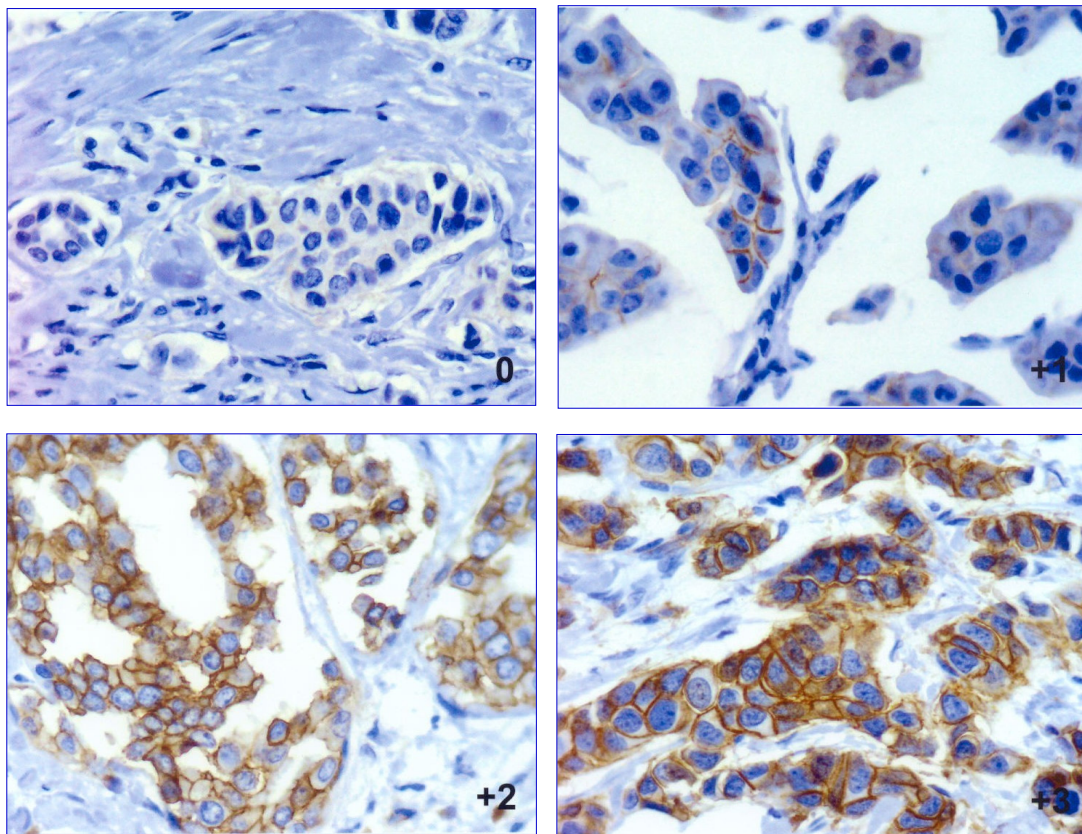
En la primera parte de nuestro estudio se examinó el nivel de expresión del receptor HER-2, miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico y de peso molecular 185 kDa (p185^{HER-2}), en un total de 337 muestras de tejido mamario tumoral. Estas muestras fueron obtenidas a partir de tres hospitales, el Hospital Clínico Universitario de Valencia (n = 119), el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona (n = 40) y el Oregon Health Sciences University Hospital de Estados Unidos (n = 178).

En lo referente a las muestras procedentes del Hospital Clínico Universitario de Valencia empleadas en este estudio, éstas procedieron de la resección quirúrgica de tumores de mama en el Servicio de Cirugía de este Hospital. Dichas muestras se conservaron en el Banco de Tumores del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico, el cual incluye muestras tumorales recogidas entre 1982 y 2003 y de las que se dispone de seguimiento clínico completo. Dichas muestras fueron obtenidas siguiendo los procedimientos institucionales de este centro y previo consentimiento informado de las pacientes. Es importante constatar que, a efecto de establecer el valor pronóstico de algunos de los parámetros clínicos y/o moleculares determinados en el estudio, todas las muestras que se incluyeron en nuestro análisis pertenecieron a pacientes diagnosticadas con anterioridad a 1995, con lo que el seguimiento clínico tenía un mínimo de cinco años.

Con el fin de preservar la integridad de las muestras tumorales y la correcta conservación del material biológico, una fracción de estos tumores fue congelada inmediatamente tras su obtención durante el acto quirúrgico, empleando para ello nitrógeno líquido, y fueron conservadas a -80° C hasta el momento de su utilización.

Tradicionalmente, el método de estudio del nivel de expresión del receptor HER-2 y de su localización subcelular, tanto a nivel clínico como en investigación básica, ha sido mediante su detección inmunohistoquímica. Puesto que nuestro laboratorio dispone de un banco de tumores de mama, caracterizamos la expresión inmunohistoquímica de la proteína HER-2 en una serie de los mismos empleando para ello un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra el dominio C-terminal del receptor. En la siguiente imagen podemos observar ejemplos representativos de diversos tumores de mama con la característica tinción de membrana del receptor HER-2, que como se aprecia presenta distintos grados de intensidad (0, 1+, 2+, 3+) dependiendo de los distintos tumores analizados.

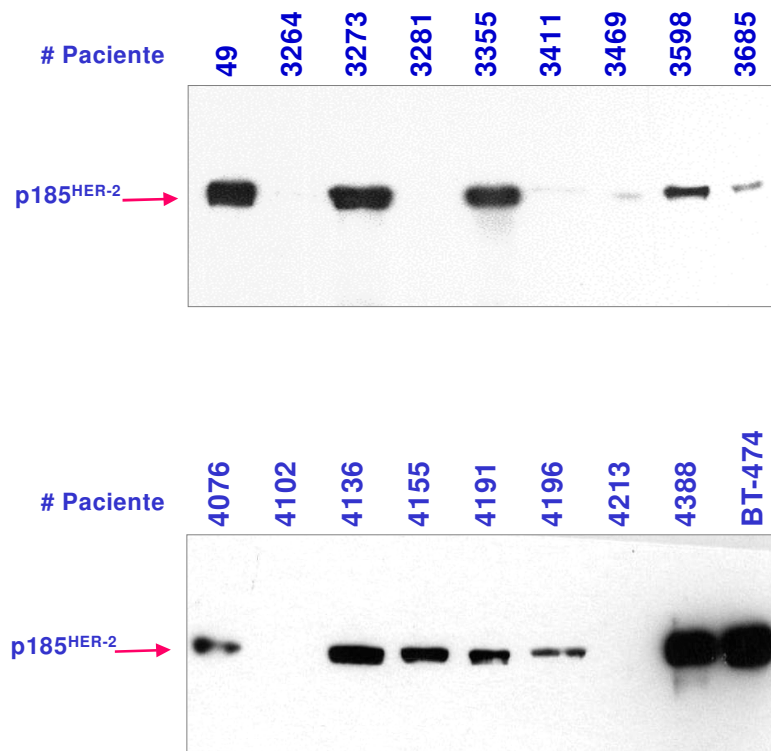
FIGURA 4. Determinación inmunohistoquímica de la proteína HER-2 en cáncer de mama



Tinción inmunohistoquímica de HER-2 en cáncer de mama mostrando diferentes grados de intensidad dependiendo de los diversos tumores analizados.

Completamos el estudio de estas muestras mediante el análisis de la expresión del receptor HER-2 con técnicas de Western blot, empleando un anticuerpo que reconoce el dominio C-terminal citosólico del receptor HER-2 (Lin et al., 1999), clon CB11, y que ha sido ampliamente utilizado en estudios de esta naturaleza. Como ya había sido referido con anterioridad por numerosos estudios realizados por otros grupos, en nuestro análisis detectamos un patrón de expresión de p185^{HER-2} variable entre las distintas muestras de cáncer de mama analizadas. Así, observamos la presencia de niveles bajos o moderados de HER-2 junto a muestras que mostraron un elevado nivel de expresión de p185^{HER-2}, mientras que en un grupo de las mismas se detectó ausencia de expresión del receptor. En la Figura 5, se muestra un panel de muestras representativo de distintos niveles de expresión del receptor p185^{HER-2}.

FIGURA 5. Niveles de expresión de p185^{HER-2} analizados por Western blot



Análisis de Western blot del receptor HER-2 empleando un anticuerpo específico dirigido contra el dominio intracelular del mismo

En la siguiente tabla se refiere la variabilidad en los niveles de expresión de la forma completa p185^{HER-2}, analizada por técnicas de Western blot.

Tabla 2. Niveles de expresión de p185^{HER-2}

| Expresión de p185 ^{HER-2} | % de expresión |
|------------------------------------|----------------|
| Negativa | 28.2 |
| Baja | 24.3 |
| Moderada | 25.2 |
| Alta | 22.3 |

Análisis de los niveles de expresión de p185^{HER-2} mediante técnicas de transferencia Western, empleando un anticuerpo específico para el receptor.

El análisis mediante técnicas inmunohistoquímicas de una serie de muestras tumorales que presentaron elevados niveles de expresión de p185^{HER-2}, evaluados también por Western blot, demostró que dichas muestras presentaron una moderada o intensa tinción de membrana en más del 10% de las células. Ello sugiere que la sobreexpresión de HER-2 presente en estas muestras puede ser identificada tanto por técnicas inmunohistoquímicas como por Western blot. Concretamente en nuestro grupo de muestras se observó que el porcentaje de sobreexpresión de p185^{HER-2} fue del 22.3%, dato que coincide con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.

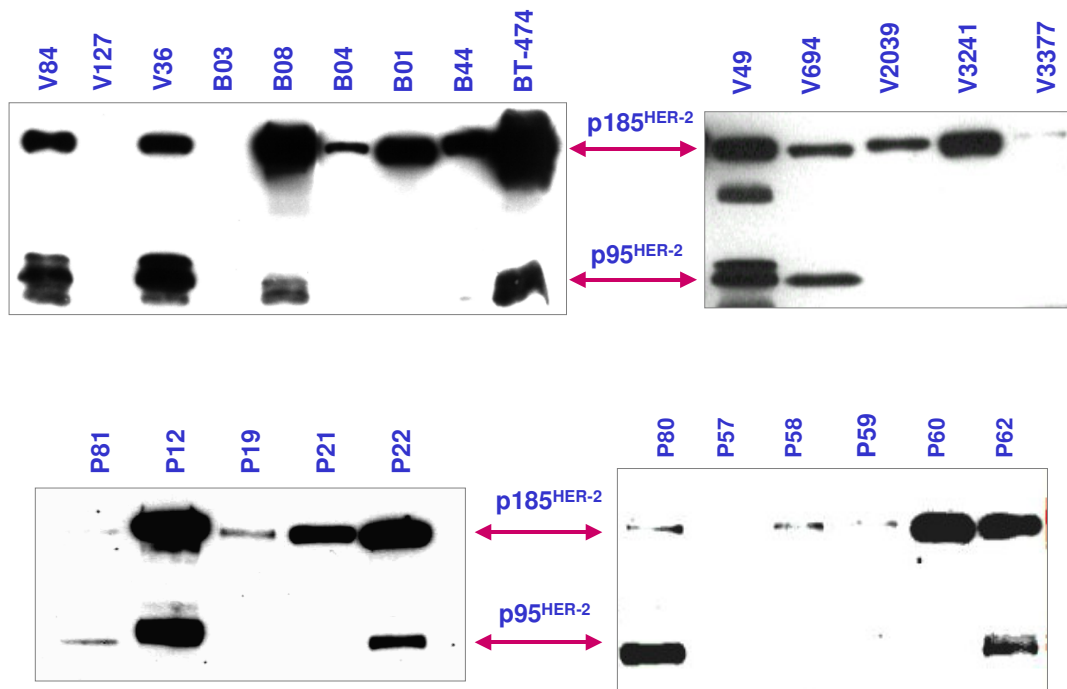
En el curso de este estudio, detectamos asimismo la presencia de una forma truncada del receptor HER-2 generada por la acción de una metaloproteasa, no identificada en la actualidad, que origina un fragmento intracelular de HER-2 asociado a

la membrana plasmática y con un peso molecular de 95 kDa. Estudios previos realizados por otros grupos han demostrado que esta forma truncada del receptor, denominada p95^{HER-2}, posee actividad quinasa *in vitro* y se halla fosforilada en los residuos de tirosina del dominio catalítico *in vivo* (Christianson et al., 1998; Molina et al., 2001).

El estudio por técnicas de Western blot de los niveles de expresión de p185 y p95 demostró que, en la amplia serie de tumores de mama analizadas en nuestro estudio, la expresión de p95^{HER-2} también fue heterogénea. Así, pudimos comprobar la existencia de muestras en las que la única forma del receptor presente en el tumor fue p185^{HER-2}, mientras que en otros casos se apreciaron distintos niveles de expresión de ambas formas del receptor, tanto p185^{HER-2} como p95^{HER-2}.

La siguiente Figura muestra una serie de ejemplos representativos de la expresión de ambas formas del receptor en cánceres de mama.

FIGURA 6. Niveles de expresión de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} en tumores de mama



Análisis de Western blot de muestras de cáncer de mama empleando un anticuerpo dirigido contra el dominio intracelular de HER-2.

Como se puede apreciar en la Figura 6, se observó una amplia heterogeneidad en cuanto a los niveles de expresión de ambas formas del receptor. Así, un grupo de muestras no mostró expresión de ninguna forma del receptor HER-2 (véase, por ejemplo, las muestras n° V3377, V127, B03, P57), otras muestras tumorales solamente expresaron la forma completa del receptor p185^{HER-2} (las muestras n° V2039, V3241), mientras que un tercer grupo de tumores presentaron ambas formas del receptor HER-2, p185 y p95 (por ejemplo, las muestras n° V49, V649, V84, V36). Por otra parte, en el grupo de muestras que presentaban la forma completa de HER-2, los niveles de expresión de p185^{HER-2} fueron variables, ya que algunos tumores mostraron un nivel de expresión bajo o moderado de éste (como por ejemplo, las muestras n° V694, V2039, V84, V36), mientras que un segundo grupo de tumores presentaron elevados niveles de p185^{HER-2} (véase las muestras n° V49, V3241, B08).

En la mayoría de los tumores en donde estaban presentes ambas formas del receptor, la expresión de p95 era menor o semejante a la de p185 (como ocurre en las muestras n° V49, V649, V84, B08, P12, P22, P62) y solamente en unos pocos casos la expresión de la forma truncada fue mayor que la de la forma completa del receptor (como es el caso de las muestras n° V36 o P80). Por otra parte, nuestro análisis demostró que únicamente en un pequeño porcentaje de casos (2.1%) se observó exclusivamente la expresión de p95^{HER-2} sin que se apreciara la presencia en el tumor de la forma completa del receptor.

Como control positivo de expresión de ambas formas del receptor, así como del peso molecular relativo de ambas, se utilizó 30 µg de un lisado de proteína total de un cultivo de la línea celular de cáncer de mama BT-474 que fue inducida con acetato de 4-amino fenilmercurio (APMA), un compuesto mercuríco utilizado para activar metaloproteinasas de matriz *in vitro* (Molina et al., 2001).

Nuestro análisis de la expresión de ambas formas del receptor HER-2 en cáncer de mama mostró que el fragmento truncado p95^{HER-2} se expresaba en el 26.7% de las

muestras tumorales analizadas. Con el fin de conocer la asociación entre la expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} se procedió, en primer término, a la clasificación de las muestras en función del grado de expresión de p185^{HER-2}. Así se establecieron 4 grupos de muestras tumorales:

- i) Grupo de pacientes en las que no se halló expresión de la forma completa del receptor.
- ii) Grupo formado por las muestras de pacientes que presentaron un nivel de expresión bajo de la proteína p185^{HER-2}.
- iii) Una tercera categoría en la que se incluyeron las muestras de tumores con una expresión moderada de p185^{HER-2}.
- iv) Grupo de muestras que presentaron elevados niveles del receptor completo.

Pudimos comprobar que el fragmento truncado del receptor, p95^{HER-2}, se expresó únicamente en 2 de las 95 muestras tumorales analizadas que no presentaron expresión de la forma completa del receptor (2.1%). En los tumores con baja o moderada expresión de p185^{HER-2}, se observó que la presencia de la forma truncada del receptor p95^{HER-2} era más frecuente que en el grupo de tumores sin expresión de p185^{HER-2}, ya que mientras p95^{HER-2} fue detectado en 16 de las 82 muestras que presentaron una baja expresión del receptor completo p185^{HER-2} (19.5%) ($P < 0.001$), 27 de las 85 muestras con una moderada expresión de la forma completa del receptor expresaron también la forma truncada p95^{HER-2} (31.8%) ($P < 0.00001$).

Por otra parte, p95^{HER-2} se expresó en 45 de los 75 tumores analizados en nuestro estudio que presentaron sobreexpresión de p185^{HER-2} (75%), siendo esta expresión significativamente más frecuente que en el grupo de tumores con expresión moderada ($P < 0.001$) o que en aquellos que no expresaron p185^{HER-2} ($P < 0.00001$). Por tanto, nuestros resultados indican que en el tejido tumoral la expresión de p95 se correlacionó estrechamente con la presencia de la forma completa del receptor p185^{HER-2}.

En la siguiente Tabla se resume el resultado del análisis de la asociación entre la expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} en los tumores de mama empleados en nuestro estudio.

Tabla 3. Expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} en tumores primarios de mama

| Expresión de p185 ^{HER-2} | % expresión de p95 ^{HER-2} |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| Negativa (95) | 2.1 |
| Baja (82) | 19.5 |
| Moderada (85) | 31.8 |
| Sobreexpresión (75) | 60.0 |

Se estudió la expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2}, mediante técnicas de Western blot, en una amplia serie de muestras de cáncer de mama.

1.2. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con el grado de afectación ganglionar

Durante el curso del estudio del nivel de expresión de la forma completa y truncada del receptor HER-2 en cáncer de mama constatamos el hecho de que la expresión de la forma truncada del receptor, p95^{HER-2}, se presentó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes con afectación ganglionar que en las de aquellas otras que carecían de metástasis ganglionares.

Con el fin de profundizar en esta observación preliminar, las muestras fueron en primer lugar agrupadas en función del número de ganglios metastatizados detectados en cada una de las pacientes. En este sentido, se establecieron 3 categorías:

- i) Muestras tumorales de pacientes sin afectación ganglionar.

- ii) Muestras pertenecientes a pacientes que tenían un máximo de 3 ganglios afectados, es decir, de 1 a 3 ganglios metastatizados.
- iii) Muestras tumorales pertenecientes a pacientes que presentaron más de 3 ganglios afectados, es decir con un número de ganglios metastatizados mayor o igual a 4.

El análisis de correlación establecido entre los niveles de expresión del receptor HER-2 y la afectación ganglionar demostró que en las muestras de cáncer de mama analizadas el número de ganglios afectados no se asoció con la sobreexpresión de la forma completa del receptor p185^{HER-2}. En efecto, la frecuencia de sobreexpresión de p185^{HER-2} fue similar en los tres grupos establecidos en función del grado de afectación ganglionar y reseñados en el párrafo anterior, siendo ésta de un 23.8% en el grupo de pacientes sin afectación ganglionar, 18.6% en las de 1 a 3 ganglios afectos, y del 22.8% en las que presentaron más de 3 ganglios metastatizados. A la vista de estos resultados, podemos concluir que dicha correlación no fue significativa ni al considerar los tres grupos de afectación ganglionar ($P = 0.630$), ni al comparar el grupo de pacientes sin afectación ganglionar con el de las pacientes con cuatro o más metástasis ganglionares ($P = 0.982$).

En cambio, el análisis de correlación establecido entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, en las muestras de cáncer de mama analizadas y el grado de afectación ganglionar, demostró la existencia de una asociación significativa entre el número de ganglios afectados y la expresión de esta forma truncada del receptor (Tabla 4). Así, y a diferencia de lo que ocurría con la forma completa del receptor HER-2, la frecuencia de expresión de p95^{HER-2} fue diferente según el número de ganglios afectos. De esta forma, mientras la frecuencia de expresión de la forma truncada del receptor, p95^{HER-2}, fue de un 20.9% en las muestras procedentes de pacientes sin afectación ganglionar, dicha frecuencia se incrementó en el caso del grupo de pacientes con 1 a 3 ganglios afectados (29.1%), llegando a ser de un 36.7% en el grupo de pacientes que presentaron 4 o más ganglios metastatizados.

Por tanto, la expresión de la forma truncada p95^{HER-2} en nuestro estudio se asoció significativamente y de forma directa con el número de ganglios afectados en las pacientes ($P = 0.027$). Al comparar entre sí el grupo de pacientes que no presentaron afectación ganglionar con aquéllas que mostraron cuatro o más ganglios metastatizados, se observó que la proporción de tumores de mama primarios que expresaron p95^{HER-2} fue significativamente mayor en este segundo grupo de pacientes ($P = 0.013$).

En la siguiente Tabla se resume la relación existente entre la expresión de p95^{HER-2} y la sobreexpresión de p185^{HER-2} con el grado de afectación ganglionar.

Tabla 4. Relación entre la expresión de p95^{HER-2} y la sobreexpresión de p185^{HER-2} con la afectación ganglionar

| Grado de afectación ganglionar | % expresión de p95^{HER-2} | % sobreexpresión de p185^{HER-2} |
|---------------------------------------|---|---|
| Negativo (172) | 20.9 | 23.8 |
| 1–3 ganglios (86) | 29.1 | 18.6 |
| 4 o más ganglios (79) | 36.7 | 22.8 |

Se examinaron, mediante técnicas de Western blot, 337 muestras de tumores primarios de mama procedentes de pacientes agrupadas en función del número de ganglios afectados.

1.3. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de p95^{HER-2} y la afectación ganglionar en el grupo de pacientes con sobreexpresión de p185^{HER-2}

Como ha quedado expuesto en el punto anterior, la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 en pacientes de cáncer de mama se correlacionó con el número de metástasis ganglionares presentes. En cambio, no se constató la existencia de una asociación entre la sobreexpresión de la forma completa del receptor, p185^{HER-2}, con el

grado de afectación ganglionar (Tabla 4). Sin embargo, si tenemos en cuenta que el 60% de los tumores que mostraron sobreexpresión del receptor p185^{HER-2} expresaron también la forma truncada del receptor (Tabla 3) cabría esperar que esta forma completa se correlacionase, en cierta medida, con el grado de afectación ganglionar. Por este motivo, decidimos estudiar cómo afectaba la presencia o ausencia de expresión de p95, en los tumores que sobreexpresaban p185^{HER-2}, a la relación con el estado de afectación ganglionar (Tabla 5).

De esta manera, las 75 muestras pertenecientes a pacientes que presentaron sobreexpresión de p185^{HER-2} (ver Tabla 3) fueron clasificadas en función de su presentación o no de metástasis ganglionares (Tabla 5). Una vez establecidas estas categorías, se correlacionó la presencia o ausencia de expresión de p95^{HER-2} con la existencia o no de afectación ganglionar. Los resultados demostraron que p95^{HER-2} se expresó en el 48.8% de las muestras pertenecientes a pacientes carentes de afectación ganglionar, mientras que el fragmento truncado del receptor aparecía en el 73.5% de las muestras de pacientes con metástasis ganglionares.

Nuestros resultados nos permitieron establecer que la frecuencia de presentación de las muestras que mostraron sobreexpresión de p185^{HER-2} y que, al mismo tiempo, expresaron p95^{HER-2}, fue superior en el grupo de pacientes con afectación ganglionar, mientras que la sobreexpresión de p185^{HER-2} se correlacionó con la ausencia de metástasis ganglionares en aquellas muestras en las que no se expresó la forma truncada del receptor ($P = 0.03$).

Tabla 5. Relación existente entre la expresión de p95^{HER-2} y el estado de afectación ganglionar en el grupo de muestras que sobreexpresan p185^{HER-2}

| Grado de afectación | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| ganglionar | % p95 positivo | % p95 negativo |
| Negativo (41) | 48.8 | 51.2 |
| Positivo (34) | 73.5 | 26.5 |

Se analizaron 75 muestras de cáncer de mama que mostraron sobreexpresión de p185^{HER-2} (ver Tabla 3) y se agruparon en función de su expresión de p95^{HER-2}.

1.4. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con otros factores pronósticos en cáncer de mama

Después de analizar la relación existente entre la expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos, se estudió la asociación que la expresión de estas dos formas del receptor HER-2 podría tener con otros parámetros clínicos (Tabla 6), tradicionalmente considerados factores de riesgo en cáncer de mama (Henderson et al., 1998). En general, y para facilitar el análisis, todas las variables de tipo clínico fueron dicotomizadas, excepto el estadio de la enfermedad.

En este sentido, realizamos el análisis de correlación entre la expresión de p95^{HER-2} y la sobreexpresión de p185^{HER-2} en relación al nivel de expresión de los receptores de estrógenos (RE) y los de progesterona (RP), no encontrando asociación entre estas variables ($P > 0.1$). Pudimos observar que la expresión de ambas formas del receptor HER-2 fue similar en el grupo de pacientes con una edad menor o igual a 60 años que en aquel grupo de pacientes que superaban dicha edad ($P > 0.1$).

En nuestro análisis, tampoco encontramos diferencias significativas entre el nivel de expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} entre las pacientes estratificadas en función

del estadio de la enfermedad (I, II, o III) ($P \geq 0.1$). Por otra parte, ninguna de las dos formas de HER-2 se expresó diferencialmente en relación al tamaño tumoral ($P > 0.1$).

Por último, las muestras se clasificaron en función del subtipo histológico, estableciéndose dos grupos, por una parte el carcinoma ductal de tipo infiltrante y por otra los restantes subtipos tumorales. La diferencia entre los dos grupos no fue significativa, ni al considerar la sobreexpresión de p185^{HER-2} ($P > 0.1$), ni respecto a la diferencia de expresión de p95^{HER-2} ($P = 0.08$).

En general, no se encontró ninguna asociación entre la sobreexpresión de p185^{HER-2} y los restantes factores citados ($P > 0.1$), ni asociaciones significativas entre la expresión de p95^{HER-2} y los restantes factores analizados en este apartado ($P \geq 0.1$ para todos los factores, exceptuando el tipo histológico [$P = 0.08$]).

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos del análisis de la relación entre la expresión del receptor HER-2 con diversos parámetros clínicos.

Tabla 6. Relación entre HER-2 con otros factores pronósticos en cáncer de mama

| Factor | % p95 positivo | % p185 sobreexpresión |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Receptores de estrógenos | | |
| Negativo (116) | 27.6 | 24.1 |
| Positivo (221) | 26.2 | 21.2 |
| Receptores de progesterona | | |
| Negativo (144) | 22.2 | 23.6 |
| Positivo (193) | 30.1 | 21.2 |

| Edad | | |
|-----------------------------------|------|------|
| 0–59 (176) | 26.7 | 22.7 |
| ≥ 60 (161) | 26.7 | 21.7 |
| Estadio tumoral | | |
| I (85) | 18.8 | 21.2 |
| II (141) | 29.1 | 26.2 |
| III–IV (88) | 26.1 | 19.3 |
| Tipo histológico del tumor | | |
| Ductal infiltrante (251) | 28.2 | 22.1 |
| Otros (86) | 19.1 | 19.1 |
| Tamaño tumoral | | |
| < 3 cm (144) | 28.5 | 18.8 |
| ≥ 3 cm (74) | 31.1 | 21.6 |

Se relacionó la expresión de las formas completa y truncada de HER-2 con diversas variables clínicas

1.5. Estudio de la relación existente entre los niveles de expresión de p95^{HER-2} y la sobreexpresión de p185^{HER-2} en las metástasis ganglionares

Los resultados de nuestro análisis indicaron que en el amplio grupo de cánceres de mama analizados en nuestro estudio, la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 fue más frecuente en el subgrupo de muestras pertenecientes a pacientes con afectación ganglionar que en aquellas que no presentaron dicha afectación. Esta expresión fue más frecuente en el grupo de pacientes con cuatro o más ganglios metastatizados. Por otra parte, observamos que la sobreexpresión de la forma completa

del receptor se correlacionó con el grado de afectación ganglionar cuando las muestras presentaron expresión simultánea de ambas formas del receptor.

En este punto, y con el fin de esclarecer la posible participación de las formas completa y trunca del receptor HER-2 en el desarrollo de las metástasis ganglionares, estudiamos el nivel de expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} en tejido obtenido a partir de los ganglios linfáticos metastatizados. En este sentido, nuestros resultados no demostraron una diferencia significativa entre el porcentaje de metástasis ganglionares que presentaron sobreexpresión de p185^{HER-2} (22.3%) y el porcentaje de muestras de tejido de tumores primarios de mama que mostraron sobreexpresión de p185^{HER-2} (23.5%) ($P = 0.933$).

Sin embargo, el fragmento truncado del receptor HER-2 se expresó en el 44.7% de las muestras de ganglios linfáticos metastáticos analizados, mientras que solamente se encontró expresión del mismo en el 26.7% de las muestras de tumores primarios. Por tanto, nuestros resultados demuestran que la expresión de p95^{HER-2} fue significativamente mayor en los ganglios metastatizados que en los tumores primarios de mama analizados ($P = 0.0009$) (Tabla 7). Esta es la primera ocasión en la que se ha demostrado la presencia de una forma alternativa del receptor HER-2 en tejido metastático en cáncer de mama.

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos al estudiar la expresión de p95^{HER-2} y la sobreexpresión de p185^{HER-2} en muestras de tumores de mama primarios y en las metástasis ganglionares.

Tabla 7. Expresión de p95^{HER-2} y sobreexpresión de p185^{HER-2} en muestras de tumores de mama primarios y en las metástasis ganglionares

| Tipo de Tejido | % p95 ^{HER-2} positivo | % p185 ^{HER-2} sobreexpresión |
|------------------------------|---------------------------------|--|
| Tumor primario (337) | 26.7 | 22.3 |
| Metástasis ganglionares (81) | 45.7 | 23.5 |

Se analizaron en 337 muestras tumorales y 81 metástasis ganglionares los niveles de expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2}.

2. Estudio del valor pronóstico de p95^{HER-2} en cáncer de mama

En la segunda parte de nuestro estudio, basándonos en los datos obtenidos previamente y con el fin de evaluar el posible valor pronóstico de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, en cáncer de mama, y obtener la adecuada significación estadística, decidimos ampliar el número de muestras de nuestro análisis. A este respecto, se analizó un número total de 435 muestras de cáncer de mama para las formas completa y truncada de HER-2.

2.1. Características de las pacientes

En el momento de la resección del tumor la media de edad de las pacientes fue de 59 años mientras que la mediana de edad fue de 60 años y el rango de la misma fue de 22 a 93 años. En el caso del tipo histológico tumoral observamos que el 78% de los tumores pertenecieron al tipo ductal infiltrante, el 7% fueron lobulares infiltrantes, y el 15% pertenecieron a los restantes tipos histológicos.

La mayoría de las pacientes (74%), fueron sometidas a una mastectomía radical modificada, mientras que el resto de las pacientes fueron tratadas con una mastectomía parcial y análisis de los ganglios linfáticos axilares.

En cuanto al tipo de tratamiento administrado, el 57% de las pacientes recibieron quimioterapia adyuvante, mientras que el 31% de las mismas se trataron con hormonoterapia adyuvante, principalmente tamoxifeno. En general, el número de pacientes vivas y libres de enfermedad tras una mediana de seguimiento de 44 meses, con un rango que oscilaba entre 1 y 190 meses, fue de 300, correspondiente al 69%. El seguimiento clínico durante un periodo de 5 años reveló que el 61% de las pacientes seguían vivas y libres de enfermedad, mientras que el 51% de las mismas permanecían vivas y libres de enfermedad tras un seguimiento de 10 años.

2.2. Estudio de la asociación de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con factores de riesgo en cáncer de mama

Según los resultados obtenidos del análisis de Western blot de la expresión de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} en un panel representativo de muestras de cáncer de mama, en nuestro estudio el 17% de las muestras analizadas presentaron sobreexpresión de p185^{HER-2}, mientras que 9% de los tumores analizados mostraron sobreexpresión de p95^{HER-2}. El 79% de las muestras en las que se detectó sobreexpresión de p95^{HER-2} mostraron asimismo sobreexpresión de p185^{HER-2}. Por tanto, el análisis de nuestros resultados demostró que la sobreexpresión de la forma truncada del receptor HER-2 se asoció con la sobreexpresión de la forma completa del mismo ($P = 0.0001$).

En la Tabla 8 se resumen los datos obtenidos del estudio de la posible asociación entre la sobreexpresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con factores pronósticos considerados de interés en cáncer de mama.

Tabla 8. Análisis de correlación entre la sobreexpresión de la forma completa y truncada de HER-2 con factores pronósticos en cáncer de mama

| Factor | % sobreexpresión p95^{HER-2} | P | % sobreexpresión p185^{HER-2} | P |
|---------------------------------|---|----------|--|----------|
| Edad | | | | |
| < 50 años | 10 | > 0.01 | 20 | > 0.01 |
| ≥ 50 años | 9 | | 15 | |
| Afectación ganglionar | | | | |
| Negativo | 8 | 0.003 | 16 | > 0.01 |
| 1-3 | 7 | | 15 | |
| ≥ 4 | 13 | | 20 | |
| Tamaño tumoral | | | | |
| < 2 cm | 7 | > 0.01 | 15 | > 0.01 |
| ≥ 2 cm | 8 | | 18 | |
| Estadio | | | | |
| I o II | 8 | > 0.01 | 17 | > 0.01 |
| III o IV | 11 | | 15 | |
| Receptores de estrógenos | | | | |
| Negativo | 14 | 0.013 | 20 | > 0.01 |
| Positivo | 7 | | 15 | |
| Receptores progesterona | | | | |
| Negativo | 13 | 0.004 | 22 | 0.013 |
| Positivo | 5 | | 13 | |

Se analizaron muestras de cáncer de mama mediante técnicas de Western blot empleando un anticuerpo específico dirigido contra el dominio C-terminal de HER-2.

Al analizar los resultados obtenidos, observamos que la sobreexpresión de p185^{HER-2} se correlacionó con la ausencia de expresión de receptores de progesterona ($P = 0.013$), mientras que la sobreexpresión de p95^{HER-2} se asoció inversamente con la expresión de receptores de estrógenos ($P = 0.013$) y de progesterona ($P = 0.004$). Únicamente la sobreexpresión de p95^{HER-2}, y no la de la forma completa del receptor, p185^{HER-2}, se asoció significativamente con la presencia de afectación ganglionar ($P = 0.003$).

2.3. Estudio de la asociación de p95^{HER-2}, p185^{HER-2} y otros factores pronósticos con la evolución clínica de las pacientes

2.3.1. Análisis univariado

Los datos obtenidos tras la realización del análisis univariado, en el que se consideraron diversos factores biológicos y clínicos de las muestras incluídas en nuestro estudio, se resumen en la siguiente Tabla:

Tabla 9. Análisis univariado de la relación entre factores de riesgo con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de las pacientes de cáncer de mama

| Factor | Análisis Univariado | | |
|------------------------------|---------------------|-------------|----------|
| | Riesgo | IC 95% | P |
| Edad | | | |
| 29-93 (continua) | 1,02 | 1.01- 1.03 | 0.052 |
| Afectación ganglionar | 1.76 | 1.45 – 2.13 | < 0.0001 |
| ≥ 4 ganglios | | | |
| 1-3 ganglios | | | |
| Negativa | | | |
| Tamaño tumoral | 1.96 | 1.30-2.98 | 0.0008 |
| ≥ 2 cm | | | |
| < 2 cm | | | |

| | | | |
|-----------------------------------|------|-------------|----------|
| Estadio | 1.88 | 1.59-2.23 | < 0.0001 |
| IV | | | |
| III | | | |
| II | | | |
| I | | | |
| Receptores de estrógenos | 0.61 | 0.44 - 0.84 | 0.0025 |
| Positivo | | | |
| Negativo | | | |
| Receptores de progesterona | 0.6 | 0.44 – 0.84 | 0.0008 |
| Positivo | | | |
| Negativo | | | |
| p185^{HER-2} | 1.31 | 0.88 – 1.96 | 0.1733 |
| Elevado | | | |
| Bajo | | | |
| p95^{HER-2} | 2.13 | 1.35 – 3.35 | 0.003 |
| Elevado | | | |
| Bajo | | | |

Análisis univariado en el que se incluyen diversas variables

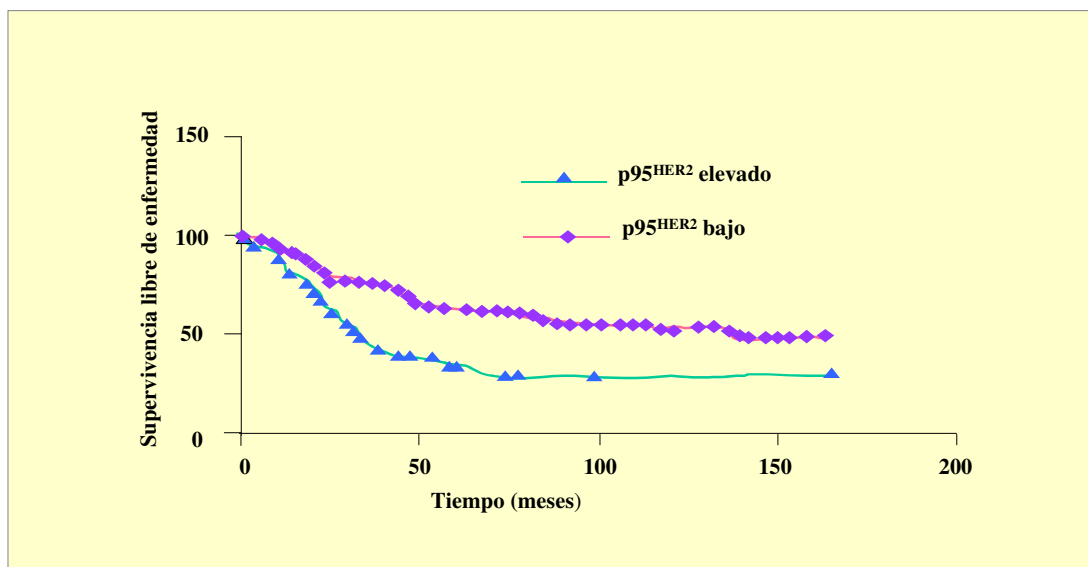
Al realizar el análisis univariado, observamos que la sobreexpresión de p95^{HER-2} se asoció significativamente con una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) ($P = 0.0003$). En este sentido, el 64.1% de las pacientes cuyos tumores primarios expresaron bajos niveles de p95^{HER-2} permanecieron libres de enfermedad durante 5 años, mientras que únicamente el 36.6% de las pacientes cuyas muestras de cáncer de mama mostraron elevados niveles de expresión de la forma truncada de HER-2 siguieron libres de enfermedad tras ese periodo de tiempo.

Cuando consideramos un periodo de seguimiento de 10 años, observamos que mientras el 53.4% de las pacientes cuyas muestras tumorales presentaron bajos niveles

de expresión de $p95^{HER-2}$ siguieron libres de enfermedad, el 30.5% de las pacientes cuyos tumores primarios de mama mostraron unos elevados niveles de expresión de la forma truncada de HER-2, $p95^{HER-2}$, permanecieron libres de enfermedad. Por otra parte, las pacientes en cuyas muestras se detectaron elevados niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ tuvieron una peor evolución, tanto si consideramos la probabilidad de sufrir recaída, como la de morir debido a la enfermedad ($P = 0.0012$).

En la Figura 7A se muestra el análisis de Kaplan-Meier del porcentaje de pacientes que sufren recaída o muerte tras la cirugía en función de los niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ (bajos o elevados). Como se puede observar en la gráfica, las curvas correspondientes a los distintos niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ fueron significativamente diferentes ($P = 0.0003$). La media de supervivencia de las pacientes cuyas muestras tumorales mostraron bajos niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ fue de 139 meses, mientras que la supervivencia se estimó en 39 meses en el caso de las pacientes cuyos tumores primarios presentaron elevados niveles de expresión de $p95^{HER-2}$.

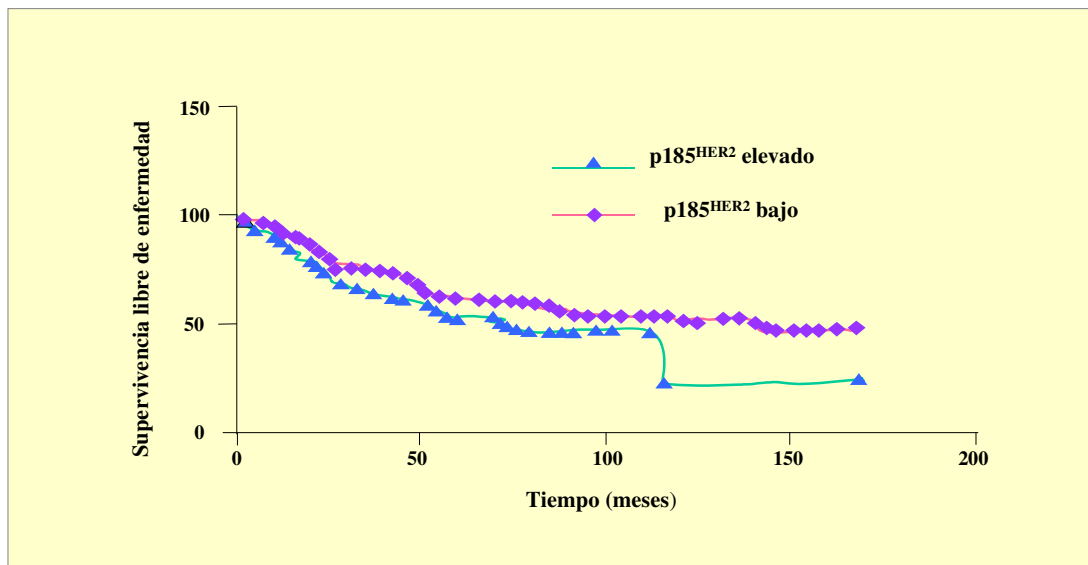
FIGURA 7A. Análisis de Kaplan-Meier de la SLE en función de los niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ (bajo o elevado).



Se determinaron los niveles de expresión de $p95^{HER-2}$ y se realizó el análisis de Kaplan-Meier en función de los mismos.

En la Figura 7B se presenta el análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes incluidas en nuestro estudio, en función de los niveles de expresión en la muestra tumoral, bajos o elevados, de p185^{HER-2}. Aunque se observó una tendencia a la asociación entre la sobreexpresión de p185^{HER-2} y una menor SLE, no resultó estadísticamente significativa ($P = 0.173$). La media de supervivencia de las pacientes cuyas muestras tumorales mostraron bajos niveles de expresión de p185^{HER-2} fue de 139 meses, mientras que la de las pacientes cuyos tumores primarios presentaron unos elevados niveles de p185^{HER-2} fue de 74 meses.

FIGURA 7B. Análisis de Kaplan-Meier de la SLE en función de los niveles de expresión de p185^{HER-2} (bajo o elevado).



Se determinaron los niveles de expresión de p185^{HER-2} y se realizó el análisis de Kaplan-Meier en función de los mismos.

Al considerar por separado la SLE tras 5 años y la SLE tras 10 años, observamos que la proporción de pacientes cuyas muestras tumorales sobreexpresaron p185^{HER-2} que permanecieron vivas tras un periodo de seguimiento de 10 años fue menor que transcurridos 5 años (55.1% a los 5 años frente al 24.8% a los 10 años), aunque el número de pacientes de las que se disponía de información durante un periodo de seguimiento de 10 años fue menor.

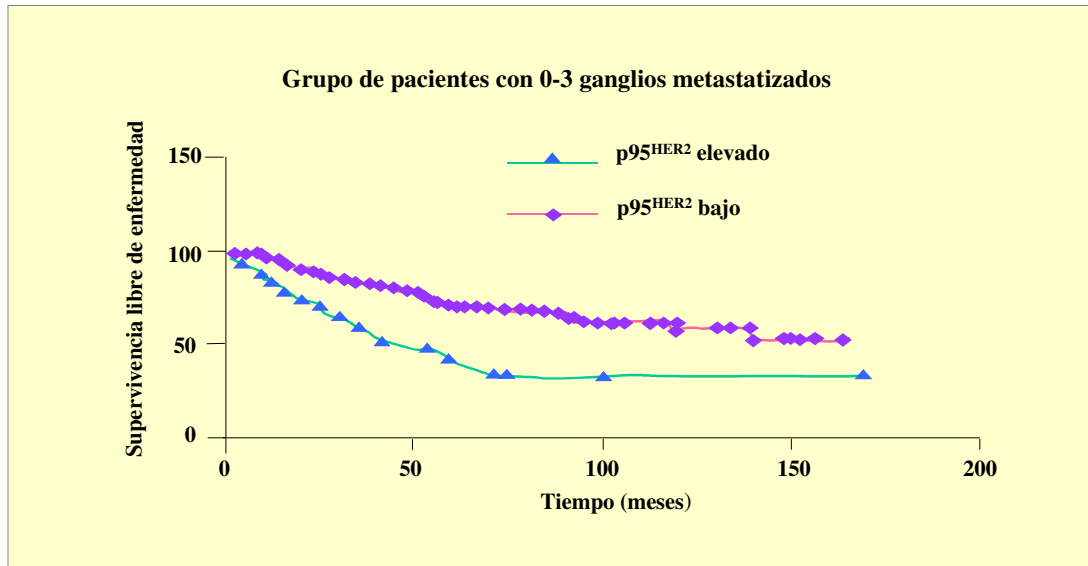
2.4. Estudio de la asociación entre la expresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con la evolución clínica en el grupo de pacientes con menos de cuatro ganglios metastatizados

Como se ha señalado anteriormente, estudios previos llevados a cabo por otros grupos y por el nuestro (Christianson et al., 1998; Molina et al., 2002), sugirieron la existencia de una asociación entre la expresión de p95^{HER-2} y el grado de afectación ganglionar en pacientes de cáncer de mama. Puesto que el número de tumores primarios de mama pertenecientes a pacientes sin afectación ganglionar de los que dispusimos para la realización de este estudio fue limitado, analizamos un subgrupo de muestras correspondientes a pacientes con 0 a 3 ganglios metastatizados.

