

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA



TESIS DOCTORAL

M^a ANGELES LLORENS RIVERA

**EXPRESION DE RECEPTORES HORMONALES, FACTORES DE
CRECIMIENTO Y ONCOGENES EN CANCER DE MAMA EN HUMANOS**

Director: Dr. MONTSERRAT PUENTE CUEVA

Hospital Universitario San Carlos
Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición
Departamento de Medicina. Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

1994

A César

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Montserrat Puente Cueva por haberme dado la oportunidad de conocer y dedicarme durante estos años al apasionante mundo de la ciencia y por el interés que se ha tomado en mi formación. Ha habido muchas dificultades pero el esfuerzo ha merecido la pena.

Agradezco al Dr. A.L. Charro Salgado, jefe del Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición del Hospital Universitario San Carlos el haberme admitido en su grupo de trabajo y a los miembros de este Servicio que de una u otra manera me han apoyado.

También quiero agradecer a mi tutor, el Dr. J. Odriozola Lino, por su ayuda en los trámites necesarios para la presentación de esta tesis y a cada miembro del Tribunal por haber accedido a estar en él.

A la Dra. Adela Pelayo por su colaboración en la realización de parte del trabajo, por sus consejos y por el tiempo dedicado.

Quiero agradecer especialmente la amistad, el apoyo y la paciencia de las personas con las que he compartido el día a día del laboratorio: M^a José, Elena, M^a Carmen, Eva, Sandra, M^a Jesús. Ellas han sido mi impulso en muchos momentos y, de la misma forma que han sufrido conmigo, espero que esta Tesis les de un poquito de la satisfacción que supone para mí.

De forma especial quiero agradecer al Dr. M. Barbacid la oportunidad de vivir durante unos meses la investigación en primera línea. A Fabienne por su dedicación y amistad aquellos días y al resto del laboratorio por conseguir que me diera pena volver.

Agradezco a Lola y a Richi su inestimable ayuda en la maduración de este proyecto, sus críticas correcciones y también las noches sin dormir. Ellos se han ganado el título de padrinos de esta tesis.

A Amelia Nieto y al laboratorio de Juan Ortín por su ayuda en la transformación de bacterias y a P. Martín (C.S.I.C.) por su ayuda con los datos estadísticos.

A la Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid y a la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer por haber financiado parte del tiempo que he dedicado a este trabajo.

Gracias a Gemma Rodríguez-Tarduchy por su ayuda en mis comienzos con el RNA y por todas las conversaciones sobre la ciencia y también sobre la vida. A mis amigos "extracientíficos" por su continuo ánimo, su respeto y su cariño cuando más lo he necesitado.

A mi padre y a mi madre por ser, siempre y a pesar de todo, mis fieles incondicionales.

A César por compartir también conmigo esta experiencia, por su constante apoyo y su importante ayuda y sobre todo por creer en mí. Sin él todo hubiera sido mucho más difícil.

INDICE

INTRODUCCION

1.- La glándula mamaria	2
1.1.- Morfología	2
1.2.- Control hormonal del desarrollo mamario	3
2.- Factores que controlan el crecimiento en cáncer de mama	4
2.1 - Receptores de estrógenos y progesterona en cáncer de mama	6
2.1.1.- Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas	6
2.1.2.- Características de los receptores de estrógenos y de progesterona	8
2.1.3.- Dependencia hormonal en cáncer de mama	9
2.2.- Factores de crecimiento en cáncer de mama	11
2.2.1.- Factor de crecimiento epidérmico/Factor de crecimiento transformante alfa	13
2.2.2.- Factor de crecimiento transformante beta	15
2.3.- El receptor de EGF. Receptores tirosín-quinasa	18
2.3.1.- Receptores tirosín-quinasa. Generalidades	18
2.3.2.- El receptor de EGF	20
3.- Factores genéticos	21
3.1.- Generalidades	21
3.2.- Oncogenes y Genes supresores	23
3.2.1.- Oncogén <i>c-erbB-2/HER-2/neu</i>	24
3.2.1.- Otros oncogenes y genes supresores en cáncer de mama	25
4.- Aspectos clínicos del cáncer de mama	26
4.1.- Clasificación en estadios del cáncer de mama. Sistema TMN	26
4.2.- Parámetros anatomopatológicos	27
4.2.1.- Grados histológicos de malignidad	27
4.2.2.- Clasificación histológica	28
• Carcinomas "in situ"	28
• Histología de los cánceres de mama invasivos	29
4.3.- Nuevas posibilidades terapéuticas	31

OBJETIVOS	34
------------------------	-----------

MATERIALES Y METODOS	36
-----------------------------------	-----------

MATERIALES	36
------------------	----

1.- Material Biológico	36
1.1.- Muestras tumorales	36
1.2.- Líneas Celulares	36
1.3.- Estirpes Bacterianas	36
2.- Material no biológico	37
2.1.- Compuestos radiactivos	37
2.2.- Sondas de cDNA	37
2.3.- Proteínas y enzimas	38
2.4 - Reactivos para cultivos celulares	38
2.5.- Reactivos para cultivo de bacterias	38
2.6.- Equipos de reactivos	39
2.7.- Reactivos específicos	39
2.8.- Reactivos generales	39

METODOLOGÍA	40
-------------------	----

1.- Procesamiento de las muestras	40
2.- Estudio de niveles de proteína	41
2.1.- Homogeneización. Obtención de las fracciones celulares	41

2.2.- Determinación del contenido de receptores de estrógenos y progesterona	41
2.3.- Cuantificación de receptores de EGF.....	43
2.3.1.- Marcaje del EGF con ¹²⁵ I	43
2.3.2.- Ensayo de receptores para EGF	45
2.4.- Análisis de TGF- α y TGF- β	45
2.4.1.- Preparación de las muestras	45
2.4.2.- Cuantificación de TGF- α	46
2.4.3.- Cuantificación de TGF- β	48
2.5.- Cuantificación de la proteína p185 codificada por el oncogén <i>c-erbB-2/HER-2/neu</i>	49
2.5.1.- Preparación de las muestras	49
2.5.2.- Ensayo	49
3.- Estudio de expresión génica	51
3.1.- Extracción de RNA	51
3.2.- Técnica de Northern	51
3.3.- Obtención de las sondas.....	52
3.4.- Marcaje de las sondas	52
3.5.- Soluciones	53
4.- Técnicas histológicas.....	53
4.1.- Inmunocitoquímica para la determinación de receptores hormonales	54
4.2.- Tinción con hematoxilina-eosina	54
5.- Método estadístico.....	54
RESULTADOS	56
1.- Características descriptivas de las muestras.....	56
1.1.- Tipo histológico	56
1.2.- Grado de diferenciación	57
1.3.- Edad	59
1.4.- Metástasis linfoganglionares.....	60
2.- Estudio de expresión	61
2.1.- Receptores hormonales: ER y PR	62
2.1.1.- Estudio de niveles de proteína	62
2.1.2.- Estudio de expresión génica	64
2.1.3.- Correlaciones con las características de los tumores.....	65
2.1.4.- Correlación enzimoimmunoensayo/inmunocitoquímica	68
2.2.- Receptores de EGF.....	70
2.2.1.- Estudio de niveles de proteína	70
2.2.2.- Estudio de expresión génica	71
2.2.3.- Correlación con las características de los tumores.....	72
2.3.- Factor de crecimiento transformante- α (TGF- α).....	73
2.3.1.- Estudio de niveles de proteína	73
2.3.2.- Correlaciones con otros parámetros.....	74
2.4.- Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)	76
2.4.1.- Estudio de niveles de proteína	76
2.4.2.- Estudio de expresión génica	78
2.4.3.- Correlaciones con las características de los tumores.....	79
2.5.- Proteína p185	81
2.5.1.- Estudio de niveles de proteína	81
2.5.2.- Correlaciones con las características de los tumores.....	81
DISCUSION	86
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFIA	102

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AR	Ampiregulina
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
Ci	Curio
CSF-1R	Receptor del factor estimulante de colonias-1
CV	Coefficiente de variación
DAB	Diaminobencidina
dCTP	Deoxycitidina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Acido etiléndiaminotetracético
EGF	Factor epidérmico de crecimiento
EGFR	Receptor del EGF
EIA	Enzimoimmunoensayo
ELISA	<i>Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima</i>
ER	Receptor de estrógenos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAPDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HAP	Hidroxiapatita
HB-EGF	Factor tipo EGF de unión a la heparina
HGFR	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRE	Elementos de respuesta a hormonas
hsp	Proteína de choque térmico
ICA	Inmunocitoquímica
IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
IgG	Inmunoglobulina G
kb, bp	kilobase, par de base
kd	Constante de disociación
KDa	Kilodalton (s)
LBA	Ensayo de unión al ligando

MDGF	Factor de crecimiento derivado de la mama
MEM	Medio mínimo esencial
MGFR	Receptor del factor de crecimiento de mastocitos
MOPS	Acido morfolinopropanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
MTG	Monotioglicerol
NDF	Factor de diferenciación de <i>neu</i>
NGFR	Receptor del factor nervioso de crecimiento
OPD	o-fenilendiamina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	Polietilén glicol
PR	Receptor de progesterona
Rb	Retinoblastoma
RIA	Radioinmunoensayo
RTK	Receptor tirosín-quinasa
SA	Actividad específica
SBR	Sistema Scarff-Bloom-Richardson
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
TGF-α	Factor de crecimiento transformante- α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF	Factor de necrosis tumoral
VGF	Factor de crecimiento de viruela

INTRODUCCION

I.- LA GLANDULA MAMARIA

I.1.- MORFOLOGIA

La glándula mamaria está formada por células epiteliales de origen ectodérmico (parénquima) y por un componente de tejido conectivo de origen mesodérmico denominado estroma [1] que lleva vasos sanguíneos y fibras nerviosas a la glándula.

La glándula mamaria presenta una morfología variable a lo largo del desarrollo. En el nacimiento ya se ha establecido un sistema rudimentario de conductos en el que pueden reconocerse células epiteliales y mioepiteliales. En la pubertad, en respuesta a los niveles crecientes de hormonas ováricas sexuales, se desarrolla el sistema de conductos epiteliales, se acumula grasa en el tejido conectivo entre los lóbulos y los lobulillos, aunque las unidades secretoras verdaderas no se formarán hasta la gestación. Durante la lactancia, los cambios morfológicos son mínimos. Después de la menopausia las estructuras epiteliales y del tejido conectivo experimentan una atrofia provocada por la deficiencia hormonal.

Anatómicamente, el tejido glandular de la mama sexualmente madura (en reposo), está constituido por 15 a 20 lóbulos dispuestos radialmente en dirección al pezón. Cada lóbulo tiene su propio conducto excretor y está separado de los otros por capas de tejido conectivo fibroso y grasa, que siguen un trayecto vertical a través de la mama.

Los lóbulos están formados por múltiples lobulillos conectados por tejido conectivo, vasos sanguíneos y conductos, y a su vez los lobulillos están constituidos por conjuntos de alveolos o acinos que se abren a múltiples conductillos galactóforos. Estos pequeños conductos se unen para formar conductos mayores y, finalmente, se forma un conducto simple para cada lóbulo o conducto galactóforo principal que tienen su propia salida en el pezón.

En la glándula lactante pueden diferenciarse al menos tres tipos celulares: células epiteliales no secretoras alrededor de los conductos, células epiteliales secretoras en los conductos terminales así como en los lóbulos y alveolos y células mioepiteliales que rodean los alveolos y los pequeños conductos dentro de la lámina basal. Estas células mioepiteliales tienen origen epitelial pero poseen filamentos citoplasmáticos semejantes a los de las células de músculo liso.

1.2.- CONTROL HORMONAL DEL DESARROLLO MAMARIO

Se han definido distintos tipos de **hormonas** como factores importantes en el desarrollo mamario. Entre éstas, se encuentran hormonas ováricas (estrógenos y progesterona), adrenales (glucocorticoides), pituitarias (prolactina y hormona de crecimiento), tiroideas y, durante el embarazo, las placentarias (esteroides y lactógeno placentario). En períodos de desarrollo de la glándula mamaria se han detectado niveles elevados de estrógenos y progesterona circulantes. Los estrógenos son responsables de la formación de depósitos de grasa, desarrollo del estroma y crecimiento de un amplio sistema de conductos. La progesterona y la prolactina estimulan el crecimiento y funcionalidad de los lobulillos y alveolos.

La presencia de sitios de unión de alta afinidad para un gran número de hormonas en distintas fracciones subcelulares de la glándula mamaria, sugiere la existencia de acciones directas en el tejido para llevar a cabo los diferentes efectos biológicos. Entre las hormonas que presentan receptores intracelulares en las células epiteliales se incluyen los estrógenos, progesterona, hormonas tiroideas y glucocorticoides. La prolactina y las catecolaminas, sin embargo, se unen a receptores de membrana.

En tejido mamario normal maduro se ha descrito la presencia de **receptores** de estrógenos(ER) fundamentalmente en las células epiteliales y, de forma mayoritaria, en los lobulillos mientras que las células del estroma no expresan ER. Se estima que cerca de un 6% de las células epiteliales en la mama normal son positivas para ER [2, 3] y estos niveles de expresión pueden ser modulados durante el ciclo menstrual. Hasta un 29% de estas células contienen receptores de progesterona (PR) [3]. Las células mioepiteliales no expresan ninguno de los receptores hormonales [3].

Más recientemente se han definido factores polipeptídicos que actúan como mediadores de la respuesta hormonal tanto en tejido normal como neoplásico, y que son conocidos como **factores de crecimiento**. Estos factores pueden actuar de forma endocrina cuando son sintetizados por órganos lejanos, por mecanismos paracrinos cuando son sintetizados por un tipo celular concreto modulando la función de las células adyacentes en el mismo tejido o en un tejido diferente, o bien de forma autocrina cuando el factor actúa en la misma célula que lo ha producido a través de receptores específicos localizados en la superficie celular [1]. Es importante mencionar también las acciones de factores de crecimiento no secretados, unidos a la membrana, sobre células adyacentes (mecanismo juxtacrino) [4]. Parece ser que dentro de la glándula mamaria las células epiteliales, mioepiteliales y del estroma se comunican a través de factores paracrinos, aunque también existen mecanismos autocrinos descritos fundamentalmente en las células epiteliales [5].

2.- FACTORES QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO EN CANCER DE MAMA

Cuando el cáncer de mama se manifiesta clínicamente se caracteriza por una proliferación excesiva, desdiferenciación, mutabilidad genética y metástasis [6].

La etiología y progresión de la enfermedad están estrechamente relacionados con la presencia de ovarios funcionales productores de estrógenos y progesterona. Existen datos epidemiológicos que indican que el tiempo de exposición de las glándulas mamarias al estímulo estrogénico es directamente proporcional al riesgo de desarrollar cáncer de mama. Una exposición prolongada a los estrógenos endógenos, es consecuencia de situaciones como una menarquia precoz, una menopausia tardía y primer embarazo en edad avanzada [7]. Los estrógenos son mitogénicos para el epitelio mamario tanto normal como neoplásico y aunque se desconocen los errores genéticos presentes en las fases iniciales del proceso tumoral se postula que las hormonas ováricas tienen una gran influencia en la acumulación de cambios genéticos.

La importancia de los estrógenos como inductores de la proliferación se vió confirmada al comprobar que aproximadamente un tercio de las pacientes con cáncer de mama experimentan una remisión del tumor cuando se las somete a tratamientos que implican el descenso de los niveles de estrógenos circulantes o el bloqueo de sus efectos biológicos. Más tarde se demostraron los efectos directos de los estrógenos y anti-estrógenos en la proliferación de células de cáncer de mama en cultivo [8].

Aunque el mecanismo exacto no está establecido, la estimulación del crecimiento celular por estrógenos requiere la unión de la hormona a una proteína receptora seguida de la activación y unión del complejo hormona-receptor al DNA, modificando la transcripción de genes específicos y la síntesis de proteínas. El descubrimiento de esta ruta bioquímica ha permitido la manipulación hormonal del crecimiento neoplásico mediante el uso de anti-estrógenos que inhiben de forma competitiva la unión de los estrógenos al receptor [9, 10], pero el modelo de regulación de crecimiento del cáncer de mama se ha complicado enormemente como resultado de la aparición de otros factores y otras rutas alternativas (Figura 1).

El modelo contempla las distintas hipótesis acerca de los mecanismos por los que los estrógenos y la progesterona regulan la proliferación del epitelio mamario, su tumorigénesis y la progresión maligna del mismo [11].

Se preserva la **acción estrogénica directa** a través de receptores celulares modulando la expresión génica y propiedades fenotípicas. Otra alternativa es la acción indirecta de los estrógenos a través de la secreción de factores de crecimiento endocri-

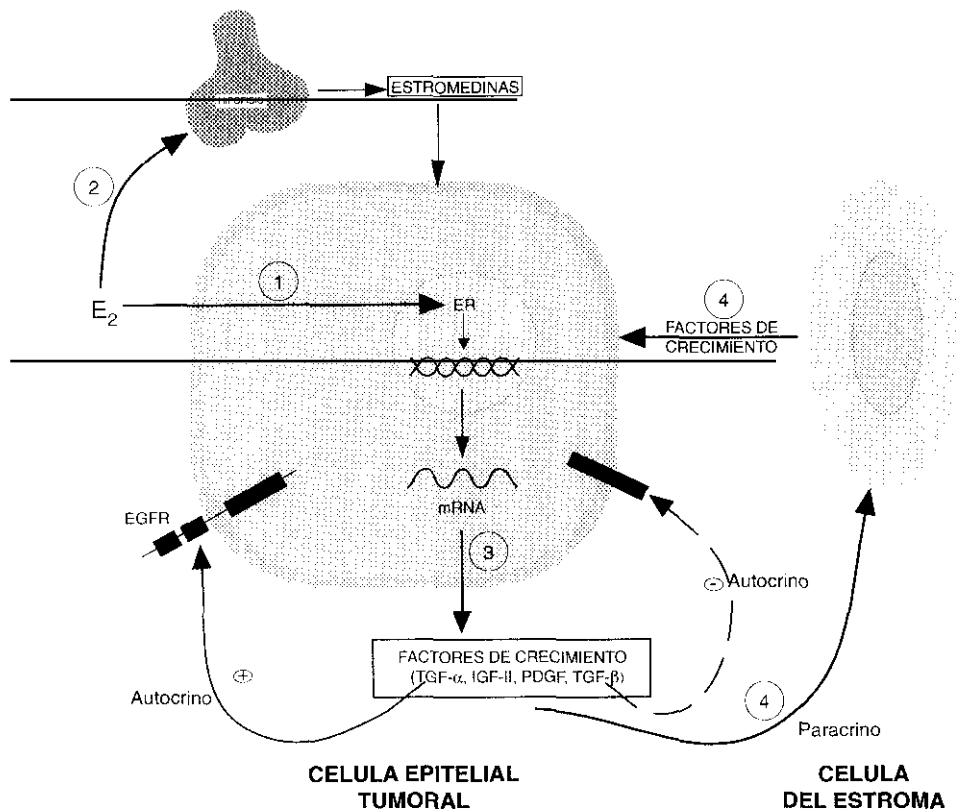


Figura 1. Mecanismos de control del crecimiento en cáncer de mama.

Los estrógenos pueden actuar a través de sus receptores (1), a través de estromedinas sintetizadas en órganos distantes (2), a través de factores de crecimiento autocrinos que se producen y actúan sobre las células epiteliales (3) y a través de interacciones paracrinas entre las células epiteliales y las del estroma (4).

nos, denominados **estromedinas** y producidos en órganos distantes como la hipófisis. Además, existen evidencias que sugieren la influencia de **factores de crecimiento** polipeptídicos entre los que se encuentran los factores de crecimiento del tipo insulina (IGFs), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformantes (TGFs), factor derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) [12-14]. La identificación de receptores de alta afinidad para estos factores permite postular que los efectos de los estrógenos pueden estar mediados por factores de crecimiento autocrinos que se producen y actúan sobre las células epiteliales.

Este modelo además sugiere que los componentes del estroma como fibroblastos, células mononucleares o células endoteliales pueden estar también implicados en el desarrollo y crecimiento del cáncer de mama. De la misma forma que las células neoplásicas secretan péptidos que estimulan el crecimiento del estroma, las células "benignas" del estroma pueden producir factores secretables que estimulan el crecimiento de las células tumorales a través de **interacciones paracrinas**.

A lo largo de esta introducción se irán estudiando cada uno de los factores implicados en este complejo mecanismo de regulación: receptores hormonales, factores de crecimiento, receptores para estos factores y genes relacionados.

Además, como mecanismos adicionales, se pueden considerar la prevención estrogénica de algún mecanismo de apoptosis inducido por el huésped, la supresión estrogénica del sistema inmune del huésped y que los estrógenos reviertan el efecto de algún inhibidor tumoral [5].

2.1.- RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA EN CANCER DE MAMA

Las hormonas pueden actuar directamente sobre la célula tumoral por medio de la interacción con receptores específicos. La presencia de sitios de unión de alta afinidad es un requisito imprescindible para que las células respondan a la estimulación hormonal.

La mayoría de los cánceres de mama dependen de la acción estrogénica para su crecimiento; de hecho, se postula que los estrógenos funcionan como carcinógenos, promotores tumorales y como reguladores del crecimiento tumoral [7].

Dada la importancia de este factor hormonal, se ha investigado en profundidad acerca del papel del receptor de estrógenos (ER) en el control de la expresión génica y del proceso de mitosis [15], así como su utilización como marcador de la respuesta hormonal y prognosis [16]. El receptor de progesterona (PR) tiene importancia como *mediador de respuestas hormonales y como producto de la acción estrogénica en las células tumorales* y se ha estudiado tanto como marcador tumoral [17] como en términos de su regulación por agonistas y antagonistas estrogénicos [18].

2.1.1.- Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas

Los receptores esteroideos pertenecen a una superfamilia de proteínas reguladoras de la transcripción génica, formada por los receptores de la hormona tiroidea, de la vitamina D3 y del ácido retinoico, así como por los receptores de las hormonas esteroideas y el oncogén *c-erb-A*. Los miembros de esta familia comparten tres propiedades importantes: *se fijan a un ligando hormonal, se unen a secuencias específicas de DNA y actúan modificando la actividad transcripcional de genes específicos (trans-activación)* [19, 20].

La localización intracelular del receptor de estrógenos se ha identificado mediante la homogenización de tejido marcado radiactivamente y posterior aislamiento de las fracciones soluble e insoluble mediante ultracentrifugación. Cuando el tejido es marcado a 4°C, la radiactividad predomina en la fracción celular soluble, o citosol. Por el contrario, cuando el tejido se incubaba a 37°C, la hormona permanece predominan-

temente en la fracción nuclear. Estos datos condujeron a postular que los estrógenos actúan en dos pasos [16]. Según esta hipótesis, el receptor de estrógenos es una proteína soluble que, al unirse a la hormona a temperatura fisiológica, se introduce en el compartimento nuclear de la célula diana. Estudios más recientes sugieren que los receptores esteroideos están presentes tanto en el núcleo como en el citoplasma, y que su distribución en uno u otro compartimento se modifica por la unión a la hormona.

El receptor hormonal está formado por tres regiones principales. El extremo aminoterminal de la proteína es la región con la que reaccionan la mayoría de los anticuerpos obtenidos frente al receptor purificado. La región de unión al DNA, situada en la zona media, está formada por aproximadamente unos 70 aminoácidos. El extremo carboxilo, formado por unos 250 aminoácidos, es el más complejo estructural y funcionalmente. Está implicado en la unión a la hormona y la traslocación nuclear, así como en los procesos de dimerización y trans-activación [19]. También existen dominios de trans-activación adicionales localizados en la región amino-terminal y en la de unión al DNA.

La unión de la hormona al receptor le capacita para activar e inactivar genes específicos. Esta región de unión al DNA es la más conservada, invariablemente contiene cisteína e histidina, tan separadas como lo permite la unión coordinada de una molécula de cinc para dar lugar a la formación de “dedos” de cinc. Cada región de unión al DNA de cada receptor tiene dos de estos dedos y se ha postulado que permiten que la proteína se coloque en los surcos principales del DNA [21].

Los receptores hormonales no ocupados se localizan a nivel intracelular en forma de complejos heteroligoméricos que incluyen una proteína de choque térmico (hsp) así como otras proteínas peor caracterizadas [22]. Esta forma “inactiva” no es capaz de interactuar con el DNA porque el dominio de unión al DNA debe estar bloqueado por otros dominios de la proteína o por otros componentes del complejo oligomérico, impidiendo así la traslocación nuclear.

Tras la unión de la hormona, el complejo se disocia, dejando accesible el sitio por el que el receptor se une al DNA. Después de la unión del ligando, la forma activa del receptor parece ser un homodímero que contiene dos moléculas de ligando, aunque la estequiometría todavía no ha sido definitivamente establecida [23]. Además parece que la hormona induce un cambio conformacional en el dominio de unión al ligando necesario para la actividad transcripcional [24].

El mecanismo de acción de las hormonas esteroideas queda esquematizado en la figura 2.

Los fragmentos del DNA que se unen al receptor se denominan elementos de respuesta a hormonas (HRE). En el caso del receptor de estrógenos (ER) es una forma

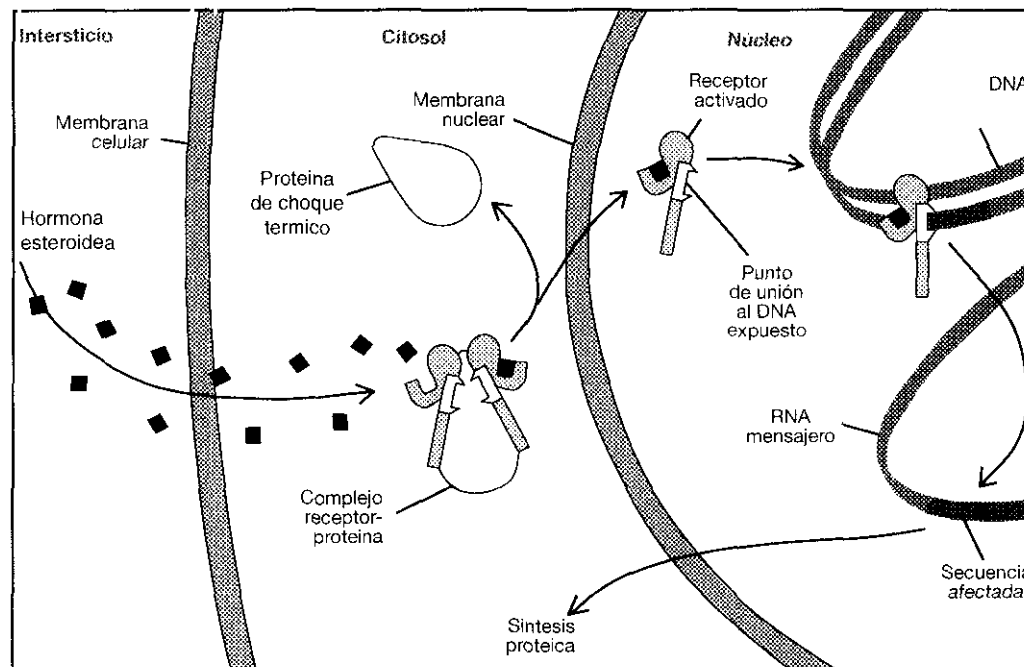


Figura 2. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.

La hormona se introduce en la célula y se une al componente receptor del complejo receptor-proteína, dando lugar a su disociación, la liberación de la proteína de choque térmico y la activación del receptor. El receptor activado se traslada desde el citosol hasta el núcleo, donde se une al DNA. La unión al DNA da lugar a una modificación en la tasa transcripcional de genes específicos. La producción resultante de más o menos RNA mensajeros da lugar a modificaciones en el contenido celular de proteínas específicas.

dimérica la que se une a los elementos reguladores [25]. La dimerización podría constituir un mecanismo para incrementar la afinidad de la proteína receptora por un DNA específico frente a otro no específico, generando más puntos de unión por molécula de receptor que en el caso de un receptor monomérico [26].

Además de la unión del ligando, los posibles mecanismos que modulan las interacciones moleculares de los receptores hormonales incluyen: fosforilación del receptor, cambios en la topología del DNA y organización del DNA en nucleosomas [23].

2.1.2.- Características de los receptores de estrógenos y progesterona

El receptor estrogénico (ER) en humanos está constituido por una proteína de 595 aminoácidos con un peso molecular de 66 KDa [27].

Los estrógenos ejercen sus efectos sobre la proliferación y potencial metastásico de las células epiteliales de cáncer de mama a través de este receptor. Los agonistas de estrógenos así como los antagonistas, pueden unirse a ER en el mismo sitio que los estrógenos sugiriendo que estas moléculas pueden regular la actividad del receptor alterando de forma diferente su conformación [28].

Las acciones de la progesterona están mediadas por el receptor de progesterona

(PR), una proteína poco abundante que a su vez está regulada por estrógenos [18], progestinas [29, 30] y factores de crecimiento [31]. Este receptor presenta dos isoformas que se diferencian en la longitud del dominio aminoterminal y denominadas PR-A y PR-B (A: 88-93 KDa; B: 109-119 KDa). La isoforma PR-A es una versión truncada de PR-B en la que están ausentes 165 aminoácidos en el extremo amino-terminal de PR-B. Las dos isoformas tienen idénticas secuencias en los dominios de unión al DNA y unión al ligando y pueden proceder de un mismo gen con dos sitios distintos de iniciación de la traducción dentro del mismo transcrito de RNA [32]; o bien de dos RNAs mensajeros (mRNA) diferentes generados por dos promotores [33].

Tratando de encontrar una explicación molecular a la existencia de dos formas distintas de PR, se ha descrito recientemente que la actividad de estos receptores es específica del tipo celular y del promotor. En circunstancias en las que PR-A es inactiva, es capaz de actuar como un potente represor de la transcripción mediada por PR-B [34]. El gen PR tiene, por tanto, el potencial de codificar tanto activadores (PR-A o PR-B) como represores (PR-A) de la transcripción. La biosíntesis diferencial de estas dos isoformas podría constituir un mecanismo para producir distintas respuestas a la progesterona en determinadas células.

La homología de secuencia entre ER y PR es del 56% en el dominio de unión al DNA y de un 28% en la región de unión a la hormona [28].

A nivel de expresión de mRNA el ER aparece como una banda de 6,2-6,6 Kb en análisis de Northern [35-38] mientras que a PR le corresponde un patrón de cinco transcritos de tamaños 11,4, 5,8, 5,3, 3,5 y 2,8 Kb detectados en las líneas celulares MCF-7 y T-47D, todos de suficiente tamaño para codificar la proteína de 120 kDa [18, 29, 39].

Aunque las hormonas responsables por excelencia de la estimulación de la proliferación celular en cáncer de mama son los estrógenos, cada vez se le atribuye un papel más importante a la progesterona en la biología del cáncer de mama. En sistemas experimentales, PR se comporta como mediador de la regulación transcripcional de genes como la ácido graso sintetasa [40] o el receptor del EGF [41].

2.1.3.- Dependencia hormonal en cáncer de mama

El contenido de ER y PR del tumor se utiliza como criterio de clasificación para decidir qué pacientes son susceptibles de recibir una terapia anti-estrogénica [42]. Los tumores que se desarrollan en células sensibles a la acción hormonal, como las de la glándula mamaria, retienen algunos de los controles reguladores de sus progenitores normales, pero esos controles pueden perderse o alterarse durante la progresión de un

estado hormono-dependiente a la independencia hormonal [43].

En términos generales, cerca de un tercio de los tumores positivos para ER no responden a la terapia endocrina. Esto fue atribuido inicialmente a la heterogeneidad celular dentro del tumor con respecto a la sensibilidad hormonal [44] y a la existencia de algún defecto post-receptor que impidiera la activación de la transcripción génica [17].