Este grupo de pacientes presentó una evolución significativamente mejor que aquella de las pacientes con 4 o más ganglios afectados ($P < 0.0001$). Sin embargo, no difirió significativamente del grupo de pacientes en las que no se detectaron metástasis ganglionares ($P = 0.095$).

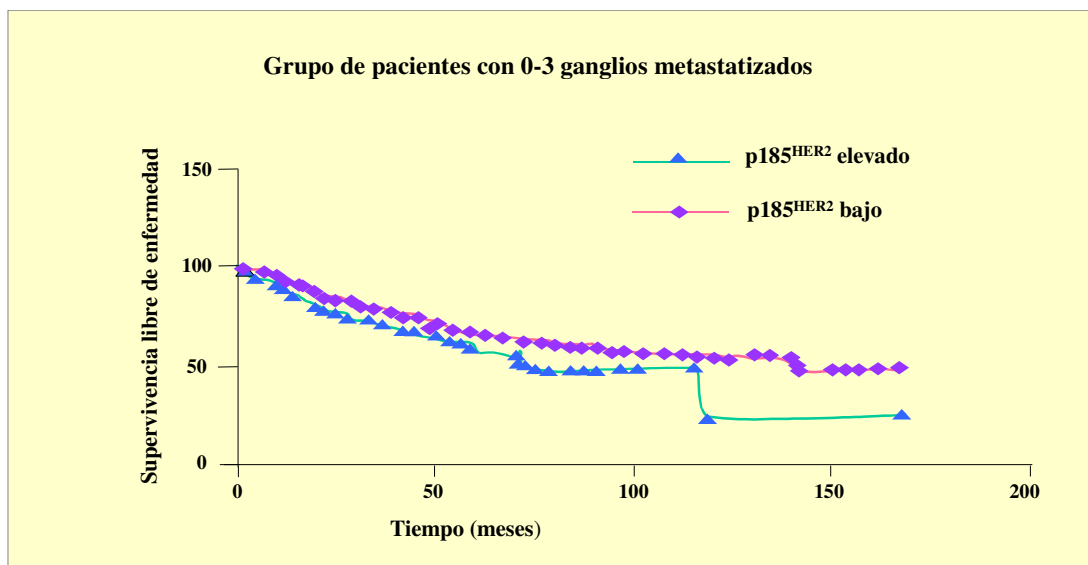
En la Figura 7C y 7D observamos que en el grupo de pacientes con menos de 4 ganglios afectados la sobreexpresión de p95^{HER-2} ($P = 0.0008$), pero no la de p185^{HER-2} ($P = 0.238$), se asoció con una menor SLE. En este sentido, observamos que las curvas referentes a la supervivencia de las pacientes en función de los niveles de expresión de p95^{HER-2} fueron significativamente diferentes, mientras que las correspondientes a la SLE en función de la expresión de la forma completa de HER-2 no variaron significativamente.

Figura 7C. Análisis de Kaplan Meier de la SLE en función de los niveles de expresión de p95^{HER-2} (bajo o elevado) en el grupo de pacientes que presentaron de 0 a 3 ganglios metastatizados.



Se determinaron los niveles de expresión de p95^{HER-2} en muestras de pacientes con 0-3 ganglios metastatizados y se realizó el análisis de Kaplan-Meier en función de los mismos.

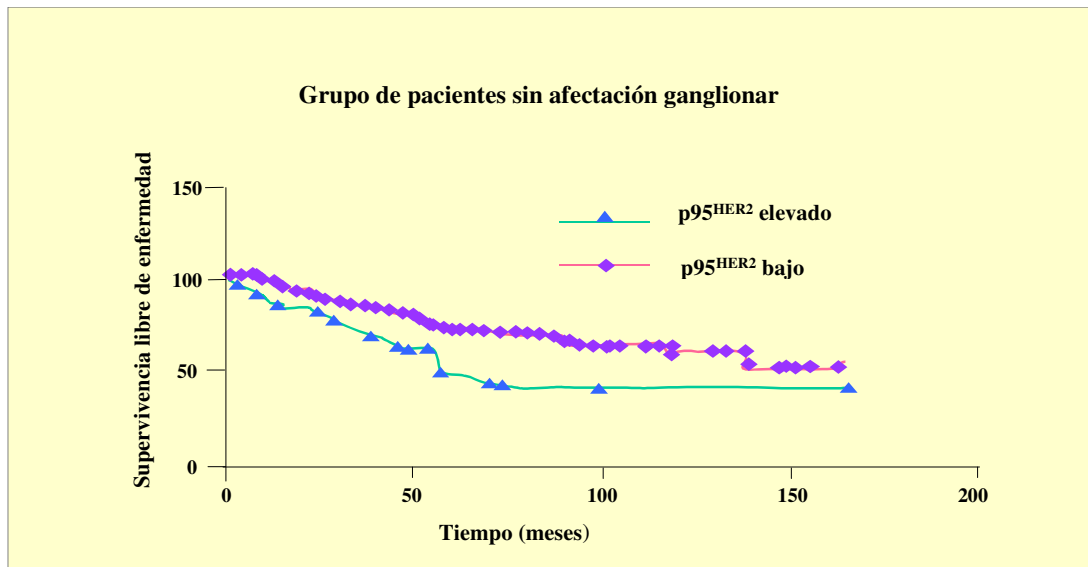
Figura 7D. Análisis de Kaplan Meier de la SLE en función de los niveles de expresión de p185^{HER-2} (bajo o elevado) en el grupo de pacientes que presentaron de 0 a 3 ganglios metastatizados.



Se determinaron los niveles de expresión de p185^{HER-2} en muestras de pacientes con 0-3 ganglios metastatizados y se realizó el análisis de Kaplan-Meier en función de los mismos.

Incluso al considerar únicamente la SLE del grupo de pacientes que no presentaron afectación ganglionar y pese al escaso número de casos, observamos que la sobreexpresión de p95^{HER-2} en dicho grupo se asoció con una peor evolución de la enfermedad ($P = 0.05$).

Figura 7E. Análisis de Kaplan-Meier de la SLE en función de los niveles de expresión de p95^{HER-2} (bajo o elevado) en el grupo de pacientes que no presentaron afectación ganglionar.



Se determinaron los niveles de expresión de p95^{HER-2} en muestras de pacientes sin afectación ganglionar y se realizó el análisis de Kaplan-Meier en función de los mismos.

2.4.1. Análisis multivariado

En esta parte de nuestro estudio se analizaron mediante un modelo de regresión estratificada de Cox diversos factores de riesgo, importantes por su interés en cáncer de mama, con el fin de identificar posibles factores independientes que influyan en la supervivencia de las pacientes de este tipo de tumor. En la siguiente Tabla quedan recopilados los datos obtenidos de este estudio.

Tabla 10. Análisis multivariado en los que se incluyeron diversos factores de riesgo tradicionalmente considerados de interés en cáncer de mama

| Factor | Análisis Multivariado | |
|--------------------------------|-----------------------|-------|
| | Riesgo | P |
| Edad | 3.151 | 0.002 |
| < 50 | | |
| ≥ 50 | | |
| Afectación ganglionar | 2.516 | 0.012 |
| 0-3 ganglios | | |
| ≥ 4 ganglios | | |
| Tamaño tumoral | 0.958 | 0.338 |
| ≥ 2 cm | | |
| < 2 cm | | |
| Estadio | 2.907 | 0.004 |
| I o II | | |
| III o IV | | |
| Receptores estrógenos | -2.487 | 0.013 |
| Negativo | | |
| Positivo | | |
| Receptores progesterona | -0.318 | 0.751 |
| Negativo | | |
| Positivo | | |

| | | |
|-----------------------------|-------|-------|
| p185^{HER-2} | 1.163 | 0.245 |
| Bajo | | |
| Elevado | | |
| p95^{HER-2} | 1.203 | 0.007 |
| Bajo | | |
| Elevado | | |

Análisis multivariado considerando diversas variables

Al analizar los resultados reflejados en la Tabla 10, observamos que ciertos factores de riesgo, ya caracterizados en cáncer de mama, como son la edad ($P = 0.002$), la afectación ganglionar ($P = 0.012$), el estadio de la enfermedad ($P = 0.004$) y la expresión de receptores de estrógenos (RE) ($P = 0.013$) resultaron factores pronósticos de carácter independiente.

Asimismo, p95^{HER-2} ($P = 0.007$) también mostró ser un factor pronóstico de la supervivencia de las pacientes de tipo independiente mientras que, en nuestro estudio, ni p185^{HER-2} ni el tamaño tumoral así como tampoco la presencia de receptores de progesterona (RP) resultaron ser factores pronóstico independientes indicativos de la SLE.

3. Estudio de la expresión de la forma truncada de HER-2, p100^{HER-2}, en cáncer de mama

En algunos estudios llevados a cabo anteriormente por otros grupos se había referido la existencia de una forma truncada del receptor HER-2 correspondiente al dominio extracelular del mismo. Esta forma es generada por un mecanismo de procesamiento alternativo del RNA mensajero codificante para el receptor HER-2. La proteína resultante posee un peso molecular de 100 kDa y se detectó en el medio condicionado de líneas celulares de cáncer de mama, en experimentos llevados a cabo *in vitro*, y en el suero y orina de pacientes afectas de cáncer de mama, *in vivo*. Sin embargo, los resultados obtenidos en los distintos estudios llevados a cabo hasta la actualidad ofrecen resultados discordantes sobre su papel en cáncer de mama.

En esta parte de nuestro trabajo se analizó la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, en una amplia serie de muestras de cáncer de mama. Asimismo, se estudió la relación existente entre la expresión de p100^{HER-2} con otros factores biológicos y clinicopatológicos de interés en el pronóstico de las pacientes de cáncer de mama.

3.1. Estudio de la expresión de la forma completa del receptor, p185^{HER-2}, y de la forma truncada, p100^{HER-2}, en tumores primarios de mama

Para la realización de esta parte del estudio, en primer lugar examinamos la expresión de la forma completa del receptor HER-2 y la de la forma truncada del mismo, generada por un mecanismo de procesamiento alternativo del RNA, mediante técnicas de RT-PCR empleando los cebadores específicos para cada forma de HER-2, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos de esta Memoria:

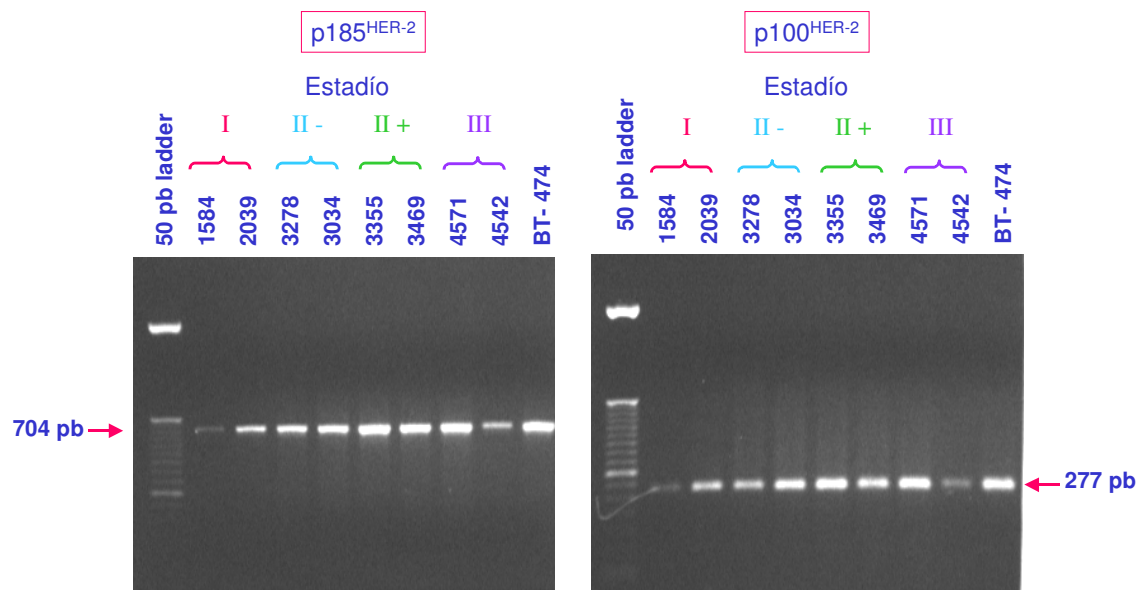
HER-2 completo sentido 5'-TCAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACC-3'; antisentido 5' CATAAGCTGTGTCACCAGCTGCAC3' .

HER-2 truncado sentido 5'-TCAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACC-3' ; antisentido 5'-CCCCTTTTATAGTAAGAGCCCCAGA-3'.

Al emplear este procedimiento se amplificó una región de 704 pares de bases comprendida entre los nucleótidos 1851 y 2553 de la secuencia de HER-2, en el caso de la forma completa del receptor, y una región de 277 pares de bases, comprendida entre los nucleótidos 1851 y 2056, en el caso de la forma truncada del mismo. Como controles positivos de expresión y tamaño del fragmento amplificado se utilizaron los plásmidos pCEV27 con el inserto correspondiente a las formas completa y truncada de HER-2 respectivamente.

Como queda reflejado en la Figura 8 la expresión de las formas completa y truncada del receptor analizadas mediante técnicas de RT-PCR, se detectó con una elevada frecuencia, 82.6% y 81.4%, respectivamente, en las muestras de cáncer de mama analizadas en nuestro estudio.

FIGURA 8. Imágenes representativas de la expresión de las formas completa y truncada del receptor HER-2 en una serie de tumores primarios de mama determinada por RT-PCR.



Se realizaron análisis de RT-PCR de la expresión de las formas completa y truncada del receptor HER-2 en cáncer de mama utilizando cebadores específicos para cada una de las mismas. BT-474 se utilizó como control de expresión.

Al analizar la relación existente entre la expresión de las formas completa y truncada del receptor HER-2, observamos que la expresión de la forma truncada del mismo se presentó en el 94.4% de las muestras que también expresaron la forma completa del mismo, mientras que dicha forma truncada se detectó únicamente en el 20.0% de las muestras de cáncer de mama que no expresaron la forma completa ($P = 0.000$).

En la siguiente Tabla se resume la relación existente entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 con la expresión de la forma completa del mismo en un serie de tumores de mama, analizada mediante técnicas de RT-PCR.

Tabla 11. Relación entre la expresión de las formas completa y truncada del receptor HER-2 en cáncer de mama.

| Expresión de la forma completa de HER-2 | % de expresión de la forma truncada de HER-2 |
|--|---|
| Negativa (15) | 20.0 |
| Positiva (71) | 94.4 |

Análisis, mediante técnicas de RT-PCR, de la expresión de la forma completa y truncada del receptor HER-2 en 86 muestras de cáncer de mama.

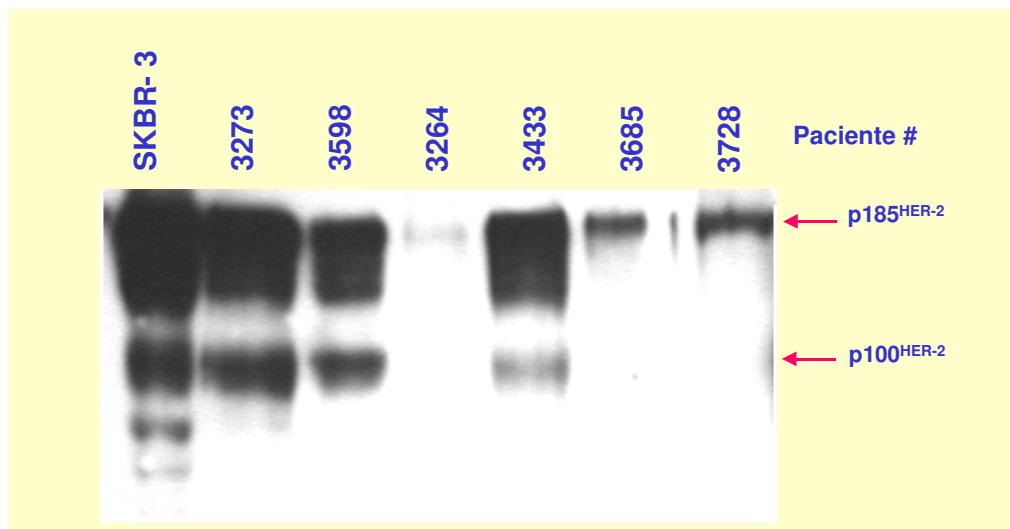
De forma paralela, analizamos el nivel de expresión de la proteína truncada originada por la traducción del transcrito correspondiente al procesamiento alternativo del RNA mensajero de HER-2 que posee un peso molecular de 100 kDa y corresponde al dominio extracelular del receptor completo. El estudio de la expresión de la proteína p100^{HER-2} mediante técnicas de Western blot en el extenso grupo de muestras de cáncer de mama incluidas en nuestro análisis, se llevó a cabo empleando dos anticuerpos distintos dirigidos, en ambos casos, contra el dominio N-terminal del receptor, es decir,

el correspondiente al dominio extracelular de HER-2. Los anticuerpos utilizados fueron, en concreto, el anticuerpo monoclonal anti-HER-2, clon 10A7 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, Reino Unido), y el anticuerpo monoclonal anti-HER-2, clon L87 (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, EE UU), como se detalla en la sección de Material y Métodos de esta Memoria.

Al analizar la presencia de la proteína truncada $p100^{\text{HER-2}}$, se observó una amplia variación de su nivel de expresión entre las distintas muestras de cáncer de mama analizadas. Se estimó así que la forma truncada $p100^{\text{HER-2}}$ se presentó en el 63.7% del total de tumores primarios analizados en nuestro estudio.

La siguiente Figura muestra una serie de ejemplos representativos de la expresión de ambas formas del receptor en cáncer de mama.

FIGURA 9. Niveles de expresión de $p185^{\text{HER-2}}$ y $p100^{\text{HER-2}}$ en tumores de mama



Análisis de Western blot del receptor HER-2 en muestras de cáncer de mama empleando un anticuerpo específico dirigido contra el dominio extracelular del receptor. Se incluye una muestra de lisado de la línea celular de cáncer de mama SKBR-3 como control

Al estudiar la expresión de ambas formas del receptor se observó que mientras algunas de las muestras analizadas no mostraron expresión del receptor HER-2 (como por ejemplo puede observarse en la muestra n° 3264), otras muestras tumorales

presentaron únicamente expresión de p185^{HER-2} (muestras n° 3685 y 3728) y, por último, también se observaron muestras de cáncer de mama en las que aparecieron ambas formas del receptor, p185^{HER-2} y p100^{HER-2} (muestras n° 3273, 3598 y 3433).

Dada la heterogeneidad del nivel de expresión de p100^{HER-2} en las mismas, las muestras fueron clasificadas según dichos niveles en cuatro categorías. Así, se observó que mientras 20 muestras del total presentaron una baja expresión de p100^{HER-2} (18.5%), 17 muestras de cáncer de mama presentaron unos niveles moderados de expresión de esta forma truncada (15.7%). Por último, en 31 de las muestras de pacientes con cáncer de mama se detectaron unos elevados niveles de expresión de p100^{HER-2} (28.7%).

Asimismo, nuestros resultados experimentales demostraron que aproximadamente el 62.5 % de las muestras expresaron la forma completa del receptor y esta expresión tenía diferentes niveles de intensidad. De esta manera, 33 muestras analizadas en nuestro estudio presentaron una baja expresión de p185^{HER-2} (30.6%), se detectó la presencia de 10 muestras con una expresión moderada (9.3%), mientras que 22 de las muestras analizadas presentaron una elevada expresión de la forma completa del receptor (20.4%). Por otra parte, en 43 de las muestras analizadas la expresión de p185^{HER-2} fue indetectable (39.8%).

En la siguiente Tabla se muestran los resultados del análisis de expresión de las formas truncada p100^{HER-2} y completa p185^{HER-2} del receptor HER-2 en cáncer de mama utilizando técnicas de Western blot.

Tabla 12. Niveles de expresión de p100^{HER-2} y p185^{HER-2} en cáncer de mama

| Nivel de expresión | % expresión de p100 ^{HER-2} | % expresión de p185 ^{HER-2} |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Negativo | 36.3 (40) | 39.8 (43) |
| Bajo | 18.5 (20) | 30.6 (33) |
| Moderado | 15.7 (17) | 9.3 (10) |
| Elevado | 28.7 (31) | 20.4 (22) |

Se examinó, mediante técnicas de Western blot, la expresión de las formas completa, p185^{HER-2} y truncada, p100^{HER-2}, en muestras de cáncer de mama.

Con el fin de determinar si existía una asociación entre la expresión de la forma completa p185^{HER-2} y la forma truncada correspondiente al dominio extracelular del mismo, p100^{HER-2}, las muestras fueron clasificadas en función del grado de expresión de p185^{HER-2}. Siguiendo este criterio, las muestras fueron agrupadas de la siguiente forma:

- i) Las muestras que no expresaron la forma completa de HER-2,
- ii) Aquellas muestras que presentaron bajos niveles de expresión de p185^{HER-2},
- iii) Muestras con moderada expresión de la forma completa del receptor p185^{HER-2},
- iv) Por último, las muestras con unos elevados niveles de expresión del receptor completo.

El análisis de los datos obtenidos, demostró la existencia de una asociación entre el nivel de expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, y la expresión de la forma completa del mismo, p185^{HER-2}. En este sentido, se observó que la expresión

de p100^{HER-2} se correlacionó significativamente con el grado de expresión de la forma completa del receptor, tal como se refleja en la siguiente Tabla.

Tabla 13. Expresión de p100^{HER-2} en función de los niveles de expresión de p185^{HER-2} en tumores primarios de mama

| Expresión de p185 ^{HER-2} | % de expresión de p100 ^{HER-2} |
|------------------------------------|---|
| Negativa (43) | 23.3 |
| Baja (33) | 81.8 |
| Moderada (10) | 100.0 |
| Sobreexpresión (22) | 95.5 |

Se estudió la expresión de p100^{HER-2} y p185^{HER-2} en muestras de pacientes de cáncer de mama, empleando técnicas de Western blot como se describe en la sección de Material y Métodos de esta Memoria.

Así se observó que el 23.3% de las muestras analizadas expresaron la forma truncada correspondiente al dominio extracelular de HER-2, aún en ausencia de la forma completa del mismo. Sin embargo, en las muestras con una baja expresión de la forma completa del receptor HER-2 la expresión de la forma truncada p100^{HER-2} fue más frecuente, puesto que 81.8% de las muestras con baja expresión de p185^{HER-2} expresaron la forma truncada p100^{HER-2}. Todas las muestras de cáncer de mama que presentaron moderados niveles de expresión de la forma completa p185^{HER-2} expresaron asimismo la forma truncada, p100^{HER-2}, mientras que el 95.5% de las muestras con elevados niveles de expresión de p185^{HER-2} presentaron también la forma truncada. Por tanto, la presencia de la forma truncada p100^{HER-2} fue significativamente más frecuente en las muestras con una moderada o elevada expresión de p185^{HER-2} que en aquellas

muestras pertenecientes a pacientes en las que los niveles de expresión de la forma completa del receptor fueron bajos o indetectables ($P = 0.000$).

3.2. Estudio de la relación entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, con la afectación ganglionar en cáncer de mama

Tras analizar la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 correspondiente al dominio extracelular del mismo, p100^{HER-2}, en un panel representativo de muestras de cáncer de mama, y estudiar su asociación con la expresión del receptor completo p185^{HER-2}, estudiamos la posible relación entre la expresión de esta forma truncada con una serie de factores pronósticos considerados de interés en cáncer de mama.

Comenzamos nuestro análisis determinando la existencia de una posible asociación entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, y la afectación ganglionar, que es, como se sabe, el principal factor pronóstico en cáncer de mama. Para ello, las muestras tumorales fueron clasificadas en función del número de ganglios afectados organizándolas en 3 grupos o categorías:

- i) Las muestras pertenecientes a pacientes que carecían de afectación ganglionar
- ii) Las muestras procedentes de pacientes con un máximo de tres ganglios metastatizados
- iii) El grupo de pacientes en las que se detectaron más de tres ganglios metastatizados

El análisis de correlación entre el grado de afectación ganglionar y la expresión de p100^{HER-2} demostró que la forma truncada se presentaba con más frecuencia y de forma significativa en las muestras de pacientes sin afectación ganglionar (77.8%), comparadas con aquellas muestras de cáncer de mama pertenecientes a pacientes con uno a tres ganglios metastatizados (41.9%), o con las muestras procedentes de pacientes con 4 o más ganglios afectados (58.6%) ($P = 0.006$).

En la siguiente Tabla se resume la asociación entre la expresión de p100^{HER-2} y el grado de afectación ganglionar en muestras de pacientes de cáncer de mama clasificadas en función del número de ganglios metastatizados.

Tabla 14. Relación entre la expresión de p100^{HER-2} con la afectación ganglionar en muestras de cáncer de mama

| Grado de afectación ganglionar | % de expresión de p100 ^{HER-2} |
|--------------------------------|---|
| Negativo (45) | 77.8 |
| 1–3 ganglios (31) | 41.9 |
| 4 o más ganglios (29) | 58.6 |

Se examinó mediante técnicas de Western blot la expresión de p100^{HER-2} en muestras de tumores primarios de mama procedentes de pacientes agrupadas en función del número de ganglios metastatizados.

3.3. Estudio de la relación entre la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, y otros factores pronósticos implicados en cáncer de mama

Tras el análisis de la relación entre la expresión de p100^{HER-2} con la afectación ganglionar estudiamos la relación entre la expresión de la forma truncada del receptor con otros factores pronósticos tradicionalmente considerados en cáncer de mama. Para facilitar la interpretación de los datos, las variables clínicas analizadas fueron clasificadas en dos categorías, exceptuando el estadio de la enfermedad.

Al estudiar la asociación entre la expresión de p100^{HER-2} y la expresión de receptores de estrógenos y de progesterona, no se encontró ninguna relación entre estas variables, ya que la forma truncada, p100^{HER-2} se expresó de forma similar en el grupo

de muestras pertenecientes a pacientes que expresaron receptores de estrógenos y progesterona que en el grupo de pacientes que no los presentaron ($P > 0.1$).

Al considerar la edad de las pacientes, tampoco se encontraron diferencias, ya que la expresión de p100^{HER-2} fue semejante en el grupo de pacientes con una edad igual o superior a 60 años respecto al grupo con una edad inferior a ésta ($P > 0.1$). La expresión de la forma truncada no se asoció con el estado menopáusico de las pacientes, ya que se demostró que su presencia fue similar en el grupo de pacientes en estado premenopáusico que en aquellas en estado post-menopáusico ($P > 0.1$).

Por otra parte, la expresión de la forma truncada, p100^{HER-2} no se asoció al tipo histológico del tumor analizado, puesto que la frecuencia de expresión fue similar en el carcinoma ductal infiltrante al hallado en los tumores de los restantes tipos histológicos estudiados ($P > 0.1$).

Al igual que ocurrió al considerar el número de ganglios afectados, la expresión de la forma truncada del receptor correspondiente al dominio extracelular de HER-2, p100^{HER-2}, se correlacionó con el estadio de la enfermedad, siendo su expresión más frecuente en las muestras de pacientes en estadio I que en las muestras de pacientes de estadios II y III ($P = 0.001$).

En la siguiente Tabla se refleja la relación existente entre la expresión de p100^{HER-2} con una serie de factores clínicos considerados factores pronósticos en cáncer de mama.

Tabla 15. Asociación entre la expresión de p100^{HER-2} con factores pronósticos de cáncer de mama

| Factor | % expresión de p100^{HER-2} |
|--|--|
| Afectación ganglionar | |
| Negativo (45) | 77.8 * |
| Positivo (60) | 50.0 * |
| Receptores de estrógenos (RE) | |
| Negativo (53) | 62.3 |
| Positivo (55) | 63.6 |
| Receptores de progesterona (RP) | |
| Negativo (52) | 65.4 |
| Positivo (56) | 60.7 |
| Edad | |
| 0–59 (49) | 63.3 |
| ≥ 60 (59) | 62.7 |
| Estado menopáusico | |
| Premenopáusica (44) | 68.2 |
| Postmenopáusica (61) | 57.4 |
| Estadio | |
| I (21) | 90.5 * |
| II (56) | 58.9 * |
| III (31) | 51.6 * |

Tipo histológico

| | |
|-------------------------|------|
| Ductal infiltrante (67) | 61.2 |
| Otros (17) | 58.8 |

Tamaño tumoral

| | |
|-------------|------|
| < 3 cm (81) | 66.7 |
| ≥ 3 cm (27) | 51.9 |

Las relaciones significativas se señalan mediante un asterisco (*). El número de muestras correspondientes a cada grupo se indica entre paréntesis.

4. Estudio del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina en tumores primarios de mama

La heregulina es el ligando común a los miembros de la familia HER, HER3 y HER4. La unión de este ligando promueve la heterodimerización de los diferentes miembros de la familia HER y, como ya habíamos expuesto en la Introducción de esta Memoria, HER-2 es el candidato de elección para la formación de estos heterodímeros, siendo éste el primer paso que conduce a la activación de las vías de transducción de señal mediadas por HER-2.

La familia de factores de crecimiento a la que pertenece la heregulina incluye varios miembros que surgen debido a múltiples variantes de “splicing” de cuatro genes codificantes para neuregulinas (NRGs). La heregulina pertenece a la familia de la neuregulina 1, al igual que el factor de diferenciación *neu* (NDF), el ARIA y el factor de crecimiento de la glía (GGF).

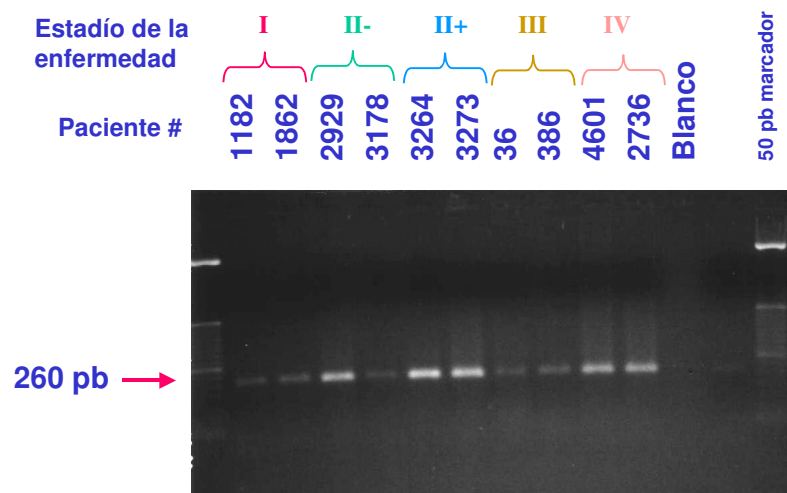
En esta parte del estudio se examinó la expresión del factor de crecimiento heregulina en muestras tumorales de cáncer de mama y su relación con la expresión de la forma completa y truncada del receptor HER-2, así como su posible asociación con otra serie de factores biológicos y clinicopatológicos.

4.1. Estudio de la expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama, mediante técnicas de RT-PCR

En primer término, en esta parte del estudio se examinó la expresión del factor de crecimiento heregulina mediante técnicas de RT-PCR, como se describe en la sección de Material y Métodos de esta Memoria, empleando los siguientes cebadores específicos: sentido 5'-AGTCCTTCGGTGTGAAACCA-3'; antisentido 5'-GGCATACCAGGATGATCTC-3' .

Con este procedimiento, se amplificó una región de 260 pares de bases comprendida entre los nucleótidos 606 y 866 de la secuencia de heregulina. Como control positivo de expresión y tamaño del fragmento amplificado se utilizó el plásmido pCEV27-HRG (amablemente cedido por el Dr. Aaronson) que lleva insertado la secuencia completa de heregulina. Como se puede apreciar en la Figura 10, mediante técnicas de RT-PCR la expresión de este factor de crecimiento en las muestras de cáncer de mama analizadas en nuestro estudio fue frecuente (92.8%).

FIGURA 10. Expresión de heregulina en muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad

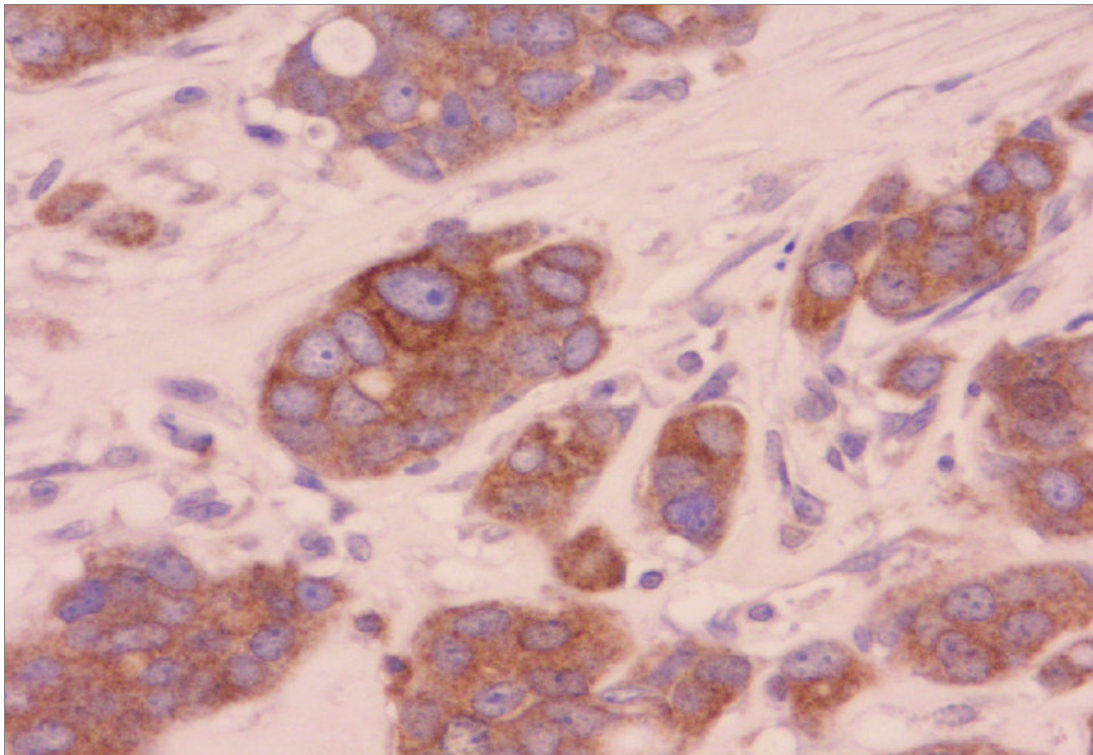


Expresión de heregulina en muestras de cáncer de mama de diferentes estadios determinada mediante técnicas de RT-PCR.

4.2. Estudio del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina y su localización subcelular en cáncer de mama

El análisis mediante técnicas inmunohistoquímicas de la expresión del factor de crecimiento heregulina en un panel de muestras de cáncer de mama realizado con un anticuerpo específico, demostró que esta glicoproteína se expresó de forma diferencial en función de la muestra analizada. El análisis se llevó a cabo empleando un anticuerpo específico dirigido contra el dominio extracelular de la proteína. Los resultados de un típico experimento de detección inmunohistoquímica de heregulina se pueden observar en la siguiente figura (Figura 11).

FIGURA 11. Determinación inmunohistoquímica de la proteína heregulina en cáncer de mama



Análisis inmunohistoquímico de la expresión de heregulina en cáncer de mama. En esta muestra de carcinoma ductal infiltrante de grado medio (grado II) se observó tinción en el citoplasma de las células tumorales correspondiente al factor de crecimiento heregulina. En esta imagen también se observa como otros elementos celulares del estroma, como son los fibroblastos, presentan una leve expresión de la proteína.

Como puede observarse en la Tabla 16, al estudiar la expresión del factor de crecimiento heregulina en los distintos grupos de muestras de cáncer de mama establecidos en función del estadio de la enfermedad, nuestros datos revelaron que 7 de las 25 muestras de cáncer de mama analizadas pertenecientes al estadio I expresaron la glicoproteína heregulina (28%). En 7 de las 27 muestras de tumores primarios analizadas pertenecientes a pacientes en estadio II de la enfermedad observamos expresión del factor de crecimiento (26%). Por último, 12 de las 33 muestras analizadas procedentes de pacientes en estadio III de la enfermedad presentaron tinción citosólica al emplear un anticuerpo anti-heregulina (36%). Según estos resultados, en el grupo de muestras de tumores de mama primarios analizados en nuestro estudio la expresión de la glicoproteína heregulina no se asoció con el estadio de la enfermedad ($P > 0.1$).

Paralelamente, en este mismo grupo de muestras se analizó la expresión del receptor HER-2 por técnicas inmunohistoquímicas. Nuestros experimentos revelaron que 8 de las 25 muestras pertenecientes al estadio I de la enfermedad (32%) presentaron la característica tinción de membrana del receptor HER-2. En 5 de las 25 muestras analizadas pertenecientes a pacientes en estadio II de la enfermedad se detectó expresión de la proteína HER-2 (19%). Por último, en 11 de las 33 muestras tumorales pertenecientes a pacientes en estadio III hallamos expresión del receptor de membrana HER-2 (33%). En todos los grupos considerados, la intensidad de la tinción de HER-2 fue muy heterogénea.

La siguiente Tabla resume la expresión de HER-2 y heregulina en una amplia serie de cánceres de mama analizadas mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Tabla 16. Análisis inmunohistoquímico de HER-2 y heregulina en cáncer de mama

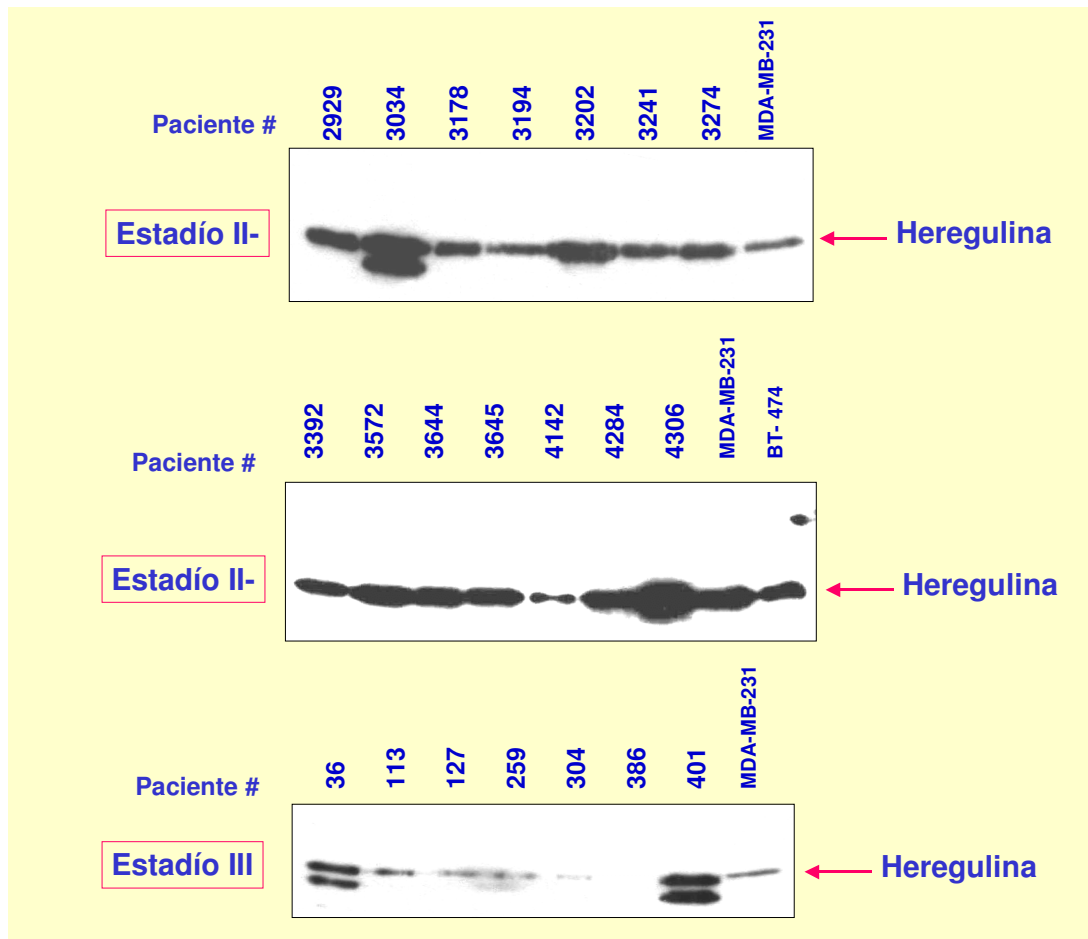
| Estadio de la enfermedad | % HER-2 en células tumorales | % heregulina en células tumorales |
|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| Estadio I (25) | 32 | 28 |
| Estadio II (27) | 19 | 26 |
| Estadio III (33) | 33 | 36 |

Se examinaron, mediante técnicas inmunohistoquímicas, un número total de 85 muestras de tumores de mama procedentes de pacientes agrupadas en función del estadio de la enfermedad.

De forma paralela al estudio inmunohistoquímico de la expresión y localización subcelular del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama, procedimos a la determinación de su nivel de expresión en estas mismas muestras mediante técnicas de transferencia Western. Este análisis se llevó a cabo empleando un anticuerpo monoclonal anti-heregulina que reconocía el dominio extracelular de esta glicoproteína, que ha sido ampliamente utilizado en estudios de esta naturaleza.

Nuestros resultados demostraron que el 84.6% de las muestras de cáncer de mama analizadas presentaron expresión de heregulina. Por otra parte, y al igual que ocurría con la expresión del receptor HER-2, el factor de crecimiento heregulina también presentó un nivel de expresión diferencial entre las distintas muestras de cáncer de mama analizadas.

En la Figura 12 se muestran los niveles de expresión de heregulina en un panel representativo de tumores de mama. Como control positivo de expresión de la proteína se utilizó un extracto celular de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231.

FIGURA 12. Estudio de expresión de heregulina en cáncer de mama

Análisis mediante Western blot del factor de crecimiento heregulina en muestras de cáncer de mama realizado con un anticuerpo específico. Se incluyó una muestra de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 como control de expresión.

Como puede apreciarse en la Figura anterior, los niveles de expresión de heregulina fueron altamente heterogéneos entre las distintas muestras analizadas. Así, se detectaron altos niveles de expresión (muestras n° 36, 401, 3034 y 4306), niveles medios (muestras n° 3178, 3241, 3274) y bajos (muestras n° 4142, 304, 4142), en algunos casos su presencia en la muestra tumoral fue indetectable (muestra n° 386).

Como se resume en la Tabla 17, nuestros resultados mostraron que el 15.1% de las muestras de cáncer de mama analizadas mediante técnicas de Western blot no mostraron expresión de heregulina, mientras que en otras muestras analizadas su nivel

de expresión fue bajo o moderado, 22.4% y 41.4%, respectivamente. Por otra parte, el 20.7% de las muestras procedentes de pacientes de cáncer de mama presentaron unos elevados niveles de expresión de este factor de crecimiento.

Tabla 17. Niveles de expresión del factor de crecimiento heregulina

| Nivel de expresión | % expresión de heregulina |
|--------------------|---------------------------|
| Negativo (18) | 15.5 |
| Bajo (26) | 22.4 |
| Moderado (48) | 41.4 |
| Elevado (24) | 20.7 |

Se examinó mediante técnicas de Western blot, empleando un anticuerpo específico, la expresión del factor de crecimiento heregulina en muestras de cáncer de mama. El número de muestras correspondientes a cada grupo se indica entre paréntesis.

4.3 *Estudio de la asociación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y del receptor HER-2 en cáncer de mama*

Puesto que los factores de crecimiento, tales como la heregulina, participan en el proceso de formación de heterodímeros entre los miembros de la familia HER, estudiamos la posible asociación entre la expresión de heregulina y la expresión del receptor HER-2.

En primer lugar, para el análisis de esta asociación las muestras tumorales fueron clasificadas en función de su grado de expresión del factor de crecimiento heregulina. Basándonos en este parámetro, se establecieron cuatro categorías: expresión negativa, baja expresión, muestras de expresión moderada y, por último, las muestras que presentaron una elevada expresión de este factor de crecimiento.