Otra posibilidad es la existencia de receptores anormales asociados a un fenotipo de resistencia. A nivel de proteína se han descrito modificaciones post-traduccionales de ER que implican fosforilación, modulando la unión de la hormona, y formas truncadas de receptor en su dominio de unión al DNA [45]. A nivel de RNA, se han identificados transcritos inusuales para ER en biopsias de carcinomas de mama [37, 46-48] que en caso de ser traducidos a proteínas viables, podrían interferir con la funcionalidad del receptor normal.

Cultivos de líneas celulares sensibles a la acción hormonal mantenidas en ausencia de esteroides experimentan una pérdida de respuesta manteniendo sus receptores intactos, lo que sugiere que la transición a un estado de hormono-independencia puede también ser debida a mecanismos de proliferación alternativos en los que la pérdida del receptor podría ser una consecuencia y no una causa.

Por último, existe otra posibilidad para explicar la transición a un estado de hormono-independencia que implica la secreción de factores de crecimiento autocrinos por las células neoplásicas. La expresión constitutiva, no regulada por estrógenos, podría justificar la aparición de un fenotipo independiente.

Esta hipótesis se vio avalada por hallazgos importantes, en células en cultivo los estrógenos estimulan la secreción de factores de crecimiento mitogénicos (TGF- α , IGFs) e inhiben la secreción de factores de crecimiento negativos como TGF- β . [15] que a su vez es inducido por anti-estrógenos [49, 50]. Además se describió la expresión de receptores de EGF en biopsias de cáncer de mama, fundamentalmente en el grupo de tumores ER- y su presencia se asocia con un peor pronóstico [51]. También cuenta con evidencias en contra como estudios de transfección con un DNA complementario (cDNA) de TGF- α en la línea celular MCF-7, hormono-dependiente, que provoca la sobreexpresión de TGF- α reteniendo su sensibilidad a estrógenos [52] y la utilización de anticuerpos anti-EGFR que bloquean el efecto proliferativo del TGF- α pero no el de los estrógenos [53].

2.2.- FACTORES DE CRECIMIENTO EN CANCER DE MAMA

Los factores de crecimiento se definen como polipéptidos que modulan la proliferación celular a través de la unión con receptores específicos de alta afinidad localizados en la membrana celular, desencadenando una cascada de señales bioquímicas que resultan en la activación o represión de distintos genes. Además, el descubrimiento de que los productos de ciertos oncogenes eran homólogos estructurales de ciertos factores de crecimiento y sus receptores, les atribuyó un papel fundamental en el estudio de la transformación celular y la carcinogénesis.

Según su acción final, los factores mitogénicos pueden clasificarse como factores de "competencia" (PDGF, FGF) que impulsan el avance desde G_0 a G_1 y factores de "progresión" (EGF, IGF-1, TGF- α) que son necesarios para la adquisición del compromiso de la replicación y, por tanto, responsables de la transición G_1/S (Figura 3). La transición a lo largo de la fase G_1 requiere la estimulación por el factor durante varias horas; si la señal es interrumpida por un corto período de tiempo, la célula vuelve al estado G_0 . Existen además factores inhibidores como TGF- β , interferones o TNF que pueden antagonizar los efectos proliferativos de los factores mitogénicos [54, 55].

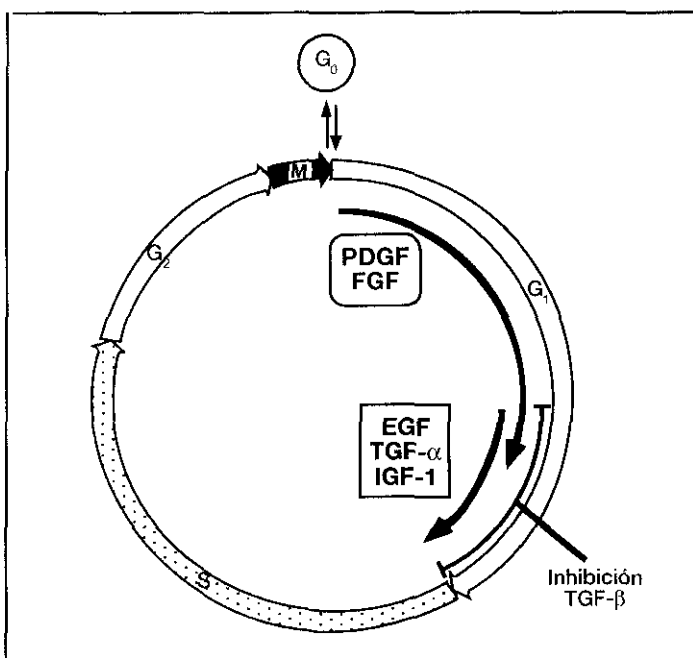


Figura 3. Respuestas celulares a los factores de crecimiento.

Los factores de competencia determinan la entrada en el ciclo celular. La transición de G_1 a la fase S está mediada por los factores de progresión mientras que el proceso de mitosis no requiere de señales extracelulares.

Gran parte de la importancia de los factores de crecimiento se debe a su implicación en el proceso neoplásico. Las células transformadas muestran un descenso en el requerimiento de suero para crecer, es decir, no necesitan de factores de crecimiento exógenos y este fenómeno podría estar mediado por la activación de la síntesis de fac-

tores de crecimiento endógenos, la síntesis de receptores alterados para estos factores de crecimiento, o por la activación de algún mecanismo post-receptor que sustituya la necesidad de factores de crecimiento [56].

Varios oncogenes virales identificados por transfección representan formas alteradas de genes celulares que codifican receptores de factores de crecimiento de la familia tirosín-quinasa. A este respecto, existe una clara evidencia de que el oncogén *v-erbB* codifica una versión truncada del receptor de EGF (EGFR) que contiene únicamente la región transmembrana y el dominio asociado con la actividad tirosín-quinasa, implicado en la estimulación de la proliferación celular [57]. Esto implica la posibilidad de que el receptor se encuentre permanentemente activado sin la necesidad de la unión del ligando. Además del caso *v-erbB*/EGFR, se ha visto este tipo de homología en otros receptores (*v-fms*/CSF-1R, *kit*/MGFR, *trk*/NGFR, *met*/HGFR) [55].

Como ya se ha apuntado brevemente, las células transformadas requieren menos factores de crecimiento exógenos para su óptimo crecimiento y multiplicación con respecto a las células normales. Para explicar este fenómeno se postula que esas células podrían llegar a ser malignas por la producción endógena de factores de crecimiento polipeptídicos que actúan sobre las células que los secretan vía receptores funcionales permitiendo la expresión fenotípica del péptido por la misma célula que lo ha producido. Este proceso se ha denominado **secreción autocrina** [58], y ha llegado a ser el concepto fundamental que relaciona oncogenes y factores de crecimiento. Los oncogenes confieren autonomía de factores de crecimiento a las células, no sólo codifican directamente factores de crecimiento autocrinos, sino también amplificando las señales mitogénicas generadas por ellos [56].

Según esta hipótesis autocrina, y teniendo en cuenta que existen factores de crecimiento tanto estimuladores como inhibidores, se puede postular que la transformación maligna es el resultado no sólo de la excesiva producción, expresión y acción de factores autocrinos positivos, sino también del fracaso de las células para sintetizar, expresar o responder a factores negativos específicos que las células liberan normalmente para controlar su propio crecimiento.

Además, la hipótesis autocrina podría explicar el control del crecimiento en células de cáncer de mama hormono-dependiente de forma que estas células secreten, en respuesta a estrógenos, niveles elevados de factores de crecimiento mitogénicos y niveles bajos de factores inhibidores [59]. El efecto de los antiestrógenos sería el contrario, es decir, incrementar la producción de factores inhibidores e inhibir la secreción de mitógenos. Por otra parte, las células hormono-independientes, podrían expresar de forma constitutiva altos niveles de factores mitogénicos en ausencia de estrógenos y, de esta forma, ser independientes a la acción hormonal.

Las células epiteliales de cáncer de mama son capaces de secretar *in vitro* factores de crecimiento, entre los que se incluyen los factores de crecimiento transformantes (TGF- α , TGF- β), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y descrito recientemente, el factor de crecimiento derivado de la mama (MDGF-I), secretado por la leche humana y por el medio condicionado de líneas celulares de cáncer de mama [60, 61]. La secreción de TGF- α e IGF-I es estimulada por estrógenos, fundamentando la posibilidad de que los efectos mitogénicos de los estrógenos sean indirectos y mediados por cambios en la secreción de factores de crecimiento.

A continuación, se expondrán brevemente las características de los factores de crecimiento incluídos en nuestro estudio.

2.2.1.- Factor de crecimiento epidérmico / Factor de crecimiento transformante-alfa.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es el prototipo de una amplia familia en la que se incluyen el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α), la ampiregulina (AR), el factor de crecimiento derivado de schwannoma (SDGF), el factor similar al EGF de unión a la heparina (HB-EGF), y varios ligandos para el receptor HER-2/*erbB-2/neu* entre los que se incluyen el factor de diferenciación de *neu* (NDF) y las heregulinas [4] (Figura 4). Todos estos miembros de la familia del EGF proceden de proteínas precursoras ancladas a membrana que también han sido descritas en invertebrados (los productos de los genes *lin-3* y *spitz*). También pertenece a esta familia una proteína vírica denominada factor de crecimiento de la viruela (VGF).

Los miembros de esta familia están caracterizados por la presencia de una o varias "unidades estructurales de EGF" en sus dominios extracelulares. Esta unidad se define por la existencia de seis residuos de cisteína conservados dentro de una secuencia de 35-40 aminoácidos. Los precursores humanos y de ratón (proEGF) son proteínas de membrana de más de 1200 aminoácidos con un total de nueve unidades de EGF en la región extracelular; la unidad más cercana a la región transmembrana corresponde al EGF maduro, mientras que las ocho unidades restantes tienen una función desconocida [62]. El EGF es un polipéptido termoestable con una longitud de 48 a 53 aminoácidos. Sus efectos en la célula incluyen mitogénesis, transporte de nutrientes y electrolitos, glicolisis y cambios morfológicos. El EGF humano, también conocido como urogastrona, fue aislado en orina en base a su actividad antisecretora gástrica [63]. La expresión de EGF ha sido observada a niveles de RNA mensajero y de proteína en riñón, páncreas, intestino delgado y cerebro de ratón adulto.

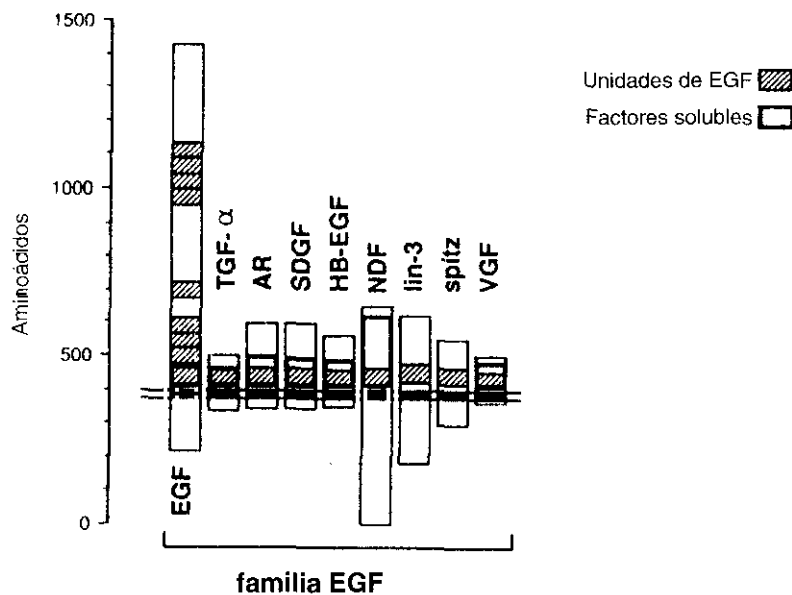


Figura 4. Factores de crecimiento anclados a membrana de la familia del EGF.

Se representan las "unidades estructurales de EGF", la zona del factor soluble y los dominios transmembrana (cajas negras)

El precursor proEGF es sintetizado como una glicoproteína de entre 140 y 170 kDa, dependiendo del nivel de glicosilación que, una vez que alcanza la membrana celular, sufre una ruptura proteolítica en el extremo C-terminal, generando la forma madura soluble.

El TGF- α es un polipéptido aislado, como un mitógeno relacionado con el EGF, en el sobrenadante de cultivos de células transformadas por oncogenes [64]. Hay distintas formas de TGF- α secretado, con tamaños entre 5 y 20 kDa. La forma más pequeña tiene una longitud de 50 aminoácidos y muestra una homología con el EGF humano y de ratón del 44% y 33% respectivamente [65]. La caracterización del cDNA ha revelado que esta forma de 50 aminoácidos se sintetiza como un precursor (proTGF- α) de 160 aminoácidos en humanos y de 159 en rata [66]. Estudios bioquímicos y celulares han confirmado que proTGF- α es una proteína de transmembrana [67]. La secuencia del péptido maduro (correspondiente a los residuos 40-89 en proTGF- α) está muy conservada, mostrando un 92% de homología entre las formas humana y de rata [66] y se genera a partir de un mRNA de 4,5-4,8 kb que, en la forma humana, corresponde a seis exones en un gen de al menos 70-100 kb de longitud, localizado en el cromosoma 2 [68]. La heterogeneidad en cuanto al tamaño de las formas de TGF- α puede explicarse por diferentes rupturas proteolíticas en el dominio externo del precursor y por el grado de glicosilación, que dependen del tipo celular [68].

El interés en el estudio del TGF- α tiene su origen en la presencia de este factor en tumores [69-71], líneas celulares derivadas de tumores [72, 73], y células transforma-

das por oncogenes celulares, retrovirus y promotores tumorales [74, 75]. La implicación de este factor en algunos aspectos de la tumorigénesis ha sido sugerida por la incidencia tan alta de neoplasias de mama y de hígado en ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- α . La expresión de este factor se ha detectado en tejidos adultos entre los que se incluyen la pituitaria, cerebro, queranocitos y macrófagos, y está elevada en células de cáncer de mama en respuesta a agentes promotores tumorales como los ésteres de forbol, EGF o al propio TGF- α [76].

Además de la similitud estructural y en que ambos factores se producen en forma de prohormonas, el EGF y el TGF- α ejercen sus funciones a través de su unión al mismo receptor, el receptor del EGF (EGFR).

No existen evidencias para afirmar que el EGF por sí mismo se asocie con la inducción y la capacidad de invasión de las células tumorales. La biosíntesis de este factor queda restringida a algunos tejidos y ni el precursor ni el EGF son producidos por las células transformadas [77]. En contraste, el TGF- α se relaciona generalmente con la proliferación epitelial y las células tumorales. Existen varios aspectos de la biología del TGF- α relevantes en cuanto a la tumorigénesis: la expresión inapropiada o sobreexpresión de TGF- α , la amplificación del receptor de EGF/TGF- α en algunas células tumorales [78], y el incremento de respuesta de las células al TGF- α producido por las variaciones en las rutas bioquímicas normalmente estimuladas por el complejo activado ligando-receptor.

2.2.2.- Factor de crecimiento transformante beta.

El TGF- β es un factor de crecimiento polipeptídico estable y multifuncional. Se han descrito receptores para esta proteína en casi todas las células de mamífero estudiadas pero, sin embargo, el efecto de este factor depende del tipo celular y del estado fisiológico de las células [79, 80].

La forma descrita originalmente, y ahora denominada TGF- β 1, es sólo uno de los miembros de una superfamilia de proteínas genéticamente relacionadas e implicadas en la regulación del crecimiento, diferenciación y función en distintos organismos. Estas proteínas incluyen otras formas de TGF- β , denominadas TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5, así como activinas, inhibinas, proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el producto del gen decapentaplégico de *Drosophila*, la hormona anti-Mülleria y productos de genes de *Xenopus* y de ratón [81]. TGF- β 1 y TGF- β 2 han sido aisladas en tejidos o en medio condicionado de líneas celulares mientras que las otras tres isoformas sólo han sido identificadas a través del "screening" de librerías de DNA complementario (cDNA).