Este análisis nos permitió observar la existencia de una asociación significativa entre la expresión y/o sobreexpresión de p185^{HER-2} con el grado de expresión de heregulina. En este sentido, la sobreexpresión de la forma completa del receptor fue más frecuente en las muestras que presentaron simultáneamente moderada (39.5%) o elevada expresión (21.7%) del factor de crecimiento heregulina en comparación con los grupos de muestras que mostraron un bajo nivel de expresión (19.2%) o indetectable (5.9%) de la misma. Por tanto, nuestros resultados indicaron que la sobreexpresión de la forma completa del receptor HER-2 se asoció de forma significativa con el grado de expresión del factor de crecimiento ($P = 0.003$).

En cambio, no se observó asociación estadísticamente significativa entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, y el grado de expresión de la glicoproteína heregulina. La expresión de la forma truncada del receptor se observó en 8 de las 17 muestras de cáncer de mama analizadas en las que no se apreció la presencia de heregulina (47.1%), y en 14 de las 26 muestras que mostraron una baja expresión de la misma. Por otra parte, 31 de un total de 48 muestras con expresión moderada de heregulina mostraron asimismo expresión de p95^{HER-2} (64.6%), mientras que 15 de las 23 muestras que presentaron elevados niveles de expresión de la glicoproteína heregulina mostraron expresión de p95^{HER-2} (65.5%). Por tanto, nuestros resultados indican que en el grupo de muestras analizadas en nuestro estudio, la expresión de p95^{HER-2} no se asoció con el grado de expresión del factor de crecimiento heregulina ($P > 0.1$).

En la siguiente Tabla se resumen los datos obtenidos de esta parte de nuestro análisis.

Tabla 18. Relación entre la expresión y/o la sobreexpresión de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con el nivel de expresión de heregulina

| Expresión de heregulina | % de expresión de p95 ^{HER-2} | % de sobreexpresión de p185 ^{HER-2} | % de expresión de p185 ^{HER-2} |
|-------------------------|--|--|---|
| Negativa (17) | 47.1 | 5.9 | 41.2 |
| Baja (26) | 53.8 | 19.2 | 69.2 |
| Moderada (48) | 64.6 | 39.6 | 89.6 |
| Elevada (23) | 65.2 | 21.7 | 82.6 |

Se examinó la expresión de HER-2 en muestras de tumores primarios de mama agrupadas en función del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina.

4.4 *Estudio de la relación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina con factores pronósticos en cáncer de mama*

Después de analizar la relación existente entre la expresión de HER-2 con la expresión del factor de crecimiento heregulina, decidimos estudiar la posible existencia de una asociación entre la expresión de este factor de crecimiento con distintos parámetros clínicos (Tabla 19) de interés en cáncer de mama. Para facilitar el análisis, todas las variables de tipo clínico fueron dicotomizadas, excepto el estadio de la enfermedad.

En este sentido, en el grupo de muestras de cáncer de mama analizadas en nuestro estudio no se encontró asociación entre la expresión de la proteína heregulina y la expresión de los receptores de estrógenos (RE) y/o de progesterona (RP) ($P > 0.1$). Tampoco se encontró relación entre la expresión de heregulina con la edad, ya que la tasa de expresión de la glicoproteína fue similar en el grupo de pacientes con una edad

igual o inferior a 59 años en comparación con el grupo de pacientes con una edad superior a 60 ($P > 0.1$).

Tampoco varió significativamente la expresión de heregulina entre las pacientes estratificadas en función del estadio de la enfermedad (I, II, ó III) ($P \geq 0.1$). Por su parte, la frecuencia de expresión del factor de crecimiento no demostró variar en función del tamaño tumoral, considerando éste como mayor o menor de 3 cm. ($P > 0.1$).

Cuando tomamos como criterio el tipo histológico del tumor, considerando dos grandes grupos que abarcaban el carcinoma ductal infiltrante de mama por un lado, y el resto de tipos tumorales por otro, no se encontró relación entre la expresión de heregulina con ningún tipo tumoral específico ($P > 0.1$). Por último, tampoco fue posible establecer la existencia de una relación significativa entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y la afectación ganglionar ($P > 0.1$).

En la siguiente tabla se resumen los datos obtenidos al estudiar la expresión del factor de crecimiento heregulina en función de una serie de factores tradicionalmente considerados de valor pronóstico en cáncer de mama.

Tabla 19. Asociación entre la expresión proteica de heregulina con factores pronósticos en cáncer de mama

| Factor | % expresión heregulina |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Afectación ganglionar | |
| Negativo (53) | 81.1 |
| Positivo (61) | 86.9 |
| Receptores de Estrógenos | |
| Negativo (59) | 84.7 |
| Positivo (58) | 84.5 |

Receptores de Progesterona

| | |
|---------------|------|
| Negativo (59) | 82.8 |
| Positivo (58) | 86.4 |

Edad

| | |
|-----------|------|
| 0–59 (68) | 83.7 |
| ≥ 60 (49) | 85.3 |

Estado menopáusico

| | |
|----------------------|------|
| Premenopáusica (44) | 86.4 |
| Postmenopáusica (61) | 82.9 |

Estadio tumoral

| | |
|----------|------|
| I (28) | 71.4 |
| II (56) | 91.1 |
| III (33) | 84.4 |

Tipo histológico

| | |
|-------------------------|------|
| Ductal infiltrante (71) | 87.3 |
| Otros (18) | 88.9 |

Tamaño tumoral

| | |
|-------------|------|
| < 3 cm (49) | 84.1 |
| ≥ 3 cm (29) | 86.2 |

Se examinó la expresión del factor de crecimiento heregulina en muestras de cáncer de mama clasificadas en función de diversos parámetros clínicos. El número de muestras correspondientes a cada grupo se indica entre paréntesis.

5. Estudio del estado de activación del receptor HER-2 en cáncer de mama

Los estudios realizados sobre los miembros de la familia HER han demostrado que su función depende, al menos en parte, de la presencia de factores de crecimiento como pueden ser heregulina o el factor de crecimiento epidérmico (EGF), siendo éstos los que promueven la dimerización de los receptores. Esta dimerización conlleva una fosforilación cruzada de los residuos de tirosina del dominio catalítico de los receptores que forman el dímero. Esta fosforilación produce su activación siendo ésta el inicio de la cascada de señalización que dará lugar en última instancia a la transcripción de genes implicados en proliferación y supervivencia celular.

En esta parte de nuestro estudio analizamos el estado de fosforilación de la forma completa, p185^{HER-2} y troncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2 en un panel de cánceres de mama. Asimismo, se relacionó esta activación con la expresión de otros factores biológicos y con una serie de parámetros clínicos considerados de interés por su valor pronóstico en cáncer de mama.

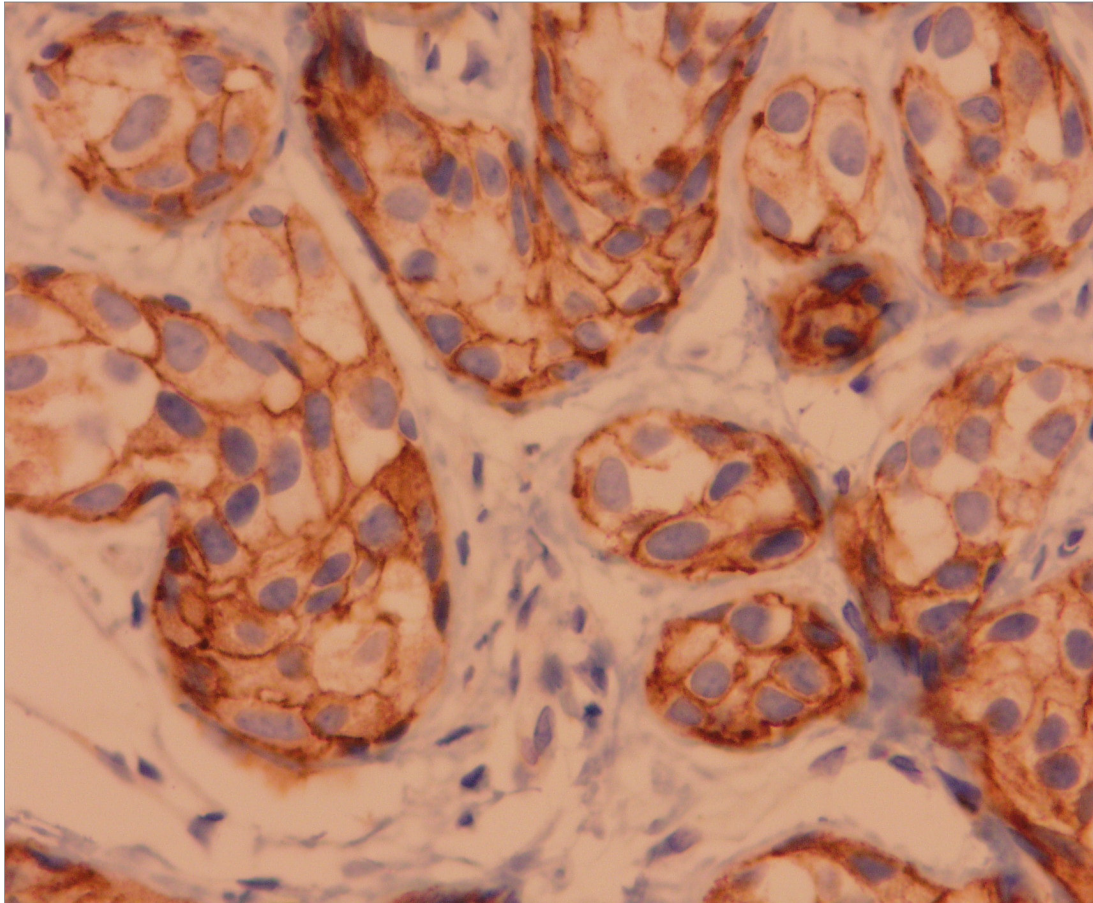
5.1. Estudio del nivel de fosforilación del receptor HER-2 en tumores primarios de mama mediante técnicas inmunohistoquímicas

El análisis mediante técnicas inmunohistoquímicas del grado de activación del receptor HER-2 en muestras de cáncer de mama se llevó a cabo empleando un anticuerpo que reconoce específicamente el residuo de tirosina 1248 del receptor cuando éste se encuentra fosforilado. El análisis de una serie de tumores mediante esta técnica demostró que los niveles de fosforilación del receptor HER-2 presentaron una extensa variabilidad dependiendo de la muestra analizada.

En la siguiente imagen se representa una tinción inmunohistoquímica de la forma fosforilada del receptor HER-2 en una muestra de cáncer de mama. Como ya hemos comentado, la tinción localizada en la membrana celular e indicativa de la

presencia del receptor HER-2 fosforilado en la misma, presentó distintos grados de intensidad dependiendo de las muestras tumorales analizadas.

FIGURA 13. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de HER-2 fosforilado en cáncer de mama

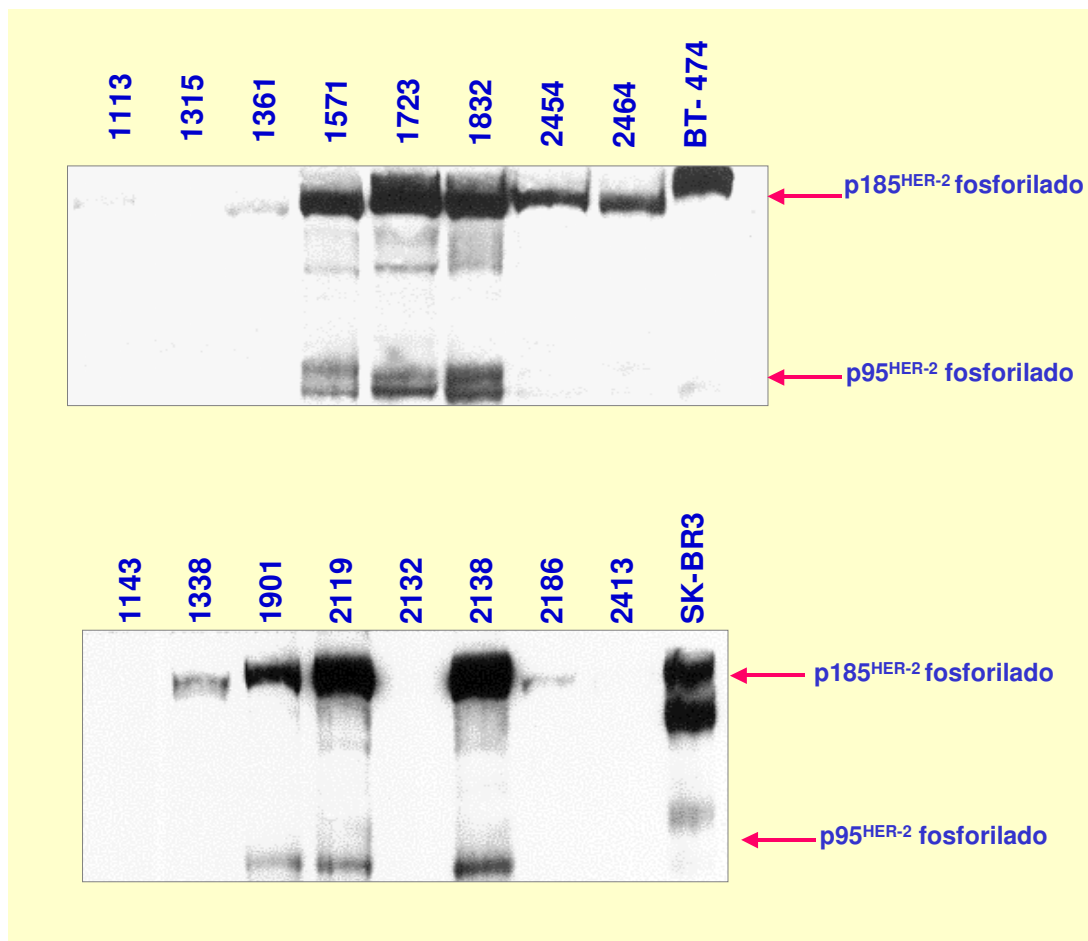


Análisis inuohistoquímico de HER-2 fosforilado en una muestra de cáncer de mama con un anticuerpo anti-HER-2 fosforilado. Al analizar esta muestra de cáncer de mama correspondiente a un carcinoma ductal de grado intermedio (grado II), se observó que la tinción de la membrana de las células malignas mostró una morfología parcial y de intensidad débil.

5.2. Estudio del estado de activación de las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2, mediante técnicas de Western blot en cáncer de mama

El estudio del estado de activación del receptor HER-2 mediante técnicas inmunohistoquímicas nos permitió conocer el grado de fosforilación de HER-2 en las distintas muestras de cáncer de mama analizadas. Sin embargo, esta técnica no nos permite distinguir a qué forma del receptor, la completa, p185^{HER-2} o la truncada, p95^{HER-2}, corresponde el nivel de fosforilación de HER-2 observado. Por este motivo, y con el fin de conocer con exactitud el grado de activación de cada una de las formas del receptor de membrana con actividad tirosina quinasa HER-2, analizamos el estado de fosforilación de éstas en una amplia serie de muestras tumorales procedentes de pacientes de cáncer de mama, empleando técnicas de Western blot. Para ello, se empleó un anticuerpo específico que reconoce únicamente ambas formas del receptor cuando presentaran el residuo de tirosina 1248 fosforilado, correspondiente al dominio C-terminal intracelular del receptor.

En el curso de este análisis observamos que el grado de activación de la forma completa y truncada del receptor HER-2 presentó una gran variabilidad entre las diferentes muestras incluidas en nuestro estudio. Así, y como se puede apreciar en la Figura 14, mientras algunas muestras no presentaron ninguna de las formas del receptor activadas (véase por ejemplo las muestras n° 1113 y 1315), en otros casos se detectaron grados variables de activación del mismo. En este sentido, observamos que algunas muestras presentaron únicamente la forma completa del receptor, p185^{HER-2} activada (muestras n° 1338 y 2464), mientras que, por el contrario, un considerable número de muestras mostraron ambas formas del receptor, p185^{HER-2} y p95^{HER-2}, fosforiladas (muestras n° 1571, 1832 y 2138).

FIGURA 14. Análisis mediante Western blot de HER-2 fosforilado en cáncer de mama

Análisis de Western blot empleando un anticuerpo específico anti-HER-2 fosforilado. Se incluyeron muestras de las líneas celulares de cáncer de mama BT-474 y SK-BR3 como control de expresión

La forma completa del receptor, p185^{HER-2} fosforilada se presentó en 150 de las muestras analizadas (74.6%), mientras que la forma truncada p95^{HER-2} se detectó en su estado fosforilado en 60 del total de muestras analizadas (29.8%). En 74 de las 150 muestras en las que se detectó la activación de p185^{HER-2}, los niveles de la misma fueron bajos (38.7%), mientras que 50 de las muestras analizadas presentaron unos niveles moderados de fosforilación del receptor completo (26.3%), y 26 tumores mostraron elevados niveles de p185^{HER-2} fosforilado (13.6%).

En lo referente a la activación de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2} observamos que 35 de las muestras mostraron bajos niveles de activación (18.4%),

mientras que 14 muestras presentaron moderados niveles de activación (7.4%) y, por último, 11 de las muestras analizadas expresaron unos elevados niveles de fosforilación de la forma truncada del receptor (5.8%). Como hemos comentado anteriormente, la observación de esta distribución indica que los niveles de fosforilación de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} en las muestras analizadas fueron muy variables.

FIGURA 15. Representación de los niveles de fosforilación de las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, en cáncer de mama

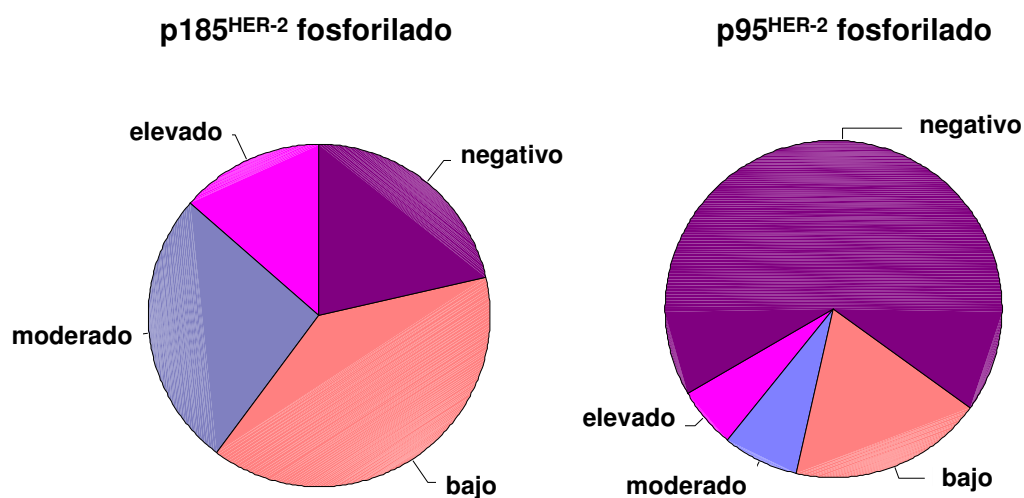


Diagrama de sectores en el que se representa el grado de fosforilación de las formas completa y truncada de HER-2

El nivel basal de expresión de la proteína fue independiente del nivel de fosforilación de la misma, indicando que las diferencias observadas en los niveles de fosforilación de las formas completa y truncada de HER-2 se deben a diferencias en los niveles de activación de las mismas entre las distintas muestras y no a diferencias en la cantidad de proteína de cada tumor empleada en los experimentos de SDS-PAGE.

Como resumen, en la siguiente Tabla podemos observar la distribución de las muestras en función de la expresión de los niveles de fosforilación de p185^{HER-2} y p95^{HER-2}.

Tabla 20. Grado de activación de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2} y truncada, p95^{HER-2} en muestras de cáncer de mama

| Nivel de expresión | % p185 ^{HER-2} fosforilado | % p95 ^{HER-2} fosforilado |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Negativo | 21.5 (41) | 68.4 (130) |
| Bajo | 38.7 (74) | 18.4 (35) |
| Moderado | 26.3 (50) | 7.4 (14) |
| Elevado | 13.6 (26) | 5.8 (11) |

Se examinó la expresión de las formas completa, p185^{HER-2} y truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2 fosforiladas en muestras de tumores de mama. El número de muestras correspondientes a cada subgrupo se indica entre paréntesis.

En el siguiente paso de nuestro estudio analizamos la posible asociación entre la fosforilación de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, con los niveles de fosforilación de la forma completa p185^{HER-2}. En este sentido, se estudió el estado de activación de la forma truncada del receptor p95^{HER-2} en las diferentes muestras de cáncer de mama agrupadas en función del grado de fosforilación de la forma completa p185^{HER-2} (nulo, bajo, moderado o alto).

En la siguiente Tabla podemos observar el resultado del análisis de la relación entre el estado de fosforilación de la forma truncada en función de los niveles de expresión de la forma completa fosforilada.

Tabla 21. Relación entre el estado de fosforilación de p95^{HER-2} y el grado de activación de la forma completa del receptor, p185^{HER-2}, en muestras de cáncer de mama

| Activación de p185 ^{HER-2} | % fosforilación de p95 ^{HER-2} |
|-------------------------------------|---|
| Negativa (41) | 4.9 |
| Baja (74) | 15.1 |
| Moderada (50) | 58.6 |
| Elevada (26) | 69.2 |

Se examinó, mediante técnicas de Western blot empleando un anticuerpo específico, la expresión de p95^{HER-2} fosforilado en muestras de tumores primarios de mama previamente agrupadas en función de los niveles de fosforilación del receptor HER-2 completo, p185^{HER-2}.

Al analizar la asociación entre la fosforilación de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2} con el grado de activación de la forma completa del mismo p185^{HER-2}, observamos que la fosforilación del receptor truncado fue significativamente más frecuente en las muestras de cáncer de mama que presentaron una moderada (58.6%) o elevada (69.2%) activación de p185^{HER-2}, en comparación con aquellas muestras de cáncer de mama que presentaron bajo grado de fosforilación de p185^{HER-2} (15.1%), o en las que no presentaron la forma activa de p185^{HER-2} (4.9%) ($P < 0.001$).

5.3. Estudio de la relación entre la fosforilación de las formas completa y truncada del receptor HER-2 con la expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama

En esta parte del estudio analizamos la posible existencia de una asociación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y la activación del receptor HER-2. Con este fin, y como se aprecia en la siguiente Tabla, las muestras tumorales se clasificaron en función de la expresión del factor de crecimiento heregulina y se estudió su relación con el estado de fosforilación de las formas completa y truncada del receptor HER-2.

Tabla 22. Relación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y el estado de activación de las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, en muestras de cáncer de mama

| Expresión de heregulina | % fosforilación de p95^{HER-2} | % fosforilación p185^{HER-2} |
|--------------------------------|---|---|
| Negativa (17) | 0.0 | 35.3 |
| Positiva (79) | 14.0 | 71.3 |

Se examinó, mediante técnicas de Western blot, la activación de HER-2 en muestras de tumor primario de mama agrupadas en función de la expresión del factor de crecimiento heregulina. El número de muestras correspondientes a cada grupo se indica entre paréntesis.

El análisis de los datos obtenidos mostró que la fosforilación del receptor HER-2 completo, p185^{HER-2}, se asoció significativamente con la expresión del factor de crecimiento heregulina ($P = 0.004$), resultado que ya observamos al analizar la relación entre la presencia del factor de crecimiento heregulina y los niveles totales de la forma completa del receptor. De este modo, la fosforilación de p185^{HER-2} se detectó en el 71.3% de las muestras en las que se expresó heregulina. Por el contrario, la presencia de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, fosforilado no se correlacionó con la expresión del factor de crecimiento heregulina ($P > 0.05$).

5.4. Estudio de la relación entre los niveles de fosforilación de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} con el grado de afectación ganglionar en cáncer de mama

Puesto que previamente habíamos establecido la existencia de una asociación significativa entre la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, con la presencia de afectación ganglionar en cáncer de mama, cabría esperar que la forma activa del fragmento truncado del receptor se relacionase igualmente con la extensión de la afectación ganglionar.

Con el fin de confirmar esta hipótesis las muestras tumorales pertenecientes a pacientes de cáncer de mama fueron clasificadas en función de su grado de afectación ganglionar. Así, se establecieron tres categorías o grupos de muestras en relación a la presencia o no de ganglios metastatizados y de su número, que fueron las siguientes; i) un grupo de muestras pertenecientes a pacientes sin afectación ganglionar; ii) una segunda categoría en la que se agrupaban las muestras procedentes de pacientes con uno a tres ganglios afectados por metástasis, y; iii) por último, el grupo de muestras de pacientes con cuatro o más metástasis ganglionares.

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos al analizar la asociación entre la activación de p95^{HER-2} y la sobreexpresión de la forma completa del receptor HER-2 fosforilado con el grado de afectación ganglionar en muestras de cáncer de mama.

Tabla 23. Relación entre la fosforilación de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, y la sobreexpresión de la forma completa, p185^{HER-2}, fosforilada con el grado de afectación ganglionar

| Grado de afectación ganglionar | % p95^{HER-2} fosforilado | % sobreexpresión p185^{HER-2} fosforilado |
|---------------------------------------|--|--|
| Negativo (94) | 29.0 | 13.8 |
| 1–3 ganglios (55) | 27.3 | 12.7 |
| 4 o más ganglios (78) | 51.3 | 20.5 |

Se examinó, mediante técnicas de Western blot, el estado de activación de HER-2 en muestras de cáncer de mama clasificadas en función del número de ganglios metastatizados de las pacientes de las que procedieron.

Al analizar los resultados obtenidos en esta parte del estudio observamos que, al igual que ocurría en el caso de la expresión de los niveles totales del fragmento truncado p95^{HER-2}, la fosforilación del mismo se asoció con el grado de afectación ganglionar en muestras pertenecientes a pacientes de cáncer de mama. Así, la activación del fragmento truncado del receptor HER-2 fue significativamente más frecuente en las muestras procedentes del grupo constituido por pacientes con cuatro o más ganglios metastatizados que en las muestras tumorales de pacientes con uno a tres ganglios metastatizados o que en el grupo de muestras de pacientes sin afectación ganglionar ($P = 0.003$).

De esta forma, el 51.3% de las muestras pertenecientes a las pacientes con cuatro o más ganglios afectados presentaron la forma activa de p95^{HER-2}, mientras que únicamente el 27.3% de las muestras procedentes de pacientes con uno a tres ganglios metastatizados expresaron la forma truncada de HER-2 fosforilada. Por último, se

observó activación de p95^{HER-2} en el 29.0% de las muestras procedentes de pacientes sin afectación ganglionar.

Sin embargo, en el grupo de muestras analizadas en nuestro estudio no se observó una asociación significativa entre la sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado y el grado de afectación ganglionar. En este sentido, no se detectaron diferencias significativas al comparar los distintos grupos de muestras analizadas ($P > 0.1$).

5.5. Estudio de la relación existente entre la expresión de las formas completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, fosforiladas con factores pronósticos en cáncer de mama

En esta parte del análisis se estudió la asociación entre la activación de la forma completa, p185^{HER-2} y la truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2 con diversos factores pronósticos de importancia en cáncer de mama. Con el fin de facilitar el análisis todas las variables clínicas fueron clasificadas en dos categorías, a excepción del estadio de la enfermedad.

En este sentido, no se detectó una relación entre el estado de fosforilación de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, y la expresión de los receptores de estrógenos y de progesterona ($P > 0.1$). Sin embargo, la sobreexpresión del receptor completo p185^{HER-2} activado fue significativamente más frecuente en las muestras que presentaron niveles anormalmente bajos de receptores de estrógenos ($P = 0.049$). Esta diferencia no se mantuvo al analizar la relación entre p185^{HER-2} fosforilado y los niveles de los receptores de progesterona ($P > 0.1$).

Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre el nivel activación de la forma truncada, p95^{HER-2}, o la sobreexpresión de la forma completa, p185^{HER-2}, fosforilada en relación a la edad de las pacientes ($P > 0.1$). Lo mismo sucedió al analizar los niveles de activación de la forma completa, p185^{HER-2}, o de la truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2 en relación al estado menopáusico ($P > 0.1$).

La forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, fosforilada se presentó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama correspondientes a pacientes en estadios II y III de la enfermedad que en aquellas muestras de pacientes en estadio I ($P = 0.001$). Sin embargo, la sobreexpresión de la forma completa del receptor, p185^{HER-2}, fosforilada no se asoció con el estadio de la enfermedad ($P > 0.1$).

En lo referente al tipo histológico tumoral, no se encontró ningún tipo de asociación entre los distintos tipos histológicos de los tumores analizados en nuestro estudio con el nivel de activación de p185^{HER-2} ($P > 0.1$). En cambio, la fosforilación de la forma truncada p95^{HER-2} apareció con mayor frecuencia en las muestras tumorales del tipo ductal infiltrante que en los restantes tipos histológicos ($P = 0.006$).

Por otra parte, ni la fosforilación de la forma truncada, p95^{HER-2}, ni los elevados niveles de expresión de p185^{HER-2} fosforilado se relacionaron con el tamaño tumoral ($P > 0.1$).

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al correlacionar la activación de la forma truncada p95^{HER-2} y la sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado con una serie de parámetros clínicos de interés en cáncer de mama.

Tabla 24. Relación entre la fosforilación de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con factores pronósticos en cáncer de mama

| Factor | % p95^{HER-2} fosforilado | % sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado |
|---------------------------------|--|---|
| Receptores de estrógenos | | |
| Negativo (110) | 38.2 | 20.7 * |
| Positivo (116) | 34.5 | 11.2 * |

Receptores de progesterona

| | | |
|----------------|------|------|
| Negativo (118) | 39.8 | 19.3 |
| Positivo (108) | 32.4 | 12.0 |

Edad

| | | |
|------------|------|------|
| 0–59 (141) | 35.5 | 14.1 |
| ≥ 60 (85) | 37.6 | 18.8 |

Estado menopáusico

| | | |
|-----------------------|------|------|
| Premenopáusica (90) | 38.2 | 12.2 |
| Postmenopáusica (137) | 35.0 | 18.2 |

Estadio

| | | |
|----------|--------|------|
| I (27) | 3.7 * | 11.1 |
| II (140) | 41.4 * | 14.9 |
| III (48) | 31.3 * | 14.6 |

Tipo histológico

| | | |
|--------------------|--------|------|
| Ductal infiltrante | 41.6 * | 16.9 |
| Otros | 21.7 * | 13.7 |

Tamaño tumoral

| | | |
|--------|------|------|
| < 3 cm | 33.9 | 17.5 |
| ≥ 3 cm | 43.6 | 10.7 |

Se estudió la activación de HER-2 en función de una serie de factores pronósticos en cáncer de mama. Las relaciones significativas se señalan mediante un asterisco (*). El número de casos correspondiente a cada grupo se indica entre paréntesis.

6. Estudio de la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama

A lo largo de los años se ha ido incrementando el interés por estudiar las vías de transducción intracelulares, lo que ha permitido aportar nuevas evidencias que relacionan estas vías con el desarrollo del cáncer.

En el caso del cáncer de mama estas vías de señalización son, con frecuencia, estimuladas por la presencia de un ligando o factor de crecimiento que se une a su correspondiente receptor específico. La unión del ligando activa el receptor y le capacita para transmitir la señal extracelular a otras moléculas intracelulares de manera que ésta acaba llegando al núcleo. En el caso de los receptores de la familia HER, la presencia del ligando promueve la dimerización de los mismos y la trans-fosforilación de los residuos de tirosina de sus dominios catalíticos, mecanismo que promueve la actividad tirosina quinasa intrínseca de los receptores e inicia la cascada de señalización.

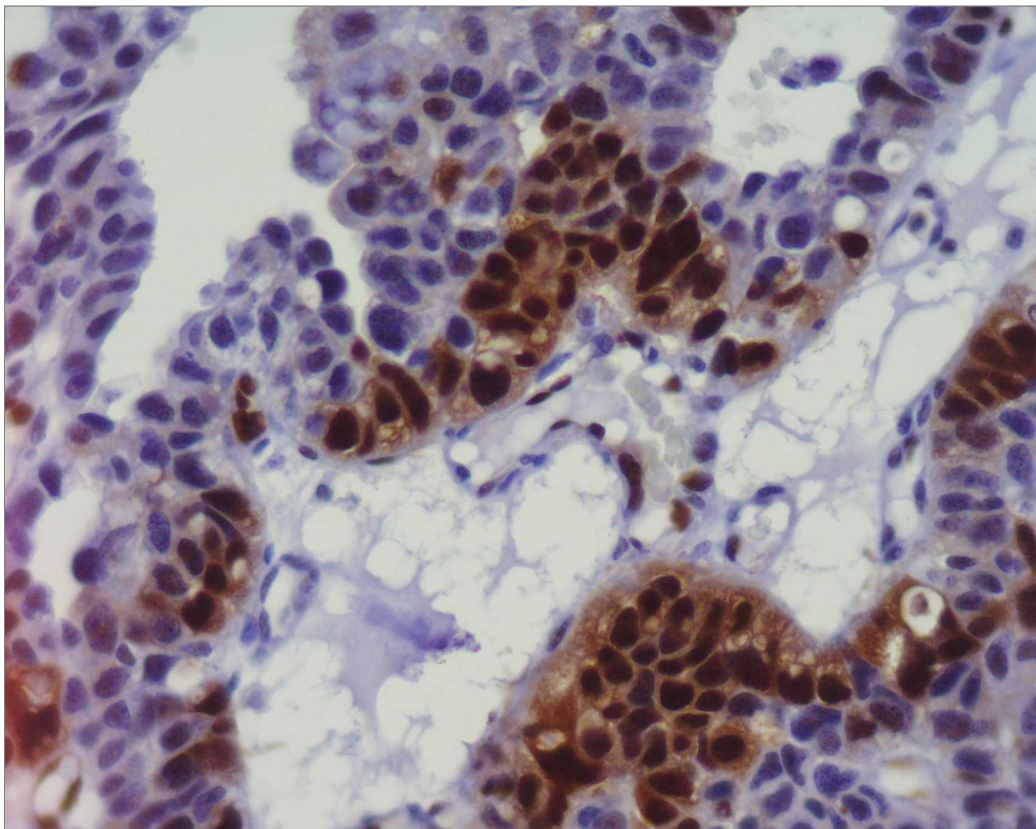
Como ya citamos en la Introducción de esta Memoria, una de las vías de señalización mejor establecidas en cáncer de mama es la vía Ras-Raf-MAPK. Esta vía se caracteriza por la fosforilación final de la proteína con actividad quinasa MAPK. Esta activación capacita esta quinasa para, una vez translocada al núcleo de la célula, promover la transcripción de multitud de genes implicados en proliferación celular.

Por sus implicaciones en cáncer de mama, en esta parte de nuestra investigación estudiamos la activación de la vía de transducción de señal Ras-Raf-MAPK analizando el estado de fosforilación de la proteína MAPK en una amplia serie de muestras de cáncer de mama en las que previamente se había caracterizado la expresión del receptor HER-2 y su estado de activación. Asimismo, estudiamos la posible existencia de una relación entre la fosforilación de las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2} del receptor HER-2 con la activación de MAPK en muestras de tumores primarios de mama.

6.1. Estudio de los niveles de activación de MAPK en cáncer de mama

Comenzamos esta parte de nuestro estudio analizando, por medio de técnicas inmunohistoquímicas, el estado de fosforilación de la proteína MAPK. Para ello, empleamos un anticuerpo específico que reconocía únicamente los residuos de treonina 202 y tirosina 204 fosforilados de esta proteína, en muestras de cáncer de mama. El estudio inmunohistoquímico de la activación de MAPK, del que presentamos un ejemplo representativo en la Figura 16, demostró que los niveles de activación de MAPK fueron heterogéneos, ya que las diversas muestras de cáncer de mama analizadas presentaron diferentes grados de activación de esta enzima.

FIGURA 16. Estudio inmunohistoquímico de MAPK en cáncer de mama



Análisis inmunohistoquímico de la activación de MAPK en un caso de cáncer de mama.

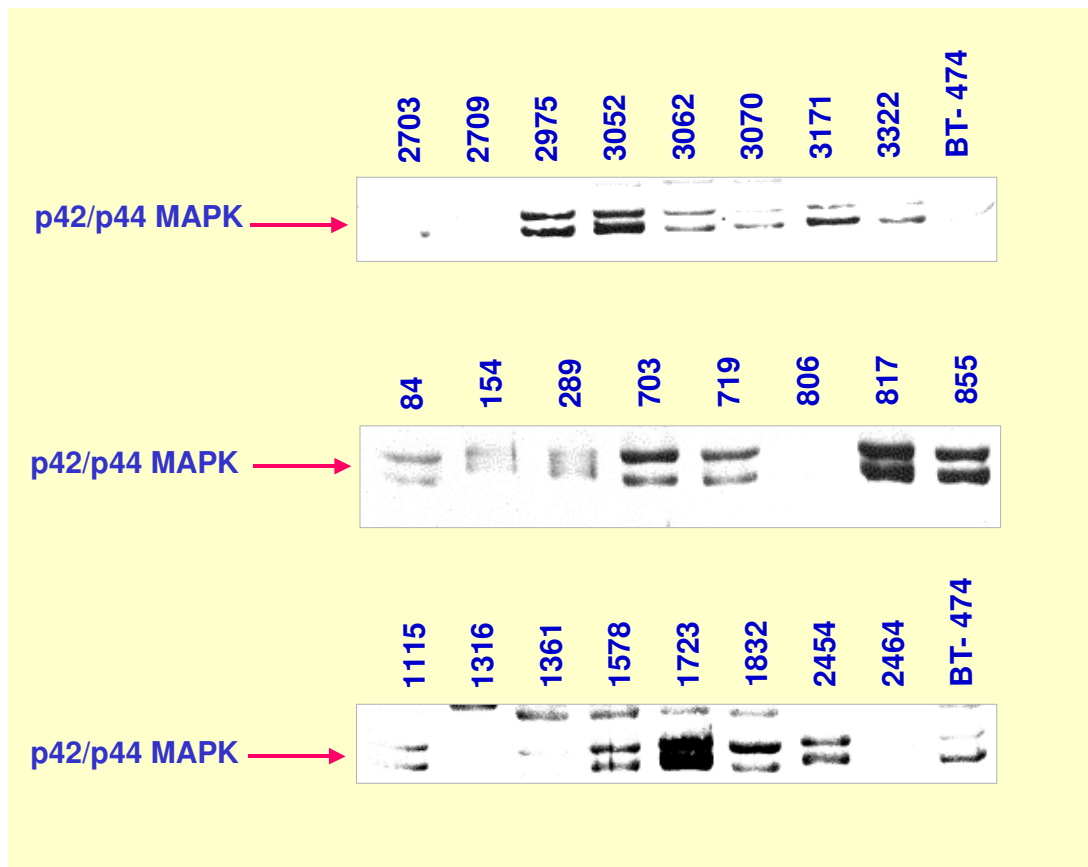
Como se puede apreciar en esta Figura, perteneciente a una muestra de carcinoma ductal infiltrante de alto grado (grado III), la expresión de MAPK fosforilada se ubica en el

citoplasma celular y en algunos núcleos de células malignas, tras la translocación de la molécula al núcleo, lo que tiene lugar una vez activada.

De forma complementaria al análisis del estado de activación de MAP quinasa mediante técnicas inmunohistoquímicas, estudiamos los niveles de fosforilación de esta proteína quinasa mediante técnicas de Western blot en un amplio panel de tumores primarios de mama. De nuevo para llevar a cabo esta parte del estudio se empleó un anticuerpo que reconocía únicamente las moléculas de MAPK cuando éstas se encontraron activadas por fosforilación de sus residuos de treonina 202 y tirosina 204.

La Figura 17 corresponde al análisis mediante técnicas de Western blot de los niveles de activación de la proteína MAPK en muestras de cáncer de mama. Como se puede apreciar, los niveles de fosforilación de MAPK resultaron heterogéneos en el conjunto de muestras de cáncer de mama analizadas. En este sentido, y tal como puede observarse, algunas muestras no expresaron la forma activa de la proteína quinasa (véase por ejemplo las muestras nº 2709 y 806), mientras que otros tumores presentaron unos bajos niveles de fosforilación de la misma (muestras nº 84, 154 y 1115). Es de destacar que algunas muestras tumorales mostraron unos moderados (muestras nº 703 y 719) o elevados niveles de fosforilación de MAPK (muestras nº 817, 855, 1723).

FIGURA 17. Análisis de la activación de MAPK en cáncer de mama determinada mediante transferencia Western



Análisis mediante Western blot del nivel de activación de MAPK en una serie de muestras de cáncer de mama empleando un anticuerpo específico. Se incluyó una muestra de la línea celular de cáncer de mama BT-474 como control de expresión.

En la siguiente Tabla se resume la diversidad de los niveles de activación de MAPK en el panel de muestras de cáncer de mama analizadas en nuestro estudio.

Tabla 25. Análisis de los niveles de fosforilación de MAPK en cáncer de mama

| Nivel de fosforilación de MAPK | % muestras |
|--------------------------------|------------|
| Negativo (30) | 20.0 |
| Bajo (49) | 32.7 |
| Moderado (47) | 31.3 |
| Elevado (24) | 16.0 |

Se examinó, mediante técnicas de Western blot empleando un anticuerpo específico, el nivel de activación de la proteína quinasa MAPK en cáncer de mama. El número de casos incluidos en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

El análisis del conjunto de datos obtenidos reveló que el 80% de las muestras expresaron la forma fosforilada de MAPK. En el 32.7% de las muestras analizadas los niveles de fosforilación de MAPK detectados fueron bajos y un porcentaje similar de las muestras, 31.3%, mostraron una moderada activación de la misma. Por último, el 16.0% del total de los tumores de mama analizados expresaron unos elevados niveles de la forma activa de MAPK.

De forma paralela se analizó el nivel de expresión de la forma total de MAPK en cada una de las muestras de nuestro estudio. En este sentido, el nivel basal de expresión de la proteína fue independiente del nivel de fosforilación de la misma, indicando que las diferencias observadas en los niveles de fosforilación de MAPK se deben a diferencias en los niveles de activación de la misma entre las distintas muestras y no a diferencias en la cantidad de proteína de cada tumor empleada en los experimentos de SDS-PAGE.

6.2. Estudio de la relación existente entre la activación de MAPK y la fosforilación del receptor HER-2 en cáncer de mama

En el presente apartado de nuestro estudio analizamos la posible relación existente entre la fosforilación del receptor de membrana con actividad tirosina quinasa HER-2 y la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK.

Con este fin se estudió la relación entre la fosforilación de las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2 con la activación de MAPK, en una amplia serie de muestras de cáncer de mama, cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla.

Tabla 26. Relación entre la fosforilación de las formas completa y truncada de HER-2 con la activación de MAPK

| Activación de MAPK | % de fosforilación de p95 ^{HER-2} | % de fosforilación de p185 ^{HER-2} |
|--------------------|--|---|
| Negativo (28) | 25.0 | 53.6 |
| Positivo (117) | 45.7 | 88.9 |

El nivel de activación de p185^{HER-2}, p95^{HER-2} y MAPK se analizó mediante técnicas de Western blot, empleando anticuerpos específicos en muestras de cáncer de mama.

Como se puede observar en la Tabla 26, el análisis de la relación existente entre la fosforilación de la forma truncada de HER-2, p95^{HER-2} con la activación de MAPK mostró que el 45.7% de las muestras que presentaron MAPK activada expresaron asimismo la forma fosforilada del receptor truncado, p95^{HER-2}, mientras que ésta última fue detectada en el 25% de las muestras que no presentaron actividad MAPK.

Por otra parte, el 88.9% de las muestras que presentaron activación de MAPK expresaron asimismo la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, fosforilada,

mientras que p185^{HER-2} fosforilado se detectó en el 53.6% de las muestras que no presentaron la forma activa de la quinasa.

Por tanto, en nuestro estudio, la forma fosforilada de p95^{HER-2} se expresó con mayor frecuencia en las muestras en las que se detectó la forma activa de MAPK en comparación con las muestras que no la presentaron ($P < 0.046$). En el caso del receptor completo se observó un efecto similar, ya que la forma activa del receptor completo se presentó con mayor frecuencia en las muestras en las que también se detectó la forma activa de MAPK ($P < 0.00001$).

A continuación, profundizamos en el estudio de esta asociación analizando la relación entre la expresión de las formas completa y truncada de HER-2 fosforiladas con el grado de activación de MAPK. Para llevar a cabo este análisis, en primer lugar, las muestras fueron clasificadas en función de los niveles de activación de MAPK. En este sentido, las muestras se agruparon en cuatro categorías:

- i) Muestras en las que no se detectó la forma activa de MAPK
- ii) Muestras que presentaron bajos niveles de fosforilación de MAPK
- iii) Grupo de muestras de cáncer de mama que mostraron una moderada activación de MAPK
- iv) Grupo formado por las muestras que presentaron unos elevados niveles de fosforilación de la proteína quinasa MAPK

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al analizar la relación existente entre el grado de activación de MAPK y la fosforilación del receptor completo, p185^{HER-2}, y truncado, p95^{HER-2}, en el total de muestras de cáncer de mama analizadas.