La forma TGF- β 1 fue aislada de plaquetas y placenta humanas, riñón bovino y

células de embriones de ratas transformadas por virus como una proteína de 25 kDa no glicosilada constituida por dos subunidades de 13 kDa unidas por puentes disulfuro. El clonaje del TGF- β 1 humano, de mono y de ratón ha permitido la descripción de una proteína precursora de 45 kDa en cuya región C-terminal está localizado el monómero maduro de TGF- β 1 [82]. La forma TGF- β 2 fue aislada de hueso bovino, plaquetas de cerdo, líneas celulares de adenocarcinoma de próstata humano y glioblastoma como un dímero de 30 kDa. La secuencia de aminoácidos de TGF- β 3 fue determinada a partir de un cDNA preparado a partir de tejidos humanos, de pollo [83] y de ratón [84, 85], mientras que TGF- β 4 y TGF- β 5 han sido descritos en condriocitos de embriones de pollo [86, 87] y en embriones de *Xenopus* respectivamente.

Todas las formas de RNA mensajero de TGF- β , codifican largas proteínas precursoras con una secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal asociada con la región biológicamente activa de la molécula y que muestra una gran homología (71-82%) entre las cinco isoformas. Esta es una región altamente conservada, la diversidad en la secuencia corresponde fundamentalmente a la región "pro" del precursor.

A través de experimentos *in vitro* se ha establecido la multifuncionalidad de los distintos TGF- β [88]. Sus efectos dependen de la naturaleza de la célula, su estado de diferenciación y las influencias del entorno como son la composición de la matriz extracelular y la presencia de otros factores de crecimiento actuando en la célula al mismo tiempo.

Algunas de las actividades biológicas de este factor son:

- **Proliferación:** Los TGF- β s son potentes inhibidores para la mayoría de las células epiteliales y las células del sistema hematopoyético mientras que estimulan el crecimiento de muchas células de origen mesenquimal. Para algunas células, el TGF- β puede tanto estimular como inhibir el crecimiento dependiendo de la presencia de otros factores de crecimiento de forma simultánea en el medio de cultivo. El efecto inhibitor del TGF- β es generalmente reversible excepto cuando está asociado a un proceso de diferenciación terminal.

- **Diferenciación:** El TGF- β puede inducir la expresión de un fenotipo diferenciado en algunas células y bloquearlo en otras.

- **Funcionalidad:** Este factor es capaz de regular distintos aspectos de la función diferenciada de muchos tipos celulares. Al igual que sus efectos sobre la diferenciación, los efectos sobre la función pueden ser totalmente independientes de cualquier tipo de cambio en la proliferación celular.

Aunque, como ya se ha descrito, la forma activa del TGF- β 1 es un dímero unido por puentes disulfuro generado a partir de la región carboxilo-terminal del precursor, la

mayoría de las células en cultivo secretan una forma latente incapaz de unirse a los receptores de la superficie celular sin una previa activación *in vitro* [89, 90].

La forma latente del TGF- β 1 (235 kDa) es un complejo de alto peso molecular formado por la forma activa de 25 kDa, asociada no covalentemente con un dímero de la región "pro" del precursor (75 kDa) (Figura 5). En la mayoría de los casos, esta región "pro" está unida a una glicoproteína genéticamente no relacionada (~135 kDa) de función desconocida, aunque se cree que puede regular la biosíntesis o activación del complejo latente [91].

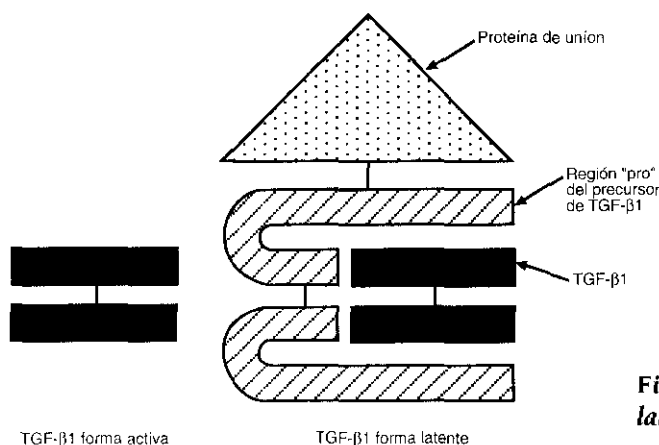


Figura 5. TGF- β 1: forma activa y forma latente en la es secretado.

En algunas células se ha descrito un complejo latente que carece de la proteína de unión. Los complejos para TGF- β 2 y TGF- β 3 no han sido completamente caracterizados pero se cree que son estructuralmente similares al descrito para TGF- β 1. Las diferencias en la secuencia de la región "pro" del precursor podrían ser las responsables de la especificidad de las distintas isoformas por tejidos diferentes así como influir en la capacidad para ser activadas.

La forma latente puede ser activada *in vitro* por cualquier cambio que implique una modificación de la estructura terciaria del complejo, tal como exposición a agentes caotrópicos, a pH extremo o a la acción de ciertas proteasas o glicosidasas [90, 92]. El mecanismo de activación *in vivo* parece ser altamente complejo con moléculas implicadas como la plasmina o el receptor de IGF-II/manosa 6-fosfato.

Los polipéptidos hormonalmente funcionales actúan en las células diana mediante la unión específica con proteínas integrales de membrana acopladas a transductores de la señal citoplasmáticos. El TGF- β se une con alta afinidad a la superficie de muchos tipos celulares [93, 94]. Han sido identificados dos glicoproteínas (receptores I y II) y un proteoglicano de membrana, denominado betaglicano (receptor tipo III) como los componentes que se unen con mayor afinidad al TGF- β [80, 95].

Recientemente se ha caracterizado un receptor para TGF- β y activina del tipo I denominado ALK-5 [96].

Aunque no se conoce demasiado acerca de las rutas de transducción de la señal, parece claro que la unión del TGF- β a las células tiene efectos importantes, tanto en la expresión génica como en acontecimientos a nivel de citoplasma como son estabilización del mensaje, traducción, y modificaciones post-traduccionales de proteínas [97]. Además, el TGF- β también tiene efectos sobre la expresión de proteínas de la matriz extracelular y de enzimas implicadas en su degradación; de hecho, se piensa que muchas de las funciones biológicas de las formas de TGF- β están mediadas en parte por alteraciones en la composición o en la extensión de la matriz extracelular. También son relevantes los efectos sobre la expresión y actividad de proto-oncogenes y reguladores transcripcionales y los más recientes nexos postulados entre el TGF- β y el gen supresor del retinoblastoma (rb) [98-100].

El crecimiento celular no restringido provocado por la ausencia de la actividad inhibidora del TGF- β es quizás la más importante de las posibles consecuencias derivadas de una pérdida patológica de la función del TGF- β . Esta pérdida de función puede ser debida a defectos en la expresión o activación del TGF- β , o bien a defectos a nivel del receptor o post-receptor [101].

2.3.- EL RECEPTOR DE EGF. RECEPTORES TIROSIN-QUINASA

2.3.1.- Receptores tirosín-quinasa. Generalidades

Un gran número de factores de crecimiento estimulan la mitogénesis celular por interacción con una familia de receptores que poseen actividad intrínseca tirosín-quinasa. Estos receptores tirosín-quinasa (RTKs) están constituídos por un dominio extracelular de unión al ligando conectado a un dominio intracelular catalítico responsable de la generación de un mensaje bioquímico (Figura 6) [102].

La combinación de las funciones de unión al ligando y catalítica dentro de una misma molécula situada a ambos lados de la membrana, representa un modelo único de regulación alostérica dentro del contexto de la activación, generación y control de la señal biológica. El dominio transmembrana no tiene funcionalidad en la transducción de la señal.

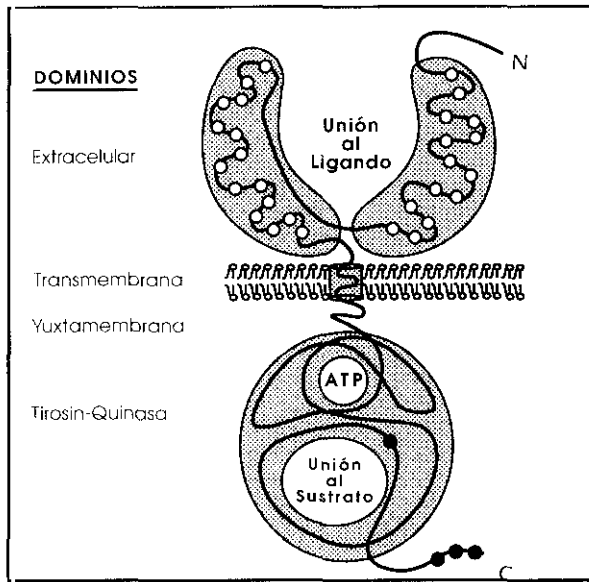


Figura 6. Prototipo de receptores tirosín-quinasa. Están indicados los extremos carboxilo y amino-terminales, el sitio de unión al ligando, al ATP y a sustratos endógenos. Los círculos blancos representan los residuos de cisteína y los negros los residuos de tirosina implicados en la funcionalidad del receptor.

Esta familia de glicoproteínas de la superficie celular se clasifica en subclases estructuralmente distintas que pueden reflejar distintas vías moleculares de activación celular [103] (Figura 7). La clasificación está basada en la propuesta por Ullrich y Schlessinger en 1990.

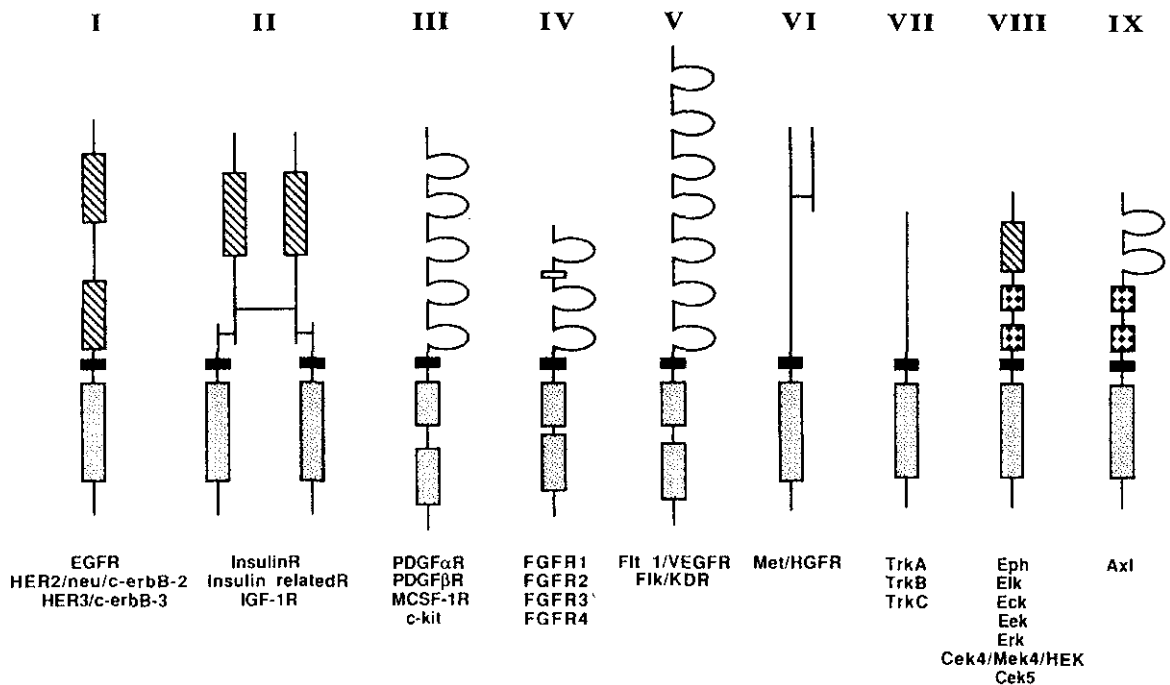


Figura 7. Subfamilias de receptores tirosín quinasa.

Se detallan las siguientes características estructurales: dominio tirosín-quinasa (barras punteadas), dominios transmembrana (zonas negras), dominios ricos en cisteína (barras rayadas), dominios similares a inmunoglobulina (semicírculos).

2.3.2.- El receptor de EGF

El receptor de EGF (EGFR) es una proteína tirosín-quinasa de 170 kDa que se expresa en la mayoría de tipos celulares y tejidos [104] (Como revisión: [105]). Su secuencia completa de aminoácidos ha sido deducida mediante química de proteínas y clonaje de cDNA [57, 78]. Se produce la ruptura de un péptido señal en el extremo amino-terminal para dar lugar a la proteína madura de 1186 residuos (621 aminoácidos corresponden al dominio extracelular y 542 al dominio intracelular separados por una región transmembrana de residuos hidrofóbicos).

El gen del EGFR se localiza en la región p13-q22 del cromosoma 7. Las células normales y transformadas que expresan EGFR tienen dos especies de mRNA con tamaños de 10 y 5,6 kb [78]. Ha sido detectado un tercer mRNA de 2,8 kb en células A431 de carcinoma de vulva que se traduce en una proteína derivada de un gen truncado que carece de los dominios transmembrana y quinasa.

Otros miembros de esta subclase (Clase I, fig anterior), incluyen la proteína codificada por *c-erbB-2/neu/HER-2* (p185) y la correspondiente al gen *erbB-3*. La característica distintiva de esta subclase es la presencia de dos regiones repetidas con secuencias ricas en cisteína dentro del dominio extracelular y un dominio tirosín quinasa ininterrumpido en la región citoplasmática [106].

Los principales ligandos del EGFR son EGF y TGF- α aunque también actúan como ligandos la ampiregulina y HB-EGF. Se especula acerca de que el TGF- α es el ligando durante la vida fetal y embrionaria mientras que el EGF es el ligando normal desde el período neonatal hasta la vida adulta, y que la expresión de TGF- α puede llegar a ser mayoritaria de nuevo si las células se vuelven tumorales [107].

La unión del ligando induce dimerización del EGFR y autofosforilación [106, 108]. Cuando se produce esta unión, el dominio extracelular experimenta un cambio conformacional que induce la oligomerización del receptor, estabilizando las interacciones entre los dominios citoplasmáticos adyacentes y activando la función quinasa por interacción molecular. Los dímeros de receptores poseen una elevada actividad tirosín-quinasa y una alta afinidad por el ligando, mayor que la descrita para la forma monomérica.

Los RTKs catalizan la fosforilación de sustratos exógenos así como de residuos de tirosina dentro de sus propias cadenas polipeptídicas. Los sitios de autofosforilación del EGFR están localizados en la cadena carboxi-terminal [109]. La autofosforilación parece liberar una represión interna estableciendo una conformación del receptor idónea para interactuar y fosforilar sustratos celulares.

Tanto el EGFR como el resto de los RTKs tienen un potencial oncogénico latente

debido a su capacidad para generar una señal mitogénica que, cuando es activado, resulta en un escape del control de las rutas normales de señalización.

Los productos de oncogenes retrovirales derivados de RTKs representan modelos ideales de estudio de estructuras implicadas en la activación de la quinasa y la regulación de las rutas de señalización. Además de alteraciones estructurales causadas por reordenamientos cromosómicos de genes RTK, la sobreexpresión de ciertos RTKs así como la secreción autocrina de los ligandos, puede ser decisiva para la iniciación y progresión de procesos neoplásicos [102].

En la glándula mamaria el EGFR se localiza en las células epiteliales, sobre todo en las mioepiteliales, y, de forma variable, en el estroma [1].

El pronóstico es peor para los pacientes cuyos tumores sobreexpresan EGFR debido generalmente a un aumento en el nivel de mensajero. Ha sido establecida una correlación inversa entre los niveles de EGFR y el contenido en receptores de estrógenos, compatible con un modelo autocrino para la estimulación de las células tumorales.

3.- FACTORES GENETICOS

3.1.- GENERALIDADES

Se ha estimado en un 5-10% el cáncer de mama en mujeres de menos de 50 años asociado con una predisposición familiar a padecer la enfermedad. Estudios epidemiológicos en estas familias favorecen la hipótesis de que existe un gen dominante autosómico heredado en una proporción mucho más alta en cánceres premenopaúsicos que postmenopaúsicos. Todavía no se conoce con certeza cuántos son los genes implicados, su localización cromosómica, su función a nivel celular o los mecanismos por los que dichos genes son transmitidos o expresados [5].