Tabla 27. Relación entre los niveles de fosforilación de MAPK y la presencia de la forma activa de p185^{HER-2} y p95^{HER-2}

| Fosforilación de MAPK | % p95 ^{HER-2} fosforilado | % p185 ^{HER-2} fosforilado | % sobreexpresión p185 ^{HER-2} fosforilado |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Negativo (28) | 25.5 | 53.6 | 0.0 |
| Bajo (48) | 42.6 | 83.3 | 14.6 |
| Moderado (46) | 47.8 | 93.5 | 19.6 |
| Elevado (23) | 47.8 | 91.3 | 52.2 |

Expresión de HER-2 fosforilado en muestras de cáncer de mama agrupadas en función de los niveles de activación de MAPK. El número de casos incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

Como se puede observar en la Tabla 27, la expresión de la forma truncada p95^{HER-2} fosforilada se detectó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama en las que también se encontraron niveles apreciables de la forma activa de MAPK. Sin embargo, la expresión de p95^{HER-2} fosforilado no varió de manera notable en función del grado de activación de MAPK. En este sentido, p95^{HER-2} fosforilado se presentó con una frecuencia similar en las muestras en las que la expresión de la forma activa de MAPK fue baja (42.6%), en comparación con el grupo de muestras en las que fue moderada (47.8%) o aquel grupo formado por las muestras de pacientes de cáncer de mama en las que la fosforilación de MAPK presentó elevados niveles ($P > 0.1$).

En relación con la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, fosforilada se observó que apareció con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama en las que también se halló activación de MAPK. Por otra parte, en el grupo de muestras analizadas, la fosforilación de dicha forma completa se correlacionó con el nivel de activación de la proteína MAPK. En este sentido, se observó que la forma fosforilada de

p185^{HER-2} se presentó en el 83.3% de las muestras en las que se halló un bajo nivel de activación de MAPK, mientras que fue detectada en el 93.5% de las muestras con moderados niveles de activación de la proteína quinasa y en el 91.3% de las muestras en las que la activación de MAPK fue elevada. Estos resultados indican que la presencia de la forma completa del receptor p185^{HER-2} fosforilado fue significativamente más frecuente en las muestras en las que se detectaron unos moderados o elevados niveles de activación de MAPK, al compararlo con aquellas muestras en las que los niveles de activación de la misma fueron bajos o indetectables ($P < 0.00001$).

Cuando se analizó la relación existente entre la sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado y el grado de activación de MAPK, observamos que los elevados niveles de fosforilación de la forma completa del receptor únicamente pudo ser observada en las muestras en las que se detectó actividad MAPK, siendo negativa en los casos en los que MAPK no se halló fosforilada. Por otra parte, la sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado fue significativamente más frecuente en el grupo de muestras que presentaron unos elevados niveles de activación de la proteína MAPK (52.2%) comparado con aquellas muestras en las que los niveles de activación de MAPK fueron moderados (19.6%) o bajos (14.6%) ($P < 0.004$).

6.3. Estudio de la relación entre la activación de MAPK y los niveles de expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama

Con anterioridad habíamos demostrado la existencia de una relación significativa entre los niveles de expresión de heregulina y el grado de activación de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}. Por este motivo, en esta parte de nuestro estudio analizamos la implicación de la presencia del factor de crecimiento heregulina en la transducción de señal mediada por la forma completa del receptor de membrana HER-2, p185^{HER-2} fosforilado en relación con la activación de MAPK.

En la siguiente Tabla se resumen los datos obtenidos del estudio de la relación existente entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y la activación de

MAPK en las muestras que presentaron la forma completa del receptor HER-2 fosforilada.

Tabla 28. Relación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y el estado de activación de MAPK en las muestras que expresan p185^{HER-2} fosforilado

| Activación de MAPK | % heregulina negativo | % heregulina positivo |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| Negativo (10) | 28.6 | 71.4 |
| Positivo (49) | 2.3 | 97.7 |

El grupo de muestras que presentaron activación de p185^{HER-2} fueron clasificadas en función del estado de activación de MAPK

Nuestros resultados mostraron que, en el grupo de muestras que presentaron p185^{HER-2} fosforilado, la expresión de heregulina fue más frecuente en aquellas muestras que presentaron simultáneamente activación de MAPK (97.7%), si lo comparamos con el grupo en las que, pese a existir expresión de p185^{HER-2} fosforilado y expresión de heregulina, no existió activación de MAPK (71.4%). Por tanto, la expresión de heregulina se correlacionó con la activación de MAPK en el grupo de muestras en las que la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2} se hallaba fosforilada ($P = 0.014$).

En el grupo de muestras que no presentaron expresión de heregulina, la fosforilación de p185^{HER-2} no se relacionó con la activación de MAPK. Por este motivo, nuestros resultados indican que la activación de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, se relacionó con la activación de MAPK en aquellas muestras que expresaron el factor de crecimiento heregulina.

6.4. Estudio de la relación entre la activación de MAPK y el grado de afectación ganglionar en cáncer de mama

Tras estudiar la relación existente entre el estado de activación de MAPK y la fosforilación de las formas completa y truncada del receptor HER-2, analizamos la relación entre éstas y la activación de la vía de transducción de señal Ras-Raf-MAPK con una serie de variables clínicas habitualmente consideradas de importancia en el pronóstico de las pacientes de cáncer de mama.

Puesto que, previamente habíamos descrito que la activación de la forma truncada, p95^{HER-2} se asoció con una mayor afectación ganglionar y, a su vez, se relacionó con la activación de MAPK, decidimos estudiar la asociación entre la expresión de las formas completa y truncada de HER-2, p185^{HER-2} y p95^{HER-2} fosforiladas con el grado de afectación ganglionar en el grupo de muestras de cáncer de mama en las que se detectó activación de MAPK.

Para facilitar este análisis, las muestras se clasificaron en función del número de metástasis ganglionares presentes en las pacientes a partir de las cuales se obtuvieron. De esta manera, se distinguieron varios grupos: i) una categoría formada por las muestras pertenecientes a pacientes sin afectación ganglionar; ii) un segundo grupo formado por el conjunto de muestras obtenidas a partir de pacientes en las que se detectaron una a tres metástasis ganglionares, y; iii) por último, las muestras pertenecientes a pacientes a las que le fueron detectados cuatro o más ganglios afectados.

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al relacionar la fosforilación de las formas completa y truncada de HER-2 con el grado de afectación ganglionar en el grupo de pacientes que presentaron actividad MAPK.

Tabla 29. Relación existente entre la activación de HER-2 con el grado de afectación ganglionar en el grupo de pacientes cuyas muestras tumorales presentaron activación de MAPK

| Grado de afectación ganglionar | % p95^{HER-2} fosforilado | % p185^{HER-2} fosforilado |
|---------------------------------------|--|---|
| Negativo (36) | 38.9 | 91.9 |
| 1–3 ganglios (31) | 29.0 | 83.9 |
| 4 o más ganglios (49) | 61.2 | 89.8 |

Se estudió la relación entre la activación de HER-2 y el grado de afectación ganglionar en muestras de cáncer de mama que presentaron activación de MAPK.

Al analizar los datos obtenidos en la Tabla anterior observamos que en el grupo de muestras en las que se detectó la forma activa de MAPK, la expresión de la forma truncada, p95^{HER-2} fosforilada fue significativamente mayor en las muestras pertenecientes a pacientes con cuatro o más ganglios afectados (61.2%), si lo comparamos con aquellas muestras procedentes de pacientes en las que únicamente se detectaron uno a tres ganglios metastatizados (29.0%), o con las muestras de cáncer de mama pertenecientes a pacientes sin afectación ganglionar. Por tanto, nuestros resultados nos permitieron establecer que la activación de la proteína MAPK y la expresión simultánea de la forma fosforilada de p95^{HER-2} se relacionó directamente con el grado de afectación ganglionar de las pacientes, siendo significativamente mayor en el grupo de pacientes con un mayor número de ganglios metastatizados ($P = 0.026$). Cuando analizamos los datos referentes a p185^{HER-2} fosforilado, observamos que en el grupo de pacientes en las que se detectó activación de MAPK, la expresión de p185^{HER-2} no se correlacionó con el estado de afectación ganglionar ($P > 0.1$).

6.5. Estudio de la relación entre la activación de MAPK y HER-2 con otros factores pronósticos en cáncer de mama

Tras estudiar la relación entre la expresión de la forma activa de la proteína MAPK y la activación de HER-2 con el grado de afectación ganglionar en muestras de tumores de mama, se estudió la posible relación existente entre la expresión de las formas completa y truncada de HER-2 fosforiladas y la activación de MAPK con otros factores clínicos considerados de interés en esta enfermedad. Con el fin de facilitar la labor analítica, estas variables clínicas fueron clasificadas en dos categorías, a excepción del estadio de la enfermedad.

Nuestros resultados no demostraron una relación estadísticamente significativa entre la activación de MAPK y de p185^{HER-2} fosforilado con la expresión de receptores de estrógenos o progesterona, así como tampoco mostró estar condicionado por la edad de aparición del tumor, ni se relacionó con el estado menopáusico de las pacientes. En relación con el estadio de la enfermedad, el tamaño tumoral y el tipo histológico del tumor, observamos que la expresión simultánea de la forma completa del receptor HER-2 fosforilada y de MAPK activada no se relacionó con estos factores ($P > 0.1$).

Sin embargo, nuestros resultados demostraron que la expresión simultánea de MAPK activada y de la forma truncada p95^{HER-2} fosforilada fue significativamente más frecuente en las muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes de estadios más avanzados de la enfermedad ($P = 0.026$). Asimismo, nuestros resultados demuestran que la expresión conjunta de p95^{HER-2} y MAPK fosforiladas resultó significativamente más frecuente en aquellas muestras tumorales de mayor tamaño ($P = 0.041$). De forma similar, la fosforilación de la forma truncada del receptor HER-2 y de la serina/treonina quinasa se halló con una frecuencia significativamente mayor en tumores primarios de mama pertenecientes al histotipo ductal infiltrante, en comparación con los restantes tipos histológicos ($P = 0.037$).

Nuestros datos no demostraron la presencia de una correlación entre la activación de MAPK y de p95^{HER-2} con la expresión de receptores hormonales (receptores de estrógenos y progesterona) ($P > 0.1$). Tampoco se halló una relación estadísticamente significativa entre la presentación simultánea de p95^{HER-2} y de MAPK activados en relación con la edad o el estado menopáusico de las pacientes ($P > 0.1$).

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al estudiar la relación entre la fosforilación de las formas completa y truncada de HER-2 y la activación de MAPK con diversos factores clínicos.

Tabla 30. Relación entre la actividad de HER-2 y MAPK con otros factores pronósticos en cáncer de mama

| Factor | % p95^{HER-2} fosforilado | % p185^{HER-2} fosforilado |
|-----------------------------------|--|---|
| Receptores de estrógenos | | |
| Negativo (53) | 52.8 | 94.4 |
| Positivo (63) | 39.7 | 84.1 |
| Receptores de progesterona | | |
| Negativo (61) | 55.7 | 91.9 |
| Positivo (55) | 34.5 | 85.5 |
| Edad | | |
| 0–59 (63) | 47.6 | 89.1 |
| ≥ 60 (53) | 56.6 | 88.7 |
| Estado menopáusico | | |
| Premenopáusica (41) | 51.2 | 92.9 |
| Postmenopáusica (75) | 42.7 | 86.7 |

Estadio tumoral

| | | |
|----------|--------|------|
| I (9) | 11.1 * | 77.8 |
| II (77) | 44.2 * | 89.7 |
| III (20) | 50.0 * | 85.0 |

Tipo histológico del tumor

| | | |
|-------------------------|--------|------|
| Ductal infiltrante (88) | 51.1 * | 92.0 |
| Otros (28) | 28.6 * | 79.2 |

Tamaño tumoral

| | | |
|-------------|--------|------|
| < 3 cm (87) | 40.2 * | 89.7 |
| ≥ 3 cm (30) | 62.1 * | 86.7 |

Se examinó la relación entre la activación de p185HER-2 y p95HER-2 con algunos factores clínicos de interés en muestras de cáncer de mama que presentaron activación de MAPK. El número de muestras correspondiente a cada variable se indica entre paréntesis. Las relaciones estadísticamente significativas se señalan con un asterisco (*).

7. Estudio de la activación de la vía de señalización PI3-K/Akt en cáncer de mama

La existencia de un estricto proceso de control de la regulación de la supervivencia celular es imprescindible para mantener una correcta homeostasis. Las células dañadas deben ser eliminadas mientras que las células diferenciadas deben mantener su estado. Un fallo de alguno de estos procesos puede traducirse en la acumulación de mutaciones que podrían conducir al desarrollo del cáncer o de enfermedades degenerativas.

En multitud de tipos celulares PI3-K ha demostrado jugar un importante papel en el proceso de señalización que interviene en la supervivencia celular. El clásico modelo de activación de PI3-K implica, en primer lugar, la unión del mismo a los residuos de tirosina fosforilados del dominio catalítico de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (RTK) como son, por ejemplo, los miembros de la familia HER.

La activación de PI3-K la capacita para, a su vez, activar por fosforilación multitud de efectores intracelulares. Uno de los más relevantes en el proceso de supervivencia celular es Akt/PKB, cuya fosforilación en un residuo de serina y otro de treonina conlleva su completa activación, siendo éste uno de los efectores más conocidos de PI3-K.

Existen multitud de evidencias que demuestran que Akt está implicado en el desarrollo de procesos malignos. En concreto, Akt1 se ha encontrado amplificado en el adenocarcinoma gástrico, además de haberse hallado amplificación génica y sobreexpresión de la proteína Akt2 en algunas líneas celulares de carcinoma pancreático y ovárico e, incluso, en muestras de cáncer de ovario y mama, siendo su sobreexpresión más frecuente en tumores no diferenciados y, por lo tanto, más agresivos.

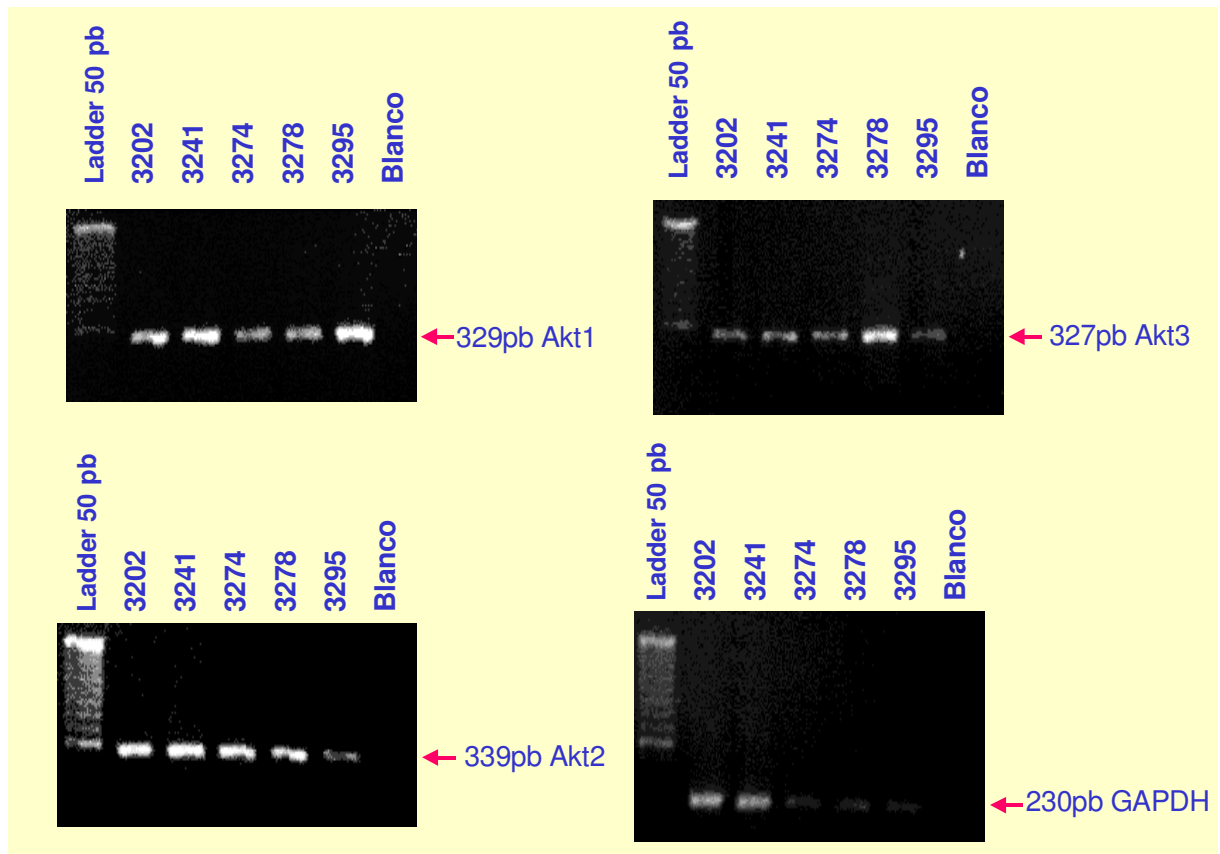
En esta parte de nuestro estudio analizamos la expresión de las diferentes isoformas de Akt y estudiamos la activación de la vía de transducción de señal PI3-K/Akt en cáncer de mama. Asimismo, estudiamos la relación entre la activación de esta vía con HER-2 y otros factores biológicos, así como su asociación con factores clínicos de interés en cáncer de mama.

7.1. Estudio de la expresión de Akt en cáncer de mama

Para llevar a cabo esta parte del estudio, en primer lugar caracterizamos el nivel de expresión de las 3 isoformas de Akt (Akt1, Akt2 y Akt3) mediante técnicas de RT-PCR, como se describe en la sección de Material y Métodos de esta Memoria, empleando los cebadores específicos para cada isoforma. Con este procedimiento se amplificó una región de 329 pares de bases comprendida entre los nucleótidos 199 y 528 de la secuencia de Akt1; una región de 339 pares de bases comprendida entre los nucleótidos 88 y 422 de la secuencia de Akt2; y una región de 327 pares de bases comprendida entre los nucleótidos 1 y 327 de la secuencia de Akt3.

Como se puede apreciar en la Figura 18, mediante técnicas de RT-PCR se detectó, con gran frecuencia, la expresión de las distintas isoformas de Akt, en las muestras de cáncer de mama analizadas en nuestro estudio, presentándose asimismo con una gran heterogeneidad.

FIGURA 18. Panel representativo de la expresión de las distintas isoformas de Akt en muestras de cáncer de mama en distintos estadios de evolución, determinada por RT-PCR.



Análisis de la expresión de las isoformas de Akt en cáncer de mama. La amplificación de la enzima Glicerualdehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizada como control.

El análisis de los datos obtenidos mostró que las distintas isoformas de Akt se presentaron de forma diferencial, de manera que algunas muestras expresaron todas las isoformas mientras que en otras únicamente se detectaron algunas de ellas.

Así, la isoforma Akt1 fue detectada en el 85.9% de las muestras analizadas, porcentaje similar al de la presentación de la isoforma Akt2, que fue detectada en 75 de las 92 muestras analizadas mediante técnicas de RT-PCR (81.5%). Por el contrario, la isoforma Akt3 se presentó en un menor porcentaje de muestras, puesto que únicamente en la mitad de las mismas fue posible su detección (54.3%).

En la siguiente Tabla se muestra el porcentaje de muestras con expresión de las isoformas Akt1, Akt2 y Akt3 en la serie de tumores primarios de mama analizada

Tabla 31. Distribución de la expresión de las isoformas de Akt en cáncer de mama

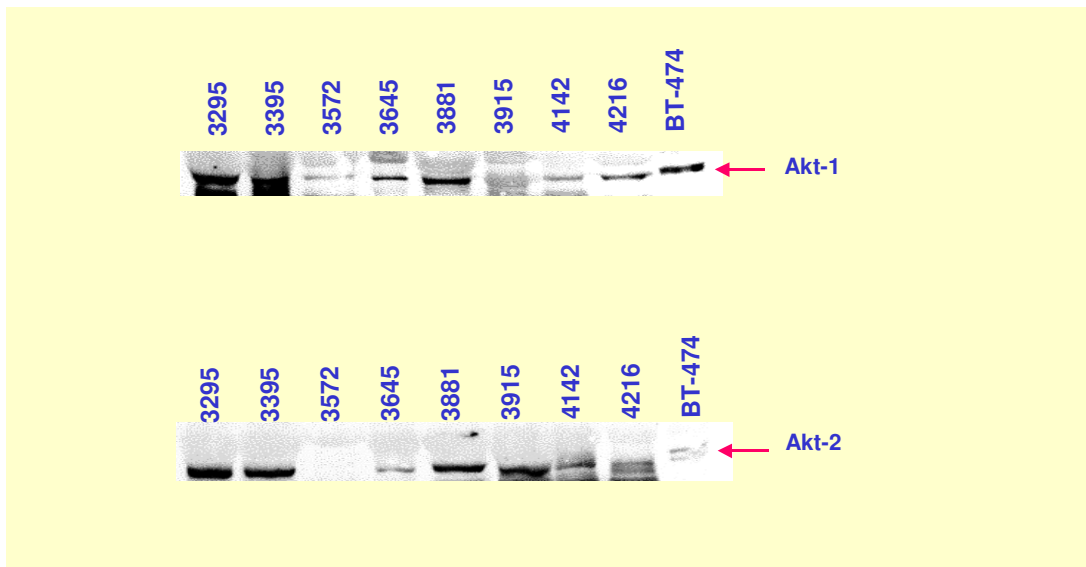
| Expresión | Akt1 | Akt2 | Akt3 |
|------------------|-------------|-------------|-------------|
| Negativo | 14.1 | 18.5 | 45.7 |
| Positivo | 85.9 | 81.5 | 54.3 |

Se analizaron mediante técnicas de RT-PCR la expresión de las isoformas de Akt en muestras de cáncer de mama.

De forma paralela al análisis de expresión empleando técnicas de RT-PCR, se llevó a cabo el estudio de la expresión de las isoformas 1 y 2 de Akt mediante Western blot. Se emplearon anticuerpos específicos dirigidos contra los respectivos dominios C-terminales de Akt1 y Akt2.

En este sentido, se observó que ambas isoformas de Akt, Akt1 y Akt2, se presentaron de forma simultánea en la mayoría de las muestras analizadas, pese a presentarse con diferentes niveles de expresión dependiendo de los diferentes tumores primarios.

En la Figura 19 se muestra una típica imagen de transferencia Western en la que se aprecia el grado de expresión de las isoformas Akt1 y Akt2 en las distintas muestras de cáncer de mama analizadas en este estudio.

FIGURA 19. Análisis del nivel de expresión de Akt1 y Akt2 en cáncer de mama.

Análisis de Western blot empleando anticuerpos específicos para cada isoforma de Akt en muestras de cáncer de mama. La línea celular BT-474 se incluyó como control de expresión.

Como se puede apreciar en la Tabla 32 en la que se resume el grado de expresión de cada una de las isoformas de Akt analizadas en esta parte de nuestro estudio, Akt1 y Akt2 se expresaron de forma diferencial entre las distintas muestras incluidas en esta parte de nuestro estudio. De un total de 133 muestras, 102 mostraron expresión de Akt1 (83.3%), de éstas el 32.4% mostró unos bajos niveles de expresión de la proteína, mientras que el 41.9% presentó moderados niveles de expresión de Akt1. Por último, en un pequeño porcentaje de muestras, 9.6%, se detectaron unos elevados niveles de expresión de esta isoforma de Akt.

En el análisis de Akt2, 114 del total de las 133 muestras analizadas presentaron expresión de esta isoforma, en concreto, el 43.3% de éstas mostraron bajos niveles de expresión de Akt2, mientras que en el 28.6% de los tumores analizados se detectaron moderados niveles de Akt2, únicamente en el 4.5% de los mismos se hallaron unos elevados niveles de expresión de esta proteína.

Tabla 32. Niveles de expresión de las isoformas Akt1 y Akt2 analizadas mediante técnicas de Western blot en cáncer de mama

| Expresión | Akt1 | Akt2 |
|------------------|-------------|-------------|
| Negativo | 16.2 (22) | 23.3 (31) |
| Bajo | 32.4 (44) | 43.6 (58) |
| Moderado | 41.9 (57) | 28.6 (38) |
| Elevado | 9.6 (13) | 4.5 (6) |

Se analizó la expresión de Akt1 y Akt2 en muestras de tumores primarios de mama empleando anticuerpos específicos dirigidos contra estas proteínas. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

7.2. Estudio del estado de activación de Akt en cáncer de mama

Puesto que Akt es activo y realiza sus funciones en señalización intracelular cuando está fosforilado, de forma complementaria al estudio de la expresión de las distintas isoformas de Akt analizamos su estado de activación.

Para ello en primer lugar realizamos el análisis inmunohistoquímico de Akt fosforilado en una serie de muestras de tumores primarios de mama. Como se describe en la sección de Material y Métodos de esta Memoria, en este estudio empleamos un anticuerpo específico dirigido contra el residuo de serina 473 fosforilado de la molécula de Akt. En la siguiente Figura se muestra un ejemplo de una tinción inmunohistoquímica de la forma fosforilada de Akt en cáncer de mama.

FIGURA 20. Estudio inmunohistoquímico de Akt fosforilado en cáncer de mama

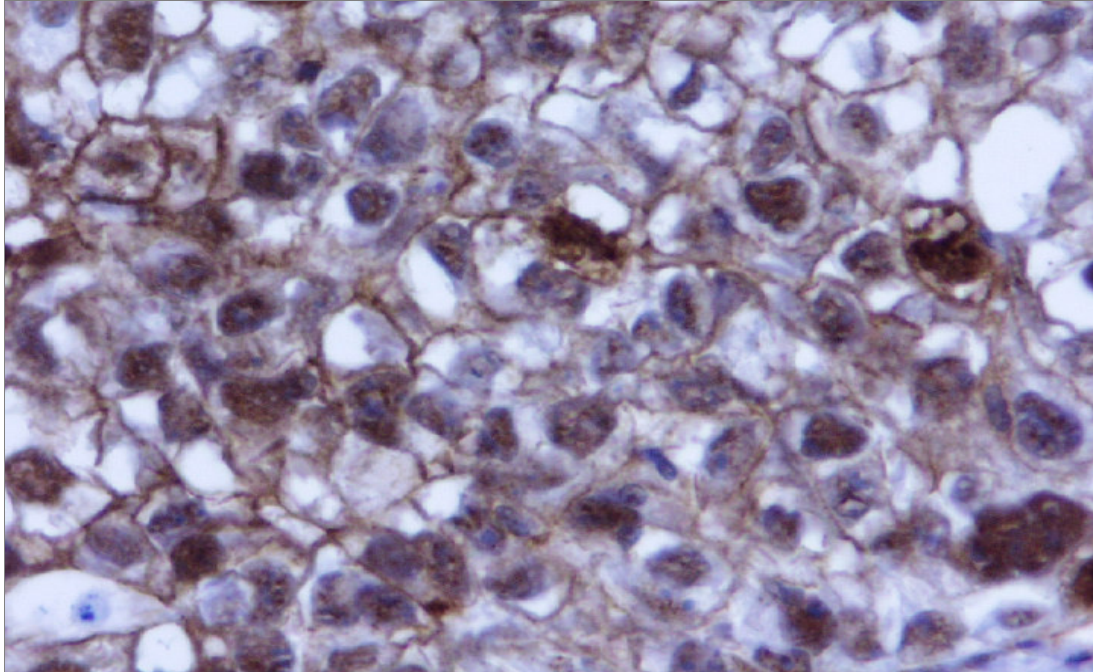
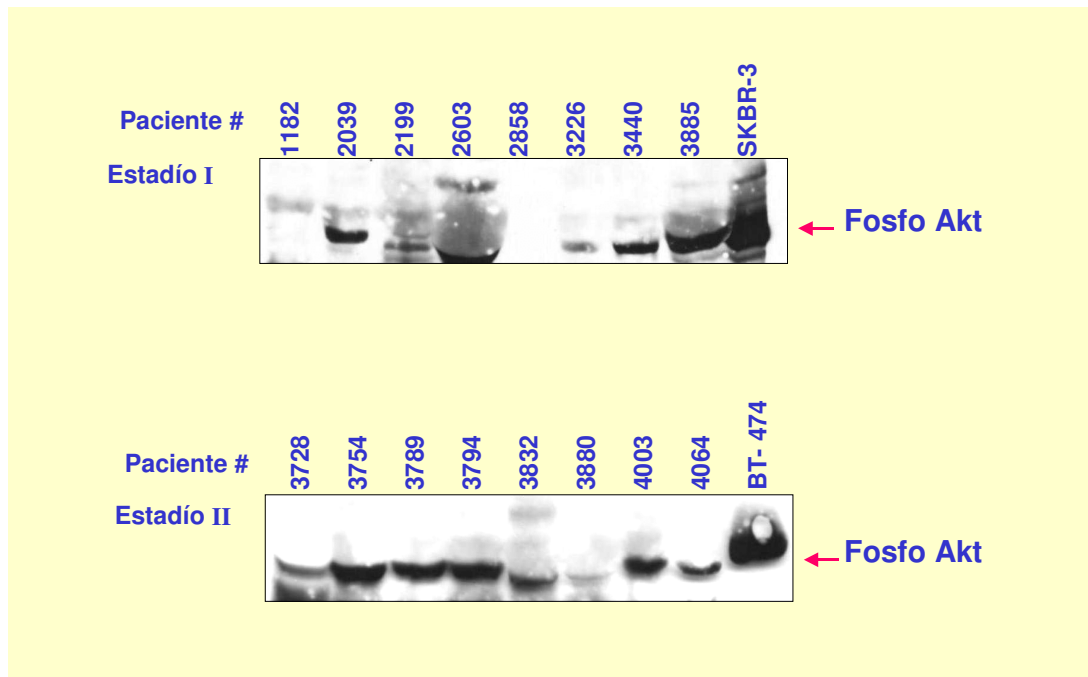


Imagen representativa de un carcinoma ductal infiltrante de alto grado (grado III), en el que se observa un patrón de expresión de Akt fosforilado heterogéneo y difuso, localizado en la membrana celular, en los núcleos de las células malignas y en algunos citoplasmas celulares.

De forma simultánea al análisis de la expresión de la forma fosforilada de Akt empleando técnicas inmunohistoquímicas, caracterizamos el estado de activación de Akt en una amplia serie de muestras de cáncer de mama mediante técnicas de Western blot. En este sentido, empleamos, nuevamente, un anticuerpo dirigido específicamente contra la forma fosforilada de Akt. Este anticuerpo reconocía el residuo de serina 473 fosforilado de la molécula de Akt.

En la siguiente imagen se aprecian los resultados del estudio de los niveles de activación de Akt en cáncer de mama.

FIGURA 21. Análisis del nivel de expresión de Akt fosforilado en cáncer de mama

Estudio de los niveles de expresión de Akt fosforilado una serie de muestras de cáncer de mama. Las líneas celulares SKBR-3 y BT-474 se incluyeron como control de expresión.

Los resultados derivados de este análisis mostraron que la activación de Akt se presentó con frecuencia puesto que el 84.7% de las muestras analizadas mostraron la forma fosforilada de la molécula. En general, las muestras que mostraron esta activación presentaron distintos grados de intensidad de la misma. En este sentido, el 36.0% de las muestras analizadas presentaron unos bajos niveles de expresión de Akt fosforilado, mientras que el 33.3% de las mismas mostraron Akt fosforilado con moderados niveles de expresión y, por último, en un menor porcentaje de los tumores analizados en este estudio, 15.3%, fue posible detectar la sobreexpresión de Akt fosforilado.

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al estudiar los niveles de expresión de Akt fosforilado empleando técnicas de Western blot.

Tabla 33. Estudio de los niveles de activación de Akt en cáncer de mama

| Niveles de expresión | % Akt fosforilado |
|----------------------|-------------------|
| Negativo (23) | 15.3 |
| Bajo (54) | 36.0 |
| Moderado (50) | 33.3 |
| Elevado (23) | 15.3 |

Se analizaron los niveles de Akt fosforilado mediante transferencia Western, empleando un anticuerpo específico, en muestras de cáncer de mama. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

El nivel basal de expresión de la proteína Akt fue independiente del nivel de fosforilación de la misma, indicando que las diferencias observadas en los niveles de fosforilación de Akt se deben a diferencias en los niveles de activación de la misma entre las distintas muestras y no a diferencias en la cantidad de proteína de cada tumor empleada en los experimentos de SDS-PAGE.

7.3. Estudio de la relación entre la expresión y estado de activación de Akt con la activación de HER-2 en cáncer de mama

En este apartado de nuestro estudio analizamos la posible relación existente entre la expresión de Akt y la activación de la vía de transducción de señal PI3-K/Akt con la activación del receptor de membrana con actividad tirosina quinasa HER-2 en cáncer de mama.

Con este fin, en primer lugar estudiamos la relación entre la expresión de las diferentes isoformas de Akt con la expresión de las formas completa, p185^{HER-2}, y troncada, p95^{HER-2}, fosforiladas. En la siguiente Tabla se resumen los resultados

obtenidos al estudiar la relación entre la expresión de Akt1 y Akt2 con la activación de las formas completa y truncada de HER-2.

Tabla 34. Relación entre la expresión de las isoformas de Akt con p185^{HER-2} y p95^{HER-2} fosforilados en cáncer de mama

| Expresión de Akt1 | % fosforilación p185^{HER-2} | % fosforilación p95^{HER-2} |
|--------------------------|---|--|
| Negativo (22) | 81.8 | 40.9 |
| Positivo (105) | 91.4 | 42.9 |

| Expresión de Akt2 | % fosforilación p185^{HER-2} | % fosforilación p95^{HER-2} |
|--------------------------|---|--|
| Negativo (31) | 80.6 | 32.3 |
| Positivo (93) | 92.5 | 45.2 |

Análisis de la expresión de HER-2 en muestras de cáncer de mama agrupadas en función de la expresión de Akt 1 y Akt 2. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

Al analizar los datos obtenidos, observamos que, en general, la expresión de las isoformas de Akt, Akt1 y Akt2 no se relacionaron con el estado de activación de las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2.

Observamos que el 91.4% de las muestras que mostraron expresión de Akt1 presentaron la forma completa del receptor p185^{HER-2} fosforilada. En el 92.5% de las muestras analizadas que expresaron Akt2 se halló asimismo expresión de p185^{HER-2} fosforilado. En conjunto, la expresión de la forma completa de HER-2 fosforilada no fue significativamente más frecuente en las muestras que expresaron cualquiera de las isoformas de Akt ($P > 0.1$). En relación a la forma truncada de HER-2, p95^{HER-2}, fosforilada tampoco se encontró una relación estadísticamente significativa entre su

activación y la expresión de la isoforma Akt1. El 42.9% de las muestras que expresaron Akt1 presentaron asimismo expresión de p95^{HER-2} fosforilado, mientras que en las muestras que expresaron Akt2, p95^{HER-2} fosforilado se detectó en el 45.2% de los casos ($P > 0.1$).

Una vez completado el estudio de la relación entre la expresión basal de las isoformas de Akt y la fosforilación de ambas formas del receptor HER-2, analizamos la posible relación existente entre la activación de Akt y la fosforilación de las formas completa, p185^{HER-2}, y troncada, p95^{HER-2}, del mismo. Para facilitar este estudio, las muestras fueron clasificadas en función de su nivel de expresión de Akt fosforilado, con lo que se obtuvieron varios grupos de muestras: i) muestras en las que no se detectó expresión de Akt fosforilado; ii) aquellas muestras en las que la forma activa de Akt estuvo presente con bajos niveles; iii) el conjunto de cánceres de mama en los que los niveles de Akt fosforilado fueron moderados; y, iv) por último, aquellas que presentaron sobreexpresión de la forma activa de Akt. En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al relacionar el grado de activación de Akt con la fosforilación de las formas completa y troncada de HER-2.

Tabla 35. Relación entre los niveles de fosforilación de Akt y HER-2 fosforilado

| Niveles de fosforilación Akt | % p95^{HER-2} fosforilado | % p185^{HER-2} fosforilado | % sobreexpresión p185^{HER-2} fosforilado |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Negativo (23) | 21.7 | 56.5 | 0.0 |
| Bajo (51) | 39.2 | 76.6 | 17.6 |
| Moderado (49) | 40.8 | 91.8 | 16.3 |
| Elevado (22) | 50.0 | 95.5 | 45.5 |

Análisis de Western blot empleando un anticuerpo específico contra HER-2 fosforilado de muestras de cáncer de mama agrupadas en función de los niveles de activación de Akt. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

Como se puede observar en la Tabla 35, la expresión de la forma truncada p95^{HER-2} fosforilada se presentó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama en las que simultáneamente se detectó la expresión de Akt fosforilado. Sin embargo, la expresión de p95^{HER-2} fosforilado no varió de forma significativa en función de los niveles de activación de Akt fosforilado. Así, p95^{HER-2} fosforilado fue detectado con una frecuencia similar en las muestras en las que la expresión de Akt fosforilado fue baja (39.2%), en comparación con aquellas en las que fue moderada (40.8%), o con las muestras de pacientes de cáncer de mama en las que la fosforilación de Akt presentó elevados niveles (50.0%) ($P > 0.1$).

En el aspecto referente a la expresión de p185^{HER-2} fosforilado, observamos que el porcentaje de muestras que expresaron la forma completa del receptor fosforilado se incrementó significativamente dependiendo del grado de activación de Akt. En este sentido, mientras el 56.6% de las muestras que no presentaron expresión de Akt fosforilado expresaron la forma completa del receptor fosforilado, el 76.6% de las muestras en las que se detectaron unos bajos niveles de activación de Akt presentaron también expresión de la forma completa del receptor HER-2 fosforilada. Asimismo, en el 91.8% de las muestras de tumores primarios de mama con moderados niveles de activación de Akt se detectó expresión de p185^{HER-2} fosforilado, mientras que el 95.5% de las muestras con sobreexpresión de Akt fosforilado presentaron simultáneamente activación de p185^{HER-2} ($P = 0.001$).

Esta misma relación pudo observarse al analizar la asociación entre la sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado y el grado de activación de Akt. En este sentido, observamos que todas las muestras con sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado presentaron activación de Akt y que el porcentaje de muestras que sobreexpresaron p185^{HER-2} fosforilado se incrementó con el grado de activación de Akt. Así, mientras que la sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado estuvo presente únicamente en el 17.6% de las muestras con bajos niveles de activación de Akt y en el 16.3% de las muestras con un grado moderado de expresión de Akt fosforilado, el 45.5% de las muestras con

sobreexpresión de Akt fosforilado presentaron asimismo sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado ($P = 0.001$).

7.4. Relación entre la activación de Akt y la expresión del factor de crecimiento heregulina en cáncer de mama

En nuestro estudio sobre la relación entre la activación de la vía de transducción de señal PI3-K/Akt con la activación del receptor HER-2, observamos que únicamente la forma completa del receptor HER-2 fosforilado presentó asociación con el grado de activación de Akt. De la misma manera, con anterioridad demostramos la existencia de una correlación entre el grado de expresión de la glicoproteína heregulina y la expresión de p185^{HER-2} fosforilado. Por este motivo, en esta parte de nuestro estudio analizamos la posible relación existente entre la expresión de heregulina y la activación de Akt y p185^{HER-2} en cáncer de mama.

Con este fin, estudiamos la relación entre la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2} fosforilado y la activación de Akt en el grupo de tumores primarios de mama en los que se detectó expresión del factor de crecimiento heregulina. Los resultados obtenidos en este estudio se reflejan en la siguiente Tabla.

Tabla 36. Relación entre la activación de Akt y p185^{HER-2} fosforilado en las muestras de cáncer de mama que presentaron expresión de heregulina

| Activación de Akt | % p185^{HER-2} fosforilado negativo | % p185^{HER-2} fosforilado positivo |
|--------------------------|--|--|
| Negativo | 50.0 | 50.0 |
| Positivo | 16.4 | 83.6 |

El grupo de muestras que expresaron el factor de crecimiento heregulina fueron clasificadas en función del estado de activación de Akt y de p185^{HER-2}.

Al analizar los datos obtenidos en este análisis, observamos que en el grupo de muestras procedentes de pacientes en las que se detectó expresión del factor de crecimiento heregulina la mitad de las muestras que no presentaron activación de Akt mostraron expresión de p185^{HER-2} fosforilado, mientras que el 83.6% de las muestras en las que se detectó activación de Akt presentaron asimismo activación de la forma completa del receptor HER-2 fosforilado. Por tanto, en el grupo de muestras que mostraron expresión del factor de crecimiento heregulina la expresión de p185^{HER-2} fosforilado se asoció significativamente con la activación de Akt ($P = 0.049$). Por otra parte, y tal y como se aprecia en la siguiente Tabla, en la serie de muestras en las que no se encontró expresión de la glicoproteína heregulina dicha asociación no resultó significativa ($P > 0.1$).

Tabla 37. Relación entre la activación de Akt y de p185^{HER-2} completo en las muestras de cáncer de mama que no presentaron expresión de heregulina

| Activación de Akt | % p185 ^{HER-2} fosforilado negativo | % p185 ^{HER-2} fosforilado positivo |
|-------------------|--|--|
| Negativa | 75.0 | 25.0 |
| Positiva | 66.7 | 33.3 |

El grupo de muestras en las que no se detectó expresión del factor de crecimiento heregulina fueron clasificadas en función del estado de activación de Akt y p185^{HER-2}

7.5. Estudio de la relación entre la activación de Akt y el grado de afectación ganglionar en cáncer de mama

Tras el análisis de la asociación entre la activación de la vía de transducción de señal PI3-K/Akt con una serie de factores biológicos, estudiamos la relación entre esta vía y algunos parámetros clínicos considerados de interés en cáncer de mama.

En este sentido, y en primer lugar, estudiamos la existencia de una posible asociación entre la expresión de las formas completa y truncada de HER-2, p185^{HER-2} y p95^{HER-2} fosforiladas, con el grado de afectación ganglionar en el grupo de muestras de cáncer de mama en las que se detectó expresión de Akt fosforilado.

Para facilitar la labor analítica las muestras de cáncer de mama fueron clasificadas en función del número de ganglios afectados por metástasis. Así se obtuvieron diversas categorías: i) muestras procedentes de pacientes sin afectación ganglionar; ii) tumores primarios de mama pertenecientes a pacientes con uno a tres ganglios metastatizados; iii) el grupo de muestras de pacientes con cuatro o más ganglios afectados.

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al relacionar la fosforilación de las formas completa y truncada de HER-2 con el grado de afectación ganglionar en el grupo de pacientes que presentaron actividad Akt.

Tabla 38. Relación entre las formas de HER-2 fosforilado con el grado de afectación ganglionar en el grupo de muestras que presentaron expresión de Akt fosforilado

| Grado de afectación ganglionar | % p95^{HER-2} fosforilado | % p185^{HER-2} fosforilado |
|---|--|---|
| Negativo (38) | 36.8 | 92.1 |
| 1–3 ganglios (35) | 25.7 | 82.9 |
| 4 o más ganglios (49) | 57.1 | 83.7 |

El total de muestras que presentaron Akt fosforilado y que expresaron las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, de HER-2 fosforiladas se agruparon en función del grado de afectación ganglionar. El número de casos incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

Como se puede observar en los resultados obtenidos en el grupo de muestras en las que se detectó expresión de Akt fosforilado, la expresión de p95^{HER-2} fosforilado fue significativamente más frecuente en el grupo de muestras pertenecientes a pacientes con 4 o más ganglios afectados (57.1%) si lo comparamos con las muestras de pacientes sin afectación ganglionar (25.7%) o con el grupo formado por los tumores de mama procedentes de pacientes con 1 a 3 ganglios afectados (36.8%) ($P = 0.049$).

Por tanto, la forma truncada del receptor HER-2 fosforilado se expresó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes con un mayor grado de afectación ganglionar en el grupo de muestras en las que se presentó la forma activa de Akt. En este mismo grupo de muestras no se encontró relación entre la expresión de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2} fosforilada con el grado de afectación ganglionar ($P > 0.1$).

Como podemos observar en la Tabla 39 la activación de las formas completa y truncada de HER-2 no se correlacionó con el grado de afectación ganglionar en las muestras que no presentaron actividad Akt ($P > 0.1$).

Tabla 39. Relación entre las formas de HER-2 fosforilado con el grado de afectación ganglionar en el grupo de muestras en las que no detectó activación de Akt

| Grado de afectación ganglionar | % p95^{HER-2} fosforilado | % p185^{HER-2} fosforilado |
|---------------------------------------|--|---|
| Negativo (8) | 25.0 | 75.0 |
| 1-3 ganglios (4) | 25.0 | 50.0 |
| 4 o más ganglios (11) | 18.2 | 45.5 |

El grupo de muestras de cáncer de mama que no mostraron actividad Akt fueron clasificadas en función del grado de afectación ganglionar. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

7.6. Estudio de la relación entre la fosforilación de HER-2 y la activación de Akt con otros factores pronósticos en cáncer de mama

Después de analizar la relación existente entre la activación de HER-2 y de la vía de transducción de señal PI3-K/Akt, estimada evaluando el nivel de fosforilación de Akt, con el grado de afectación ganglionar en muestras de tumores primarios de mama, estudiamos la posible correlación entre la expresión de Akt y HER-2 fosforilados con otros factores clínicos tradicionalmente considerados de interés en esta enfermedad. Con el fin de facilitar el estudio de esas relaciones entre estos parámetros, las variables clínicas fueron clasificadas en dos categorías, a excepción del estadio de la enfermedad.