Los cánceres humanos más comunes son aquellos en los que están implicadas células epiteliales, es decir, que se desarrollan en tejidos con un altísimo grado de recambio celular. Este tipo de procesos tumorales son consecuencia de uno o varios cambios permanentes que propician un estado patológico de proliferación continuo o incluso aumentado. Los cambios a los que se hace referencia pueden ser positivos dominantes conduciendo a la célula a una infinita sucesión de ciclos proliferativos o bien negativos, incapacitándola para experimentar una diferenciación o una muerte

celular programada normales [110]. Esto quiere decir que la alteración en el DNA puede resultar tanto en la activación de genes estimuladores del crecimiento (oncogenes dominantes) como en la inactivación de genes inhibidores del crecimiento (genes supresores) [111][112].

La localización e identificación de estos genes se puede abordar mapeando cromosomas de familias afectadas por la enfermedad con el fin de identificar marcadores genéticos asociados con la enfermedad diferenciables en los sujetos sanos. En el caso de familias con historia de cáncer de mama, ha sido detectado un patrón de estos marcadores en el cromosoma 17 y ha sido atribuído a un gen responsable del cáncer de mama familiar, de la "patología proliferativa de la mama" y de algunos cánceres de ovario, denominado BRCA21 y localizado en la región 17q21-23 [113].

Parece que la predisposición genética para padecer cáncer de mama se relaciona de forma directa con la predisposición a desarrollar una enfermedad conocida como "patología proliferativa de la mama" considerada como un estadio premaligno. Esta enfermedad se origina en la unidad ductal terminal, es polimórfica y sus focos iniciales se detectan frecuentemente en muestras de mastectomía. Los genes dominantes para la "enfermedad proliferativa de la mama" como estadio inicial en la progresión al cáncer de mama no han sido identificados todavía, aunque se han descrito distintas alteraciones genéticas en las que están implicados tanto oncogenes como genes supresores (Figura 8) [114]

El gen nm23 se pierde durante el proceso metastásico de la progresión del cáncer pero todavía no ha sido asociado con el cáncer familiar. Este gen fue aislado de una línea celular de cáncer de mama metastásico; está implicado en el desarrollo normal y cuando el gen es mutado o se pierde induce un crecimiento anormal y metástasis [115][116].

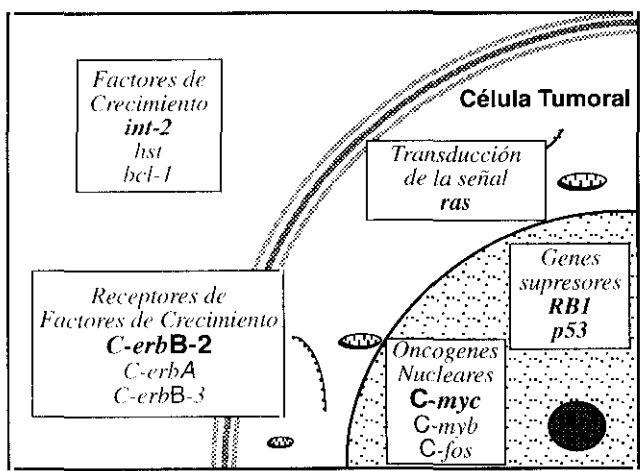


Figura 8. Oncogenes y genes supresores en cáncer de mam

3.2.- ONCOGENES Y GENES SUPRESORES

Los oncogenes son formas alteradas de genes celulares normales conocidos como proto-oncogenes. Fueron identificados mediante el estudio de retrovirus transformantes [117]. Algunos retrovirus tienen la capacidad de incorporar fragmentos de genes celulares al genoma viral favoreciendo la formación de tumores. Estos oncogenes retrovirales no son más que formas alteradas de proto-oncogenes celulares que han sido incorporados al genoma viral por recombinaciones ilegítimas durante las infecciones víricas [118].

Se han descrito diversos mecanismos por los que se puede producir la activación de proto-oncogenes a las formas oncogénicas responsables de la transformación [119]: amplificación génica (aumento del número de copias del gen) con aumento de la expresión del producto codificado, alteraciones por mutación, deleciones, inserciones y traslocaciones cromosómicas que pueden producir una expresión aberrante, etc.

Por medio de los estudios de transfección *in vitro* de células de ratón con DNA genómico extraído de tumores sólidos humanos, se han llegado a identificar varios proto-oncogenes que han sufrido la transformación a la forma oncogénica en varios tipos celulares.

Se han identificado varias familias de genes que ejercen sus funciones como factores de crecimiento, receptores para estos factores, segundos mensajeros o como factores de transcripción, todos ellos implicados en el complejo entramado de señalización que conduce, en cascadas sucesivas, al crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular [110]:

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE ALGUNOS PROTO-ONCOGENES CELULARES	
Función	Proto-oncogenes
Factores de crecimiento	<i>sis</i> (PDGF), <i>int-2</i> , <i>hst-1</i>
Receptores de factores de crecimiento con actividad tirosín-quinasa	<i>erbB</i> (EGFR), <i>fms</i> (CSFR), <i>met</i> (HGFR), <i>neu</i> , <i>ros</i> , <i>trk</i> , <i>ret</i>
Tirosín-quinasas	<i>src</i> , <i>abl</i> , <i>lck</i> , <i>yes</i>
Regulación de transducción de la señal	<i>Ha-ras</i> , <i>K-ras</i> , <i>N-ras</i> , <i>gsp</i> , <i>gip</i>
Serín/Treonín-quinasa	<i>mos</i> , <i>raf</i>
Factores de transcripción	<i>myc</i> , <i>myb</i> , <i>fos</i> , <i>c-jun</i> , <i>rel</i>

En el cáncer de mama humano, la *amplificación génica* es el mecanismo de activación más frecuente [120]. En cuanto a la incidencia de mutaciones puntuales o traslocaciones en cáncer de mama, se podría hablar de una pequeña proporción de tumores en los que se han detectado mutaciones puntuales de alguno de los genes de la familia *ras*, pero parece que este tipo de defecto genético no tiene una importancia relevante en el desarrollo esta patología. Hasta el momento no se han descrito traslocaciones.

La presencia de oncogenes puede explicar la aparición de muchos tumores pero, dada la naturaleza somática de la mutación que los origina, no se puede explicar la *predisposición genética para padecerlos, que debe transmitirse por medio de otros genes diferentes*.

Una posibilidad es que el componente hereditario sea un gen supresor inactivado por una pequeña *delección o mutación puntual*. Su comportamiento es recesivo a nivel celular y por tanto la copia normal residual del gen compensa completamente el defecto, *que puede persistir en la población. Los portadores pueden no desarrollar nunca el cáncer, pero si en una o varias células de un órgano vulnerable, la única copia funcional del gen es dañada o perdida, la transformación maligna será altamente probable*.

Las células pueden descubrir la existencia de una única copia mutada de un gen supresor mediante una *delección en el alelo normal*. La existencia de esta pérdida de heterocigosis indica que es probable que exista un gen supresor en algún lugar dentro de los límites de la *delección* [111]. En el cáncer de mama se ha demostrado pérdida de heterocigosis en varias regiones cromosómicas: 17p, 17q, 16p, 13q, 11p y 1q. La lesión en 13q probablemente se relaciona con el gen de retinoblastoma (Rb) y hay bastante certeza de que el gen relevante en 17p es el gen supresor p53.

3.2.1.- Oncogén *neu/c-erbB-2/HER-2*:

Este oncogén fue identificado en DNA de neuroblastomas de rata inducidos químicamente. La forma oncogénica en rata contiene una mutación puntual que provoca la *sustitución de un único aminoácido en la región transmembrana de la proteína* y que es la responsable del potencial oncogénico asociado con un incremento de la actividad tirosín-quinasa [121, 122].

El oncogén *c-erbB-2/HER-2/neu* se localiza en el cromosoma 17 (17q21) y tiene como producto una fosfoglicoproteína de 185 kDa conocida como p185 *erbB-2*, que atraviesa la membrana celular, y que adopta las características estructurales descritas para esta subclase de receptores con actividad tirosín-quinasa. Aunque no se conoce la

identidad del ligando para este receptor, se piensa que se trata de un factor de crecimiento celular. Han sido propuestos distintos candidatos, el primero descrito fue una glicoproteína de 30 kDa (Gp30) secretada por una línea celular de cáncer de mama [123]. Posteriormente se aisló y caracterizó una segunda forma de 75 KDa que interacciona de forma específica con p185 *erbB-2* [124]. Las heregulinas son un familia de proteínas (45KDa) que se unen e inducen la fosforilación de p185 estimulando el crecimiento de una línea celular de cáncer de mama *in vitro* [125]. Se ha clonado después un gen que parece ser el homólogo de la heregulina en rata denominado NDF(factor de diferenciación de *neu*) [126] (Ver 2.2.1). Por último, se ha descrito un factor activante específico de p185 [127].

En humanos, se ha descrito la amplificación del gen en un 9-33% de carcinomas de mama así como en otros tumores y en un gran número de líneas celulares derivadas de adenocarcinomas, entre ellas de origen mamario [128]. La sobreexpresión de p185 puede suceder con y sin amplificación génica. Además del mecanismo de amplificación, se ha descrito la sustitución de isoleucina por valina en la posición 655 en un adenocarcinoma de mama humano pero se piensa que no tiene significado en la activación oncogénica [129]. Es, por tanto, el mecanismo de amplificación del proto-oncogén el mecanismo de activación más común, y el que se ha descrito para el cáncer de mama en un gran número de trabajos.

El trabajo pionero fue el de Slamon y col. [130] que analizaron extractos de DNA de tejido tumoral por la técnica de Southern en 189 carcinomas de mama. Se detectó amplificación en un 30% de las muestras, y esta amplificación se correlacionó con un peor pronóstico. Posteriormente se han ido publicando trabajos con resultados muy variados y en ocasiones contradictorios. En este momento todavía no ha sido establecido el valor pronóstico de este factor.

Además de la determinación del número de copias del gen, el desarrollo de anticuerpos contra la proteína p185, permite determinar los niveles del producto del gen en las muestras tumorales, bien por inmunohistoquímica o por enzimoimmunoensayo.

3.2.2.- Otros oncogenes y genes supresores en cáncer de mama

- ***int-2/hst/bcl-1 (unidad 11q13)***: el gen *int-2* aparece amplificado hasta en un 19% de los carcinomas de mama y esta amplificación se correlaciona con la existencia de recidivas locales, edad superior a 50 años y la presencia de metástasis ganglionares axilares. El "screening" de la región entre 11q11 y 11q24 detectó co-amplificación de los oncogenes *bcl-1* y *hst* en los tumores en los que se había descrito amplificación del *int-2*. Sin embargo, la amplificación de estos genes no se correlaciona con la

expresión de sus RNAs mensajeros. Se postula que algún oncogén todavía no identificado en la unidad de amplificación 11q13 puede ser el responsable del comportamiento maligno de estos tumores [114].

- **c-myc**: se ha detectado sobreexpresión de este gen en varios tipos de tumores. La proteína *c-Myc* es una proteína nuclear implicada en la regulación de la transcripción de otros genes importantes en la regulación del crecimiento. La amplificación de este gen se asocia con el cáncer de mama inflamatorio, edad superior a 50 años y peor pronóstico.

- **c-erbB-3**: gen homólogo del oncogén *v-erbB* [131] que es expresado por algunos tumores en niveles relativamente elevados, aunque se desconoce si el gen está amplificado o reordenado.

- **Rb**: se ha detectado inactivación de Rb en aproximadamente un 30% de los tumores de mama. Este gen codifica una fosfoproteína nuclear que es inactivada por deleciones o mutaciones. La forma no fosforilada mantiene las células en G₀ y G₁, mientras que la forma fosforilada libera las células de ese mecanismo de control permitiendo que tengan lugar la síntesis de DNA y el proceso de mitosis.

- **p53**: La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear que se une al DNA inhibiendo la transformación de células de ratón por *c-myc* y *ras*. Está implicada en la regulación del ciclo celular y cuando se inactiva conduce a la célula a una proliferación descontrolada. Las mutaciones en p53 se detectan en cáncer de mama y en otros tipos de cáncer, y la pérdida del alelo en 17p es característica en varios tumores agrupados en el "síndrome del cáncer familiar"

4.- ASPECTOS CLINICOS DEL CANCER DE MAMA

4.1.-CLASIFICACION EN ESTADIOS DEL CANCER DE MAMA. SISTEMA TMN

La clasificación en estadios del cáncer de mama consiste en definir la extensión de dicha enfermedad. Se evalúan datos clínicos procedentes de la exploración física de la paciente, evaluaciones radiológicas, determinaciones bioquímicas analíticas, datos

quirúrgicos y estudio anatomopatológico del tumor. Esta información es útil a la hora de elegir un tratamiento, estimar el pronóstico y comparar resultados obtenidos con distintos protocolos de tratamiento. El sistema de clasificación TNM es el reconocido internacionalmente y adoptado tanto por la *Union Internationale Contre le Cancer* y la *American Joint Commission on Cancer Staging and End-Results Reporting* [132]. Este sistema está basado en la extensión del tumor (T), la implicación de ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M).

La evaluación clínica de la existencia de ganglios axilares afectados conlleva un riesgo de falsos positivos y falsos negativos, sin embargo la clasificación patológica basada en la evaluación histológica de la muestra axilar permite una predicción del pronóstico mucho más precisa que la que posibilita la clasificación clínica [133]. El pronóstico de la enfermedad está claramente relacionado con la extensión de los ganglios afectados.

4.2.- PARAMETROS ANATOMOPATOLOGICOS

La anatomía patológica permite confirmar el diagnóstico de malignidad que previamente establece la clínica con los métodos complementarios de exploración. Un estudio anatomopatológico de la pieza operatoria obtenida en el tratamiento inicial, aporta una serie de datos estructurales que permiten hacer una buena valoración en cuanto al pronóstico.

Para cada enferma hay que reunir los datos clínicos, los hallazgos operatorios, los correspondientes a las estructuras de la pieza, valoración de receptores hormonales, así como otras determinaciones bioquímicas con el fin de conseguir una evaluación pronóstica más completa [134].

En la valoración anatomopatológica del pronóstico se tienen en cuenta: la existencia de metástasis ganglionares, el tamaño tumoral, el tipo histológico y el grado de diferenciación histológica.

4.2.1.-Grados histológicos de malignidad (diferenciación tumoral)

Los grados histológicos de malignidad tienen una decisión subjetiva y por sí solos no sirven para hacer deducciones pronósticas. Están en relación con el grado de diferenciación de las células tumorales o grado de malignidad. Las clasificaciones más utilizadas son la de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) [135] y el sistema de grados de

Fisher [136].

El sistema SBR se basa en la valoración de tres parámetros:

- Grado de diferenciación definido por la capacidad del tumor para formar estructuras tubulares, glandulares o papilares.
- Polimorfismo nuclear (tamaño del núcleo y forma y características de la cromatina).
- Número de mitosis (actividad proliferativa del tumor).

Permite clasificar los tumores en Grado I si están bien diferenciados, Grado II si son moderadamente diferenciados y Grado III si están poco diferenciados [137].

4.2.2.-Clasificación histológica

Un método más objetivo es utilizar la clasificación histológica de los tumores malignos. En esta clasificación, con sus lógicas variaciones, están de acuerdo los anatomopatólogos, y cada tipo de tumor lleva ya en si mismo un pronóstico de malignidad.

Los tipos más comunes son los ductales infiltrantes y los lobulillares infiltrantes, bien en sus formas puras o en combinación con otros tipos tumorales.

A- CARCINOMA "IN SITU"

Se caracteriza porque la proliferación de las células malignas tiene lugar dentro de los conductos y los lobulillos sin invadir el tejido del estroma adyacente. Dependiendo de su localización, características citológicas y patrones de crecimiento, se clasifica en ductal y lobulillar.

A.1.- Carcinoma ductal "in situ"

El término "carcinoma ductal in situ" (algunas veces denominado "cáncer de mama intraductal") describe un conjunto de lesiones en las que la característica histológica común es la proliferación de las células malignas dentro de los conductos sin invadir el estroma y generalmente es diagnosticada basándose en la existencia de microcalcificaciones clínicamente ocultas detectadas por mamografía.

El carcinoma ductal "in situ" puede dividirse desde el punto de vista morfológico en una variedad de subtipos, siendo los más comunes el tipo comedo y el no comedo que incluye cribiforme, micropapilar y sólido. El subtipo denominado comedo se caracteriza por núcleos grandes, polimórficos, con presencia de numerosas mitosis y resi-

duos necróticos celulares en el centro de los conductos. En contraste, el subtipo no comedo se caracteriza por la presencia de núcleos monomórficos, pocas o ninguna mitosis y la ausencia de necrosis. Estudios recientes demuestran que estos subtipos difieren en su capacidad de proliferación, en la sobreexpresión del oncogén *c-erbB-2* [138], en la frecuencia de microinvasión oculta [139], en el patrón mamográfico e incidencia de bilateralidad.

Existen datos procedentes de estudios puntuales que indican que algunos casos de carcinoma ductal "in situ" evolucionan a un cáncer invasivo y que este proceso puede tardar muchos años en hacerse evidente [140]. Un estudio indica que el subtipo comedo es más susceptible de asociarse con la progresión hacia un carcinoma invasivo que el subtipo no comedo [141]. Sin embargo, hasta el momento presente, no existen características clínicas, morfológicas o biológicas que puedan considerarse predictivas.

A.2.- Carcinoma lobulillar "in situ"

Este término describe una patología caracterizada por una proliferación sólida de células pequeñas dentro de los lobulillos de la mama (y de forma ocasional en los conductos) con núcleos pequeños, uniformes, de forma ovoide y moderadamente irregulares. El diagnóstico puede confundirse con el del carcinoma ductal "in situ". Generalmente se localiza en múltiples áreas de la mama, es decir, es multicéntrico, y rara vez se asocia con carcinomas invasivos no detectados.

La incidencia real de este tipo de cáncer en la población no es conocida ya que carece de signos clínicos o mamográficos, se estima su aparición en 1-3% de las muestras de biopsia de mama. Es más frecuente entre mujeres premenopaúsicas debido, en parte, a que este grupo de mujeres padecen de forma más habitual patologías benignas de la mama que requieren biopsia.

Se cree que este tipo de carcinoma puede ser una lesión premaligna o bien un marcador indicativo de un riesgo elevado de desarrollar un cáncer de mama invasivo [142].

B.- HISTOLOGIA DE LOS CANCERES DE MAMA INVASIVOS

Los cánceres de mama invasivos comprenden un grupo histológicamente heterogéneo de lesiones. La mayoría de los carcinomas de mama son adenocarcinomas y se clasifican en función de su apariencia microscópica, bien como ductales o lobulillares. La mayoría de los tumores parecen originarse en la sección terminal de los conductos, independientemente de su tipo histológico. Los cinco tipos más comunes de cáncer de mama invasivo son.

B.1.- Carcinoma Ductal Infiltrante

Es sin duda el más común de los tipos histológicos (aproximadamente 75% de los cánceres de mama) y se caracteriza por la ausencia de características histológicas especiales. Estos tumores son duros a la palpación y habitualmente metastatizan a los ganglios linfáticos axilares lo que implica un peor pronóstico en comparación con otros tipos histológicos.

B.2. Carcinoma Lobulillar Infiltrante

Es relativamente poco común (aprox. 5-10% de los carcinomas de mama). Se caracterizan por ser multifocales y bilaterales. A nivel microscópico, el carcinoma lobulillar está formado por células pequeñas generalmente dispuestas en hilera, esta forma de crecimiento se denomina "fila india", con tendencia a crecer también alrededor de los conductos.

Existen variantes como el tipo de célula pequeña o en "anillo de sello" de peor pronóstico que el patrón clásico.

B.3.- Carcinoma Tubular

Constituye aproximadamente el 2% de los cánceres de mama. Las metástasis axilares no son frecuentes y el pronóstico es mejor que en el caso del carcinoma ductal infiltrante. Se detecta bien mamográficamente, las células presentan baja actividad mitótica y moderada atipia.

B.4.- Carcinoma Medular

Está formado por cordones celulares que se anastomosan entre sí, agrupándose en masas; contiene células grandes muy diferenciadas con núcleos polimórficos en fases de mitosis y frecuentes nucleolos que hacen prominencia en la membrana celular; hay un alto grado de anaplasia. El estroma es muy escaso, como característica de este tumor, hay una gran infiltración linfoidea que ocupa el estroma intratumoral y que, por su aspecto, da el nombre de medular al tumor. Está circunscrito y la citología parece indicar una gran malignidad. Constituye aproximadamente el 5-7% de los tumores de mama. La supervivencia a los cinco años después del tratamiento es mejor que el descrito para el tipo ductal infiltrante, siempre que el tumor presente todas las características descritas.

B.5.- Carcinoma Mucinoso o Coloide

Constituye aproximadamente el 3% de los carcinomas mamarios y se caracteriza por la acumulación abundante de mucina extracelular alrededor de grupos de células tumorales. Las formas puras suelen encontrarse en mujeres de 60 años, evolucionan con gran lentitud y la supervivencia es mayor que la media general de los carcinomas de mama. Tiene una difusión retardada y menor número de metástasis en ganglios axilares que el carcinoma ductal. Existen formas mixtas en las que junto con estructuras de cáncer coloide hay un adenocarcinoma corriente; en estas formas mixtas la evolución se inclina hacia mayor malignidad pero siempre la presencia de material mucinoso indica menor actividad.

Otras formas poco frecuentes de carcinoma de mama incluyen los tipos papilares, apocrinos, secretores y formas metaplásicas (incluyendo carcinoma escamoso, espinocelular y carcinosarcomas).

4.3.- NUEVAS POSIBILIDADES TERAPEUTICAS BASADAS EN LOS MECANISMOS BIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD

Quizás uno de los aspectos más esperanzadores en la investigación del cáncer es la que aporta el conocimiento cada vez más profundo de la biología de la enfermedad para mejorar el diagnóstico, el pronóstico así como las posibilidades terapéuticas.

Las hormonas esteroideas siguen siendo uno de los factores más importantes en la investigación que lleva a cabo sobre cáncer de mama. Como ya se ha mencionado a lo largo de esta introducción, muchas líneas de investigación se han centrado en la identificación de sustancias inducidas por estas hormonas y que han contribuido al desarrollo de un fenotipo maligno caracterizado por mitogénesis, invasión y metástasis.

Basándose en todos los datos aportados, se podría postular que existen factores de crecimiento responsables, al menos en parte, de la evolución del epitelio normal mamario a una situación neoplásica y que las células cancerígenas mantienen su fenotipo transformado como resultado de los efectos de estos factores de crecimiento.

Estos factores incluyen IGF-I y II, TGF- α , TGF- β , EGF, PDGF, FGF y ligandos para *erbB2* y *erbB3*. Estos factores de crecimiento pueden contribuir a la progresión y mantenimiento del proceso neoplásico a través de mecanismos que implican la estimulación de las células epiteliales o del estroma adyacente.

Han sido desarrolladas terapias dirigidas contra estos factores de crecimiento y sus receptores en experimentos *in vitro* y en sistemas experimentales. Estas terapias se basan en la premisa de existen diferencias importantes y específicas entre las células neoplásicas y las células normales que permiten el dirigir la actuación terapéutica úni-

camente contra los productos celulares que contribuyen al fenotipo maligno.

Se han sugerido estrategias muy variadas entre las que se incluyen:

- Utilización de altas concentraciones de factor de crecimiento exógeno normal que se unirá al receptor inhibiendo el crecimiento de las células tumorales
- Anticuerpos monoclonales contra un factor de crecimiento específico con el fin de bloquear su acción.
- Anticuerpos monoclonales contra receptores para factores de crecimiento, bien como molécula aislada o bien conjugada con toxinas, radionucleidos o drogas [143].
- Factores inhibidores del crecimiento que neutralicen los efectos de los factores de crecimiento.
- Agentes como oligonucleótidos "antisentido" que pueden ser incorporados en el DNA de las células tumorales para inhibir la producción de un factor de crecimiento o su receptor.
- Agentes capaces de interactuar con factores de crecimiento e inactivarlos o bloquear su acceso al receptor
- Inhibidores tirosín-quinasa que interfieren con las cascadas de transducción de la señal después de que el factor de crecimiento se ha unido al receptor [144].

OBJETIVOS

- 1.- Descripción de los niveles de expresión de receptores hormonales, factores de crecimiento y oncogenes en biopsias de cáncer de mama como sistema de experimentación.
- 2.- Utilización de distintas metodologías disponibles para la caracterización de estos factores a nivel de proteína y de mRNA con el fin de validar adecuadamente la expresión de sus genes.
- 3.- Caracterización de las muestras a nivel histológico con parámetros que normalmente se utilizan como criterio de progresión tumoral, pérdida de diferenciación y metástasis.
- 4.- Estudio de la dependencia hormonal del cáncer de mama y su correlación con la pérdida de diferenciación y transición a un fenotipo más maligno.
- 5.- Estudiar si la pérdida de sensibilidad hormonal está mediada por la expresión de factores de crecimiento transformantes.
- 6.- Comprobar la existencia de un posible mecanismo de regulación autocrino de las células tumorales a través de receptores tirosín-quinasa.
- 7.- Estudio de la expresión del oncogén *c-erbB-2/HER-2/neu* e implicación en el cáncer de mama.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1.- MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.- MUESTRAS TUMORALES

Las biopsias de carcinomas de mama fueron recogidas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario San Carlos, procedentes de los Servicios de Cirugía y Ginecología del mismo centro.

1.2.- LINEAS CELULARES

La línea celular **MCF-7**, establecida por Soule [145] a partir de una efusión pleural de una paciente con adenocarcinoma de mama metastásico, fue generosamente cedida por G. Lecqlerq (Instituto Jules Bordet. Centro de tumores de la Universidad Libre de Bruselas). Esta línea celular se utilizó como control positivo de patología hormono-dependiente.

La línea **MDA-MB-231** fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection), establecida también a partir de una efusión pleural de una paciente con adenocarcinoma mamario (Cailleau, J.N.C.I. 53: 661-674, 1974). No posee receptores de estrógenos por lo que se utiliza como control negativo y modelo de independencia hormonal.

La línea **A549** fue obtenida de la ATCC, establecida a partir de un carcinoma de pulmón humano (Giard, J.N.C.I 51: 1417-1423, 1973). El medio condicionado por estas células posee niveles elevados de TGF- β .

1.3.- ESTIRPES BACTERIANAS

Se utiliza la estirpe de *E. Coli* denominada DH5, cedida amablemente por A.

Nieto (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid), para su transformación con los plásmidos que contienen los distintos fragmentos de cDNA utilizados como sondas para los experimentos con RNA.

2.- MATERIAL NO BIOLÓGICO

2.1.- COMPUESTOS RADIATIVOS

Na¹²⁵I (Actividad específica: 100 mCi/ml): Amersham

³²P- α -dCTP (Actividad específica: 3000 Ci/mmol): Amersham

2.2.- SONDAS DE cDNA

EGFR: se utiliza como sonda el fragmento de 1.8 kb clonado en el sitio EcoRI del plásmido pUC13. El clon se denomina pHER-A64-1 [78] y se obtuvo de la ATCC. El inserto incluye la secuencia codificante para los dos dominios ricos en cisteína y el dominio transmembrana de la molécula del EGFR.

TGF- α : El plásmido pTGF-C1 [66] que contiene el cDNA para TGF- α clonado en el sitio PstI del vector pBR322 fue generosamente cedido por Genentech, Inc (San Francisco, CA).

TGF- β : El plásmido p β as [82] fue igualmente cedido por Genentech, Inc. Se utiliza como sonda el inserto de 1050 bp clonado en el sitio EcoRI del plásmido sp64 y que codifica el TGF- β humano.

ER: El plásmido pSG5-HEO fue cedido por P. Chambon (Estrasburgo, Francia) y contiene el fragmento de cDNA correspondiente al ER humano de 1.8 kb clonado en el sitio EcoRI del plásmido pSG5 [27].

PR: Esta sonda fue también obtenida del laboratorio del Profesor Chambon. El plásmido hPR1 contiene el inserto que codifica la forma B del receptor de progesterona

humano clonado en el sitio EcoRI del plásmido pSG5 [33].

GAPDH: Esta sonda control fue proporcionada por R. Ramos (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid).

2.3.- PROTEINAS Y ENZIMAS

Factor de crecimiento epidérmico de ratón (Biomakor, Israel)

Ribonucleasa A (Sigma)

Enzimas de restricción: EcoRI, PstI, NcoI (Boehringer Mannheim, BRL)

Lisozima (Sigma)

Proteinasa K (Boehringer)

2.4.- REACTIVOS PARA CULTIVOS CELULARES

Para el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de mama se utilizó medio MEM (Medio Mínimo Esencial) suplementado con L-Glutamina (0.6 mg/ml), Gentamicina (40 µg/ml), Penicilina (100U/ml) y Estreptomicina (100 µg/ml), todos adquiridos a Gibco, BRL, y con 10% suero fetal de ternera (Seromed).

La línea A549 se mantiene en medio HAM F-10 (Gibco, BRL) suplementado con Gentamicina, Penicilina, Estreptomicina y suero fetal en las mismas concentraciones descritas para las otras dos líneas.

Cuando las células llegaban a confluencia eran tratadas con tripsina (Gibco, BRL) y subcultivadas en frascos T175 (Nunc).

2.5.- REACTIVOS PARA CULTIVO DE BACTERIAS

El bacto agar, triptona y extracto de levadura para la preparación de las placas de agar y del medio LB, fueron obtenidas de Difco.

2.6.- EQUIPOS DE REACTIVOS

Marcaje de sondas: Multiprime labelling system (Amersham)
Nick Translation (Amersham, BRL)

Purificación DNA: GeneClean II (Bio 101)

RIA: TGF- α (Biomedical Technologies Inc.)
TGF- β (Du Pont)

ELISA: Enzimoimmunoensayo ER/PR (Abbott)
p185 (Oncogene Science)

ICA: ER/PR (Abbott)

2.7.- REACTIVOS ESPECIFICOS

RNAzol B (Biotecx Laboratories, Inc)

DEPC (Dietilpirocarbonato)(Sigma)

Marcadores de peso molecular:

DNA: λ DNA/HindIII y ϕ X174/Hae (BRL)

RNA: RNA ladder (BRL)

Resina de intercambio iónico AG501-X8 (Biorad)

2.8.- REACTIVOS GENERALES (Grado de análisis o grado biología molecular)

Fueron adquiridos de las casa comerciales Merck, Sigma, BRL, Boehringer.

METODOLOGIA

I.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron recogidas inmediatamente después de su disección manteniéndolas a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Dentro de la pieza quirúrgica, se seleccionó la región tumoral por un anatomopatólogo, confirmando posteriormente su naturaleza neoplásica por técnicas histológicas.

Las muestras fueron pulverizadas en N_2 líquido, manteniendo condiciones severas de esterilidad, en un Microdismembrator (Braun) utilizando cápsulas de teflón. El tejido pulverizado y congelado fue distribuido en dos criotubos estériles. Una de las fracciones fue utilizada para la extracción de RNA y posterior estudio de expresión génica, mientras que la segunda fracción de tejido fue procesada para el estudio proteico.