El estudio de la relación entre la expresión de Akt fosforilado y p185^{HER2} activado con otros factores clínicos tradicionalmente considerados factores pronósticos en cáncer de mama no nos permitió establecer ninguna asociación significativa ($P > 0.1$).

Observamos que, en cambio, la activación simultánea de Akt y p95^{HER-2} se presentó con mayor frecuencia en el grupo de muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes en estadios más avanzados de la enfermedad ($P = 0.008$). Sin embargo, en nuestro estudio la activación de Akt y de la forma truncada del receptor HER2 no se asoció con el estado hormonal ni con la edad de las pacientes, así como tampoco con la expresión de los receptores de estrógenos o de progesterona ($P > 0.1$). Por otra parte, ni el tamaño ni el tipo histológico del tumor se relacionaron con la activación simultánea de Akt y p95^{HER-2} ($P > 0.1$)

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos al estudiar la relación entre la fosforilación de HER-2 y la activación de Akt con diversas variables clínicas.

Tabla 40. Relación entre las formas completa y truncada de HER2 y Akt fosforilados con diversos factores pronósticos en cáncer de mama

| Factor | % p95^{HER-2} fosforilado | % p185^{HER-2} fosforilado |
|-----------------------------------|--|---|
| Receptores de estrógenos | | |
| Negativo (59) | 45.8 | 88.1 |
| Positivo (63) | 38.1 | 84.1 |
| Receptores de progesterona | | |
| Negativo (64) | 51.6 | 87.5 |
| Positivo (58) | 31.0 | 84.5 |
| Edad | | |
| 0–59 (75) | 43.8 | 86.3 |
| ≥ 60 (49) | 38.8 | 85.7 |
| Estado menopáusico | | |
| Premenopáusica (45) | 48.9 | 93.3 |
| Posmenopáusica (77) | 37.7 | 81.8 |
| Estadio tumoral | | |
| I (7) | 14.3 * | 85.7 |
| II (80) | 42.5 * | 92.5 |
| III (26) | 30.8 * | 61.5 |
| Tipo histológico del tumor | | |
| Ductal infiltrante (95) | 25.9 | 74.1 |
| Otros (27) | 46.3 | 89.5 |

Tamaño tumoral

| | | |
|-------------|------|------|
| < 3 cm (88) | 39.8 | 92.0 |
| ≥ 3 cm (34) | 47.1 | 70.6 |

Se examinaron los niveles de activación de Akt y HER-2 en muestras de tumores primarios de mama en relación a diversos parámetros clínicos. El número de casos incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis. Las relaciones estadísticamente significativas se señalan con un asterisco (*).

8. Caracterización de la expresión de HER-2 y su implicación en la activación de las vías de transducción de la señal mitógena en cáncer de mama de alto riesgo

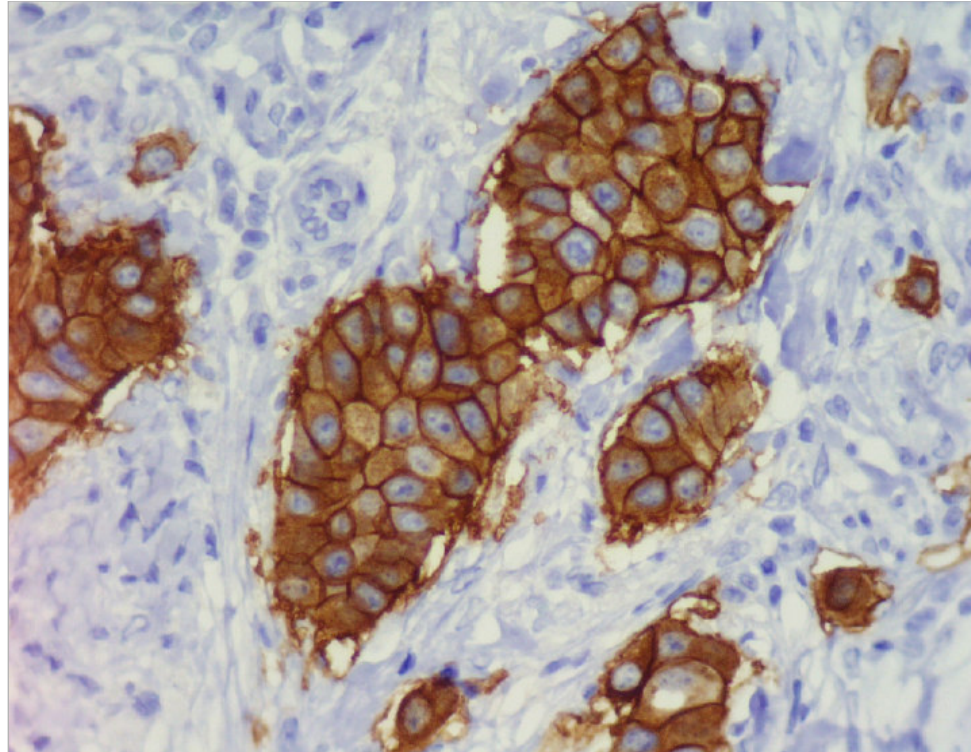
Tras la caracterización del nivel de expresión y grado de fosforilación de HER-2 en cáncer de mama, así como el estudio de su relación con otros factores biológicos y clínicos en una amplia muestra de tumores de mama, analizamos estos parámetros en un grupo particular de cáncer de mama, el cáncer de mama de alto riesgo. En este sentido, decidimos estudiar la relación o implicación del receptor de membrana HER-2 en la aparición y/o desarrollo del cáncer de mama de alto riesgo, es decir, aquel caracterizado por un elevado número de ganglios metastatizados (≥ 10 ganglios afectados). Este grupo de pacientes pertenecieron a los estadios II, III o IV. Los tratamientos empleados antes de la resección de la mama se basaron en el uso de una combinación de antraciclina, del tipo FAC o FEC, y de un régimen de acondicionamiento de tipo quimioterápico (STAMP-V' [ciclofosfamida, tiotepa, y carboplatino] o CEM) previo al trasplante autólogo de células progenitoras (ASCT).

8.1. Estudio de la expresión de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo

En la primera parte de este estudio caracterizamos la expresión de HER-2 mediante técnicas inmuohistoquímicas en las muestras de cáncer de mama de alto riesgo de las que disponíamos. Para este análisis, empleamos un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra el receptor HER-2 y observamos diferentes niveles de expresión del

mismo en función de la muestra de cáncer de mama de alto riesgo analizada. En la imagen siguiente podemos observar un ejemplo representativo en el que se aprecia la característica tinción de membrana en las células del carcinoma propia de este receptor.

FIGURA 22. Estudio inmunohistoquímico de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo

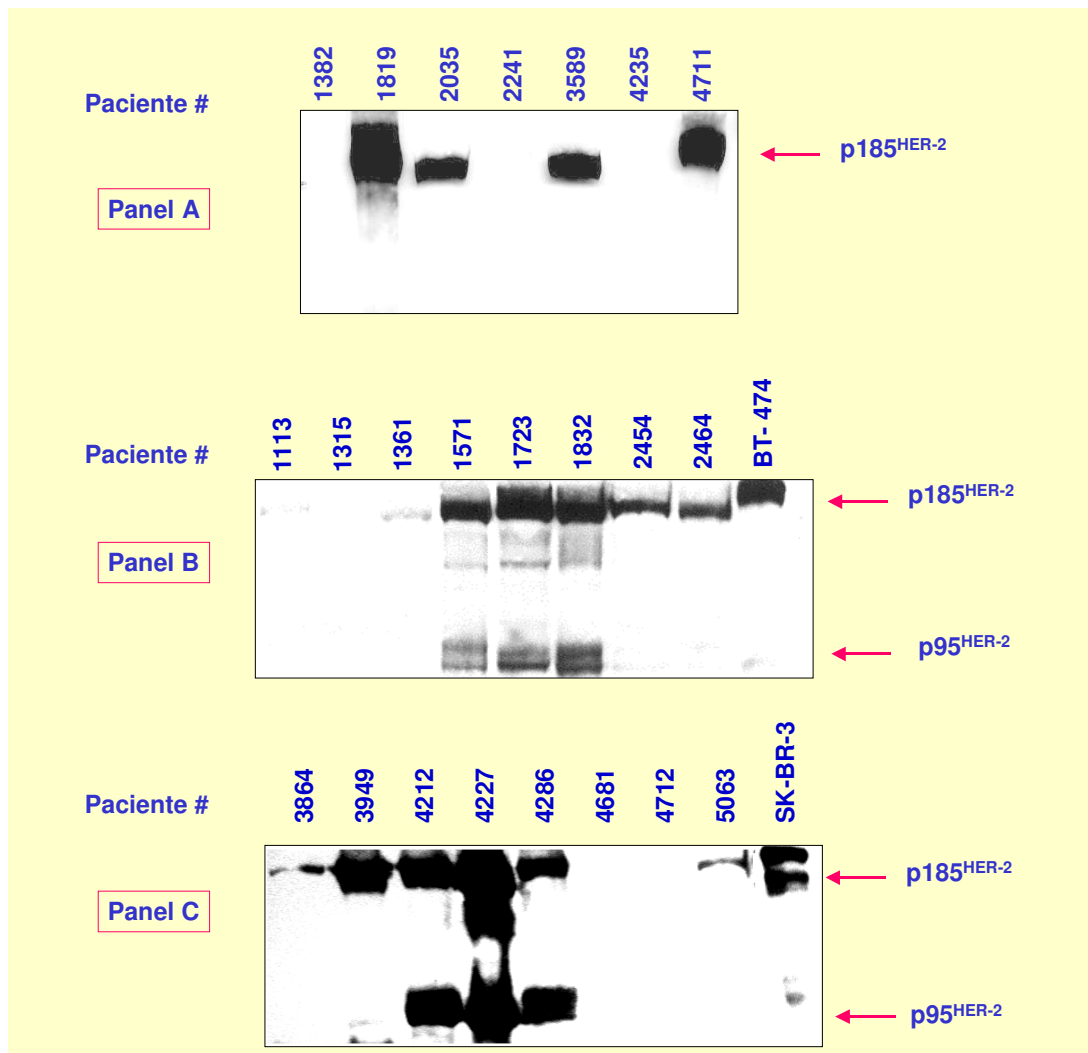


Análisis inmunohistoquímico de HER-2 empleando un anticuerpo específico. En esta imagen correspondiente a un carcinoma ductal infiltrante de alto grado (grado III) observamos una tinción de fuerte intensidad de la oncoproteína HER-2 en células ductales malignas.

A continuación, caracterizamos la expresión de las formas completa y truncada del receptor HER-2 en este grupo de tumores empleando técnicas de Western blot con un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra el dominio C-terminal del receptor utilizado, previamente, en el estudio general, en una serie de muestras de cáncer de mama de alto riesgo.

Los resultados de típicos experimentos de transferencia Western que evidencian el nivel de expresión del receptor HER-2 en muestras de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo se muestra en la siguiente Figura.

FIGURA 23. Análisis de Western blot del receptor HER-2 en muestras de cáncer de mama de alto riesgo



Análisis de la expresión de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo mediante técnicas de Western blot con un anticuerpo específico. Se incluyeron muestras de las líneas celulares BT-474 y SK-BR3 como control de expresión.

Como se puede apreciar en la Figura 23, en este grupo de muestras también encontramos unos niveles de expresión heterogéneos tanto de la forma completa, p185^{HER-2}, como de la forma truncada, p95^{HER-2}. En este sentido, mientras que algunas muestras mostraron únicamente expresión de la forma completa de HER-2 (por ejemplo, las muestras números 1819 y 2035, correspondientes al panel A o 2454 y 2464, correspondientes al panel B). Otras presentaron expresión de ambas formas del receptor (por ejemplo, las muestras números 1571, 1773 y 1832, correspondientes al

panel B, y las muestras números 4212 y 4227 correspondientes al panel C). Como se muestra en la imagen, la expresión de HER-2 fue indetectable en algunas de las muestras analizadas (por ejemplo las muestras números 2241 y 4235 del panel A).

Entre la serie de muestras que expresaron HER-2 pudimos observar distintos niveles de expresión de ambas formas del receptor. En la siguiente Tabla se resumen la frecuencia de expresión de las formas completa y truncada de HER-2 y los niveles de las mismas en las muestras de cáncer de mama de alto riesgo analizadas.

Tabla 41. Estudio de los niveles de expresión de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} en cáncer de mama de alto riesgo

| Niveles de expresión | % p185 ^{HER-2} | % p95 ^{HER-2} |
|----------------------|-------------------------|------------------------|
| Negativo | 17.6 | 39.7 |
| Bajo | 30.9 | 23.5 |
| Moderado | 29.4 | 17.6 |
| Sobreexpresión | 22.1 | 19.1 |

Análisis de Western blot con un anticuerpo específico de los niveles de expresión de las formas completa y truncada de HER-2 en muestras de cáncer de mama de alto riesgo.

De forma consecutiva estudiamos la relación entre la expresión de las formas completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2. En la siguiente tabla se recopilan los datos obtenidos al estudiar la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 en función de los niveles de expresión de p185^{HER-2}.

Tabla 42. Relación entre la expresión de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} en cáncer de mama de alto riesgo

| Niveles de expresión de p185 ^{HER-2} | % expresión de p95 ^{HER-2} |
|---|-------------------------------------|
| Negativo (12) | 0.0 |
| Bajo (21) | 42.9 |
| Moderado (20) | 85.0 |
| Sobreexpresión (15) | 100.0 |

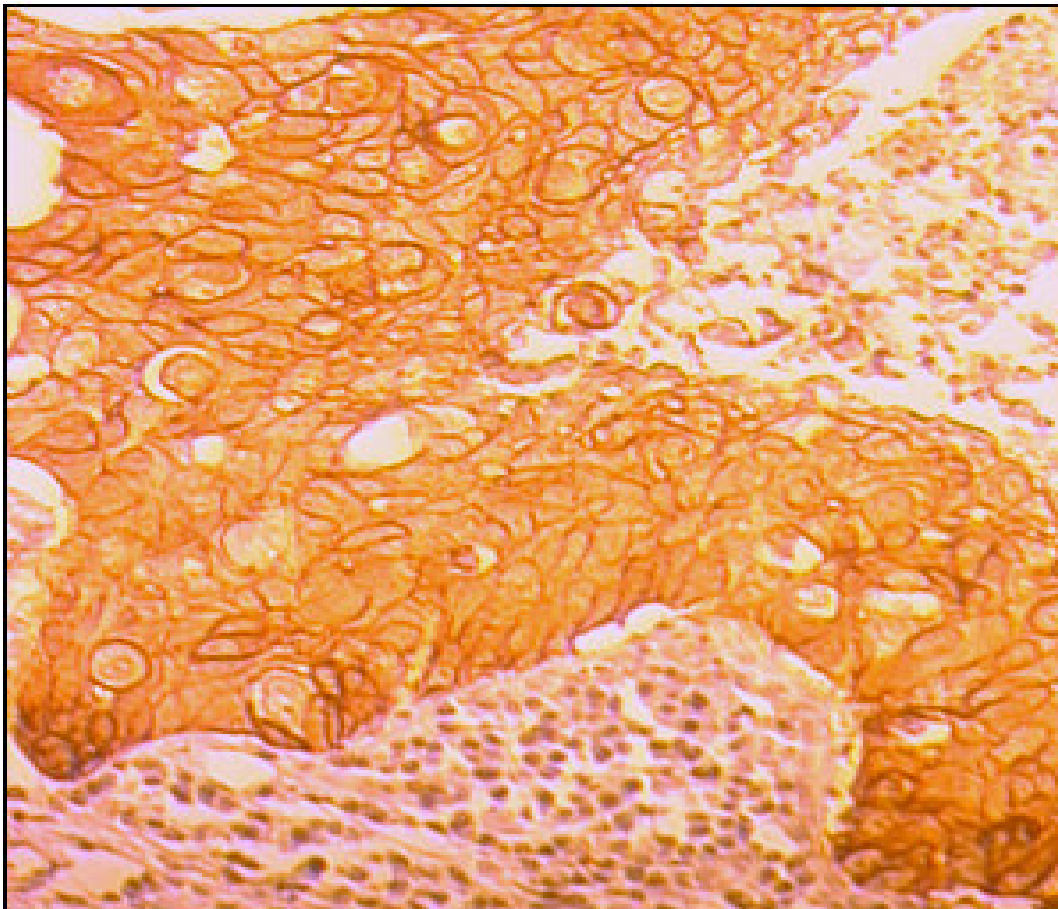
Estudio de la expresión de p95^{HER-2} en función de los niveles de expresión de p185^{HER-2} en muestras de cáncer de mama de alto riesgo empleando un anticuerpo específico. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que, en este grupo de pacientes, la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, se correlacionó con el nivel de expresión de la forma completa del mismo, p185^{HER-2}, al igual que ocurría en el estudio general. Como se puede observar, en este grupo de muestras la presencia de la forma truncada, p95^{HER-2}, solamente se presentó en los casos en los que se hallaba expresada la forma completa del receptor. Así, mientras que las muestras que mostraron bajos niveles de p185^{HER-2} presentaron expresión de p95^{HER-2} en el 42.9% de los casos, las muestras con moderada expresión del receptor completo lo hicieron con una frecuencia del 85.0% y, por último, todas las muestras que presentaron sobreexpresión de p185^{HER-2} expresaron, a su vez, p95^{HER-2}. Por tanto, la expresión de p95^{HER-2} se asoció de forma significativa con el nivel de expresión de p185^{HER-2} ($P = 0.000$).

8.2. Estudio del estado de activación de *HER-2* en cáncer de mama de alto riesgo

A continuación, procedimos a analizar el nivel de expresión de HER-2 fosforilado en nuestra serie de muestras de cáncer de mama de alto riesgo. Para ello, empleamos un anticuerpo específico que reconoce únicamente el receptor cuando presenta el residuo de tirosina 1248 fosforilado. En la siguiente Figura se muestra la tinción inmunohistoquímica de HER-2 fosforilado en una muestra de cáncer de mama de alto riesgo.

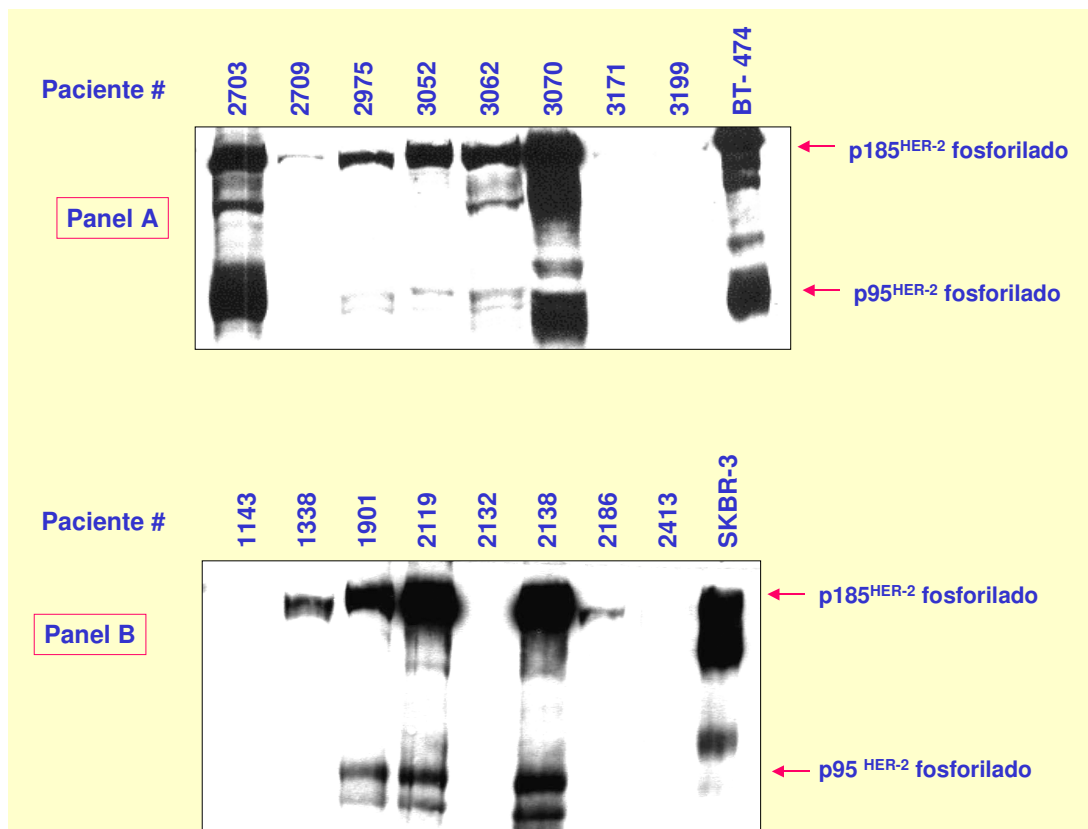
FIGURA 24. Análisis inmunohistoquímico de HER-2 fosforilado en cáncer de mama de alto riesgo



Tinción inmunohistoquímica del receptor HER-2 fosforilado con un anticuerpo específico en una muestra de cáncer de mama de alto riesgo. Como se puede observar en la Figura 24, correspondiente a un carcinoma ductal infiltrante de alto grado (grado III), la tinción inmunohistoquímica del receptor HER-2 fosforilado adoptó el característico patrón de membrana fuertemente marcado en las células tumorales.

Del mismo modo que analizamos la expresión basal de HER-2 y la relación entre la expresión de las formas completa y truncada del mismo, mediante técnicas de Western blot, procedimos al análisis del estado de fosforilación del receptor HER-2 en el panel de muestras de cáncer de mama de alto riesgo. En la siguiente Figura de Western blot podemos observar una muestra de las variaciones observadas en los niveles de fosforilación de las formas completa y truncada de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo.

FIGURA 25. Análisis de la expresión del receptor HER-2 fosforilado en muestras de cáncer de mama de alto riesgo



Análisis de la expresión de HER-2 fosforilado en cáncer de mama de alto riesgo mediante técnicas de Western blot empleando un anticuerpo específico. Se incluyeron muestras de las líneas celulares BT-474 y SK-BR3 como control de expresión.

Así, mientras algunas muestras expresaron las formas completa y truncada del receptor HER-2 fosforiladas (como por ejemplo las muestras número 1901, 2119 y 2138 pertenecientes al panel B), otro grupo de muestras presentaron únicamente la forma

completa, p185^{HER-2}, fosforilada (como son las muestras número 1338 y 2186 correspondientes al panel B y 2709 del panel A). En la siguiente Tabla se resumen la frecuencia de presentación de cada una de las formas, completa y truncada, del receptor HER-2 fosforiladas y sus correspondientes niveles de activación.

Tabla 43. Expresión de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} fosforilados en cáncer de mama de alto riesgo

| Niveles de expresión | % p185 ^{HER-2} fosforilado | % p95 ^{HER-2} fosforilado |
|----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Negativo | 20.6 | 52.4 |
| Bajo | 30.2 | 15.9 |
| Moderado | 25.4 | 15.9 |
| Sobreexpresión | 23.8 | 15.9 |

Análisis de los niveles de expresión de las formas completa y truncada fosforiladas en cáncer de mama de alto riesgo.

Posteriormente analizamos la relación existente entre la expresión de la forma truncada, p95^{HER-2} fosforilada, y los niveles de activación de p185^{HER-2} en las muestras de cáncer de mama de alto riesgo incluidas en nuestro estudio. Los resultados obtenidos en esta parte de nuestro análisis se reflejan en la siguiente Tabla.

Tabla 44. Relación entre la expresión de p95^{HER-2} fosforilado y el grado de activación de p185^{HER-2} en cáncer de mama de alto riesgo

| Niveles de activación de p185 ^{HER-2} | % p95 ^{HER-2} fosforilado |
|--|------------------------------------|
| Negativo (13) | 7.7 |
| Bajo (19) | 31.6 |
| Moderado (16) | 56.3 |
| Sobreexpresión (15) | 93.3 |

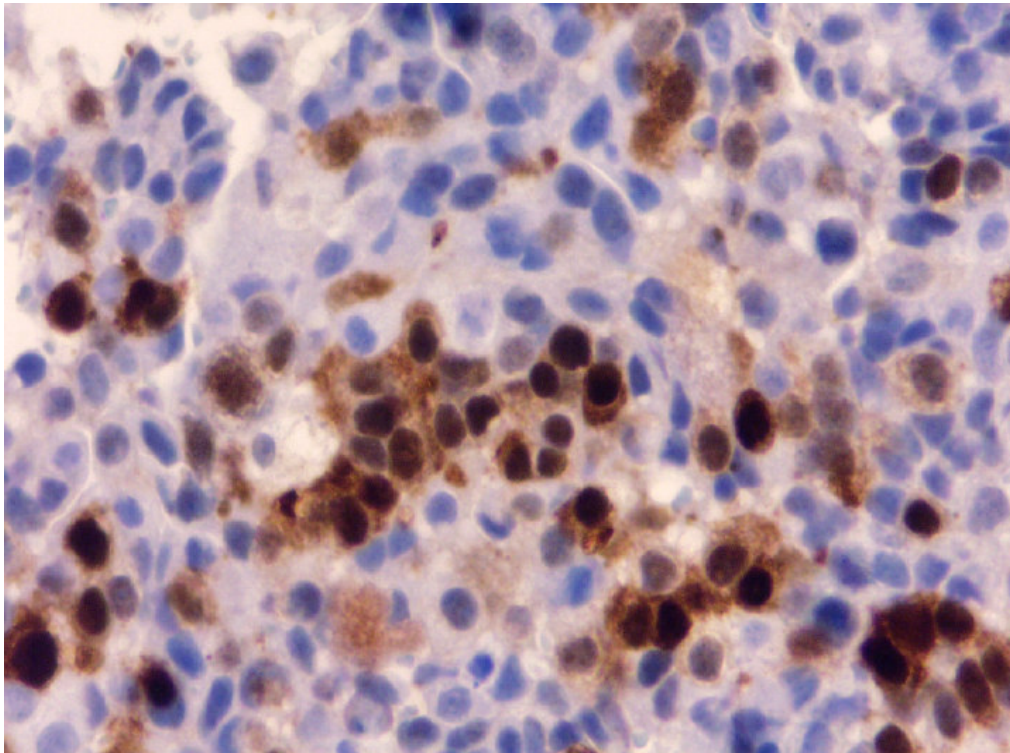
Estudio de la expresión de p95^{HER-2} fosforilado en las muestras de cáncer de mama de alto riesgo agrupadas en función de los niveles de activación de p185^{HER-2}. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

Los resultados obtenidos mostraron que en las muestras de pacientes de alto riesgo incluidas en nuestro estudio, la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2} fosforilada se correlacionó con los niveles de activación de p185^{HER-2}. Así, las muestras que no presentaron activación de p185^{HER-2} expresaron con menor frecuencia la forma truncada fosforilada (7.7%), mientras que las muestras con bajos o moderados niveles de activación de la forma completa presentaron p95^{HER-2} fosforilado con mayor frecuencia, (31.6%) y (56.3%) respectivamente. Las muestras que sobreexpresaron p185^{HER-2} fosforilado mostraron asimismo una frecuencia de expresión de p95^{HER-2} fosforilado significativamente mayor (93.3%). Por tanto, en las muestras de cáncer de mama de alto riesgo la expresión de p95^{HER-2} fosforilado se asoció de forma estadísticamente significativa con los niveles de activación de p185^{HER-2} ($P = 0.000$).

8.3. Estudio de la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama de alto riesgo

En la siguiente parte de nuestro estudio analizamos la posible participación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama de alto riesgo. Para ello, en primer lugar analizamos la expresión de MAPK fosforilada en las muestras de cáncer de mama de alto riesgo incluidas en nuestro estudio. Comenzamos estudiando la expresión y localización subcelular de esta quinasa mediante técnicas inmunohistoquímicas empleando un anticuerpo específico. Nuestros resultados demostraron que el nivel de expresión de MAPK fosforilada presentó importantes variaciones en función de la muestra de cáncer de mama analizada. En la siguiente Figura se observa un ejemplo característico.

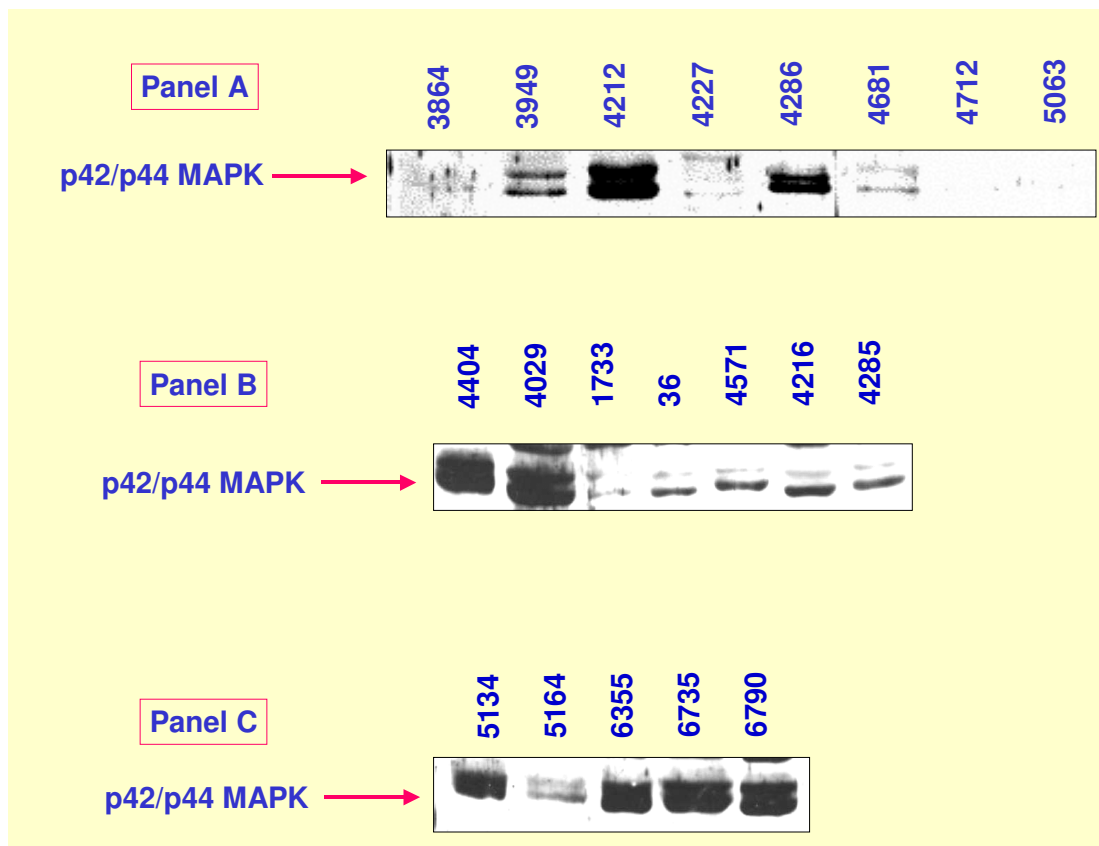
FIGURA 26. Estudio inmunohistoquímico de MAPK fosforilada en cáncer de mama de alto riesgo



Expresión de MAPK activada en una muestra de cáncer de mama de alto riesgo. En esta imagen, correspondiente a un carcinoma ductal de alto grado (grado III), se observa la tinción inmunohistoquímica de MAPK fosforilado en el citoplasma y en algunos núcleos de células malignas, después de la translocación de la proteína.

A continuación, y empleando técnicas de Western blot con un anticuerpo específico que reconocía únicamente las moléculas de MAPK fosforiladas en sus residuos de treonina 202 y tirosina 204, estudiamos la expresión de esta quinasa en las muestras de cáncer de mama de alto riesgo. Así, observamos que, de nuevo, los diferentes tumores de mama con estas características presentaron un patrón de expresión de MAPK fosforilada heterogéneo. En la siguiente Figura se presentan unos ejemplos representativos de estudios de Western blot correspondientes a MAPK fosforilada en cáncer de mama de alto riesgo.

FIGUTA 27. Estudio de Western blot del nivel de activación de MAPK en muestras de cáncer de mama de alto riesgo



Análisis de la expresión de MAPK fosforilado empleando un anticuerpo específico

En general, el 83.9% de las muestras presentaron activación de MAPK. Sin embargo, el análisis detallado de nuestros resultados demostró que las distintas muestras

presentaron diferentes niveles de activación de esta quinasa. Así, mientras algunas muestras no presentaron actividad MAPK (como por ejemplo las muestras n° 4712 y 5053 pertenecientes al panel A), algunos tumores presentaron una escasa actividad MAPK (como es el caso de las muestras n° 3864 del panel B, 4681 y 4227 del panel A), y, como puede observarse en la figura 27, otras muestras presentaron moderados niveles de expresión de MAPK fosforilada (como son las muestras n° 5164 del panel C y las muestras n° 4216 y 4285 del panel B). Por otra parte, algunas muestras tumorales presentaron unos elevados niveles de activación de MAPK (como por ejemplo las muestras n° 6355, 6735 y 6790 del panel C, 4004 del panel B y 4212 del panel A). En la siguiente Tabla se resumen los niveles de expresión de MAPK fosforilado en las muestras procedentes de pacientes de cáncer de mama con un alto grado de afectación ganglionar.

Tabla 45. Expresión de MAPK fosforilada en cáncer de mama de alto riesgo

| Niveles de expresión | % MAPK fosforilado |
|----------------------|--------------------|
| Negativo (10) | 16.1 |
| Bajo (24) | 38.7 |
| Moderado (21) | 33.9 |
| Sobreexpresión (7) | 11.3 |

Relación de los niveles de expresión de MAPK fosforilado en cáncer de mama de alto riesgo. El número de casos incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

De forma consecutiva estudiamos la relación entre la fosforilación de las formas completa y truncada del receptor HER-2 con la activación de MAPK en este grupo de pacientes. En este sentido, y como se resume en la siguiente tabla de resultados, se

estudio la expresión de p185^{HER-2} y p95^{HER-2} fosforilados en las muestras tumorales clasificadas en función de sus niveles de expresión de MAPK fosforilada.

Tabla 46. Relación entre la expresión de las formas completa y truncada de HER-2 fosforiladas en función de los niveles de activación de MAPK

| Activación de MAPK | % p185 ^{HER-2} fosforilado | % p95 ^{HER-2} fosforilado |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Negativo (10) | 20.0 | 10.0 |
| Bajo (23) | 87.0 | 39.1 |
| Moderado (21) | 95.2 | 61.9 |
| Sobreexpresión (7) | 100.0 | 85.7 |

Relación entre HER-2 fosforilado y MAPK activado en cáncer de mama de alto riesgo. El número de muestras incluido en cada subgrupo se indica entre paréntesis.

El análisis de los resultados obtenidos en esta parte de nuestro estudio mostró que la expresión de p185^{HER-2} fosforilado estuvo presente en el 20.0% de los casos en los que no se encontró activación de MAPK. Sin embargo, y tal como se observa en la Tabla, p185^{HER-2} fosforilado se presentó con mayor frecuencia en las muestras que presentaron unos mayores niveles de activación de MAPK. Así, las muestras con unos bajos niveles de expresión de MAPK fosforilada presentaron expresión de la forma completa de HER-2 fosforilado en el 87.0% de los casos, en cambio, las muestras con una moderada activación de MAPK expresaron p185^{HER-2} fosforilado en el 95.2% de las muestras. Por último, la totalidad de los tumores de mama que presentaron sobreexpresión de MAPK fosforilado expresaron asimismo la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, fosforilada. Por tanto, en el grupo de muestras pertenecientes a pacientes de cáncer de mama de alto riesgo analizadas en nuestro

estudio, la fosforilación de p185^{HER-2} se correlacionó con los niveles de activación de MAPK ($P = 0.000$).

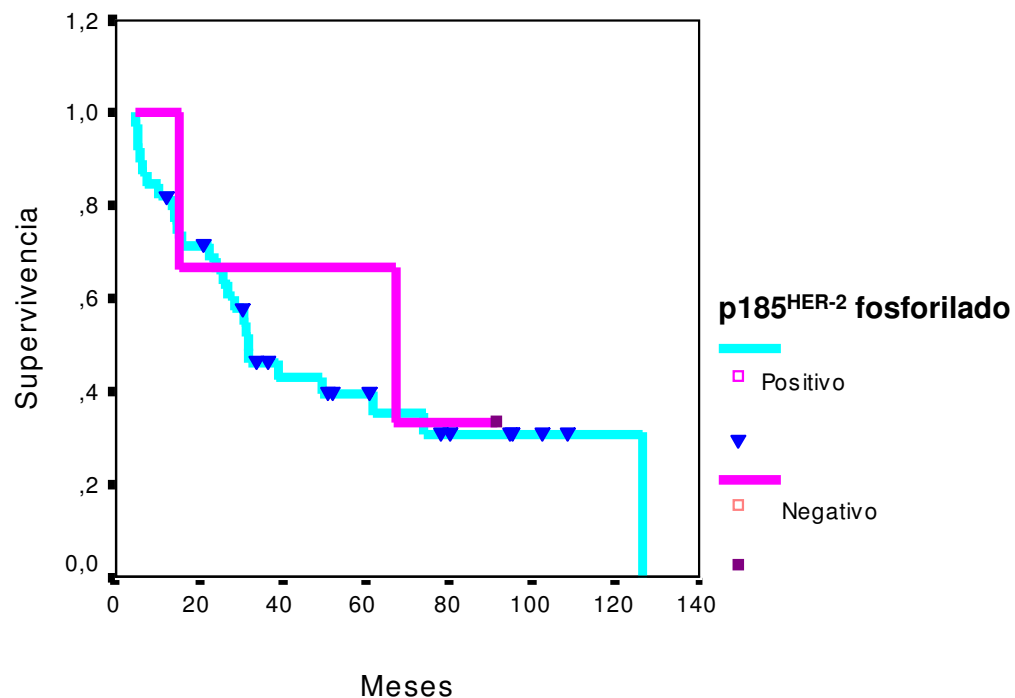
Los resultados referentes a la activación de p95^{HER-2} mostraron que esta forma del receptor HER-2 fosforilada se presentó con mayor frecuencia en las muestras que expresaron unos mayores niveles de MAPK fosforilada. En este sentido, el 39.1% de los tumores de mama con bajos niveles de MAPK fosforilada presentaron, asimismo, expresión de p95^{HER-2} activado. En las muestras con moderados y elevados niveles de MAPK activada, el 61.9% y el 85.7% de los casos, respectivamente, mostraron expresión de p95^{HER-2} fosforilado. Los resultados obtenidos mostraron que, en este grupo de pacientes caracterizadas por poseer un elevado número de ganglios afectados, la expresión de p95^{HER-2} fosforilado se correlacionó significativamente con el grado de activación de MAPK ($P = 0.007$).

Con posterioridad estudiamos la posible implicación de la relación existente entre la activación de HER-2 y MAPK con la supervivencia del grupo de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo. Con esta finalidad realizamos un análisis de Kaplan-Meier, análisis que permite conocer el valor de un determinado factor, clínico o biológico, en la evolución de las pacientes. Así, analizamos la participación de las formas completa y truncada de HER-2 fosforiladas en la evolución de las pacientes de alto riesgo cuyas muestras tumorales mostraron activación de MAPK. En las Figuras 28A y 28B se muestra, el análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia del grupo de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo en función de la presencia de HER-2 fosforilado en las muestras tumorales procedentes de este grupo de pacientes.

FIGURA 28A. Análisis de Kaplan-Meier de la SLE en función de los niveles de expresión de p185^{HER-2} fosforilado (positivo o negativo).

Pacientes de cáncer de mama de alto riesgo

Muestras con activación de MAPK

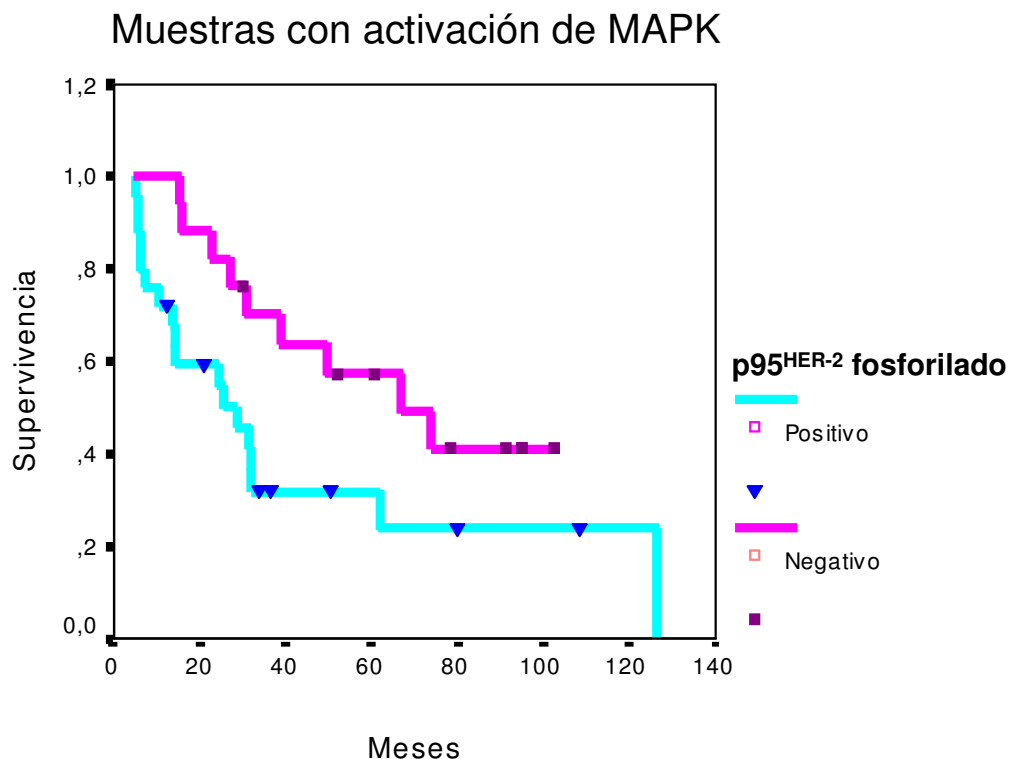


Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia de las pacientes de cáncer de mama de alto riesgo en función de la expresión de p185^{HER-2} fosforilado y la activación de MAPK.

Los resultados del análisis de Kaplan-Meier correspondiente a la forma completa de HER-2, p185^{HER-2}, fosforilada, mostraron que la curva de supervivencia de las pacientes de alto riesgo cuyas muestras expresaron MAPK y p185^{HER-2} fosforilados, no fue significativamente diferente de aquella de las pacientes cuyos tumores presentaron únicamente activación de MAPK sin fosforilación de p185^{HER-2} ($P > 0.1$).

FIGURA 28B. Análisis de Kaplan-Meier de la SLE en función de los niveles de expresión de p95^{HER-2} fosforilado (positivo o negativo).

Pacientes de cáncer de mama de alto riesgo



Análisis de Kaplan-Meier en función de la expresión de p95^{HER-2} fosforilado y la activación de MAPK.

Los resultados del análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes de cáncer de mama de alto riesgo en función de la expresión de la forma truncada de HER-2, p95^{HER-2}, fosforilado mostraron que la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes de alto riesgo cuyas muestras tumorales presentaron expresión de p95^{HER-2} fosforilado y MAPK activado fue significativamente menor que aquella de las pacientes cuyos tumores primarios de mama no presentaron activación de la forma truncada de HER-2 ($P < 0.05$). Así, la media de supervivencia del grupo de pacientes que presentaron p95^{HER-2} fosforilado y activación de MAPK fue de 47 meses, mientras que dicha supervivencia se estimó en 67

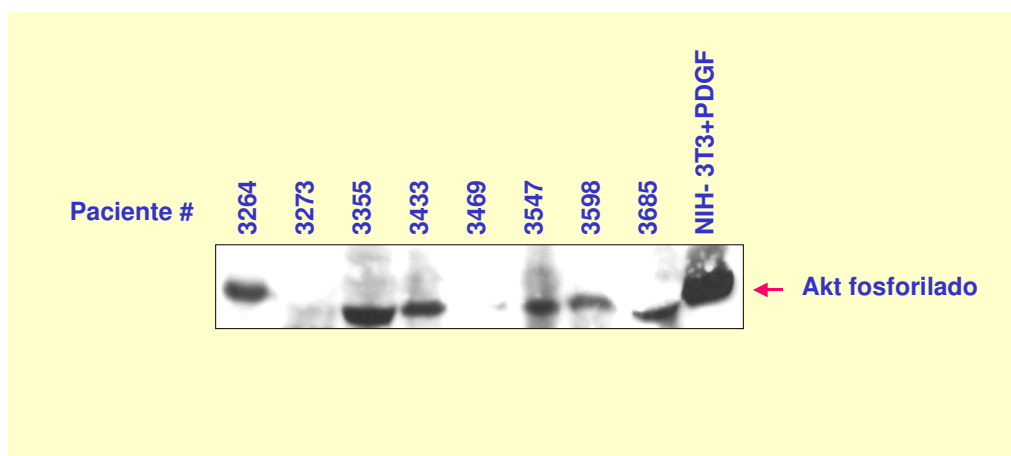
meses para aquellas pacientes que presentaron activación de MAPK sin presentar activación de p95^{HER-2} en sus tumores.