El protocolo queda esquematizado en la figura 9:

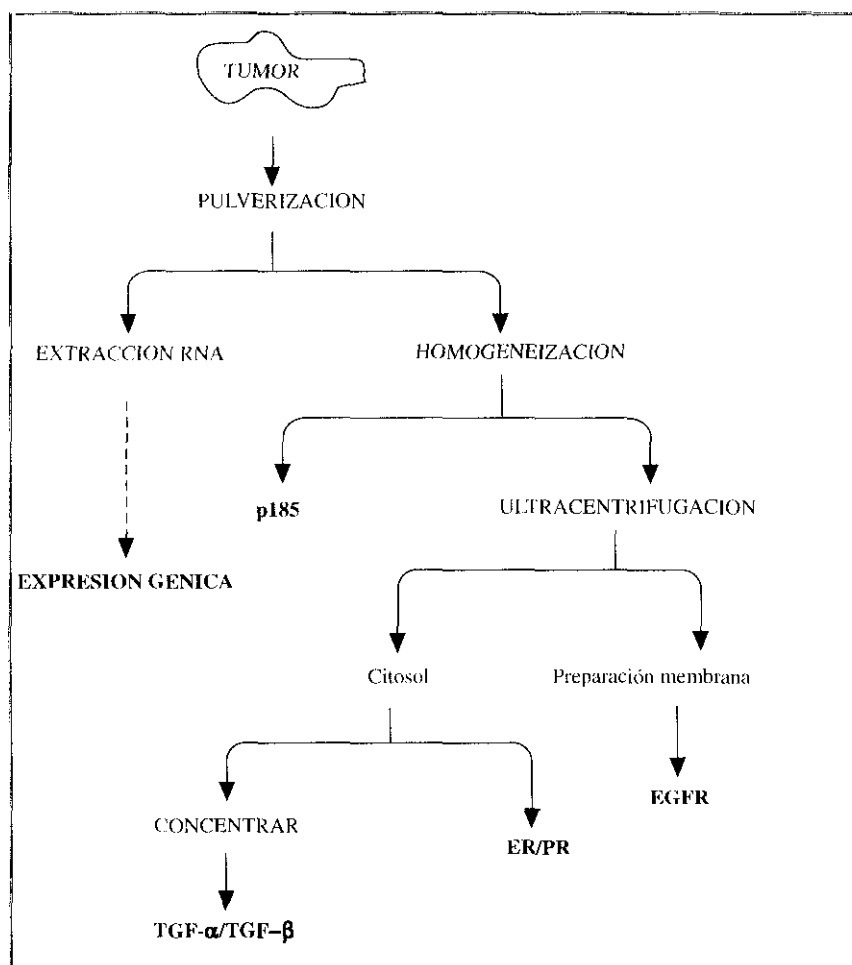


Figura 9. Esquema del procesamiento de la muestra tumoral.

2.- ESTUDIO DE NIVELES DE PROTEINA.

2.1.- HOMOGENEIZACION. OBTENCION DE LAS FRACCIONES CELULARES.

En el criotubo con la fracción de tejido correspondiente se añaden 3 ml por gramo de tejido de tampón de homogeneización (10 mM TRIS, 1,5 mM EDTA, 5 mM Molibdato sódico, 1 mM MTG) a 4°C y se prepara un homogeneizado del que se retiran 50 µl para la determinación posterior de la proteína p185, que son guardados a -80°C hasta su utilización.

El resto de la solución se centrifuga a 800xg durante 20 minutos a 4°C y el precipitado se lava de nuevo en las mismas condiciones. Los sobrenadantes de estos dos pasos se ultracentrifugan a 100.000xg durante 1 hora a 4°C para separar las fracciones citosólicas y de membrana.

Parte del citosol se procesa el mismo día de su obtención para el análisis de receptores de estrógenos (ER) y de progesterona (PR) pues se ha demostrado que ciclos de congelación/descongelación influyen en el contenido de estas proteínas termosensibles. El resto del citosol se guarda a -80°C para el posterior estudio de TGF- α y TGF- β .

En cuanto al precipitado que contiene la fracción de membrana, se redisuelve en 500 µl de tampón A/EGFR (20 mM fosfato, 150 mM NaCl, 50 µM bacitracina pH 7.4) y se mantiene a -80°C hasta su procesamiento para la determinación de EGFR.

2.2.- DETERMINACION DEL CONTENIDO DE RECEPTORES DE ESTROGENOS (ER) Y PROGESTERONA (PR)

Se utiliza para ambas proteínas un ensayo de inmunoensayo (EIA) en fase sólida basado en el principio "sandwich" [146] (Figura 10). La utilización de anticuerpos monoclonales contra ambos receptores permite el reconocimiento antigénico directo detectando, por tanto, los receptores tanto libres como ocupados por el ligando endógeno.

En el caso de ER, los anticuerpos utilizados son D547 y H222 [147][148]; para PR, los anticuerpos reconocen las formas de peso molecular 120 K y 95 K del receptor de progesterona humano [17].

El ensayo se basa en la unión del receptor presente en los citosoles a anticuer-

pos monoclonales de rata anti-receptor inmovilizados en esferas de poliestireno. Los receptores unidos a la esfera son incubados con un segundo anticuerpo monoclonal de rata que está unido covalentemente a peroxidasa de rábano. Tras la incubación del "sandwich" anticuerpo-receptor con peróxido de hidrógeno y el sustrato cromógeno (o-fenilendiamina, OPD), se desarrolla color que se cuantifica por la medida de absorbancia a 492 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de receptor unido a la esfera y su cuantificación se lleva a cabo por interpolación en la curva estándar construída a partir de concentraciones conocidas de ER y PR humanos (Rango de la curva estándar: 0-250 fmol/ml proteína de citosol).

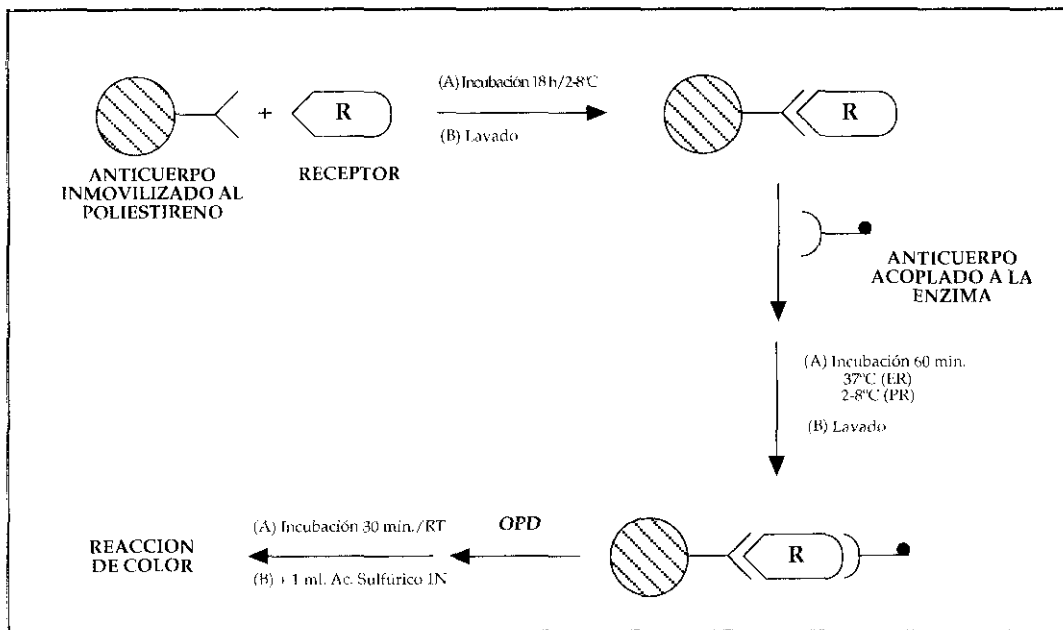


Figura 10. Enzoinmunoensayo de receptores de estrógenos(ER) y progesterona (PR).

Se utilizan 100 µl de citosol para cada uno de los ensayos con una concentración de proteína ajustada entre 1-2 mg/ml. La concentración de proteína en el citosol fue determinada por el método de Bradford [Bradford, 1976 #314].

La sensibilidad del ensayo es de 2,4 fmol/ml. Los coeficientes de variación obtenidos en nuestro estudio se recogen en la tabla I:

ER (fmol/ml)	% CV		PR (fmol/ml)	% CV	
	Intraensayo	Interensayo		Intraensayo	Interensayo
5	7,87	15,6	5	7,02	12,2
25	10,97	12,8	25	11,3	6,08
250	6,28	11,1	250	3,54	11,3

Tabla I. Coeficientes de variación intra e interensayo en el EIA para ER y PR

Estos valores se encuentran dentro del rango obtenido en un estudio multilaboratorio llevado a cabo por el Grupo para el estudio de receptores de la E.O.R.T.C. (European Organization for Research and Treatment of Cancer) en el que nuestro grupo participa.

2.3.- CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE EGF.

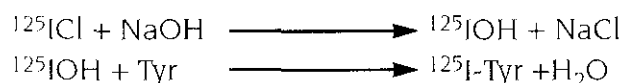
El método utilizado [149] implica la preparación de la fracción de membrana, incubación con EGF iodado, separación del ligando unido a la membrana del libre por la unión de los receptores a hidroxapatita (HAP), que adsorbe el complejo ligando-receptor. A continuación se cuantifica la radiactividad unida y se analizan los datos por el método de Scatchard.

2.3.1. Marcaje del EGF con ^{125}I .

La molécula de EGF contiene cinco residuos de tirosina y algunos están implicados en la unión al receptor. La iodación puede afectar la interacción ligando-receptor por lo que el ligando marcado debe ser preparado con sumo cuidado para evitar que se generen especies di-iodadas y tri-iodadas. Se ha realizado un estudio comparando seis métodos distintos de marcaje para el EGF [150, 151]. Basándose en criterios de actividad específica, máxima capacidad de unión, unión no específica y elución en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tres de los métodos proporcionan un ^{125}I -EGF de suficiente calidad. Estos tres métodos son Protag-125 (Baker Fine Chemicals), Enzymobeads (Bio-Rad) y Cloruro de iodo (Merck). Debido a que los dos primeros tienen un período de utilización limitado, el método del cloruro de iodo es el recomendado.

El método utilizado se basa en el propuesto por Contreras y col. [152] con ligeras modificaciones [151]. De forma breve, la adición de cloruro de iodo (ICl) a una solución proteica tamponada que contiene ^{125}I provoca la formación de $^{125}\text{I}\text{Cl}$ por una reacción de intercambio iónico tras la cual tiene lugar rápidamente la iodación de los residuos de tirosina en la molécula del EGF.

La iodación es el resultado de las siguientes reacciones:



En la reacción de iodación se utilizan 10 μg de EGF de ratón (Biomakor) y 2 mCi de Na^{125}I (Amersham) en una mezcla de reacción que contiene ICl (0,1mM) y tampón borato 0,2 M pH 8.

El EGF marcado fue purificado mediante cromatografía en columna en fase sólida C_{18} , pre-equilibrada con metanol, y tampón borato 0,2M pH 8. El ^{125}I -EGF fue eluído mediante adición de metanol 80% y ácido trifluoroacético 0,1%, evaporándose el metanol bajo una corriente de nitrógeno a 37 °C. Se efectúa un paso de purificación adicional incubando con HAP (30 min. 20°C) y separando el sobrenadante que contiene el EGF marcado. Este paso de purificación se lleva a cabo para minimizar la adsorción del EGF marcado a la HAP y la unión no específica de éste. La recuperación total del EGF es del 40-50%.

La actividad específica para cada marcaje se calcula por ensayo de auto-desplazamiento [153]. Se utiliza EGF en un rango de concentración desde 0 hasta 1000 fmol/10 μl , ^{125}I -EGF (15000 cpm/10 μl) y una preparación de membrana de placenta humana (tejido con un elevado contenido en EGFR). Un ejemplo del tipo de curva obtenida se representa en la figura 11

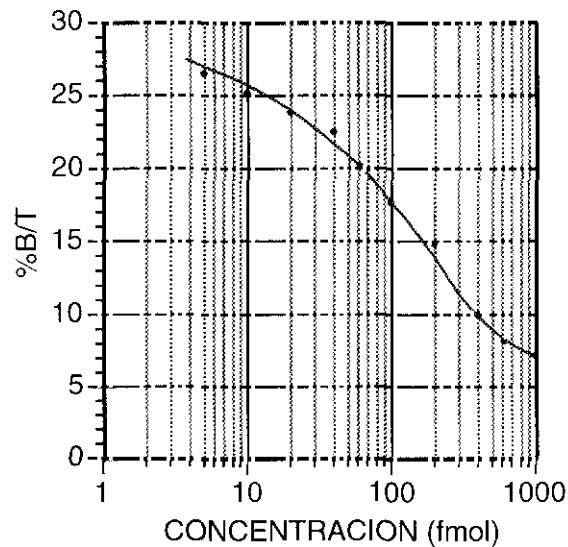


Figura 11. Determinación de SA del EGF marcado.

Se representa la fracción unido/total (B/T) frente a EGF no marcado. Por interpolación en esta curva de calibración se obtiene SA en cpm/fmol.

2.3.2.-Ensayo de receptores para EGF

Las preparaciones de membrana se sonicán (10 microns durante 10 seg.) para solubilizar los receptores. Una fracción se utiliza para determinar el contenido de proteína en presencia de Triton X-100 1% por el ensayo DC (Bio-Rad). La concentración óptima de la preparación de membrana para el ensayo de receptores es 0,5-1 mg/ml. Alícuotas de la fracción de membrana se incuban durante 18 horas a 20°C con ¹²⁵I-EGF (0,1-3,3 nM de concentración final), en presencia (unión inespecífica) o en ausencia (unión total) de EGF no marcado (0,25 μM) en tampón B/EGFR (Tampón A, BSA 0,1%). Para separar el ligando libre del unido al receptor se incubó con HAP durante 1 hora a 20°C y se centrifugó a 1000xg, 2 min., 20°C con rapidez para evitar la disociación del ¹²⁵I-EGF unido.

La cuantificación de la radiactividad retenida en el precipitado de HAP permite el análisis de Scatchard que aporta el número de sitios de unión y la constante de disociación (Kd) de la reacción.

2.4.- ANALISIS DE TGF-α Y TGF-β

2.4.1.- Preparación de las muestras

Dado que se utiliza la misma fracción de citosol para ambas determinaciones, se estandarizó un protocolo que permitiese la detección de ambas proteínas conjugando los requerimientos de cada una.

El TGF-β se secreta en una forma latente inactiva. El proceso de activación *in vitro* implica acidificación, disociando la región "pro" de la parte bioactiva del complejo.

Ambas proteínas están presentes en muy bajas concentraciones en los citosoles y en la mayor parte de los fluidos biológicos, por lo que es necesario concentrar las muestras previamente.

El protocolo utilizado implica:

- acidificación del citosol con HCl 0,1N (100 μl HCl/500 μl citosol) que proporciona un pH=2-4
- concentración de las muestras por ultrafiltración a través de Centricon-10 (Amicon)
- neutralización del concentrado con 0,5MHEPES/0,72 M NaOH hasta pH=7-8

Este concentrado se divide en dos fracciones, una para el análisis de cada proteína,

y se guarda acidificado a -80°C hasta su utilización, momento en el que se neutraliza antes de ensayarlo en el RIA correspondiente.

Previamente habíamos estandarizado un método alternativo para el TGF- α que supone una modificación del propuesto por Gregory y col. [154], basado en una extracción orgánica con etanol/dietiléter y ácido acético. Con esta técnica se consiguen recuperaciones del 44,7% pero tiene el inconveniente de que es necesario partir de volúmenes de citosol relativamente grandes. En nuestro intento de compatibilizar los ensayos para ambas proteínas y teniendo en cuenta las limitaciones en cuanto a disposición de tejido, se ha desarrollado este protocolo que permite recuperaciones del 64,3% para el TGF- α y de 80% para el TGF- β .

2.4.2.- Cuantificación TGF- α

Utilizamos la técnica de radioinmunoensayo (RIA) en fase líquida basada en la competición establecida entre un antígeno marcado radiactivamente y el mismo antígeno no marcado ("frío"), para unirse a un anticuerpo específico, esquematizada en la figura 12.

Se utiliza TGF- α humano de origen recombinante marcado con ^{125}I ; TGF- α no marcado y un anticuerpo policlonal anti-TGF- α de oveja.