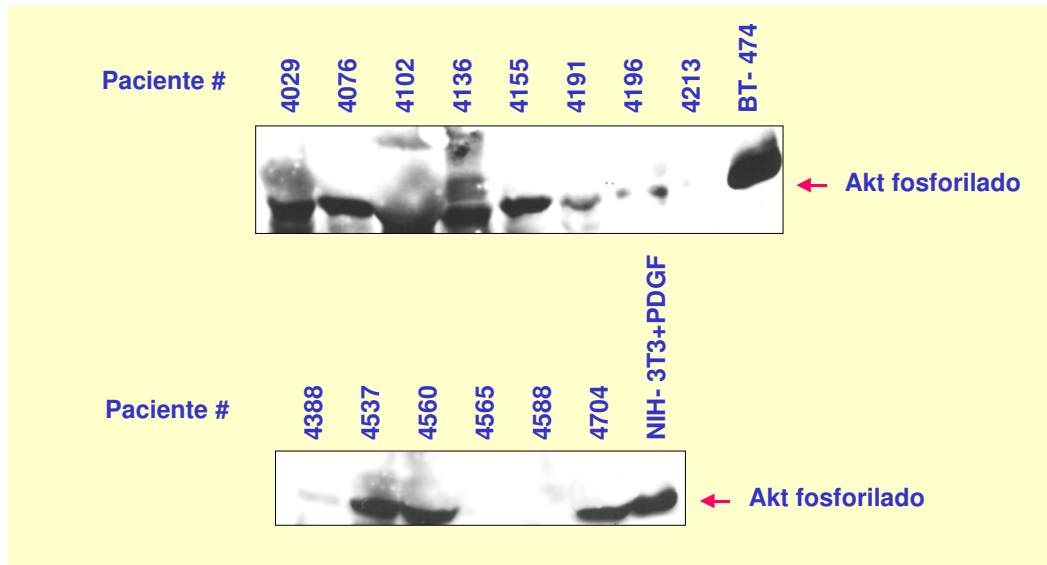
8.4. Estudio de la activación de la vía de señalización PI3-K/Akt en cáncer de mama de alto riesgo

De forma paralela al estudio de la relación entre la activación del receptor de membrana HER-2 y la activación de la vía de transducción de señal Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama de alto riesgo, analizamos la activación de la vía PI3-K/Akt en este grupo de pacientes.

Para ello, en primer lugar estudiamos los niveles de fosforilación de Akt en las pacientes incluidas en este estudio mediante técnicas de Western blot. El estudio de las muestras de cáncer de mama pertenecientes a pacientes de alto riesgo mostró que el nivel de expresión de Akt fosforilado se presentó de forma variable dependiendo de la muestra analizada. En general, observamos que el 83% de los tumores analizados presentaron diversos niveles de Akt activado. En la siguiente Figura se muestran unos ejemplos representativos obtenidos mediante técnicas de transferencia Western de los niveles de activación de Akt en este grupo de pacientes.

FIGURA 29. Análisis de Western blot de la activación de Akt en cáncer de mama de alto riesgo.





Niveles de activación de Akt en cáncer de mama de alto riesgo. Se incluyeron muestras de las líneas celulares NIH-3T3 tratada con PDGF y de BT-474 como controles de expresión.

En la siguiente Tabla quedan resumidos los datos obtenidos del análisis del estado de activación de Akt en cáncer de mama de alto riesgo.

Tabla 47. Estado de activación de Akt en las muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo

| Niveles de expresión | % Akt fosforilado |
|----------------------|-------------------|
| Negativo (9) | 17.0 |
| Bajo (9) | 17.0 |
| Moderado (22) | 41.5 |
| Sobreexpresión (13) | 24.5 |

Estudio de los niveles de expresión de Akt fosforilado empleando un anticuerpo específico en cáncer de mama de alto riesgo. El número de casos de cada subgrupo se incluye entre paréntesis.

De forma sucesiva analizamos la posible relación entre la fosforilación de las formas completa, p185^{HER-2} y truncada, p95^{HER-2}, del receptor HER-2 con el estado de activación de Akt en el grupo de muestras procedentes de pacientes de alto riesgo. En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos en este análisis.

Tabla 48. Relación entre la expresión de las formas completa y truncada de HER-2 fosforiladas con el estado de activación Akt

| Expresión Akt fosforilado | % p185^{HER-2} fosforilado | % p95^{HER-2} fosforilado |
|----------------------------------|---|--|
| Negativo (9) | 55.6 | 22.2 |
| Bajo (9) | 66.7 | 44.4 |
| Moderado (21) | 85.7 | 33.3 |
| Sobreexpresión (13) | 100.0 | 76.9 |

Las muestras de cáncer de mama de alto riesgo se clasificaron en función de los niveles de activación de Akt. El número de casos de cada subgrupo se incluye entre paréntesis.

Los resultados obtenidos al estudiar la relación entre la activación de p185^{HER-2} y el nivel de fosforilación de Akt mostraron que la activación de la forma completa del receptor fue más frecuente en el grupo de muestras que presentaron unos elevados niveles de activación de Akt. Así, en el 55.6% de las muestras en las que no se detectó activación de Akt se halló expresión de p185^{HER-2} fosforilado, mientras que el 66.7% de las muestras con bajos y el 85.7% con moderados niveles de expresión de Akt fosforilado mostraron activación de la forma completa del receptor HER-2. Por último, todas las muestras con sobreexpresión de Akt fosforilado expresaron asimismo activación de p185^{HER-2}. Por tanto, la expresión de p185^{HER-2} se relacionó con los

niveles de activación de Akt en el grupo de muestras de cáncer de mama de alto riesgo analizadas en este estudio ($P = 0.041$).

Al igual que ocurre con la forma completa del receptor HER-2, la forma truncada, p95^{HER-2} fosforilada se presentó con mayor frecuencia en las muestras con activación de Akt. En este sentido, se halló expresión de p95^{HER-2} fosforilado en el 44.4% de las muestras con bajos niveles de Akt fosforilado y en el 33.3% de los tumores primarios de mama con moderados niveles de activación de Akt. Sin embargo, la frecuencia de expresión de p95^{HER-2} fue significativamente mayor en el caso de las muestras de cáncer de mama que presentaron una mayor expresión de Akt activado (76.9%). En resumen, según los resultados obtenidos en el grupo de muestras de cáncer de mama de alto riesgo analizadas en nuestro estudio, la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2} fosforilada se correlacionó con los niveles de activación de Akt ($P = 0.038$).

8.5. Estudio comparativo de los niveles de activación de HER-2 en cáncer de mama de alto riesgo y cáncer de mama en pacientes sin afectación ganglionar

En primer lugar, y en un intento de estudiar la implicación de las formas completa y truncada de HER-2 en el desarrollo del cáncer de mama de alto grado, comparamos el grado de activación de ambas formas del receptor HER-2 en un grupo de muestras pertenecientes a pacientes carentes de ganglios metastatizados y en el grupo de muestras procedentes de pacientes con más de diez ganglios metastatizados, considerados de alto riesgo.

En este sentido, y como se resume en la siguiente Tabla, se analizó el estado de activación de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} en estos dos grupos de muestras procedentes de pacientes de cáncer de mama.

Tabla 49. Expresión de HER-2 en cáncer de mama sin afectación ganglionar y cáncer de mama de alto riesgo

| Grado de afectación ganglionar | %p185^{HER-2} fosforilado | % p95^{HER-2} fosforilado |
|---|--|--|
| Negativo (92) | 79.3 | 29.3 |
| Alto grado (63) | 76.5 | 47.6 |

Se analizó el estado de activación del receptor HER-2, empleando un anticuerpo específico, en muestras de cáncer de mama pertenecientes a pacientes sin afectación ganglionar y en pacientes de alto riesgo

Al estudiar los datos obtenidos en este análisis observamos que ambos grupos de pacientes presentaron distintos niveles de expresión de ambas formas de HER-2 fosforiladas. Cuando el análisis se llevo a cabo con mayor detalle, relacionando la activación de la forma completa y truncada del receptor con cada grupo de pacientes observamos que la expresión de p185^{HER-2} fosforilado se presentó con una frecuencia similar en ambos grupos de pacientes. Así, y tal como se puede observar en la tabla 49, en las muestras pertenecientes a pacientes carentes de afectación ganglionar la forma completa del receptor se presentó en el 79.3% de los casos, mientras que se detectó en el 76.5% de los tumores de mama correspondientes a pacientes con un elevado grado de afectación ganglionar ($P > 0.1$).

En el caso de la forma truncada, p95^{HER-2}, observamos que en ambos grupos de pacientes la activación de la misma resultó significativamente diferente. En este sentido, mientras el 29.3% de las muestras procedentes de pacientes en las que no se halló afectación ganglionar presentaron expresión de p95^{HER-2} fosforilado, el 47.6% de los tumores de mama aislados de pacientes con un alto grado de afectación ganglionar

expresaron la forma truncada de HER-2 activada. Por tanto, la tasa de expresión de p95^{HER-2} fosforilado fue 1.6 veces mayor en las pacientes con más de diez ganglios afectados si lo comparamos con las pacientes en las que no se detectaron ganglios metastatizados ($P = 0.02$).

E. Discusión

E. Discusión

El propósito general de nuestro estudio ha sido la caracterización de la expresión del receptor de membrana HER-2 en cáncer de mama, así como el análisis de dos formas truncadas del mismo, p95^{HER-2}, producida por el corte proteolítico mediado por una metaloproteasa de la forma completa de HER-2, y p100^{HER-2}, resultante de un mecanismo de procesamiento alternativo del RNA mensajero codificante para HER-2. Asimismo, hemos caracterizado las vías de transducción de señal originadas por la activación de HER-2 en cáncer de mama, fundamentalmente las vías Ras-Raf-MAPK y PI3-K/Akt, y su asociación con eventos clínico-patológicos.

1. Caracterización de la expresión de HER-2 en tumores primarios de mama

La caracterización de los niveles de expresión del receptor HER-2 en tumores primarios de mama es el resultado de la estrecha colaboración establecida entre tres centros hospitalarios: el Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, del Laboratorio de Investigaciones Oncológicas del Servicio de Oncología Médica perteneciente al Hospital Vall d' Hebron de Barcelona y del Departamento de Fisiología y Farmacología del Oregon Health Sciences University Hospital (Portland, OR, EE UU).

En la primera parte de nuestro estudio caracterizamos la expresión de la forma completa, p185^{HER-2}, y de una forma truncada en el dominio N-terminal del receptor HER-2, denominada p95^{HER-2} en base a su peso molecular, en un total de 337 tumores primarios de mama, así como en 81 metástasis ganglionares.

Dichas muestras fueron obtenidas siguiendo los procedimientos institucionales de los respectivos centros y previo consentimiento informado de las pacientes. Asimismo, y para preservar la integridad de los tumores y asegurar la correcta

conservación del material biológico, tras su extracción durante el acto quirúrgico una fracción de las muestras de tejido fue congelada inmediatamente en nitrógeno líquido y las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Como se detalla en la sección de Resultados de esta Memoria, el análisis de las muestras tumorales mostró diferentes patrones de expresión para la forma completa, $p185^{\text{HER-2}}$, y truncada, $p95^{\text{HER-2}}$, del receptor HER-2. Una importante conclusión de nuestro estudio es que la significación de $p95^{\text{HER-2}}$ y $p185^{\text{HER-2}}$, respecto a las metástasis del cáncer de mama en los ganglios linfáticos es diferente. Así, mientras la expresión de $p95^{\text{HER-2}}$ fue significativamente más frecuente en el tejido procedente de los ganglios linfáticos y su presencia en el tumor primario se correlacionó con el número de ganglios metastatizados, la sobreexpresión de $p185^{\text{HER-2}}$ se presentó con la misma frecuencia en el tumor primario *versus* tejido metastatizado, así como en pacientes con ganglios negativos *versus* pacientes que presentaron afectación ganglionar.

Asimismo, nuestros datos mostraron que mientras la mayoría de las muestras de cáncer de mama analizadas en nuestro estudio (98%) que presentaron expresión de $p95^{\text{HER-2}}$ mostraron también niveles apreciables de $p185^{\text{HER-2}}$, sin embargo, algunos tumores expresaron $p185^{\text{HER-2}}$ pero no $p95^{\text{HER-2}}$, lo que sugiere que el nivel del receptor truncado se halla regulado. Por otra parte, un reducido porcentaje de las muestras analizadas expresaron exclusivamente la forma truncada del receptor HER-2, $p95^{\text{HER-2}}$, y no la forma completa.

Estudios previos han demostrado que $p95^{\text{HER-2}}$ es generado por un mecanismo de corte proteolítico del dominio extracelular del receptor HER-2 en células de cáncer de mama en cultivo (Christianson et al., 1998; Molina et al., 2001). Este corte origina un fragmento de 95 kDa que permanece unido a membrana. Un proceso similar podría ser responsable de la generación de $p95^{\text{HER-2}}$ en el tejido mamario tumoral, puesto que el fragmento extracelular resultante del corte proteolítico ha sido detectado también en el

suero de las pacientes con cáncer de mama que presentaron expresión de HER-2 (Leitzel et al., 1995; Yamauchi et al., 1996; Harris et al., 1996; Colomer et al., 2000).

Cabría, sin embargo, la posibilidad de que tanto $p95^{\text{HER-2}}$ como la fracción extracelular, aislada en el suero de pacientes con cáncer de mama, fuesen el producto de transcritos alternativos de HER-2 (Scott et al., 1993). A este respecto, algunas evidencias adicionales sostienen la hipótesis de que $p95^{\text{HER-2}}$ en los tumores es generado mediante un mecanismo de corte proteolítico de la forma completa del receptor HER-2.

Así, en primer lugar, la forma truncada de HER-2, $p95^{\text{HER-2}}$, migra en paralelo y presenta exactamente el mismo tamaño, al someterlos a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, respecto a la forma $p95^{\text{HER-2}}$ generada por corte proteolítico en líneas celulares de cáncer de mama en cultivo. En segundo lugar, en la actualidad no se ha encontrado el transcrito alternativo de HER-2 cuya traducción origine un producto de características semejantes a $p95^{\text{HER-2}}$.

En la actualidad no se ha logrado identificar la proteasa responsable del corte proteolítico de HER-2 observado en células de carcinoma de mama, pero se piensa que, probablemente, se trate de una metaloproteasa (Christianson et al., 1998; Codony-Servat et al., 1999; Molina et al., 2001). Concretamente, se ha especulado que podría tratarse de un miembro de la familia de las desintegrinas y metaloproteasas que han demostrado participar en el corte proteolítico del dominio extracelular de diversas proteínas (Blobel et al., 1998). Obviamente, es importante la identificación de esta proteasa para comprender el papel que podría desempeñar en la regulación del corte proteolítico de HER-2 y la consiguiente generación del fragmento $p95^{\text{HER-2}}$.

A nivel metodológico, la mayor parte de nuestro estudio se realizó empleando técnicas de Western blot. Éste es el único método que permite discriminar entre las dos formas de la proteína HER-2, ya que el análisis inmunohistoquímico, comúnmente utilizado para la detección de la proteína HER-2 con fines clínicos, no es capaz de discernir la presencia de $p95^{\text{HER-2}}$.

Por otra parte, en la técnica de Western blot, al contrario de lo que ocurre en la inmunohistoquímica, se lisa y analiza un bloque de tejido y, por tanto, es incapaz de discriminar cuales son las células específicas del tejido tumoral que expresan la proteína HER-2. Puesto que p185^{HER-2} y p95^{HER-2} se detectan específicamente en las células epiteliales del carcinoma (Molina et al., 2001) aquellas muestras de tejido que presenten una alta contaminación con estroma tenderían a mostrar bajos niveles de ambas formas de la proteína HER-2. Sin embargo, cuando en el curso de nuestro estudio analizamos una amplia serie de tumores de mama mediante técnicas inmunohistoquímicas, los resultados coincidieron con los obtenidos mediante transferencia Western, lo que sugiere que los falsos negativos no suponen una proporción significativa en el conjunto del estudio.

Tal y como se describe en el apartado de Resultados de la presente Memoria, durante el desarrollo de nuestro estudio detectamos sobreexpresión de p185^{HER-2} en el 22.3% de las muestras analizadas, resultados que se encuentran en el rango de entre un 20% y un 30% obtenidos en estudios anteriores realizados por otros grupos empleando diversos métodos de detección de HER-2, tales como FISH e inmunohistoquímica (Henderson et al., 1998; Fitzgibbons et al., 2000).

Asimismo, el análisis de las metástasis ganglionares linfáticas que se realizó de forma paralela al estudio de los tumores primarios, reveló una sobreexpresión de la forma completa del receptor HER-2 a un nivel similar, concretamente de 23.5%, al del tumor primario. Este dato concuerda con un estudio reciente que evaluó la presencia de p185^{HER-2} en tumores primarios y tejido metastático de 196 muestras de cáncer de mama (Simon et al., 2001). El estado del receptor en los tumores primarios se mantenía en la mayoría de sus metástasis. En base a estos datos una conclusión de este estudio fue que la pérdida de expresión de p185^{HER-2} en el tejido metastático probablemente no fue responsable del fallo en la respuesta a la terapia con trastuzumab en una significativa fracción de las pacientes que presentaron sobreexpresión de HER-2 (Simon et al., 2001).

Nuestros datos demostraron que, en contraste con la forma completa del receptor, p95^{HER-2} se expresó con mayor frecuencia en el tejido metastático ganglionar (45.7%) que en tumores primarios de mama (26.7%). Si el fragmento truncado p95^{HER-2} interviene en la producción de metástasis, como nuestro estudio sugiere, su presencia podría servir para la identificación de pacientes que probablemente no responderán a Herceptin. A este respecto, pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa podrían ser efectivas en el tratamiento de cánceres de mama que presentan expresión de p95^{HER-2}.

En general, en cáncer de mama los factores con valor pronóstico tradicionalmente considerados para estimar la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de las pacientes son la presencia de metástasis ganglionares y el tamaño tumoral (Harris et al., 1992). Concretamente, el grado de afectación ganglionar es el factor más importante a la hora de decidir el tratamiento a aplicar de forma individualizada a cada paciente (Henderson et al., 1998).

De acuerdo con nuestros resultados ni la expresión moderada ni la sobreexpresión de p185^{HER-2} en el tumor primario se correlacionaron significativamente con la presencia de metástasis en ganglios linfáticos. Los numerosos estudios destinados a analizar la existencia de una posible asociación entre la sobreexpresión de HER-2 con el estado de afectación ganglionar han ofrecido resultados conflictivos.

Así, la mayoría de los estudios recientes, en los que en ocasiones se incluyeron más de 800 pacientes (Torregrosa et al., 1997; Barth et al., 1997; Thor et al., 2000), no han encontrado una asociación significativa entre la sobreexpresión de p185^{HER-2}, estudiada mediante técnicas inmunohistoquímicas (Mittra et al., 1995; Beckmann et al., 1996; Barth et al., 1997; Thor et al., 2000) o la amplificación del gen *HER-2/neu* (Scorilas et al., 1995; Torregrosa et al., 1997), con la afectación ganglionar. Sólo unos pocos autores han señalado la existencia de una correlación significativa entre estos dos parámetros (Tetu et al., 1994; Depowski et al., 1999).

En este sentido, nuestros resultados que demuestran que únicamente la forma truncada de HER-2, p95^{HER-2}, se asoció con el grado de afectación ganglionar podrían ayudar a clarificar por qué estudios previos, en los que no se discernió la presencia de p95^{HER-2} en el tumor, no fueron capaces de establecer una correlación consistente entre la expresión de HER-2 y el desarrollo de metástasis ganglionares.

Una posible explicación que justificase la asociación entre la forma truncada p95^{HER-2}, pero no p185^{HER-2}, con el desarrollo de metástasis ganglionares es que el fragmento truncado de HER-2 poseería una mayor potencia biológica. En este sentido, en ensayos “*in vitro*” se ha observado que la delección del dominio extracelular del receptor HER-2 se traduce en un incremento de la actividad tirosina quinasa de la resultante proteína HER-2 truncada y de su eficiencia de transformación (DiFiore et al., 1987; Segatto et al., 1988). Por otra parte, p95^{HER-2}, generada como hemos mencionado anteriormente por un mecanismo de corte proteolítico en líneas celulares de cáncer de mama, está fosforilada en los residuos de tirosina pertenecientes a su dominio catalítico y tiene actividad quinasa (Christianson et al., 1998; Molina et al., 2001), propiedades ambas que la capacitan para la transmisión de la señal mitógena.

Basándonos en nuestros hallazgos, proponemos que la sobreexpresión de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, podría promover los eventos iniciales de la proliferación anormal en el tumor primario pero, en ausencia de p95^{HER-2}, estos tumores presentan menos tendencia a metastatizar. Una explicación alternativa, poco probable basándonos en las propiedades bioquímicas previamente expuestas referentes a p95^{HER-2}, es considerar que p95^{HER-2} podría ser un marcador de los tumores que expresan una proteasa específica con un importante papel en el desarrollo de metástasis ganglionares.

Según nuestros resultados, en el grupo de pacientes que sobreexpresan HER-2 la expresión de p95^{HER-2} en el tumor primario de mama representa un incremento de hasta 2.9 veces en el riesgo de desarrollar metástasis ganglionares, el principal factor

pronóstico de mala evolución en cáncer de mama. Por tanto, p95^{HER-2}, cuya expresión también se ha detectado en pacientes sin metástasis ganglionares, podría ser importante en la predicción de la evolución de la enfermedad de las mismas. Por este motivo, los estudios de seguimiento de este grupo de pacientes deberían considerar la importancia de p95^{HER-2} para la identificación de aquellas que, sin embargo, poseen una elevada probabilidad de recurrencia.

2. Estudio del valor pronóstico de p95^{HER-2} en cáncer de mama

Según datos recientes, en torno al 60% de los nuevos casos de cáncer de mama diagnosticados anualmente en Estados Unidos no presentan metástasis ganglionares (O'Malley et al., 1996). Aproximadamente el 30% de estas pacientes recaerán durante los diez años siguientes a la intervención quirúrgica y, por tanto, podrían beneficiarse de la administración de una terapia sistémica adyuvante (Harbeck et al., 1999; Mirza et al., 2002). Sin embargo, la administración de este tratamiento adyuvante a todas las pacientes de cáncer de mama que no presenten afectación de los ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico, expondría a un amplio número de éstas a efectos tóxicos secundarios.

Las notables mejoras efectuadas durante los últimos años en el diagnóstico del cáncer de mama han permitido la detección de pequeñas lesiones mediante técnicas mamográficas antes de que la paciente presente afectación de los ganglios linfáticos axilares o que ésta sea mínima. Por este motivo, recientemente existe un interés creciente en la identificación de nuevos factores pronósticos y marcadores tumorales que contribuyan a la correcta clasificación de la enfermedad y, con ello, sirvan de guía para la administración del tratamiento óptimo (Mirza et al., 2002). En este sentido, se requiere especialmente la búsqueda de nuevos marcadores pronósticos capaces de identificar el grupo de pacientes que presentan pocas probabilidades de recaída y que,

por lo tanto, no se beneficiarían de la administración de terapia adyuvante (Sáez et al., 2003).

Pese a que numerosos estudios han analizados diversos factores pronósticos en pacientes de cáncer de mama, un reducido número de los mismos se ha centrado en el análisis del cáncer de mama con ganglios negativos y la interpretación de éstos se ha visto limitada por el bajo número de muestras y cortos períodos de seguimiento (Ross et al., 1998; Mirza et al., 2002).

Los factores pronósticos empleados en la actualidad, como son el tipo histológico y los factores clínicos, no son lo suficientemente sensibles como para identificar este subgrupo de pacientes. En estos momentos no existe ningún marcador pronóstico de carácter independiente que pueda emplearse para el seguimiento en el caso del cáncer de mama con ganglios negativos. De este punto se deduce el interés en la identificación de nuevos marcadores con valor pronóstico que permitan diferenciar aquellas pacientes que no presenten afectación ganglionar pero que tengan un mayor riesgo de recaída.

Aunque está ampliamente aceptado que la amplificación de *HER-2/neu* y/o la sobreexpresión de la proteína HER-2 en células tumorales está asociada con una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) en pacientes con ganglios positivos, su valor pronóstico en el grupo de pacientes con ganglios negativos es aún controvertido (Henderson et al., 1998). En este grupo de pacientes algunos estudios no han encontrado asociación entre la amplificación de HER-2 y/o su sobreexpresión con la SLE o la SG (Tandon et al., 1989; Harbeck et al., 1999; Reed et al., 2000; Thor et al., 2000), mientras que en otros estudios la correlación pudo establecerse con la SLE (Paterson et al., 1991; Harris et al., 1992; Andrulis et al., 1998), o con la SLE y la SG (O'Malley et al., 1996; Press et al., 1997; Depowski et al., 1999).

En algunos de estos estudios la significación quedó restringida a grupos de pacientes con ganglios linfáticos negativos (Paik et al., 1990; Allred et al., 1992),

proporcionando pruebas adicionales acerca del limitado valor pronóstico de HER-2. Estas discrepancias han sido atribuidas al uso de diferentes metodologías (Fitzgibbons et al., 2000) o bien debido a un insuficiente poder estadístico (Press et al., 1997; Henderson et al., 1998).

En estudios amplios, llevados a cabo durante extensos periodos de seguimiento, el tamaño tumoral, el grado del tumor, los niveles de catepsina D y de Ki-67, la fracción celular en fase S, el índice mitótico y la invasión vascular mostraron una asociación significativa con la supervivencia de las pacientes que se hallan en estadios tempranos de cáncer de mama y que carecen de afectación ganglionar (Mack et al., 1997; Moreno et al., 1997). Sin embargo, las dificultades técnicas y las variaciones en las determinaciones de estos factores limitan su utilidad. Además, los indicadores pronósticos más comúnmente utilizados, tales como la histología tumoral y los factores clínicos, no son lo suficientemente sensibles como para permitir la identificación del grupo de pacientes de cáncer de mama que pese a no presentar afectación de los ganglios linfáticos son susceptibles, sin embargo, de sufrir un alto riesgo de recaída. Por último, otra importante limitación en el estudio del grupo de pacientes de cáncer de mama sin afectación ganglionar es la carencia de factores pronósticos que lo caractericen.

En esta parte de nuestro estudio analizamos el valor pronóstico de dos formas del receptor de membrana HER2, la forma completa, p185^{HER-2} y una forma truncada, p95^{HER-2}, haciendo un especial énfasis en el grupo de pacientes con bajo número de ganglios metastatizados. La metodología de análisis empleada, la transferencia Western, difiere de los estudios llevados a cabo previamente que, en general, se basaron en el análisis de la amplificación del gen *HER-2/neu* mediante análisis FISH, o mediante el análisis de la expresión de la proteína empleando técnicas inmunohistoquímicas y que son el tipo de determinaciones que tradicionalmente se han empleado para la caracterización de HER2 (Xing et al., 1996; Allred et al., 1998).

Habitualmente la detección de HER-2 no se lleva a cabo mediante técnicas de Western blot, puesto que la realización de esta tecnología de forma rutinaria resulta poco práctica a nivel hospitalario. Pese a ello, en la actualidad es el único método disponible capaz de discriminar entre la molécula del receptor completa, p185^{HER-2}, y la forma truncada en el dominio N-terminal, p95^{HER-2} (Molina et al., 2001, 2002)

Como hemos señalado anteriormente, basándonos en nuestros resultados hemos establecido que la implicación de p95^{HER-2} y p185^{HER-2}, en relación al desarrollo de metástasis ganglionares en cáncer de mama, es diferente. De esta manera, hemos determinado que la expresión de p95^{HER-2} fue significativamente más frecuente en el tejido de los ganglios linfáticos metastásicos que en el propio tumor primario y que la expresión de la forma truncada en el tumor primario se correlacionó con el grado de afectación ganglionar (Molina et al., 2002). Por el contrario, la sobreexpresión de p185^{HER-2} se presentó con una frecuencia similar en el tumor primario en comparación con el tejido metastatizado y no mostró correlación con el grado de afectación ganglionar, puesto que se presentó con una frecuencia similar en el grupo de pacientes en las que no se detectó afectación ganglionar en comparación con el grupo de pacientes que presentaron ganglios metastatizados.

Basándonos en estos resultados, en esta parte de nuestro estudio hemos analizado la asociación entre la expresión de p95^{HER-2} en cáncer de mama con la evolución de las pacientes, y hemos investigado su significación, en particular, en el grupo de pacientes con bajo número de ganglios linfáticos metastatizados, grupo éste en el que la evolución de la enfermedad resulta más difícil de predecir. Además de estudiar la expresión de la forma completa y truncada del receptor HER-2, analizamos otros factores de interés a la hora de establecer el pronóstico en cáncer de mama, entre los cuales se incluyeron la edad, el número de ganglios afectados, el estadio de la enfermedad, el estado hormonal y el tamaño tumoral, empleando para ello un modelo de regresión de Cox. Este método permite incluir en el mismo análisis múltiples variables predictoras (covariables) y proporciona las estimaciones de los coeficientes para cada

una de las de ellas, permitiendo evaluar el impacto de múltiples covariables en el mismo modelo.

Nuestros resultados demostraron que el elevado nivel de expresión de p95^{HER-2}, determinado mediante técnicas de Western blot efectuadas en lisados tumorales, es un importante indicador de evolución adversa en las pacientes de cáncer de mama. De esta forma, el análisis retrospectivo llevado a cabo en 435 pacientes de cáncer de mama con una mediana de seguimiento de 44 meses, demostró que p95^{HER-2} es un factor pronóstico de recaída y muerte, estadísticamente independiente, en los grupos de pacientes que no presentan afectación ganglionar y en aquellas con bajo número de ganglios metastatizados (de uno a tres) ($P = 0.007$) (Sáez et al., 2003).

Así, el análisis multivariado de los resultados obtenidos tras la caracterización de las muestras incluidas en nuestro estudio, mostró que el riesgo de recaída o muerte debido al cáncer de mama en el grupo de pacientes que presentaron unos significativos niveles de expresión de p95^{HER-2}, fue mayor que el riesgo asociado a la mayoría de los restantes marcadores biológicos examinados. Este método estadístico permite investigar las interacciones entre los diferentes factores y también los efectos individuales de los mismos. Además, permite predecir los efectos de las variables y las interacciones entre ellas, determinando las variables independientes (predictoras).

Asimismo, la sobreexpresión de p95^{HER-2} se asoció significativamente con una menor supervivencia libre de enfermedad ($P = 0.003$). En este sentido, el 64% de las pacientes cuyas muestras de cáncer de mama presentaron bajos niveles de expresión de p95^{HER-2} permanecieron libres de enfermedad durante el periodo de los cinco años siguientes al diagnóstico y consiguiente aplicación del tratamiento médico-quirúrgico, mientras que únicamente el 37% de aquellas pacientes que mostraron elevados niveles de expresión de la forma truncada de HER-2 no sufrieron recaída durante este mismo periodo. Nuestros datos nos permitieron concluir que la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes con cero a tres ganglios metastatizados fue de 39 meses en

el caso de presentar sobreexpresión de p95^{HER-2}, mientras que se extendió a 139 meses en el caso de que sus muestras tumorales presentasen unos bajos o inapreciables niveles de expresión de la forma truncada del receptor, p95^{HER-2}.

La asociación entre la sobreexpresión de p95^{HER-2} y una menor supervivencia libre de enfermedad podría estar relacionada con sus propiedades biológicas, tales como son la mayor actividad señalizadora celular así como un mayor potencial oncogénico (Molina et al., 2002), tal y como hemos señalado con anterioridad.

Asimismo, la expresión de p95^{HER-2} en tumores primarios de mama se correlacionó de forma significativa con otros marcadores pronósticos, tales como son el grado de afectación ganglionar y los niveles de expresión de los receptores hormonales (niveles de los receptores de estrógenos y de progesterona). Por su parte, nuestros datos indicaron que la sobreexpresión de p185^{HER-2} se asoció significativamente con bajos niveles de receptores de progesterona en los tumores de mama.

En nuestras condiciones experimentales, no se pudo establecer una correlación significativa entre ninguna de las formas del receptor HER-2 con otros factores pronósticos tradicionalmente considerados de interés en cáncer de mama, como son el estadio de la enfermedad, el tamaño tumoral, la edad de las pacientes y el tipo histológico de los tumores. La ausencia de correlación entre la expresión de p95^{HER-2} y el tamaño tumoral podría explicar el hecho de la falta de asociación con el estadio de la enfermedad, puesto que este último parámetro está basado tanto en el tamaño del tumor como en la presencia de afectación ganglionar (Sáez et al., 2003). En algunos estudios previos tampoco se encontró asociación entre la sobreexpresión de HER-2 y el estadio de la enfermedad o el tamaño tumoral (Tandon et al., 1989; Paterson et al., 1991; Singleton et al., 1992; Tetu et al., 1994; Scorilas et al., 1995; Press et al., 1997), mientras que únicamente unos pocos autores han demostrado la existencia de una correlación significativa entre estos parámetros (Beckmann et al., 1996; Thor et al., 2000).

Es interesante señalar que en los casos en los que el estudio se centró en el análisis de muestras pertenecientes a pacientes carentes de afectación ganglionar no se encontró correlación entre la expresión de p185^{HER-2} y el tamaño del tumor (Paterson et al., 1991; Press et al., 1997; Andrulis et al., 1998). Asimismo, también se han obtenido resultados discordantes en los diversos estudios que se han centrado en el análisis de la asociación entre la sobreexpresión de HER-2 y el estadio de la enfermedad (Scorilas et al., 1995; Depowski et al., 1999; Agrup et al., 2000), o con bajos niveles de expresión de los receptores de estrógenos (RE) o de progesterona (RP) (Tandon et al., 1989; Scorilas et al., 1995; Beckmann et al., 1996; Carlomagno et al., 1996; Torregrosa et al., 1997; Press et al., 1997;). Por último, en el escaso número de estudios en los que se analizó el tipo histológico del tumor no se halló relación alguna con la sobreexpresión de HER-2 (Torregrosa et al., 1997; Andrulis et al., 1998).

En contraste a lo que sucedía con p95^{HER-2}, la forma completa del receptor HER2, p185^{HER-2}, no demostró tener un valor pronóstico significativo ni en el grupo de pacientes con un bajo número de ganglios afectados ni en la población general. Por otra parte, nuestros resultados demuestran que la edad de las pacientes, el grado de afectación ganglionar y los niveles de receptores de estrógenos son también factores pronósticos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de carácter independiente, resultados que concuerdan con los de otros grupos (Keyomarsi et al., 2002).

Aunque nuestro estudio es el primero en evaluar el valor pronóstico de p95^{HER-2}, la asociación entre la sobreexpresión de p185^{HER-2} y el pronóstico en cáncer de mama ha sido ampliamente estudiado (Henderson et al., 1998; Ross et al., 1998; Mirza et al., 2002).

Los estudios que han descrito la existencia de una correlación significativa entre los niveles de expresión de p185^{HER-2} y la evolución de la enfermedad en la población general, encontraron una asociación más consistente en el grupo de pacientes que

presentaron metastatización ganglionar en comparación con aquellas pacientes sin afectación ganglionar.

Gran parte de los estudios en los que se analizó la amplificación del gen *HER-2/neu* mediante técnicas de FISH, o en los que se detectó la proteína HER-2 empleando técnicas de ELISA, encontraron una asociación entre estos parámetros y la evolución de la enfermedad. Por su parte, los estudios basados en la detección inmunohistoquímica de la proteína HER-2 en muestras de tejido tumoral fijado han conducido a resultados contradictorios (Ross et al., 1998).

En nuestro caso, no observamos una correlación significativa entre la sobreexpresión de p185^{HER-2} y el pronóstico en nuestra población de pacientes. Varios factores podrían explicar este hallazgo. En primer lugar, en nuestros grupos de pacientes hubo una alta proporción de las mismas con ganglios negativos, grupo en el que p185^{HER-2} tiene menor significado pronóstico.

En segundo término, el tiempo medio de seguimiento de las pacientes fue de 4.2 años, un periodo de tiempo relativamente corto para una enfermedad que puede presentar recaídas tardías. Cuando limitamos el estudio al subgrupo de pacientes con un seguimiento de 10 años, la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes cuyas muestras tumorales presentaron elevados niveles de expresión de p185^{HER-2} fue del 25%, en comparación con el 54% del grupo de pacientes con bajos niveles de p185^{HER-2}. Pese a que las diferencias no fueron suficientes como para alcanzar significación estadística, esta tendencia sugiere que la sobreexpresión de p185^{HER-2} es más importante en las pacientes que recaen más tardíamente (Mirza et al., 2002; Sáez et al., 2003).

En resumen, nuestros resultados demuestran que la expresión de p95^{HER-2} define un grupo de cánceres de mama con un mayor potencial metastático o de crecimiento y, en consecuencia, una evolución significativamente peor. Este hallazgo indica que la forma truncada de HER-2 podría ser un factor pronóstico de utilidad en los cánceres de

mama que presentan un bajo número de ganglios afectados, ayudando a los médicos a identificar aquel subgrupo de pacientes que podría beneficiarse de una terapia sistémica adyuvante (Sáez et al., 2003).

3. Estudio de la expresión de la forma truncada del receptor $HER-2$, $p100^{HER-2}$, en cáncer de mama

El potencial pronóstico y predictivo del oncogén HER-2 podría estar modulado por una serie de procesos moleculares. Así, se dispone de evidencias experimentales que sugieren que la proliferación inducida por HER-2 y la sensibilidad de las células que sobreexpresan HER-2 a tratamientos específicos está alterada por la presencia de formas truncadas de la proteína HER2.

En general, y como hemos descrito previamente, los mecanismos responsables de la aparición de formas truncadas de las proteínas transmembrana y la liberación del dominio extracelular al medio incluyen el corte proteolítico de la proteína transmembrana y/o el procesamiento alternativo del RNAm. El corte proteolítico implica la acción de una proteasa a nivel de la membrana celular que corta la proteína en dos fragmentos, un fragmento extracelular y un segundo fragmento compuesto por los dominios transmembrana e intracelular y que constituye la forma truncada $p95^{HER-2}$.

Por otra parte, se ha observado que el procesamiento alternativo del RNAm codificado por el protooncogén HER-2 puede producir tanto la forma de RNAm completa (4.6 kb), como una forma truncada (2.3 kb). El RNAm completo de HER-2 codifica la proteína HER-2 de 185 kDa que contiene los dominios extracelular, transmembrana y citoplasmático. En cambio, la forma truncada de RNAm de HER-2 sólo codifica el dominio extracelular de la proteína, carece de los dominios transmembrana e intracelular y da lugar a una proteína cuyo peso molecular es de 100 kDa denominada, por ello, $p100^{HER-2}$. La proteína HER-2 truncada contiene el dominio

extracelular completo de HER-2, con excepción de los últimos 20 aminoácidos amino-terminales.

La presencia de dos formas de RNAm de HER-2 (4.6 kb y 2.3 kb) fue descrita por primera vez en 1986 en líneas celulares de cáncer humano, pero no fue hasta 1993 cuando se examinó la expresión y el papel biológico de la forma truncada del receptor HER-2 en un panel de líneas celulares. Se observó que ocho líneas de cáncer epitelial humano expresaron las dos formas del RNA mensajero y que el nivel de expresión del RNAm truncado en relación al RNAm completo era variable en las distintas líneas celulares analizadas. La cantidad de RNAm HER-2 completo en relación con el RNAm de HER-2 truncado oscilaba entre una relación 40:1 hasta una relación de 1:1, demostrando así que la expresión de las dos formas difería en función del tipo celular analizado (Scott et al., 1993).

En este mismo estudio se observó que la sobreexpresión de la forma truncada de HER-2 tuvo como consecuencias un crecimiento más rápido de las células transfectadas con HER-2 truncado, una resistencia primaria a los efectos antiproliferativos de anticuerpos monoclonales anti-HER-2 en células con una alta expresión endógena de HER-2 truncado y una inducción de resistencia completa *in vitro* en células basalmente sensibles a estos anticuerpos al ser transfectadas con HER-2 (Scott et al., 1993). Estas observaciones indican que la forma truncada de HER-2 puede afectar al comportamiento biológico y clínico de los tumores y a su sensibilidad a los anticuerpos anti-HER-2. El mecanismo mediante el cuál la sobreexpresión de HER-2 truncado induce resistencia a los anticuerpos anti-HER-2 no está bien caracterizado, si bien una hipótesis es que la proteína HER-2 truncada interfiere en la asociación que se forma entre los anticuerpos y el receptor HER-2 completo.

Evidencias observadas en otros receptores relacionados apoyan que una forma truncada del receptor comporte actividad biológica. Estas observaciones demuestran que el procesamiento alternativo del RNAm de HER-2 y la consecuente síntesis de la

proteína HER-2 truncada en tumores humanos puede tener un importante papel en la regulación del crecimiento celular y en su comportamiento biológico. Este concepto está apoyado por un reciente estudio en 21 tumores de mama en el que se observó una amplia variación (rango de 30 veces) en los niveles de RNAm truncado *versus* completo y en el que se observó que la expresión relativa de RNAm truncado era superior a nivel de los ganglios axilares metastásicos que a nivel de los tumores primarios (Gebhardt et al., 1998). De forma similar, en tumores primarios y ganglios linfáticos obtenidos de pacientes con cáncer de próstata con sobreexpresión de HER-2 determinada por análisis inmunohistoquímico, se detectó una marcada sobreexpresión del RNAm de HER-2 truncado (pero no del RNAm de HER-2 completo) por RT-PCR. Este estudio indica que la detección de HER-2 por inmunohistoquímica podría estar traduciendo la sobreexpresión de HER-2 truncado, p100^{HER-2}, en lugar de la de HER-2 completo, y este hallazgo adquiere mayor relevancia si consideramos que la sobreexpresión de HER-2 fue un predictor de mal pronóstico (12 de 13 pacientes con tinción positiva para HER-2 presentaron metástasis) en esta serie de pacientes con cáncer de próstata, lo que indica que la proteína HER-2 truncada puede afectar adversamente al pronóstico de las pacientes (Veltri et al., 1996).

Otra implicación potencial de la proteína HER-2 truncada es su posible contribución a la producción de HER-2 soluble. Esta forma truncada fue detectada en el medio condicionado de líneas celulares de cáncer de mama, en experimentos llevados a cabo *in vitro*, y en el suero y orina de pacientes afectas de cáncer de mama, *in vivo* (Mosley et al., 1989; Petch et al., 1990; Zabrecky et al., 1991). Como hemos señalado, la proteína HER-2 soluble corresponde con el dominio extracelular de HER-2. Según algunos estudios, la presencia de altos niveles de HER-2 soluble en suero se asocia a peor pronóstico y a menor sensibilidad a tratamientos antitumorales (quimioterapia y hormonoterapia) en pacientes de cáncer de mama. Además, en estos estudios la presencia de elevados niveles de HER-2 truncado en el suero de pacientes ha demostrado modificar la farmacocinética de los anticuerpos anti-HER-2 (reduciendo la

estabilidad de los niveles terapéuticos de los anticuerpos), y se asocia a resistencia al tratamiento con estos anticuerpos en mujeres con cáncer de mama metastásico. A pesar de las correlaciones clínicas de la presencia de HER-2 soluble en pacientes con cáncer de mama, los mecanismos de liberación del dominio extracelular al suero no están bien caracterizados.

Por otra parte, algunos estudios previos propusieron que la sobreexpresión de esta forma truncada podría inhibir la proliferación y diferenciación de las células de cáncer de mama, incluso en presencia de los factores de crecimiento adecuados (Aigner et al., 2001). Se ha especulado que esta forma soluble ejercería una inhibición de carácter paracrino sobre las células vecinas interfiriendo en la formación de los heterodímeros de HER-2 con los restantes miembros de su familia. Estos estudios demostraron la existencia de una asociación entre la presencia de esta forma truncada de HER-2, p100^{HER-2}, con una mejor evolución de la enfermedad. Así, estos autores describieron unos bajos niveles de expresión de p100^{HER-2} en muestras de tumores gástricos procedentes de pacientes con un elevado número de ganglios metastatizados y en aquellas correspondientes a estadios más avanzados de la enfermedad (Aigner et al., 2001).

Basándonos tanto en las evidencias experimentales como en los estudios clínicos preliminares, es obvio que la presencia de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, en tumores mamarios podría tener profundas implicaciones clínicas y biológicas en cáncer de mama. Sin embargo, en la actualidad no se ha logrado esclarecer su participación en la evolución de las pacientes.

Dada su importancia en cáncer de mama, y dentro del marco del estudio del receptor HER-2 y sus formas truncadas en un amplio panel de muestras de cáncer de mama, decidimos analizar la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, mediante técnicas de RT-PCR y Western blot. Nuestros resultados revelaron que p100^{HER-2} se presentó con mayor frecuencia en aquellas muestras que presentaron

moderados o elevados niveles de expresión de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, ya que más del 95% de las muestras con moderados niveles de expresión de p185^{HER-2} o sobreexpresión del mismo presentaron asimismo expresión de p100^{HER-2}. Por tanto, en el grupo de muestras de cáncer de mama analizadas la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p100^{HER-2}, se correlacionó significativamente con los niveles de expresión de la forma completa de HER-2, p185^{HER-2} ($P = 0.000$).

Puesto que la presencia de metástasis ganglionares en las pacientes afectadas de cáncer de mama es el factor determinante a la hora de evaluar la evolución de la enfermedad y la administración del tratamiento oportuno, una vez determinado el nivel de expresión de p100^{HER-2} en los distintos tumores analizados y su relación con la forma completa del receptor, en nuestro estudio analizamos la relación existente entre la expresión de esta forma truncada con la presencia de metástasis ganglionares.

Nuestros resultados mostraron que ambos factores se correlacionaron inversamente. En este sentido, es interesante constatar que en nuestras condiciones experimentales la expresión de p100^{HER-2} fue significativamente más frecuente en las muestras de tumores primarios pertenecientes a pacientes en las que no se detectaron ganglios metastatizados. Así, la forma truncada p100^{HER-2} fue detectada en el 77.8% de las muestras de pacientes sin afectación ganglionar, mientras que un porcentaje inferior al 60% de las muestras procedentes de pacientes con uno a tres ganglios metastatizados, o del grupo de pacientes con cuatro o más ganglios afectados presentaron expresión de p100^{HER-2} ($P = 0.006$). Este resultado se ajustan con los obtenidos por otros grupos (Aigner et al., 2001). Las discrepancias observadas entre nuestros resultados y los de otros autores podría deberse al diferente comportamiento de la forma truncada p100^{HER-2} en células de distinto origen, así como al uso de diferentes métodos de determinación de la misma.

Al igual que ocurrió al considerar el número de ganglios afectados, la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 correspondiente al dominio extracelular,

p100^{HER-2}, se correlacionó de forma inversa con el estadio de la enfermedad. Así, en nuestro estudio la expresión de p100^{HER-2} fue más frecuente en los estadios tempranos del cáncer de mama ($P = 0.001$), resultados que concuerdan con los obtenidos por otros grupos de trabajo (Aigner et al., 2001).

Para completar el análisis de la correlación entre p100^{HER-2} y otros factores pronóstico en cáncer de mama, tras el estudio de la asociación entre la presencia de dicha forma truncada con el grado de afectación ganglionar y con el estadio de la enfermedad, analizamos su posible relación con otros factores pronósticos considerados de interés en la evolución del cáncer de mama.

En este sentido, nuestros resultados demuestran que la forma truncada p100^{HER-2} no se relacionó con la expresión de receptores de estrógenos o progesterona. Así, esta forma del receptor se presentó con una frecuencia similar en las muestras tumorales en las que no se detectó expresión de receptores de estrógenos y de progesterona en comparación con aquellas que la presentaron ($P > 0.1$).

La expresión de la forma truncada, p100^{HER-2}, no fue significativamente diferente en función de la edad de las pacientes de las que procedían las muestras analizadas. La expresión de esta forma truncada de HER-2 fue similar en el grupo de pacientes con una edad igual o superior a 60 años respecto al grupo con una edad inferior a ésta ($P > 0.1$). Tampoco se pudo establecer una asociación entre la expresión de p100^{HER-2} y el estado menopáusico de las pacientes, puesto que esta forma se presentó con una frecuencia semejante en las pacientes pre-menopáusicas o en el grupo de mujeres post-menopáusicas.

El tipo histológico tumoral fue otro factor de riesgo evaluado y en este parámetro tampoco se encontró una asociación significativa entre la expresión de p100^{HER-2} con un tipo histológico u otro. En este sentido, la frecuencia de expresión de esta forma truncada fue semejante en el carcinoma ductal infiltrante que en los tumores de los restantes tipos histológicos analizados ($P > 0.1$).

Nuestros resultados demuestran, por tanto, que la presencia de p100^{HER-2} en el tumor primario de mama se asoció a formas menos agresivas de la enfermedad.

4. Estudio del nivel de expresión del factor de crecimiento heregulina en tumores primarios de mama

Se ha descrito que la sobreexpresión de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (RTKs) da lugar a su activación, sin embargo, la presencia en el medio de factores de crecimiento también la promueve (Peles et al., 1993). Una de las familias de factores de crecimiento mejor caracterizada es la de la neuregulina 1, a la que pertenecen el factor de diferenciación neu (NDF), el ARIA, el factor de crecimiento de la glía (GGF) y la heregulina. Todas estas glicoproteínas se generan por diversos mecanismos de procesamiento alternativo de cuatro genes codificantes para neuregulinas (NRGs) (Chang et al., 1997; Zhang et al., 1997).

Heregulina es el ligando común a HER-3 y HER-4, miembros de la familia de RTKs, HER (Chang et al., 1997; Zang et al., 1997). Al unirse a HER-2 y HER4 induce la formación de heterodímeros HER-2/HER-3 o HER-2/HER-4 (Groenen et al., 1994; Lemmon et al., 1997). Estos heterodímeros permiten la transfosforilación y transactivación de HER-2, y la consecuente transducción de señales mitogénicas (Karunagaran et al., 1996; Jones et al., 1999).

La heregulina puede ejercer su efecto biológico de forma autocrina, paracrina y yuxtacrina, y de hecho la expresión de heregulina puede ser detectada tanto en el tejido neoplásico como en el estroma tumoral, resultados que concuerdan con nuestros datos obtenidos mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estudios *in vitro* e *in vivo* apoyan el papel de la heregulina en la tumorigénesis y progresión del cáncer de mama (Lewis et al., 1996). La transfección de heregulina o la adición exógena aumenta la proliferación de las células de cáncer de mama, se asocia a un fenotipo más agresivo, induce un

crecimiento independiente de los estrógenos y resistencia a los efectos antiproliferativos del tamoxifeno y aumenta la capacidad metastásica de las células. En cambio, la heregulina induce una mayor sensibilidad al tratamiento con adriamicina y etopósido en células de cáncer de mama humano transfectadas con heregulina, un efecto que se asoció a una elevación en la expresión de topoisomerasa II α (Harris et al., 1998).

In vitro, se ha observado la existencia de una correlación entre la respuesta proliferativa a heregulina y el número de receptores HER-2 en células de cáncer de mama. Todas estas evidencias indican que la expresión de heregulina puede afectar al comportamiento clínico y biológico del cáncer de mama, y que su importancia puede depender de la expresión de HER-2 en los tumores (Lewis et al., 1996; Harris et al., 1998).

Basándonos en estos datos, y dada la importancia de la heregulina en cáncer de mama, en nuestro estudio analizamos los niveles de expresión de este factor de crecimiento en muestras tumorales de cáncer de mama, estableciendo su relación con la expresión de la forma completa y truncada p95^{HER-2}, del receptor HER-2. Nuestros resultados demuestran que la expresión y/o sobreexpresión de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, se presentó con mayor frecuencia en aquellos tumores de mama que presentaron unos mayores niveles de expresión del factor de crecimiento heregulina, datos que concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores (Lewis et al., 1996). En este sentido, la sobreexpresión de la forma completa del receptor fue más frecuente en las muestras que presentaron moderada (39.5%) o elevada expresión (21.7%) de la glicoproteína heregulina, en comparación con las muestras tumorales que mostraron una expresión baja (19.2%) o indetectable (5.9%) de la misma ($P = 0.003$).

En cambio, la expresión de la forma truncada del receptor HER-2 p95^{HER-2} no se correlacionó con los niveles de expresión de heregulina, ya que la expresión de p95^{HER2} se presentó con una frecuencia similar en las muestras de cáncer de mama en las que no

se detectó expresión de heregulina que en aquellas que mostraron unos bajos, moderados o elevados niveles de esta glicoproteína ($P > 0.1$).

Estudios previos llevados a cabo *in vitro* propusieron la existencia de una asociación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina y el desarrollo de metástasis loco-regionales (Lupu et al., 1990, 1992; Bacus et al., 1993), así como de un fenotipo transformante e independiente de señales hormonales (Tang et al., 1996). Por esta razón, en nuestro análisis decidimos estudiar la posible asociación *in vivo* entre la expresión de heregulina y el grado de afectación ganglionar, así como con otra serie de factores clínico-patológicos considerados de interés en cáncer de mama.

En este sentido, al analizar la posible relación entre la presencia de heregulina en las muestras tumorales y la afectación ganglionar, nuestros resultados demuestran que la heregulina no se expresó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes con un mayor grado de afectación ganglionar ($P > 0.1$).

Por otra parte, observamos que en el panel de muestras analizadas en nuestro estudio no se encontró asociación entre la presencia del factor de crecimiento heregulina con la expresión de receptores de estrógenos y de progesterona ($P > 0.1$). En estas mismas muestras se observó que la expresión de heregulina fue independiente de la edad de las pacientes de las que procedían las muestras analizadas. Así, las muestras de cáncer de mama pertenecientes a pacientes con una edad inferior a 60 años expresaron la glicoproteína heregulina con la misma frecuencia que aquellas procedentes de pacientes con una edad igual o superior a 60 años ($P > 0.1$).

Asimismo, es de destacar que la expresión de heregulina no se correlacionó con el estadio de la enfermedad, siendo ésta semejante entre las pacientes estratificadas en función del estadio de la misma (I, II o III) ($P \geq 0.1$). La misma observación pudo establecerse al considerar el tamaño del tumor, puesto que no se encontró una mayor tasa de expresión del factor de crecimiento heregulina en aquellos tumores primarios de mama de mayor tamaño, considerando estos como mayores de 3 cm de diámetro ($P >$

0.1). Tampoco las muestras de carcinoma ductal infiltrante expresaron con mayor frecuencia heregulina que aquellas muestras de otros tipos histológicos ($P > 0.1$).

Por tanto, en nuestras condiciones experimentales, no se estableció ninguna relación significativa entre la expresión de heregulina y los factores considerados de interés pronóstico en cáncer de mama.

El hecho de que el factor de crecimiento heregulina se detectase con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama que sobreexpresaron p185^{HER-2}, así como con la forma activa del mismo (como veremos en el siguiente apartado), concuerda con los resultados obtenidos por otros autores y sugiere que su importancia puede depender de la expresión de HER-2 en los tumores.

5. Estudio del estado de activación del receptor HER-2 en cáncer de mama

Los estudios realizados hasta la actualidad acerca de los miembros de la familia de receptores HER han demostrado que su función depende de la presencia de factores de crecimiento, como pueden ser la heregulina o el EGF, siendo la unión del receptor a sus respectivos ligandos lo que promueve la dimerización de los receptores. Como ya hemos señalado, los cuatro miembros de la familia HER pueden asociarse entre sí para formar hasta diez diferentes dímeros, homo- o heterodímeros (Carraway et al., 1994; Tzahar et al., 1997).

La dimerización conlleva una fosforilación cruzada de los residuos de tirosina del dominio catalítico de los receptores que forman el dímero, con lo que se produce una activación de los mismos. Esta fosforilación cruzada es la primera etapa de la cascada de señalización que dará lugar en último término a la transcripción de genes implicados en proliferación y supervivencia celular (Carraway et al., 1994; Tzahar et al., 1998).

Pese a ser considerado un receptor carente de ligando conocido, HER-2 juega un importante papel en la señalización mediada por factores de crecimiento ya que dimeriza con los restantes miembros de la familia HER (Groenen et al., 1994; Lemmon et al., 1997). La dimerización de los miembros de esta familia se encuentra regulada de forma estrictamente jerárquica, siendo HER-2 el candidato de elección para la formación de los heterodímeros con otros miembros de la familia HER (Graus-Porta et al., 1997; Spencer et al., 2000).

Otro mecanismo que actúa promoviendo la formación de dímeros y, por tanto, iniciando la primera de las etapas de la transducción de la señal mitógena al núcleo, es la sobreexpresión de HER-2. Se ha descrito que este fenómeno implicaría el aumento de la concentración de receptores en la membrana, lo que a su vez promovería la autodimerización, con la consiguiente alteración de la señalización celular (Slamon et al., 1989; Hynes et al., 1994, 2001).

Debido a la multiplicidad de receptores de la familia HER y de sus ligandos, es obvio que existe un estricto mecanismo de regulación que controla sus niveles de expresión y activación (Esteve et al., 2001). La fosforilación de los residuos de tirosina presentes en el dominio catalítico incrementa la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor. Por otro lado, la fosforilación de los residuos de tirosina no pertenecientes al dominio catalítico crea diversos puntos de acoplamiento específicos para otras moléculas que intervienen en la transducción de señal mediada por receptores activados (Graus-Porta et al., 1997).

Recientemente se ha descrito que la expresión de la forma activada (fosforilación en tirosina) de HER-2, determinada mediante técnicas inmunohistoquímicas en un banco de tumores de mama, se asocia a un pronóstico adverso de las pacientes (Thor et al., 2000). La información pronóstica obtenida de la determinación de la forma activada de HER-2 fue superior a la proporcionada por los niveles de HER-2 totales, independientemente de su estado de activación. Esta

observación sugiere que el número de receptores activados puede ser biológicamente más relevante que el número total de receptores. Por este motivo, y tras caracterizar los niveles de expresión de la proteína HER-2 y sus formas truncadas en una amplia serie de cánceres de mama, decidimos analizar los niveles de activación de los mismos y las vías de señalización por las que transduce la señal mitógena.

El análisis de los niveles de fosforilación de HER-2 en las muestras de cáncer de mama empleadas en nuestro estudio mostró que la fosforilación de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, se correlacionó con los niveles de activación de la forma completa del mismo, p185^{HER-2}. Así, la fosforilación del receptor truncado fue significativamente más frecuente en las muestras de cáncer de mama que presentaron asimismo una moderada (58.6%), o elevada (69.2%), activación de p185^{HER-2}, en comparación con aquellas muestras de tumores de mama que presentaron bajo grado de fosforilación de p185^{HER-2} (15.1%), o con las que no presentaron la forma activa de éste (4.9%) ($P < 0.001$), mientras que algunas muestras no presentaron expresión de p95^{HER-2} fosforilado. Esta amplia heterogeneidad en los niveles de p95^{HER-2} presentes en los distintos tumores analizados sugiere que el nivel del receptor truncado y su fosforilación se hallan regulados *in vivo*.

Como ya hemos señalado, pese a carecer de ligando conocido HER-2 actúa como co-receptor en heterodímeros con otros miembros de la familia HER y participa activamente en la transducción de las señales extracelulares al núcleo y, en último término, conduce a la activación de genes implicados en proliferación celular. La heregulina, una molécula de 44 kDa, es capaz de inducir la fosforilación de HER-2 (Lupu et al., 1993). En un primer momento la heregulina fue considerada una proteína capaz de inducir la fosforilación de HER-2. Sin embargo, algunos estudios llevados a cabo *in vitro* demostraron que el factor de crecimiento heregulina no se unía realmente a HER-2, sino que era el ligando de otros miembros de la familia HER como son HER3 y HER4 los cuales, formando dímeros con HER-2, daban lugar a la fosforilación del mismo (Carraway et al., 1994).

Por esta razón, el siguiente paso en nuestro estudio fue establecer la relación entre la presencia de activación del receptor HER-2 con la expresión del factor de crecimiento heregulina. Los resultados obtenidos en nuestro análisis demuestran la existencia de una asociación significativa entre el estado de fosforilación del receptor HER-2 completo, p185^{HER-2}, y la expresión del factor de crecimiento heregulina, ya que la forma completa del receptor fosforilada se detectó en el 71.3% de las muestras en las que se expresó heregulina ($P = 0.004$). Por tanto, en las muestras analizadas, la heregulina interviene en los mecanismos que conducen a la activación de p185^{HER-2}, fenómeno que conlleva a su vez la activación de las vías de transducción de señal (Bacus et al., 1993). En cambio, en estas muestras la presencia de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, fosforilado no se relacionó con la expresión del factor de crecimiento heregulina ($P > 0.05$).

Como ya citamos con anterioridad, algunas formas proteicas generadas por corte proteolítico caracterizadas por carecer de algunos aminoácidos de la estructura original de la molécula, han demostrado ser hiperactivas en lo que se refiere a progresión del ciclo celular y están implicadas en el desarrollo de metástasis (Porter et al., 2001). Cabe destacar que la presencia de la metástasis afecta tanto a la evolución de la enfermedad como al tipo de tratamiento a administrar a la paciente, así como a la respuesta al mismo (Mirza et al., 2002).

Como describimos en la parte inicial de este estudio, la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, se correlacionó con el grado de afectación ganglionar siendo su expresión más frecuente en las muestras tumorales procedentes de pacientes con cuatro o más ganglios metastatizados. La expresión de p95^{HER-2} mostró ser incluso más frecuente en las metástasis ganglionares que en los propios tumores primarios.

Si consideramos que la aparición de metástasis ganglionares es el principal causante de muerte debido al cáncer de mama (Keyomarsi et al., 2002), cabe estudiar con detenimiento todos los aspectos que podrían influir en el desarrollo de las mismas.

En este sentido, en nuestro estudio estudiamos la posible relación entre la activación de HER-2 y la presencia de metástasis ganglionares. Así, y al igual que ocurría con los niveles basales de, p95^{HER-2}, observamos que la fosforilación del fragmento truncado p95^{HER-2} en muestras tumorales pertenecientes a pacientes de cáncer de mama se asoció con el grado de afectación ganglionar. De esta forma, la activación del fragmento truncado del receptor HER-2 fue significativamente más frecuente en el grupo constituido por pacientes con cuatro o más ganglios metastatizados (51.3%) que en las muestras tumorales de las pacientes con uno a tres ganglios afectados (27.3%), o que en aquellas pertenecientes a pacientes que no presentaron afectación ganglionar (29.0%) ($P = 0.003$).

En nuestro estudio, la sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado no se relacionó con el grado de afectación ganglionar, no observándose una asociación significativa entre ambos parámetros. En este sentido, no se apreciaron diferencias respecto a p185^{HER-2} fosforilado en ninguno de los grupos de muestras tumorales analizadas agrupadas en función del número de metástasis ganglionares presentes en las pacientes ($P > 0.1$).

Nuestros datos, en los que se observa una asociación entre la expresión de p95^{HER-2} fosforilado con el grado de afectación ganglionar, sugieren que esta forma truncada del receptor HER-2 desempeña un importante papel en la evolución del cáncer de mama. Así, la forma truncada p95^{HER-2} podría servir como marcador molecular indicativo de la presencia de afectación ganglionar o, incluso, podría estar en la base del desarrollo de metástasis loco-regionales, fenómeno que se traduce en una significativamente peor evolución de la enfermedad (Molina et al., 2002).

Estudios previos, realizados empleando técnicas inmunohistoquímicas, demostraron la existencia de una correlación significativa entre la expresión de HER-2 fosforilado con la afectación ganglionar y con una mayor tasa de proliferación celular. Estos mismos estudios establecieron una asociación entre la expresión de HER-2

fosforilado y/o la sobreexpresión de HER-2 con un peor pronóstico de la enfermedad en pacientes que presentaron afectación ganglionar (Thor et al., 2000). Sin embargo, como ya expusimos con anterioridad, las técnicas inmunohistoquímicas no permiten discernir entre la forma completa y truncada del receptor HER-2, por lo que las conclusiones a las que llegó este grupo podrían deberse a la activación de la forma truncada de HER-2, p95^{HER-2}, y no a la completa.

Otro parámetro clínico tradicionalmente considerado de importancia en cáncer de mama y que también procedimos a estudiar en este análisis es el tamaño tumoral que, junto con la presencia de afectación ganglionar, configura el estadio de la enfermedad. En nuestro estudio, la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, fosforilada se detectó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama correspondientes a pacientes en estadios II y III de la enfermedad al compararlo con en aquellas muestras de pacientes en estadio I ($P = 0.001$), es decir, sus niveles fueron apreciables con mayor frecuencia en aquellos estadios del cáncer de mama en los que se presenta afectación ganglionar.

Al considerar la variable del tamaño tumoral, no se observó una relación entre la activación de la forma truncada p95^{HER-2} con el tamaño del tumor ($P > 0.1$). Por tanto, probablemente la asociación hallada entre p95^{HER-2} y los estadios avanzados de la enfermedad se deba, en gran medida, a la correlación previamente descrita referente a la presencia de metástasis ganglionares.

Por su parte, los resultados obtenidos de nuestro análisis mostraron que la sobreexpresión de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, fosforilado no se asoció ni con el tamaño tumoral ni con el estadio de la enfermedad ($P > 0.1$). Sin embargo, en el panel de muestras analizadas por nuestro grupo, la sobreexpresión del receptor completo, p185^{HER-2}, activado se observó con mayor frecuencia en las muestras en las que los niveles de receptores de estrógenos fueron anormalmente bajos, en comparación con aquellas en las que los niveles fueron elevados ($P = 0.049$). En

anteriores estudios ya se había descrito la existencia de una correlación inversa entre la expresión de HER-2 y la de los receptores de estrógenos (Heintz et al., 1990). Esta correlación no se mantuvo al analizar la relación entre p185^{HER-2} fosforilado y la presencia de los receptores de progesterona ($P > 0.1$). Por otra parte, la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, fosforilada no se asoció con la expresión de los receptores de estrógenos ni de progesterona ($P > 0.1$). Dado este hecho, previsiblemente la respuesta de la paciente al tratamiento hormonal sea diferente dependiendo de que el tumor exprese una u otra forma activada del receptor HER-2.

La activación de la forma completa p185^{HER-2} o truncada p95^{HER-2} no fue significativamente diferente en los dos grupos de pacientes establecidos en función de la edad de las mismas. La misma observación pudo establecerse en el caso de que éstas fuesen categorizadas en función del estado menopáusico, probablemente debido a que éste es, a su vez, un factor directamente condicionado por la edad de las pacientes ($P > 0.1$).

El estudio del tipo histológico de las muestras analizadas marcó, de nuevo, una clara y significativa diferencia en relación a la expresión de las formas completa y truncada fosforiladas del receptor HER-2. En este sentido, nuestros resultados demostraron que la expresión de la forma completa, p185^{HER-2}, fosforilada se presenta con la misma frecuencia en los diferentes tipos histológicos tumorales ($P > 0.1$). En cambio, la expresión de la forma truncada, p95^{HER-2}, fosforilada se presentó con una frecuencia claramente mayor en aquellas muestras tumorales del tipo de carcinoma ductal infiltrante en comparación con los restantes tipos histológicos ($P = 0.006$).

En este sentido, cabe hacer referencia a algunos estudios en los que se analizó la relación entre la expresión de HER-2 con el subtipo histológico. En estos estudios, el análisis de tipo inmunohistoquímico mostró que con frecuencia el carcinoma ductal infiltrante se asoció con la expresión de HER-2 (Ross et al., 1998; Mack et al., 1999). Es posible que el uso de una metodología diferente, que en el caso de la

inmunohistoquímica no permite evaluar de forma aislada las formas del receptor HER-2, condicione los resultados obtenidos en el aspecto referente a la activación de p185^{HER-2}.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que la expresión de p95^{HER-2} activado caracteriza un grupo de pacientes con mayores probabilidades de desarrollar metástasis ganglionares en cáncer de mama y condiciona, por tanto, el tipo de tratamiento a aplicar a dichas pacientes así como la evolución de su enfermedad.

6. Estudio de la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama

Las vías de transducción de señal activadas por el receptor HER-2 *in vivo* en cáncer de mama no están bien caracterizadas. El estudio de estas vías en este tipo de tumores se constituye en el siguiente paso lógico para avanzar en el campo.

Como ya citamos en la Introducción de esta Memoria, una de las vías de señalización mejor establecidas en cáncer de mama es la vía Ras-Raf-MAPK (Carpenter et al., 1999; Hackel et al., 1999; Luteerell et al., 1999). Esta vía se caracteriza por la fosforilación final de la proteína con actividad quinasa MAPK. La forma mejor caracterizada de MAPKs en células de mamífero pertenece a la familia ERK (quinasa regulada por señales extracelulares). La activación de ERK juega un papel central en la proliferación celular inducida por factores de crecimiento que actúan bien a través de receptores con actividad tirosina quinasa, tales como los miembros de la familia del EGFR, o bien a través de receptores acoplados a proteínas G.

Existen dos isoformas de ERK (1 y 2), similares en el 90% de su secuencia y expresadas de forma ubicua en distintos tejidos. Se trata de dos proteínas de 44 y 42 kDa, respectivamente, que se translocan al núcleo celular en donde activan una amplia variedad de moléculas al fosforilar sus residuos de serina o treonina. Concretamente,

ERK fosforila ciertos miembros de la familia de factores transcripcionales ETS, mecanismo con el que se promueve la expresión de determinados genes implicados en proliferación celular.

Dada la relación existente entre la activación del receptor de membrana con actividad tirosina quinasa HER-2 y la vía de transducción de señal Ras-Raf-MAPK y sus importantes implicaciones en cáncer de mama, en nuestra investigación estudiamos la activación de dicha vía, para lo que procedimos al análisis del estado de fosforilación de la proteína MAPK en una amplia serie de muestras de cáncer de mama. En estas mismas muestras tumorales se había caracterizado previamente el nivel de expresión y el estado de activación del receptor HER-2. Se poseía, además la información referente a los múltiples factores clínicos analizados e implicados en la evolución de las pacientes de cáncer de mama.

Previamente, algunos autores habían demostrado la existencia de múltiples residuos de la molécula de HER-2 susceptibles de ser fosforilados. Sin embargo, la fosforilación del residuo de tirosina 1248 demostró ser el único factor asociado a los procesos de transformación celular (Segatto et al., 1988; Akiyama et al., 1991; Mikami et al., 1992). Así, estos estudios sugieren que este es el único residuo fosforilable de HER-2 responsable de la oncogénesis y de la activación de la vía de transducción de señal Ras-Raf-MAPK (Ben-Levy et al., 1994). Por este motivo, en nuestro estudio de los niveles de activación del receptor HER-2 hemos utilizado anticuerpos dirigidos al reconocimiento de este residuo de forma específica. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, parece que el estudio de la activación de HER-2 y su relación con la activación de MAPK podría ser más importante que la evaluación del número total de receptores HER-2 presentes en la membrana celular (Thor et al., 2000).

El análisis de nuestros resultados demostró que la presencia de HER-2 fosforilado fue mayor en las muestras que mostraron asimismo activación de MAPK. En efecto, ambas formas del receptor HER-2, p185^{HER-2} y p95^{HER-2}, fosforiladas se

detectaron con mayor frecuencia en los tumores primarios de mama que presentaron fosforilación de MAPK de forma simultánea.

La frecuencia de expresión de la forma completa del receptor p185^{HER-2} fosforilada se incrementó de forma paralela con los niveles de activación de la proteína MAPK. En este sentido, se observó que p185^{HER-2} fosforilado se detectó en el 93.5% de las muestras con moderados niveles de activación de la proteína quinasa y en el 91.3% de las muestras en las que la activación de MAPK fue elevada. Estos resultados indican que p185^{HER-2} fosforilado fue significativamente más frecuente en las muestras en las que se detectaron unos moderados o elevados niveles de activación de MAPK al compararlos con aquellas muestras en las que los niveles de activación de la misma fueron bajos o indetectables ($P < 0.00001$).

En general, observamos que todas las muestras en las que previamente habíamos detectado sobreexpresión de p185^{HER-2} presentaron asimismo actividad MAPK. Al mismo tiempo, pudimos apreciar que esta sobreexpresión fue significativamente más frecuente en el grupo de muestras que presentaron los mayores niveles de activación de MAPK (52.2%), comparado con aquellas muestras en las que los niveles de activación de la serina/treonina quinasa fueron moderados (19.6%), o bajos (14.6%) ($P < 0.004$).

Estos datos sugieren una estrecha relación entre la activación de la forma completa del receptor HER-2 y la de MAPK, *in vivo*, en cáncer de mama lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Ben-Levy et al., 1994).

En cambio, la expresión de la forma truncada p95^{HER-2} fosforilada no varió de manera notable en función del grado de activación de MAPK. En este sentido, p95^{HER-2} fosforilado se presentó con una frecuencia similar en todos los grupos de pacientes cuyas muestras expresaron MAPK activada, independientemente de los niveles de la misma ($P > 0.1$).

Algunos estudios recientes demostraron la participación del factor de crecimiento heregulina en la proliferación celular mediada por la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK en cáncer de mama (Aguilar et al., 1999). En la primera parte de nuestro análisis demostramos la existencia de una relación significativa entre los niveles de expresión del factor de crecimiento heregulina y la activación de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}. Por este motivo, en esta fase de nuestro estudio analizamos la participación del factor de crecimiento heregulina en la activación de MAPK mediada por ambas formas del receptor HER-2 fosforiladas.

Para ello, en primer término clasificamos en dos categorías las muestras de cáncer de mama en función de la expresión de la glicoproteína y analizamos, en estos dos grupos de muestras, la relación entre la activación de p185^{HER-2} y la de MAPK. Nuestros resultados demostraron que el 87.8% de las muestras de cáncer de mama que expresaron heregulina presentaron asimismo y de forma simultánea la forma activa de p185^{HER-2} y activación de MAPK ($P = 0.014$). En cambio, en el grupo de muestras que no expresaron heregulina la activación de la forma completa del receptor HER-2 no se correlacionó con la de MAPK ($P > 0.1$). Por tanto, nuestros datos indican que la expresión de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}, fosforilada se asocia con la activación de MAPK únicamente en aquellas muestras en las que se detectó la presencia del factor de crecimiento heregulina. Ello sugiere la implicación de la heregulina en los mecanismos que conducen a la activación del receptor HER-2 y la consiguiente activación de la vía MAPK

Por otra parte, en la primera parte de este estudio describimos una relación estadísticamente significativa entre la activación de la forma truncada p95^{HER-2} y el grado de afectación ganglionar. De forma paralela hemos observado que en el grupo de muestras analizadas en nuestro estudio la expresión de p95^{HER-2} fosforilado fue significativamente más frecuente en las muestras que mostraron activación de MAPK. Por este motivo, y dada la importancia de estos factores en cáncer de mama, procedimos

al análisis de la posible relación entre la activación de p95^{HER-2} y la proteína MAPK con el grado de afectación ganglionar.

A este respecto, nuestros datos demostraron que en el grupo de muestras analizadas en nuestro estudio la expresión simultánea de p95^{HER-2} fosforilado y de MAPK activada se asoció con un mayor grado de afectación ganglionar. En este sentido, observamos que el 61.2% de las muestras que presentaron activación simultánea de MAPK y p95^{HER-2} pertenecían a pacientes con cuatro o más ganglios afectados, mientras que la activación de ambas proteínas estuvo presente únicamente en el 29.0% de las muestras tumorales procedentes de pacientes con uno a tres ganglios metastatizados o de aquellas sin afectación ganglionar. Estos datos indican que la activación de p95^{HER-2} y de la proteína MAPK se correlacionó directamente con el grado de afectación ganglionar de las pacientes ($P = 0.026$). Nuestros resultados también nos permitieron establecer que en el grupo de pacientes en las que se detectó activación de MAPK el grado de afectación ganglionar no se vió condicionado por el estado de activación de p185^{HER-2} ($P > 0.1$).

Por tanto, según nuestros resultados experimentales aunque la expresión de las formas completa y truncada de HER-2 fosforiladas se presenta con una frecuencia significativamente mayor en aquellas muestras que expresan MAPK activada, únicamente la expresión simultánea de la forma truncada p95^{HER-2} y MAPK fosforiladas se asocia con el grado de afectación ganglionar. Estos datos concuerdan con los de otros autores que demuestran la existencia de una asociación entre la expresión de MAPK activada y la presencia de metástasis ganglionares siendo, por otra parte, la expresión de la quinasa mayor en las metástasis ganglionares que en los propios tumores primarios (Adeyinka et al., 2002). Estos datos sugieren que la activación conjunta de p95^{HER-2} y MAPK podría ser un marcador de la existencia de metástasis ganglionares y podría, de esta forma caracterizar un grupo de pacientes de cáncer de mama con mayores probabilidades de sufrir progresión de la enfermedad y, por tanto, con una significativa peor evolución de la misma.

Tras estudiar la relación de la vía de transducción de señal Ras-Raf-MAPK con el desarrollo de metástasis loco-regionales, se estudió la relación existente entre la expresión de las formas completa y truncada de HER-2 fosforiladas y la activación de MAPK con otros factores clínicos considerados de interés en cáncer de mama.

Así, nuestros resultados no demostraron una relación estadísticamente significativa entre la activación de MAPK y de p185^{HER-2} fosforilado con la expresión de receptores de estrógenos o progesterona, así como tampoco mostró estar condicionando por la edad de aparición del tumor, ni se relacionó con el estado menopáusico de las pacientes. En relación con el estadio de la enfermedad, el tamaño tumoral y el tipo histológico del tumor, observamos que la expresión simultánea de la forma completa del receptor HER-2 fosforilada y de MAPK activada no se relacionó con estos factores ($P > 0.1$).

Sin embargo, es interesante destacar que el análisis de nuestros resultados demostró que la expresión simultánea de MAPK activada y de la forma truncada p95^{HER-2} fosforilada fue significativamente más frecuente en las muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes de estadios más avanzados de la enfermedad ($P = 0.026$), comparado con aquellas en estadios iniciales de ésta. Asimismo, nuestros resultados demostraron que la expresión conjunta de p95^{HER-2} y MAPK fosforiladas resultó significativamente más frecuente en aquellas muestras tumorales de mayor tamaño ($P = 0.041$). De forma similar, la fosforilación de la forma truncada del receptor HER-2 y de la serina/treonina quinasa se halló con una frecuencia significativamente mayor en tumores primarios de mama pertenecientes al histotipo ductal infiltrante en comparación con los restantes tipos histológicos analizados ($P = 0.037$). Estos datos concuerdan con los presentados por otros autores que establecen una asociación estadísticamente significativa entre la activación de MAPK y una mayor actividad de los receptores de factores de crecimiento con el desarrollo y la progresión del cáncer de mama (Adeyinka et al., 2002. Por otra parte, nuestros datos no demostraron la presencia de una correlación entre la activación de MAPK y de p95^{HER-2} con la expresión de

receptores hormonales (receptores de estrógenos y progesterona) ($P > 0.1$). Tampoco se halló una relación estadísticamente significativa entre la presentación simultánea de p95^{HER-2} y de MAPK activados en relación con la edad o el estado menopáusico de las pacientes ($P > 0.1$).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que pese a existir una estrecha relación entre la activación de MAPK y la de ambas formas del receptor HER-2, únicamente la expresión conjunta de la serina/treonina quinasa y la forma truncada p95^{HER-2} fosforiladas contribuiría al desarrollo de un fenotipo adverso en cáncer de mama.

7. Estudio de la activación de la vía de señalización PI3-K/Akt en cáncer de mama

En el laboratorio la vía de transducción de señal mejor caracterizada es la constituida por Ras-Raf-MAPK. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la vía de transducción de la fosfatidilinositol 3'-OH quinasa (PI3-K)/Akt, activada por estímulos extracelulares tales como el receptor HER-2, podría ser crítica en la génesis del cáncer y ha demostrado jugar un papel fundamental en los procesos de proliferación y más recientemente de apoptosis en modelos tumorales (Cantley et al., 1999).

El clásico mecanismo de activación de la vía de señalización PI3-K implica, en primer lugar, su unión a un residuo de tirosina fosforilado. Estos residuos, pertenecen al centro catalítico de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (RTKs) del tipo de los miembros de la familia HER (Diehl et al., 1998). Esta unión, que tiene lugar a través de dos dominios SH2 de la subunidad reguladora de PI3-K, p85, origina un cambio conformacional que, se ha especulado, facilitaría la activación del dominio catalítico del mismo, p110. Uno de los efectores más conocidos de PI3-K es Akt, el cual promueve la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis celular. El potencial anti-apoptótico de PI3-K, de su efector Akt y el hecho de que ambos genes fuesen

inicialmente identificados como oncogenes virales con capacidad transformante, sugiere que estos genes podrían estar implicados en el desarrollo del cáncer.

La actividad de Akt está regulada por la unión de productos lipídicos de PI3-K a su dominio de homología a plecstrina (PH) y por fosforilación de los residuos Thr-308 y Ser-473 localizados dentro de su asa de activación y el extremo C-terminal, respectivamente. Se han identificado tres isoformas de Akt (Akt1, Akt2, Akt3) que se expresan con intensidad variable en células de cáncer humano.

Existen varias dianas de Akt que podrían ser responsables de la capacidad de esta ruta para promover supervivencia celular. Estas dianas incluyen dos componentes de la maquinaria intrínseca de muerte celular, BAD y la caspasa 9, factores de transcripción de la familia “forkhead” y una quinasa, IKK, que regula negativamente el factor de transcripción NF- κ B. Además de sus efectos sobre la apoptosis, Akt cataliza la fosforilación de GS3K, dando lugar a su inhibición y, en consecuencia, puede contribuir al acúmulo de ciclina D1 y entrada en ciclo celular (Cantley y Neel, 1999). Un indicio adicional de la importancia de Akt viene demostrado por el uso de inhibidores específicos de la ruta PI3-K/Akt que inhiben el crecimiento tumoral, elevan los niveles de p27 e inducen hipofosforilación de Rb (Busse et al., 2000).

La importancia de Akt en cáncer de mama se sugiere por las siguientes observaciones: 1) en líneas celulares de cáncer de mama se ha demostrado mayor actividad Akt (Page et al., 2000); 2) PTEN, un gen supresor de tumores que regula negativamente Akt, suprime el crecimiento de células de cáncer de mama y causa muerte celular (Weng et al., 1999), y; 3) un estudio piloto en 27 tumores sugiere que la activación de Akt3 se asocia a un fenotipo clínico más agresivo (Nakatani et al., 1999)

De forma paralela se ha observado que HER-2 activa de forma constitutiva la cascada antiapoptótica regulada por Akt (Zhou et al., 2000; Neve et al., 2000). Experimentos *in vitro* han demostrado que tanto la heregulina como la sobreexpresión de HER-2 activan de forma potente Akt (Liu et al., 1999). Además, datos recientes

indican que el anticuerpo anti-HER-2 Herceptin inhiben la fosforilación de Akt en líneas celulares de cáncer de mama, tales como BT-474, que sobreexpresan Akt (Albanell y Baselga, comunicación personal).

Sin embargo, en la actualidad no hay estudios *in vivo* que determinen la posible asociación entre activación de Akt y HER-2 en cáncer de mama humano, por lo que el siguiente paso en nuestro estudio fue la caracterización de esta asociación así como el análisis de la posible relación entre Akt y las formas completa y troncada p95^{HER-2} del receptor HER-2 en cáncer de mama.

Para ello, en primer lugar caracterizamos la expresión de las tres isoformas de Akt y sus niveles de activación en un panel de muestras de tumores primarios de mama en las que previamente habíamos determinado los niveles de expresión y activación de p185^{HER-2} y p95^{HER-2}. Nuestros resultados mostraron que las diferentes muestras tumorales presentaron una amplia variabilidad en los niveles de expresión de Akt1, Akt2 y Akt3. El estudio de la asociación entre la expresión de las diferentes isoformas de Akt con los niveles basales y el estado de activación de la forma completa de HER-2, p185^{HER-2}, y troncada, p95^{HER-2}, no mostró ninguna relación estadísticamente significativa ($P > 0.1$).

Una serie de estudios recientes demostraron que la sobreexpresión de HER-2 inducía la activación reversible de MAPK y Akt sin alterar los niveles basales de ambas proteínas y que la actividad de Akt se vio mermada en células inmunodeplecionadas de HER-2, resultados que demuestran la existencia de una conexión entre la expresión de HER-2 y Akt (Lane et al., 2000; Lenferink et al., 2001). Más recientemente, unos estudios basados en el uso *in vitro* de Herceptin, demostraron que este anticuerpo redujo la actividad de Akt y de forma paralela inhibió la proliferación celular de BT-474, una línea celular de cáncer de mama. Este anticuerpo monoclonal está dirigido contra la molécula de HER-2 y se administra a pacientes de cáncer de mama que presentan

sobreexpresión de HER-2, analizada mediante técnicas inmunohistoquímicas (Yakes et al., 2002).

Por este motivo, analizamos en nuestras muestras la existencia de una posible relación entre la activación de HER-2 y la fosforilación de Akt. Nuestros resultados demostraron que la expresión de p185^{HER-2} fosforilado se correlacionó con los niveles de activación de Akt, de manera que las muestras de cáncer de mama con mayores niveles de activación de Akt presentaron asimismo con mayor frecuencia activación de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}. Así, el 95.5% de las muestras en las que se detectó sobreexpresión de Akt fosforilado presentaron simultáneamente expresión de p185^{HER-2} fosforilado ($P = 0.001$).

Asimismo, en nuestro estudio observamos que todas las muestras que presentaron sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado mostraron simultáneamente activación de Akt y que el porcentaje de muestras que sobreexpresaron p185^{HER-2} fosforilado fue mayor en el grupo de muestras en las que se detectaron altos niveles de Akt fosforilado ($P = 0.001$). Estos datos concuerdan con los previamente publicados en la literatura (Lenferink et al., 2001).

Por otra parte, la expresión de la forma truncada p95^{HER-2} fosforilada fue más frecuente en las muestras que presentaron activación de Akt; sin embargo, la expresión de la forma truncada de HER-2 fosforilada no se correlacionó con los niveles de activación de Akt ($P > 0.1$).

Como ya comentamos con anterioridad, la presencia de factores de crecimiento se asocia con la activación de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, tales como HER-2, y se traduce en la activación de las vías de señalización implicadas en proliferación celular y diferenciación celular. Algunos estudios han demostrado la existencia de una relación entre la expresión del factor de crecimiento heregulina con la activación de la vía de señalización PI3-K/Akt. Esta activación altera

el ciclo celular e inhibe la apoptosis (Daly et al., 1999; Liu et al., 1999; Altioik et al., 1999).

Como hemos referido previamente, nuestros datos demuestran la existencia de una correlación entre la fosforilación de la forma completa de HER-2, p185^{HER-2}, y el grado de expresión de la glicoproteína heregulina. Por otra parte, también observamos que la expresión y sobreexpresión de p185^{HER-2} se asoció significativamente con los niveles de activación de Akt. Por este motivo, nos propusimos estudiar la relación existente entre la expresión de heregulina y la activación de Akt mediada por p185^{HER-2} fosforilado.

En este sentido, nuestros resultados demostraron que la relación entre la activación de p185^{HER-2} y la activación de Akt varió de forma significativa en función del grado de expresión de heregulina. Así, observamos que en el grupo de muestras que presentaron expresión del factor de crecimiento heregulina la activación de Akt se asoció significativamente con la activación de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2} fosforilado ($P = 0.049$). Sin embargo, cuando consideramos el grupo de muestras que no expresaron la glicoproteína observamos que dicha asociación no se mantuvo ($P > 0.1$). Estos datos indican que la activación de Akt mediada por la activación de p185^{HER-2} tiene lugar preferentemente en el grupo de muestras que expresaron heregulina.

Algunos estudios realizados en una serie de carcinomas de mama han correlacionado la amplificación génica y sobreexpresión proteica de las diferentes isoformas de Akt con un aumento de la proliferación celular y el desarrollo de metástasis (Yakes et al., 2002). Por esta razón analizamos la relación existente entre la activación de la vía de transducción de señal PI-3K/Akt, iniciada por la activación de HER-2, con el grado de afectación ganglionar de nuestras pacientes así como con el estado de determinadas variables clínicas consideradas de interés en cáncer de mama.

Nuestros resultados previos establecieron una clara relación entre la expresión y activación de la forma truncada de HER-2, p95^{HER-2}, con el grado de afectación ganglionar, lo que nos llevó a estudiar la relación existente entre la activación de p95^{HER-2} y p185^{HER-2} con los niveles de afectación ganglionar en las muestras en función de la expresión de Akt fosforilado de las mismas. Al analizar nuestros datos observamos que, en el grupo de muestras en las que detectamos actividad Akt, la expresión de p95^{HER-2} fosforilado fue significativamente más frecuente en el grupo de muestras pertenecientes a pacientes con cuatro o más ganglios afectados que en aquellos grupos de pacientes sin afectación ganglionar o que presentaron de uno a tres ganglios metastatizados ($P = 0.049$). Estos datos concuerdan con los de otros autores (Ignatoski et al., 2000) y sugieren la existencia de una posible acción sinérgica entre la fosforilación de p95^{HER-2} y la activación de Akt activado en el desarrollo de metástasis ganglionares en cáncer de mama.

En el grupo de muestras en las que se detectó la forma activa de Akt no fue posible establecer una correlación significativa entre la presencia de p185^{HER-2} fosforilado con el grado de afectación ganglionar ($P > 0.1$). El estudio de la relación entre la expresión de Akt fosforilado y p185^{HER-2} activado con otros factores clínicos tradicionalmente considerados factores pronósticos en cáncer de mama no nos permitió establecer ninguna asociación significativa ($P > 0.1$).

Observamos que, en cambio, la activación simultánea de Akt y p95^{HER-2} se presentó con mayor frecuencia en el grupo de muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes en estadios más avanzados de la enfermedad ($P = 0.008$). Sin embargo, en nuestro estudio la activación de Akt y la forma truncada del receptor HER2 fosforilada no se asoció con el estado hormonal ni con la edad de las pacientes, así como tampoco con la expresión de los receptores de estrógenos o de progesterona ($P > 0.1$). Por otra parte, el tipo histológico del tumor tampoco se relacionó con la activación simultánea de Akt y p95^{HER-2} ($P > 0.1$)

8. Caracterización de la expresión de *HER-2* y su implicación en la activación de las vías de transducción de señal mitógena en cáncer de mama de alto riesgo

Los principales factores clínicos tradicionalmente considerados al evaluar el pronóstico de las pacientes de cáncer de mama son el tamaño tumoral, el tipo histológico del tumor y el nivel de afectación ganglionar. Todos estos parámetros permiten al especialista conocer el grado de agresividad de la enfermedad y administrar el tratamiento oportuno a las pacientes. Sin embargo, el marcador que mejor identifica un mal pronóstico en cáncer de mama es la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos (Hynes et al., 1994).

En efecto, la presencia o no de metástasis ganglionares en cáncer de mama conforma dos grupos de pacientes claramente diferentes en el aspecto referente al tratamiento. Además, el desarrollo de metástasis, y no la tasa de proliferación celular del propio tumor primario, ha demostrado ser la causa más frecuente de muerte debida al cáncer de mama (Carter et al., 1989; Rodenhuis et al., 2000; Nieto et al., 2000; Gianni et al., 2001; Peters et al., 2001).

Recientemente se han identificado una amplia serie de marcadores moleculares que podrían presentar valor pronóstico en cáncer de mama. Probablemente, uno de los más prometedores fuese *HER-2* ya que se ha observado que la sobreexpresión de este receptor de membrana desempeña un importante papel en la transformación maligna y en el desarrollo del tumor (Di Fiore et al., 1987; Hudziak et al., 1987; Slamon et al., 1987, 1989). La sobreexpresión de *HER-2* fue descrita en primer lugar en un carcinoma de tipo ductal *in situ* (Vijver et al., 1988) y con posterioridad otros grupos encontraron alteraciones de *HER-2* en este mismo tipo histológico tumoral (Allred et al., 1992; Ross et al., 1998). Se ha observado que aproximadamente el 25% de los tumores de mama de tipo invasivo presentan amplificación de *HER-2/neu* (Slamon et al., 1987; Esteva-Lorenzo et al., 1998).

Por otra parte, en estudios recientes se ha descrito que el número de alteraciones genómicas presentes en el grupo de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo fue significativamente mayor que el hallado en otros grupos de pacientes (Climent et al., 2002). Así, se observaron ganancias génicas en las regiones 17q (locus génico del gen *HER-2/neu*), 8q, 20q y 16p, así como pérdidas génicas mapeadas en 9p, 18q y 18p. Algunas de estas alteraciones se correlacionaron con diversas características clínico-patológicas. En este sentido, la expresión de receptores de progesterona se asoció de forma significativa con la pérdida de 8p, mientras que la ganancia de 8q fue significativamente más frecuente en los tumores procedentes de pacientes de alto riesgo en estadio III. Estudios previos ya habían descrito la presencia de una asociación entre la amplificación de 8q y la progresión tumoral (Isola et al., 1995; Jain et al., 2001), tanto en la mayoría de cánceres de mama como en otros tipos de neoplasias.

Asimismo, se observó en la misma serie de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo que el número de pérdidas genómicas se asoció con un mayor riesgo de recaída, al igual que ocurría en estudios previos llevados a cabo por otros grupos en cáncer de mama (Isola et al., 1995) o en otros tipos de cánceres (Knuutila et al., 1999). Este hecho refuerza la hipótesis que propone que las pérdidas de material genómico que afectan a genes supresores podrían desempeñar un papel crítico en la progresión tumoral.

De la misma manera, en este estudio se describió que las pacientes que presentaron una ganancia de la región 17q o una pérdida del locus 18p evolucionaron de forma significativamente diferente tras ser sometidas a altas dosis de quimioterapia (HDC) y trasplante autólogo de células madres (ASCT) (Climent et al., 2002). Por este motivo, el estudio de la importancia biológica y clínica de estas dos regiones debería de ser investigada en una serie más amplia de pacientes.

Para abordar la caracterización de las alteraciones de la expresión del receptor HER-2 en pacientes de cáncer de mama de alto riesgo, en esta parte de nuestro estudio analizamos el nivel de expresión y activación de HER-2 y su forma truncada p95^{HER-2}

en un grupo de muestras de cáncer de mama procedente de pacientes consideradas de alto riesgo por presentar diez o más metástasis ganglionares. Asimismo, correlacionamos el nivel de expresión y grado de activación de HER-2 con otros factores biológicos, estableciendo la posible relación entre estos últimos con una serie de factores clínicos.

Estas pacientes de cáncer de mama de alto riesgo pertenecieron a los estadios de la enfermedad II, III o IV. La media de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de estas pacientes se estimó en 76 meses, mientras que la supervivencia global de las mismas (SG) fue de 95 meses. Los tratamientos empleados antes de la resección de la mama se basaron en el uso de una combinación de antraciclinas a altas dosis y en un régimen de acondicionamiento de tipo quimioterápico previo al trasplante autólogo de células progenitoras (ASCT).

El análisis de los resultados obtenidos mostró que, al igual que ocurría en las pacientes incluidas en el estudio general, en este grupo de pacientes la expresión de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2} también se correlacionó con el nivel de expresión de la forma completa del mismo, p185^{HER-2}. Se observó asimismo que la activación de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, se correlacionaba con los niveles de activación de la forma completa del mismo ($P = 0.000$), de forma similar a lo acontecido con el resto de pacientes analizadas.

De la misma forma, observamos que en este grupo de pacientes la activación de HER-2 se asoció con la activación de las vías de transducción de señal Ras-Raf-MAPK y PI3-K/Akt. Así, nuestros resultados demuestran que los niveles de expresión de p185^{HER-2} fosforilado se correlacionaron de forma significativa con el grado de activación de MAPK ($P = 0.000$). La expresión de p185^{HER-2} fosforilado fue asimismo significativamente mayor en el grupo de muestras que presentaron una elevada activación de Akt ($P = 0.041$). Esta misma relación pudo observarse en las pacientes analizadas en la primera parte de nuestro estudio.

En efecto, es interesante destacar que de todos los grupos de pacientes de cáncer de mama incluidos en nuestro análisis, exclusivamente en el grupo de pacientes de alto riesgo la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, fosforilada se expresó con mayor frecuencia en las muestras que presentaron asimismo unos elevados niveles de activación de MAPK. En este sentido, el 85.7% de las muestras con altos niveles de MAPK fosforilado presentaron simultáneamente p95^{HER-2} fosforilado. Por tanto, en estas pacientes la activación de p95^{HER-2} se correlacionó significativamente con el grado de expresión de MAPK fosforilado ($P = 0.007$), lo que parece sugerir la existencia de una asociación entre ambos parámetros biológicos en el desarrollo de metástasis ganglionares en cáncer de mama.

Asimismo, un punto importante de nuestro estudio lo constituye el hecho de que la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes de cáncer de mama de alto riesgo cuyas muestras tumorales presentaron expresión de p95^{HER-2} fosforilado y MAPK activado simultáneamente fue significativamente menor, con una media de supervivencia que se estimó en 47 meses, comparada con aquella de las pacientes que no presentaron activación de la forma truncada de HER-2, en cuyo caso la media de supervivencia se estableció en 67 meses ($P < 0.05$). Sin embargo, la expresión simultánea de la forma completa de HER-2 fosforilada y MAPK no condicionó la evolución de este grupo de pacientes, siendo en este caso la media de supervivencia similar en ambos grupos. Por tanto, nuestros datos indican que, en el grupo de pacientes de mama de alto riesgo, exclusivamente la asociación entre la activación de p95^{HER-2} y de MAPK demostró repercutir negativamente en la supervivencia libre de enfermedad de éstas.

En base a nuestros datos experimentales, en el estudio general habíamos sugerido que la presencia de la forma truncada del receptor HER-2, p95^{HER-2}, identificaba un grupo de pacientes con significativamente peor pronóstico, menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG). Al analizar los datos obtenidos del estudio del grupo de pacientes de alto riesgo, observamos que la

presencia de p95^{HER-2} fosforilado y la consiguiente activación de la vía MAPK identifica, asimismo, un subgrupo que presenta un mayor riesgo de recaída y muerte por la enfermedad.

Asimismo, y al igual que ocurría con MAPK, y de forma exclusiva en el grupo de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo, la presencia de p95^{HER-2} fosforilado fue significativamente mayor en las muestras que presentaron una mayor actividad de Akt ($P = 0.038$), comparada con aquellas en las que los niveles de expresión de Akt fosforilado fueron menores. Puesto que el criterio de inclusión de estas pacientes en el grupo de las consideradas de alto riesgo fue la existencia de más de diez metástasis ganglionares, este dato parece sugerir la existencia de una cooperación entre la activación de p95^{HER-2} y Akt en el desarrollo de dichas metástasis en cáncer de mama.

En la siguiente fase de nuestro estudio, y con el fin de conocer más detalladamente la implicación de las formas completa y trunca de HER-2 en el desarrollo de las metástasis ganglionares y en el pronóstico de este grupo de pacientes, procedimos a la comparación del grado de activación de ambas formas del receptor HER-2 entre el grupo de muestras pertenecientes a pacientes carentes de ganglios metastatizados y el grupo de muestras procedentes de pacientes con más de diez ganglios metastatizados, consideradas de alto riesgo.

En este sentido, observamos que la expresión de p185^{HER-2} fosforilado fue similar en las muestras pertenecientes a pacientes carentes de afectación ganglionar comparadas con el grupo de pacientes con un elevado grado de afectación ganglionar ($P > 0.1$). En cambio, la expresión de p95^{HER-2} fosforilado fue significativamente mayor en las pacientes con más de diez ganglios afectados que en aquellas pacientes en las que no se detectaron ganglios metastatizados ($P = 0.020$).

F. Conclusiones

F. Conclusiones

1. La forma completa del receptor de membrana HER-2, p185^{HER-2}, se expresó con una frecuencia del 71.8% de los casos de cáncer de mama analizados en nuestro estudio, hallándose sobreexpresada en el 22.3% de los mismos. La forma truncada de HER-2 obtenida mediante un mecanismo de corte proteolítico, p95^{HER-2}, se presentó en el 26.7% de las muestras analizadas. Asimismo, se detectó una asociación significativa entre la expresión de la forma truncada p95^{HER-2} y elevados niveles de expresión de la forma completa del receptor HER-2, p185^{HER-2}.
2. La forma truncada p95^{HER-2} mostró una estrecha correlación con el grado de afectación ganglionar. Así, la expresión de p95^{HER-2} fue significativamente más frecuente en los tumores de mama procedentes de pacientes con un número más elevado de metástasis ganglionares, siendo su expresión mayor en dichas metástasis que en los tumores primarios de mama. Estos datos indican que p95^{HER-2} podría poseer un importante papel como causa del desarrollo o como marcador de metástasis loco-regionales, el principal factor pronóstico de mala evolución del cáncer de mama. En cambio, la sobreexpresión de la forma completa del receptor, p185^{HER-2}, fue similar en ambos tipos de muestras tisulares.
3. La sobreexpresión de p95^{HER-2} se asoció con bajos niveles de expresión de receptores de estrógenos y progesterona, mientras que la sobreexpresión de la forma completa, p185^{HER-2}, se correlacionó con bajos niveles de receptores de progesterona.
4. La sobreexpresión de p95^{HER-2} se correlacionó de forma estadísticamente significativa con una peor evolución de la enfermedad. Las pacientes cuyos tumores sobreexpresaron p95^{HER-2} presentaron una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) (39 meses) comparadas con aquellas con bajos niveles de

expresión de la misma (139 meses). Por otra parte, únicamente el 36.6% de las pacientes que presentaron elevados niveles de p95^{HER-2} permanecieron libres de enfermedad transcurridos 5 años desde el diagnóstico y tratamiento médico-quirúrgico.

5. En nuestro estudio, el análisis multivariado mostró que el grado de afectación ganglionar, el estadio de la enfermedad y la expresión de receptores de estrógenos fueron factores con valor pronóstico en cáncer de mama. La forma truncada p95^{HER-2}, cuya expresión también se ha detectado en pacientes sin metástasis ganglionares, mostró ser un factor con valor pronóstico de la supervivencia y su presencia en el tumor podría servir para identificar el subgrupo de pacientes con mayores probabilidades de recaída y que podrían, por tanto, beneficiarse de una terapia sistémica adyuvante. Por otra parte, en nuestro análisis p185^{HER-2} no mostró ser un factor pronóstico en cáncer de mama.
6. La expresión de la forma truncada del receptor HER-2 en cáncer de mama, p100^{HER-2}, obtenida mediante un mecanismo de procesamiento alternativo del RNAm, se asoció significativamente con la presencia de la forma completa p185^{HER-2}. Asimismo, p100^{HER-2} se presentó con mayor frecuencia en las muestras tumorales pertenecientes a pacientes sin afectación ganglionar, así como en aquellas en estadio I de la enfermedad. Este hecho sugiere que la presencia de p100^{HER-2} en los tumores primarios de mama se asocia a formas menos agresivas de la enfermedad.
7. El factor de crecimiento heregulina se detectó con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de mama que sobreexpresaron p185^{HER-2} y la forma activa del mismo. Este hecho confirma la participación de este factor de crecimiento en la activación de la forma completa del receptor de membrana HER-2 en cáncer de mama. En cambio, no se estableció una asociación significativa entre la

presencia de heregulina y la expresión y/o activación de la forma truncada p95^{HER-2} en los tumores analizados en nuestro estudio.

8. La activación de p95^{HER-2} fue más frecuente en las muestras que sobreexpresaron simultáneamente p185^{HER-2} fosforilado y se correlacionó con un mayor grado de afectación ganglionar, con los estadios más avanzados de la enfermedad y con el histotipo ductal infiltrante. La expresión de p95^{HER-2} fosforilado fue 1.6 veces más frecuente en las muestras de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo que en las de pacientes sin afectación ganglionar. Por otra parte, la expresión de p185^{HER-2} fosforilado fue similar en ambos grupos de pacientes.
9. La expresión de la forma completa, p185^{HER-2}, y truncada, p95^{HER-2}, fosforiladas se asoció significativamente con la activación de MAPK. La activación de p95^{HER-2} y MAPK se correlacionó significativamente con un mayor grado de afectación ganglionar. Estos datos sugieren que la activación conjunta de p95^{HER-2} y MAPK en el tumor podría ser un marcador de la existencia de metástasis ganglionares y caracterizar un grupo de pacientes de cáncer de mama con mayores probabilidades de sufrir formas más agresivas de la enfermedad. Por otra parte, en el grupo de pacientes de cáncer de mama de alto riesgo exclusivamente la asociación entre la activación de p95^{HER-2} y MAPK demostró repercutir negativamente en la SLE de estas pacientes.
10. La sobreexpresión de p185^{HER-2} fosforilado se asoció significativamente con elevados niveles de activación de Akt. Por otra parte, la activación de p95^{HER-2} y Akt se asoció de forma significativa con un mayor grado de afectación ganglionar. Este dato sugiere que aquellos tumores con un mayor potencial metastásico podrían presentar una cooperación entre la activación de p95^{HER-2} y Akt.

G. Referencias

G. Referencias

Adeyinka, A., Mertens, F., Bondeson, L., Garne, J.P., Borg, A., Baldetorp, B., Pandis, N. Cytogenetic heterogeneity and clonal evolution in synchronous bilateral breast carcinomas and their lymph node metastases from a male patient without any detectable BRCA2 germline mutation. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **118**: 42-47, 2000.

Agrup, M., Stal, O., Olsen, K., Wingren, S. C-erbB-2 overexpression and survival in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **63**: 23-29, 2000.

Aguilar, Z., Akita, R.W., Finn, R.S., Ramos, B.L., Pegram, M.D., Kabbinavar, F.F., Pietras, R.J., Pisacane, P., Sliwkowski, M.X., Slamon, D.J. Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene*, **18**: 6050-6062, 1999.

Aigner, A., Juhl, H., Malerczyk, C., Tkybusch, A., Benz, C.C., Czubayko, F. Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene*, **20**:2101-2111, 2001.

Akiyama, T., Matsuda, S., Namba, Y., Saito, T., Toyoshima, K., Yamamoto, T. The transforming potential of the c-erbB-2 protein is regulated by its autophosphorylation at the carboxyl-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.*, **11**:833-842, 1991.

Allred, D.C., Clark, G.M., Tandon, A.K., Molina, R., Tormey, D.C., Osborne, C.K., Gilchrist, K.W., Mansour, E.G., Abeloff, M., Eudey, L., McGuire, W.L. HER-2/neu in breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of *in situ* carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **10**: 1049-1056, 1992.

Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol.*, **11**:155-168, 1998.

Altiok, S., Batt, D., Altiok, N., Papautsky, A., Downward, J., Roberts, T.M., Avraham, H. Heregulin induces phosphorylation of BRCA1 through phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 32274-32278, 1999.

Alroy, I., Yarden, Y. The ErbB signaling network in ebyrogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interaction. *FEBS Lett.*, **410**: 83-86,1997.

Andrulis, I.L., Bull, S.B., Blackstein, M.E., Sutherland, D., Mak, C., Sidlofsky, S., Pritzker, K.P., Hartwick, R.W., Hann, W., Lickley, L., Wilkinson, R., Qizilbash, A., Ambus, U., Lipa, M., Weizel, H., Katz, A., Baida, M., Mariz, S., Stoik, G., Dacamara, P., Strongitharm, D., Geddie, W., McCready, D. *neu/erbB-2* amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **16**: 1340-1349, 1998.

Armstrong, B., Doll, R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer*, **15**: 617-631, 1975.

- Aroian, R.V., Koga, M., Mendel, J.E., Ohshima, Y., Sternberg, P.W. The *let-23* gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature*, **348**:693-699, 1990.
- Bacus, S.S., Gudkov, A.V., Zelnick, C.R., Chin, D., Stern, R., Stancovski, I., Peles, E., Ben-Baruch, N., Farbstein, H., Lupu, R. Neu differentiation factor (heregulin) induces expression of intercellular adhesion molecule 1: implications for mammary tumors. *Cancer Res.*, **53**:5251-5261,1993.
- Barth, A., Craig, P.H., Silverstein, M.J. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer*, **79**: 1918-1922, 1997.
- Baselga, J y Mendelsson, J. Receptor blockade with monoclonal antibodies as anti-cancer therapy. *Pharmacol. Ther.*, **64**: 127-54. 1994.
- Beckmann, M.W., Niederacher, D., Massenkeil, G., Tutschek, B., Beckmann, A., Schenko, G., Schnurch, H.G., Bender, H.G. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantage of prediction in recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology*, **53**: 441-447, 1996.
- Beerli, R.R, Graus-Porta, D., Woods-Cook, K., Chen, X., Yarden, Y., Hynes, N.E. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol. Cell. Biol.*, **15**:6496-6505, 1995.
- Ben-Levy, R., Paterson, H.F., Marshall, C.J., Yarden, Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J.*, **13**: 3302-3311, 1994.
- Bittner, J.J. Relation of nursing to the extra-chromosomal theory of breast cancer in mice. *Am. J. Cancer*, **35**: 90-97, 1947.
- Black, R.A., White, J.M. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10**: 654-659, 1998.
- Blaszyk, H., Hartmann, A., Cunningham, J.M., Schaid, D., Wold, L.E., Kovach, J.S., Sommer, S.S. A prospective trial of midwest breast cancer patients: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int. J. Cancer*. **89**: 32-38, 2000.
- Blobel, C.P., Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell*, **90**: 589-592, 1997.
- Borresen, A.L., Andersen, T.I., Garber, J., Barbier-Piroux, N., Thorlacius, S., Eyfjord, J., Ottestad, L., Smith-Sorensen, B., Hovig, E., Malkin, D. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res.*, **52**: 3234-3236, 1992.
- Bullen, B.A., Skrinar, G.S., Beitins, I.Z., von Mering, G., Turnbull, B.A., McArthur, J.W. Induction of menstrual disorders by strenuous exercise in untrained women. *N. Engl. J. Med.* **31**: 1349-1353, 1985.
- Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y.C., Wilson, J.A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., Yeager, H., Morava-Protzner, I., Kapusta, L., Franssen, E., Pritchard, K.I.,

- Slingerland, J.M. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat. Med.*, **3**: 227-230, 1997.
- Carlomagno, C., Perrone, F., Gallo, C., DeLaurentiis, M., Lauria, R., Morabito, A., Pettinato, G., Panico, L., D'Antonio, A., Bianco, A.R., De Placido, S. c-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J. Clin. Oncol.*, **14**: 2702-2708, 1996.
- Carpenter, G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell. Biol.*, **146**:697-702, 1999.
- Carraway, K.L., Sliwkowski, M.X., Akita, R., Platko, J.V., Guy, P.M., Nuijens, A., Diamonti, A.J., Vandlen, R.L., Cantley, L.C., Cerione, R.A. The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.*, **269**: 14303-14306, 1994.
- Carter, C.L., Allen, C., Henson, D.E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer. *Cancer*, **63**: 181-187, 1989.
- Chang, H., Riese, D.J., Gilbert, W., Stern, D.F., Mc Mahan, U.J. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene *Nature*, **387**: 509-512, 1997.
- Chen, J., Birkholtz, G.G., Lindblom, P., Rubio, C., Lindblom, A. The role of ataxia-telangiectasia heterozygotes in familial breast cancer. *Cancer Res.*, **58**: 1376-1379, 1998.
- Christianson, T.A., Doherty, J.K., Lin, Y.J., Ramsey, E.E., Holmes, R., Keenan, E.J., Clinton, G.M. NH₂-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res.*, **15**: 5123-5129, 1998.
- Claus, E.B., Risch, N., Thompson, W.D. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**: 232-242, 1991.
- Climent, J., Martinez-Climent, J.A., Blesa, D., Garcia-Barchino, MJ, Saez, R., Sanchez-Izquierdo, D., Azagra, P., Lluch, A., Garcia-Conde, J. Genomic loss of 18p predicts an adverse clinical outcome in patients with high-risk breast cancer. *Clin. Cancer. Res.*, **8**: 3863-3869, 2002.
- Codony-Servat, J., Albanel, J., Lopez-Talavera, J.C., Arribas, J., Baselga, J. Cleavage of the HER-2 ectodomain is a pernanadate activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases TIMP-1 in breast cancer cells. *Cancer Res.*, **59**: 1196-1201, 1999.
- Colomer, R., Montero, S., Lluch, A., Ojeda, B., Barnadas, A., Casado, A., Massutí, A., Cortés-Funes, H., Lloveras, B. Circulating HER-2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, **6**: 2356-2362, 2000.
- Daly, J.M., Olayioye, M.A., Wong, A.M., Neve, R., Lane, H.A., Maurer, F.G., Hynes, N.E. NDF/hereregulin-induced cell cycle changes and apoptosis in breast tumour cells: role of PI3 kinase and p38 MAP kinase pathways. *Oncogene*, **18**: 3440-3451, 1999.

- Depowski, P.L., Brien, T.P., Sheehan, C.E., Stylos, S., Johnson, R.L., Ross, J.S. Prognostic significance of p34^{cdc2} cyclin-dependent kinase and MIB1 overexpression, and HER-2/*neu* gene amplification detected by fluorescence *in situ* hybridization in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, **112**: 459-469, 1999.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.*, **12**: 3499-3511, 1998.
- DiFiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., Aaronson, S.A. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, **237**: 178-182, 1987.
- DiGiovanna, M.P., Carter, D., Flynn, S.D., Stern, D.F. Functional assay for HER-2/*neu* demonstrates active signalling in a minority of HER-2/*neu*-overexpressing invasive human breast tumours. *Br. J. Cancer*, **74**: 802-806, 1996.
- Dillon, D.A., Howe, C.L., Bosari, S., Costa, J. The molecular biology of breast cancer: accelerating clinical applications. *Crit. Rev. Oncog.*, **9**: 125-140, 1998.
- Dunning, A.M., Healey, C.S., Pharoah, P.D., Teare, M.D., Ponder, B.A., Easton, D.F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **8**: 843-854, 1999.
- Easton, D.F., Bishop, D.T., Ford, D., Crockford, G.P. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.*, **52**: 678-701, 1993.
- Esteva, F.J., Hortobagyi, G.N., Sahin, A.A., Smith, T.L., Chin, D.M., Liang, S.Y., Pusztai, L., Buzdar, A.U., Bacus, S.S. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol. Onco. Res.*, **7**: 171-177, 2001.
- Esteva-Lorenzo, F.J., Sastry, L., King, C.R. The *erbB-2* gene: from research to application. In: Dickson RB, Salomon DS, eds. *Hormones and Growth Factors in Development and Neoplasia.*, 421-444, 1998.
- Falette, N., Paperin, M.P., Treilleux, I., Gratadour, A.C., Peloux, N., Mignotte, H., Tooke, N., Lofman, E., Ingnas, M., Bremond, A., Ozturk, M., Puisieux, A. Prognostic value of P53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res.*, **58**: 1451-1455, 1998.
- Feigelson, H.S., Henderson, B.E. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, **17**: 2279-2284, 1996.
- Feigelson, H.S y Henderson, B.E. Textbook of breast cancer. A clinical guide to therapy. Second edition. Edited by Bonadonna, G., Hortobagyi, G.N., Gianni, A.M. Ed. Martin Dunitz, 2001.
- Ferguson, D.J., Anderson, T.J. Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast. *Br. J. Cancer*, **44**: 1777-1781, 1981.

- Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., Thor, A.D., Allred, D.C., Clark, G.M., Ruby, S.G., O'Malley, F., Simpson, J.F., Connolly, J.L., Hayes, D.F., Edge, S.B., Lichter, A., Schnitt, S.J. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **124**: 966-978, 2000.
- Frisch, R.E., Gotz-Welbergen, A.V., McArthur, J.W., Albright, T., Witschi, J., Bullen, B., Birnholz, J., Reed, R.B., Hermann, H. Delayed menarche and amenorrhea of college athletes in relation to age of onset of training. *JAMA*, **246**: 1559-1563, 1981.
- Fry, M. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res.*, **3**: 304-312, 2001.
- Gatti, R.A., Tward, A., Concannon, P. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol. Genet. Metab.*, **68**: 419-423, 1999.
- Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., Gordon, J.L. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*, **370**: 555-557, 1994.
- Gershtein, E.S., Shatskaya, V.A., Ermilova, V.D., Kushlinsky, N.E., Krasilnikov, M.A. Phosphatidylinositol 3-kinase expression in human breast cancer. *Clin. Chem. Acta*, **287**: 59-67, 1999.
- Gianni, A., Gianni, B. Five-year results of the randomized clinical trial comparing standard *versus* high-dose myeloablative chemotherapy in the adjuvant treatment of breast cancer with > 3 positive nodes (LN+). *Proc. ASCO*, **20**: 80, 2001.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., Hynes, N.E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO Journal*, **16**: 1647-1655, 1997.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Hynes, N.E. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 1182-1191, 1995.
- Groenen, L.C., Nice, E.C., Burgess, A.W. Structure-function relationships for the EGF/TGF-alpha family of mitogens. *Growth Factors*, **11**: 235-257, 1994.
- Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N., Ullrich, A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**: 184-189, 1999.
- Harbeck, N., Dettmar, P., Thomssen, C., Berger, U., Ulm, K., Kates, R., Hofler, H., Janicke, F., Graeff, H., Schmitt, M. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br. J. Cancer*, **80**: 419-426, 1999.
- Harris, J.R., Lippman, M.E., Veronesi, U., Willet, W. Breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **327**: 473-480, 1992.

- Harris, L.N., Trock, B., Berris, M., Esteva-Lorenzo, F., Paik, S. The role of ERBB2 extracellular domain in predicting response to chemotherapy in breast cancer patients. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **15**: A96 1996.
- Heber, D., Ashley, J.M., Leaf, D.A., Barnard, R.J. Reduction of serum estradiol in postmenopausal women given free access to low-fat high-carbohydrate diet. *Nutrition*, **7**: 137-139, 1991.
- Henderson, I.C. y Patek, A.J. The relationship between prognostic and predictive factor in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **52**: 261-268, 1998.
- Henderson, B.E., Ross, R.K., Pike, M.C., Casagrande, J.T. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.* **42**: 3232-3238, 1982.
- Hennighausen, L., Robinson, G.W. Signaling pathways in mammary gland development. *Dev. Cell.*, **1**: 467-475, 1998.
- Hermanto, U., Zong, C.S., Wang, L.H. ErbB2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth. *Oncogene*, **20**: 7551-7562, 2001.
- Hibshoosh, H. y Mansukhani, M.M. Textbook of breast cancer. A clinical guide to therapy. Second edition. Edited by Bonadonna, G., Hortobagyi, G.N., Gianni, A.M. Ed. Martin Dunitz, 2001.
- Higuchi, M., Robinson, D.S., Cailleau, R., Irie, R.F., Morton, D.L. A serologic study of cultured breast cancer cell lines: lack of antibody response to tumour specific membrane antigens in patients. *Clin. Exp. Immunol.*, **39**: 90-96, 1980.
- Hudziak, R.M., Schlessinger, J., Ullrich, A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA*, **84**: 7159-7163, 1987.
- Hynes, N.E., Stern, D.F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **198**: 165-184, 1994.
- Ingvarson, S. The Brca1 and Brca2 proteins and tumor pathogenesis. *Anticancer Res.*, **19**: 2853-2861, 1999.
- Ignatoski, K.M., Maehama, T., Markwart, S.M., Dixon, J.E., Livant, D.L., Ethier, S.P. ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br. J. Cancer*, **82**: 666-674, 2000.
- Isola, J.J., Kallioniemi, O.P., Chu, L.W., Fuqua, S.A., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Waldman, F.M. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am. J. Pathol.*, **147**: 905-911, 1995.

- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., Mekada, E. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.*, **17**: 7260-7272, 1998.
- Jain, A.N., Chin, K., Borresen-Dale, A.L., Erikstein, B.K., Eynstein Lonning, P., Kaaresen, R., Gray, J.W. Quantitative analysis of chromosomal CGH in human breast tumors associates copy number abnormalities with p53 status and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**: 7952-7957, 2001.
- Jones, J.T., Akita, R.W., Sliwkowski, M.X. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.*, **447**: 227-231, 1999.
- Kaprio, J., Rimpela, A., Winter, T., Viken, R.J., Rimpela, M., Rose, R.J. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum. Biol.*, **67**: 739-753, 1995.
- Kasprzyk, P.G., Song, S.U., Di Fiore, P.P., King, C.R. Therapy of an animal model of human gastric cancer using a combination of anti-erbB-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, **52**: 2771-2776, 1992.
- Karunagaran, D., Tzahar, E., Beerli, R.R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B.J., Seger, R., Hynes, N.E., Yarden, Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.*, **15**: 254-264, 1996.
- Keyomarsi, K., Tucker, S.L., Buchholz, T.A., Callister, M., Ding, Y., Hortobagyi, G.N., Bedrosian, I., Knickerbocker, C., Toyofuku, W., Lowe, M., Herliczek, T.W., Bacus, S.S. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **347**: 1566-1575, 2002.
- Klapper, L.N., Waterman, H., Sela, M., Yarden, Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.*, **60**: 3384-3398, 2000.
- Knuutila, S., Aalto, Y., Autio, K., Bjorkqvist, A.M., El-Rifai, W., Hemmer, S., Huhta, T., Kettunen, E., Kiuru-Kuhlefelt, S., Larramendy, M.L., Lushnikova, T., Monni, O., Pere, H., Tapper, J., Tarkkanen, M., Varis, A., Wasenius, V.M., Wolf, M., Zhu, Y. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am. J. Pathol.*, **155**: 683-694, 1999.
- Laemmli et al. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- Lane, H.A., Beuvink, I., Motoyama, A.B., Daly, J.M., Neve, R.M., Hynes, N.E. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 3210-3223, 2000.
- Lasfargues, E.Y., Coutinho, W.G., Redfield, E.S. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**: 967-978, 1978.

- Laya, M.B., Larson, E.B., Taplin, S.H., White, E. Effect of estrogen replacement therapy on the specificity and sensitivity of screening mammography. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 643-649, 1996.
- Leitzel, K., Teramoto, Y., Konrad, K., Chinchilli, V.M., Volas, G., Grossberg, H., Harvey, H., Demers, L., Lipton, A. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormonal therapy of breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **13**: 1129-1235, 1995.
- Lemmon, M.A., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D.M., Schlessinger, J. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.*, **16**: 281-294, 1997.
- Lenferink, A.E., Busse, D., Flanagan, W.M., Yakes, F.M., Arteaga, C.L. ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res.*, **61**: 6583-6591, 2001.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., Yarden, Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell*, **4**: 1029-1040, 1999.
- Lin, Y.J., Li, S., Clinton, G.M. Insulin and epidermal growth factor stimulate phosphorylation of p185HER-2/neu in the breast carcinoma line, BT474. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **69**: 111-119, 1990.
- Liu, W., Li, J., Roth, R.A. Heregulin regulation of Akt/protein kinase B in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **261**: 897-903, 1999.
- Lupu, R., Colomer, R., Kannan, B., Lippman, M.E. Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**: 2287- 2291, 1992.
- Luttrell, L.M., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**: 177-183, 1999.
- Mack, L., Kerkzelit, N., Doig, G., O' Malley, F.P. Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and immunohistochemical expression of p53, C-erb B2, bcl2 and ki-67. *Hum. Pathol.*, **28**: 974-979, 1997.
- Hibshoosh, H., Lattes, R. Immunohistochemical and molecular genetic approaches to soft tissue tumor diagnosis: a primer. *Semin Oncol.*, **24**: 515-525, 2001.
- Meyer, D., Birchmeier, C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature*, **378**: 386-390, 1995.
- Mikami, Y., Davis, J.G., Dobashi, K., Dougall, W.C., Myers, J.N., Brown, V.I., Greene, M.I. Carboxyl-terminal deletion and point mutations decrease the transforming potential of the activated rat neu oncogene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 7335-7339, 1992.

- Mirza, A.N., Mirza, N.Q., Vlastos, G., Singletary, E. Prognostic factors in node-negative breast cancer. *Ann. Surgery*, **235**: 20-26, 2002.
- Mittra, I., Redkar, A.A., Badwe, R.A. Prognosis of breast cancer: evidence for interaction between c-erbB-2 overexpression and number of involved axillary lymph nodes. *J. Surg. Oncol.*, **60**: 106-111, 1995.
- Molina, M.A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., Baselga, J. Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti-HER-2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated HER-2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.*, **61**: 4744-4749, 2001.
- Moreno, A., Lloveras, B., Figueras, A., Escobedo, A., Ramon, J.M., Sierra, A., Fabra, A. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast: Correlation between histologic clasification and biologic markers. *Mod. Pathol.*, **10**: 1088-1092, 1997.
- Mosley, B., Beckmann, M.P., March, C.J., Idzerda, R.L., Gimpel, S.D., VandenBos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., Jackson, J. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell.*, **59**: 335-348, 1989.
- Nakatani, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R.J., Roth, R.A. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem.*, **274**: 21528-21532, 1999.
- Neve, R.M., Sutterluty, H., Pullen, N., Lane, H.A., Daly, J.M., Krek, W., Hynes, N.E. Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene*, **19**: 1647-1656, 2000.
- Nieto, Y., Cagnoni, P.J., Nawaz, S., Shpall, E.J., Yerushalmi, R., Cook, B., Russell, P., McDermit, J., Murphy, J., Bearman, S.I., Jones, R.B. Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose. *J. Clin. Oncol.*, **18**: 2070-2080, 2000.
- O'Malley, F.P., Saad, Z., Kerkvliet, N., Doig, G., Stitt, L., Ainsworth, P., Hundal, H., Chambers, A.F., Turnbull, D.I., Bramwell, V. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erbB-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum. Pathol.*, **27**: 955-963, 1996.
- Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M., Hynes, N.E. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **274**: 17209-17218, 1999.
- Paik, S., Hazan, R., Fisher, E.R., Sass, R.E., Fisher, B., Redmond, C., Schlessinger, J., Lippman, M.E., King, C.R. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **8**: 103-112, 1990.
- Page, C., Huang, M., Jin, X., Cho, K., Lilja, J., Reynolds, R.K., Lin, J. Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells. *Int. J. Oncol.* **17**: 23-28, 2000.

- Paterson, M.C., Dietrich, K.D., Danyluk, J., Paterson, A.H., Lees, A.W., Jamil, N., Hanson, J., Jenkins, H., Krause, B.E., McBlain, W.A., Slamon, D.J., Fourney, R.M. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.*, **51**: 556-567, 1991.
- Parkin, D.M., Stjernsward, J., Muir, C.S. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull. World Health Organ.*, **62**: 163-182, 1984.
- Petch, L.A., Harris, J., Raymond, V.W., Blasband, A., Lee, D.C., Earp, H.S. A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 2973-2982, 1990.
- Peters, W.P., Rosner, G., Vredenburgh, J., Shpall, E. J., Crump, M., Marks, L., Cirincione, C., Hurd, D., Norton, L. Updated results of a prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents (AA) as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes (LN). *Proc. ASCO*, **20**: 81 2001.
- Phillips, K.A., Andrulis, I.L., Goodwin, P.J. Breast carcinomas arising in carriers of mutations in BRCA1 or BRCA2: are they prognostically different? *J. Clin. Oncol.*, **17**: 3653-3663, 1999.
- Press, M.F., Bernstein, L., Thomas, P.A., Meisner, L.F., Zhou, J.Y., Ma, Y., Hung, G., Robinson, R.A., Harris, C., El-Naggar, A.S., Slamon, D.J., Phillips, R.N., Ross, J.S., Wolman, S.R., Flom, K.J. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence *in situ* hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.*, **15**: 2894-2904, 1997.
- Key, T.J., Pike, M.C. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **24**: 29-43, 1988.
- Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I.C., Safe, S., Norris, J.D., McDonnell, D.P., Gaido, K.W., Bocchinfuso, W.P., Korach, K.S. Potency of combined estrogenic pesticides. *Science*, **275**: 405-406, 1997.
- Reed, W., Hannisdal, E., Boehler, P.J., Gundersen, S., Host, H., Marthin, J. The prognostic value of p53 and c-erbB-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*, **88**: 804-813, 2000.
- Rodenhuis, S., Bontenbal, M., Beex, L.V.A.M., van der Wall, E.D.J., Richel, M.A., Nooij, E.E., Voest, P., Hupperets, A.M., Westermann, O.B., Dalesio, E.G.E., Randomized phase III study of high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin in operable breast cancer with 4 or more axillary lymph nodes. *Proc. ASCO*, **19**: 286, 2000.
- Romieu, I., Hernandez-Avila, M., Lazcano, E., Lopez, L., Romero-Jaime, R. Breast cancer and lactation history in Mexican women. *Am. J. Epidemiol.*, **143**: 543-552, 1996.
- Rosen, P.P. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **9**:144-156, 1979.

- Rosen, P.P., Senie, R.T., Farr, G.H., Schottenfeld, D., Ashikari, R. Epidemiology of breast carcinoma: Age, menstrual status, and exogenous hormone usage in patients with lobular carcinoma in situ. *Surgery*, **85**:219-224, 1979.
- Ross, J.S y Fletcher, J.A. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Stem Cells*, **16**: 413-428, 1998.
- Sáez, R., Ramsey, E.E., Molina, M.A., García-Barchino, M.J., Rojo, F., Evans, A.J., Albanell, J., Keenan, E.J., Lluch, A., García-Conde, J., Baselga, J., Clinton, G.M. p95HER-2 predicts worse outcome in HER-2 positive breast cancer. *J. Natl. Cancer I.*, 2003. Mandado a publicar.
- Salomon, D.S., Kidwell, W.R., Kim, N., Ciardiello, F., Bates, S.E., Valverius, E., Lippman, M.E., Dickson, R.B., Stampfer, M. Modulation by estrogen and growth factors of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Recent Results Cancer Res.*, **113**: 57-69, 1989.
- Scorilas, A., Yotis, J., Stravolemos, K., Gouriotis, D., Keramopoulos, A., Ampela, K., Talieri, M., Trangas, T. *c-erbB-2* overexpression may be used as an independent prognostic factor for breast cancer patients. *Anticancer Res.*, **15**: 1543-1548, 1995.
- Scott, G.K., Robles, R., Park, J.W., Montgomery, P.A., Daniel, J., Holmes, W.E., Lee, J., Keller, G.A., Li, W., Fendly, B.M., Wood, W.I., Shepard, M., Benz, C.C. A truncated intracellular HER-2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 2247-2257, 1993.
- Segatto, O., King, C.R., Pierce, J.H., Di Fiore, P.P., Aaronson, S.A. Different structural alterations upregulate *in vitro* tyrosine kinase activity and transforming potency of the *erbB-2* gene. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 5570-5574, 1988.
- Simon, R., Nocito, A., Hubsher, T., Bucher, C., Torhorst, J., Scharml, P., Bubendorf, L., Mihatsch, M.M., Moch, H., Wilber, K., Schotzau, A., Kononen, J., Sauter, G. Patterns of HER-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **93**: 1141-1146, 2001.
- Singleton, T.P., Strickler, J.G. Clinical and pathologic significance of the *c-erbB-2* *HER-2/neu*) oncogene. *Pathol. Annu.*, **27**: 165-198, 1992.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*, **235**: 177-182, 1987.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**: 707-712, 1989.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Nat.l Cancer Inst.*, **51**: 1409-1416, 1973.

- Stein, R.A., Staros, J.V. Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. *J. Mol. Evol.*, **50**: 397-412, 2000.
- Tandon, A.K., Clark, G.M., Chamness, G.C., Ullrich, A., McGuire, W.L. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **7**: 1120-1128, 1989.
- Tang, C.K., Perez, C., Grunt, T., Waibel, C., Cho, C., Lupu, R. Involvement of heregulin-beta2 in the acquisition of the hormone-independent phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res.*, **56**: 3350-3358C, 1996.
- Tetu, B., Brisson, J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer*, **73**: 2359-2365, 1994.
- Thor, A.D., Liu, S., Edgerton, S., Moore, D., Kasowitz, K.M., Benz, C.C., Stern, D.F., DiGiovanna, M.P. Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu). A study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **18**: 3230-3239, 2000.
- Torregrosa, D., Bolufer, P., Lluch, A., Lopez, J.A., Barragan, E., Ruiz, A., Guillem, V., Munarriz, B., Garcia-Conde, J. Prognostic significance of *c-erbB-2/neu* amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clin. Chim. Acta.*, **262**: 99-119, 1997.
- Trempe, G.L. Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res.*, **57**: 33-41, 1976.
- Trichopoulos, D., MacMahon, B., Cole, P. Menopause and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**: 605-613, 1972.
- Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J.D., Klapper, L.N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B.J., Sela, M., Andrews, G.C., Yarden, Y. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.*, **16**: 4938-4950, 1997.
- Van de Vijver, M.J., Peterse, J.L., Mooi, W.J., Wisman, P., Lomans, J., Dalesio, O., Nusse, R. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N. England. J. Med.*, **319**: 1239-1245, 1988.
- Venkateswarlu, S., Dawson, D.M., St Clair, P., Gupta, A., Willson, J.K., Brattain, M.G. Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, **21**: 78-86, 2002.
- Wang, T.C., Cardiff, R.D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A., Schmidt, E.V. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*, **369**: 669-671, 1994.
- Wasserman, J.D., Freeman, M. An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the *Drosophila* egg. *Cell*, **95**: 355-364, 1998.

- Waterman, H., Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.*, **490**: 142-152, 2001.
- Willett, W.C., Browne, M.L., Bain, C., Lipnick, R.J., Stampfer, M.J., Rosner, B., Colditz, G.A., Hennekens, C.H., Speizer, F.E. Relative weight and risk of breast cancer among premenopausal women. *Am. J. Epidemiol.*, **122**: 731-740, 1985.
- Weng, L.P., Smith, W.M., Dahia, P.L., Ziebold, U., Gil, E., Lees, J.A., Eng, C. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res.*, **59**: 5808-5814, 1999.
- Wingo, P.A., Tong, T., Bolden, S. Cancer statistics. *C.A. Cancer J. Clin.*, **45**: 8-30, 1995.
- Wingo, P.A., Newsome, K., Marks, J.S., Calle, E.E., Parker, S.L. The risk of breast cancer following spontaneous or induced abortion. *Cancer Causes Control*, **8**: 93-108, 1997.
- Xing, W.R., Gilchrist, K.W., Harris, C.P. FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **39**: 203-212, 1996.
- Yakes, F.M., Chinratanalab, W., Ritter, C.A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C.L. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.*, **62**: 4132-4141, 2002.
- Yamauchi, H., O'Neill, A., Gelman, R., Carney, W., Tenney, D.Y., Hosch, S., Hayes, D. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J. Clin. Oncol.*, **15**: 18-25, 1996.
- Yarden, Y. Biology of HER-2 and its importance in breast cancer. *Oncology*, **61**: 1-13, 2001.
- Zabrecky, J.R., Lam, T., McKenzie, S.J., Carney, W. The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J. Biol. Chem.*, **266**: 1716-1720, 1991.
- Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., Godowski, P.J. Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, **94**: 9562-9567, 1997.
- Zhou, B.P., Hu, M.C., Miller, S.A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S.Y., Hung, M.C. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**: 8027-8031, 2000.