El complejo " ^{125}I -TGF- α - anticuerpo" es separado del TGF- α marcado libre por precipitación con un segundo anticuerpo (de asno) dirigido contra IgG de oveja y polietilenglicol (PEG).

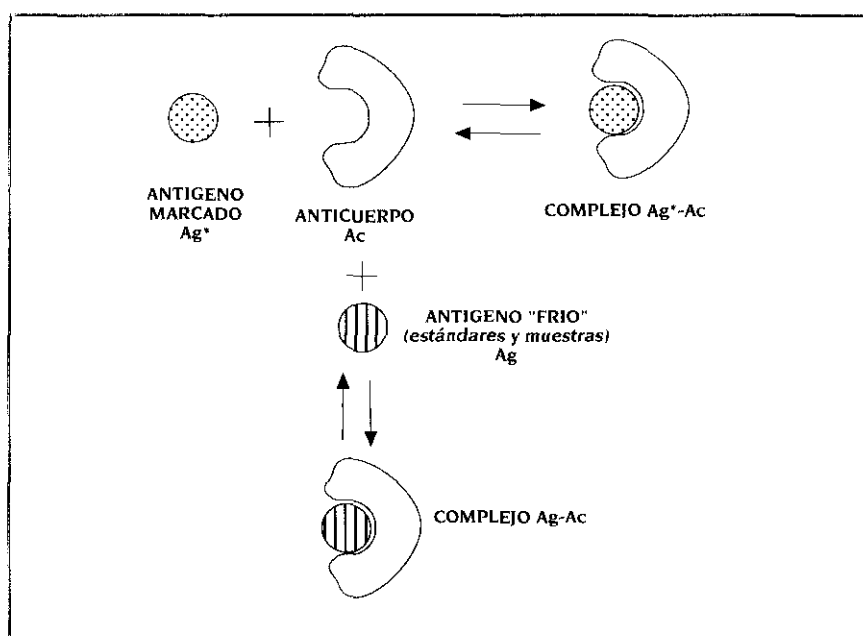


Figura 12. Esquema de la técnica de radioinmunoensayo (RIA)

Se basa en la competición establecida entre un Ag marcado radiactivamente y el mismo Ag no marcado para unirse a un Ab específico.

La concentración de TGF- α en las muestras se calcula por interpolación en la curva estándar realizada a partir de soluciones de concentraciones conocidas de TGF- α (rango: 0.025-2,5 ng/ml)

El ensayo se realizó según el siguiente protocolo:

PROTOCOLO RIA TGF-α	
100 μ l	estándares, muestras y controles
50 μ l	anticuerpo anti-TGF- α
Incubación 24 horas/4°C	
100 μ l	125 I-TGF- α
Incubación 24 horas/4°C	
100 μ l	anticuerpo anti-IgG de oveja
100 μ l	Polietilenglicol (PEG)
Incubación 15 min /20°C	
1.5 ml tampón ensayo	
centrifugación 2000xg/15 min./4°C	
Decantar sobrenadante	
Contar precipitado en un contador gamma	

En la figura 13 se representa el tipo de curva estándar que hemos obtenido para este ensayo con las desviaciones estándar (SD) para cada punto de una media de seis ensayos.

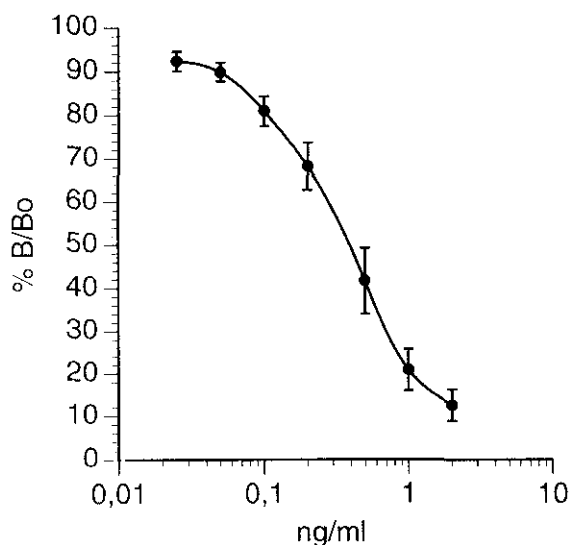


Figura 13. Curva estándar para el RIA de TGF- α

Los valores representan la media y la desviación estándar de 6 ensayos diferentes

La técnica de radioinmunoensayo descrita es un método adecuado para detectar niveles de TGF- α en el citosol de las muestras tumorales. Se ha comprobado que el ensayo reúne condiciones importantes como buena sensibilidad, precisión y especificidad.

2.4.3.- Cuantificación de TGF- β

Se utiliza un radioinmunoensayo basado en el mismo principio descrito para el TGF- α , específico para TGF- β 1 ya que no muestra reacción cruzada con TGF- β 2 (humano y porcino) y TGF- β 3 (pollo) a concentraciones de hasta 2nM.

TGF- β 1 se secreta en una forma latente, la conversión a la forma madura tiene lugar, *in vitro*, por tratamiento enzimático, acidificación y ciclos de congelación/descongelación repetidos. Bajo estas condiciones, la región "pro" se disocia de la parte bioactiva del complejo, que tiene la capacidad de interactuar con receptores y ejercer las acciones biológicas. En nuestro estudio utilizamos la acidificación como proceso de activación (ver 2.4.1).

El ^{125}I -TGF- β 1 se mantiene en una solución que contiene 0.05 M acetato sódico (pH=4), 5% sacarosa, 0.25% Albúmina bovina (BSA).

La curva estándar se prepara en un rango de concentración: 15,6-500 pg/100 μ l de TGF- β 1 humano purificado.

Para la realización del ensayo se siguió el siguiente protocolo:

<u>PROTOCOLO RIA TGF-β1</u>
100 μ l estándares, muestras
100 μ l anticuerpo anti-TGF β 1
incubación 4 horas/tª ambiente
100 μ l ^{125}I -TGF- β 1
incubación 4 horas/tª amb.
100 μ l segundo anticuerpo
incubación 16 horas/4°C
centrifugación 2200xg/4°C/30 min
Decantar sobrenadante
Contar precipitado en un contador gamma

El protocolo descrito es el resultado de la optimización de condiciones de incubación con respecto al recomendado por el fabricante. Como se verá en los resultados, esta modificación ha supuesto un incremento de la sensibilidad y precisión del ensayo.

En la figura 14 se representa la curva tipo de este RIA para una media de tres ensayos.

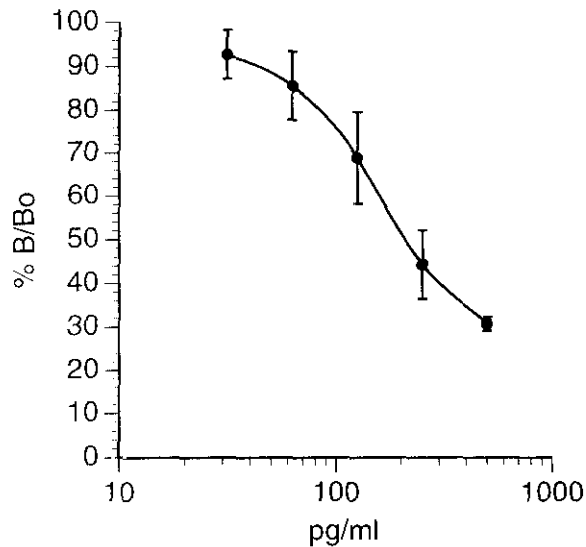


Figura 14. Curva estándar para el RIA de TGF-β.

Los valores representan la media y la desviación estándar de 3 ensayos diferentes

2.5.- CUANTIFICACION DE LA PROTEINA p185 CODIFICADA POR EL ONCOGEN c-erbB-2/HER-2/neu.

2.5.1.- Preparación de las muestras

Se sigue el proceso esquematizado en la figura 15. Como agente de extracción del antígeno se utiliza 0,1%SDS.

2.5.2.- Ensayo

Se utiliza un ELISA tipo "sandwich" que utiliza dos anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen distintos epítomos de la forma humana de p185. El primer anticuerpo está inmovilizado en los pocillos de una microplaca. El antígeno capturado por este primer anticuerpo reacciona con el segundo anticuerpo biotinilado. La cantidad de anticuerpo detector unido al antígeno es cuantificada por el acoplamiento a un conjugado estreptavidina-peroxidasa, que cataliza la conversión del sustrato cromógeno

(OPD). El proceso se esquematiza en la figura 16.

La cantidad de p185 presente en las muestras es calculada por interpolación en la curva estándar construída en el rango: 0-6 fmol/ml de oncoproteína.

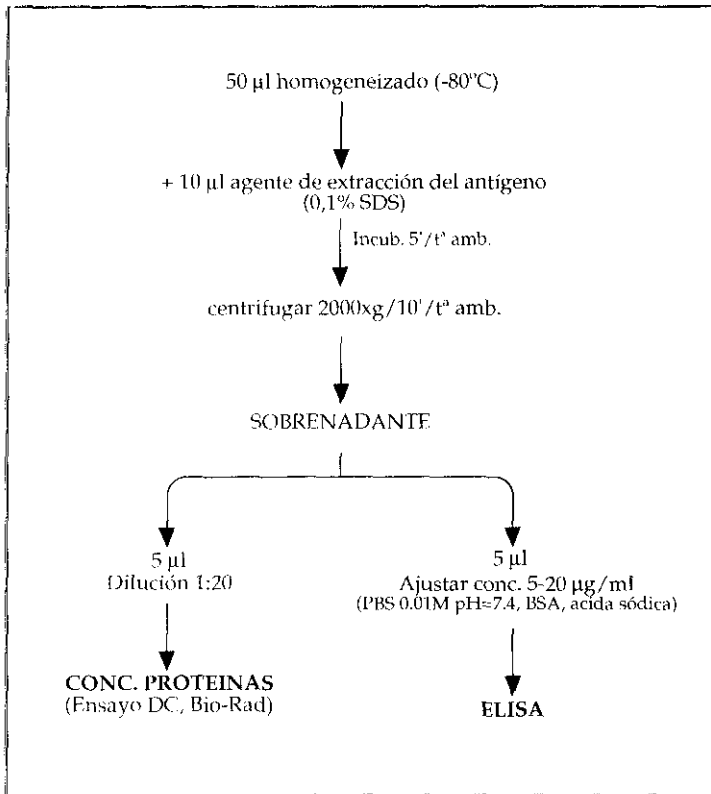


Figura 15. Protocolo para la preparación de las muestras para el ensayo de la proteína p185

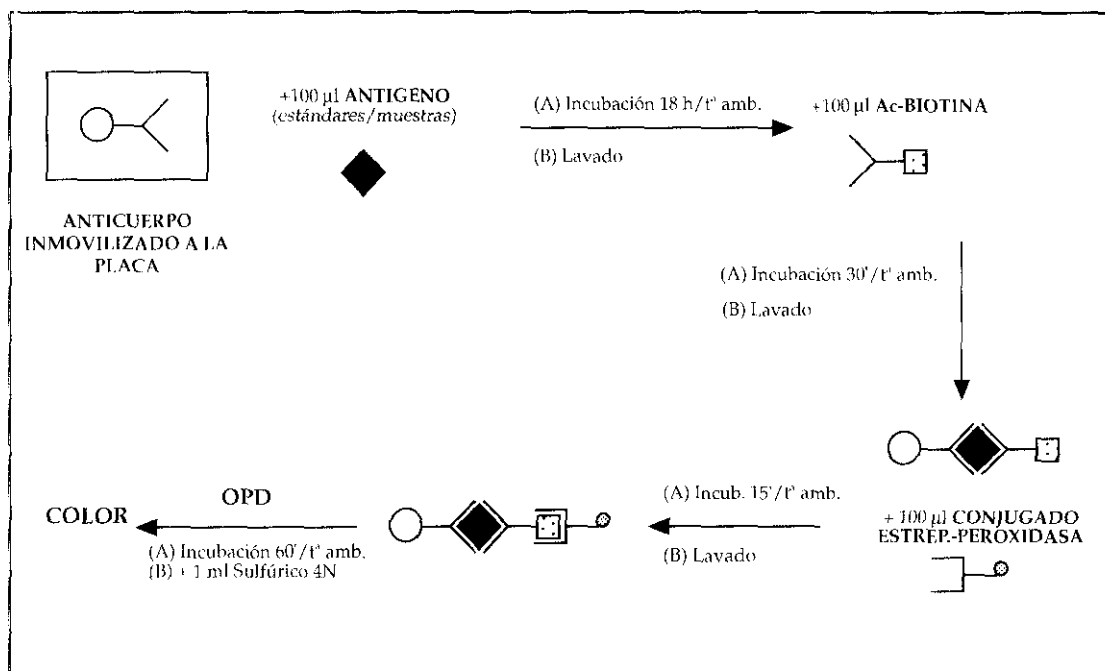


Figura 16. ELISA para la determinación de la proteína p185.

3.- ESTUDIO DE EXPRESION GENICA

3.1.- EXTRACCION DE RNA

El RNA celular se obtuvo directamente a partir del tejido pulverizado o de las líneas celulares utilizadas como control aislándose mediante extracción en fenol ácido y precipitación en isopropanol según el método de Chomczynski y Sacchi [155](AGPC) o bien por el método del RNAzol B.

Las soluciones utilizadas se tratan con dietilpirocarbonato (DEPC) como inhibidor de RNAsas y se mantienen condiciones de estricta esterilidad.

La concentración de RNA se obtiene midiendo la absorbancia a 260 nm y se calcula la relación A_{260}/A_{280} para obtener un índice de la pureza del RNA extraído. Además se realiza paralelamente una electroforesis en gel de agarosa para constatar la calidad del RNA, previamente a su utilización .

El resto del RNA se precipita con etanol y cloruro sódico 0.5M y se guarda congelado hasta su utilización.

3.2.- TECNICA DE NORTHERN

30 μ g de RNA total desnaturalizado con formamida/formaldehído a 65°C se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, 0.82M formaldehído. La electroforesis se desarrolla durante 4-5 horas a 100 voltios, utilizando como tampón de electroforesis 1xMOPS.

El RNA así separado se transfiere a membranas de nylon cargadas positivamente (Quiabrane Nylon Plus, Quiagen) por capilaridad en 10xSSC [156] durante toda la noche. Posteriormente, la unión del RNA a la membrana se hace irreversible por tratamiento a 80°C durante 2 horas.

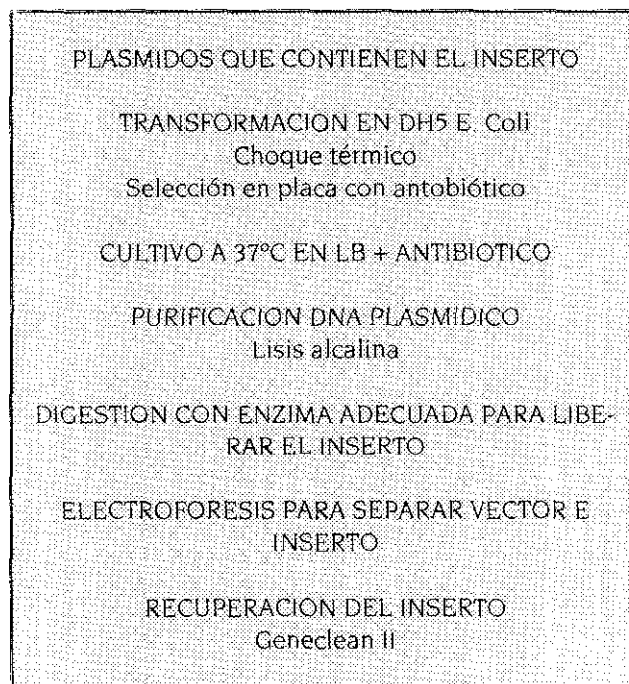
Las membranas se prehibridaron con 20 ml de solución de prehibridación en un horno (Hybaid) a 42°C durante 18-24 horas, y se hibridaron con 15 ml de la misma solución a la que se añadió la sonda correspondiente marcada con ^{32}P - α -dCTP y desnaturalizada por calor. Para eliminar la radiactividad unida de forma inespecífica a la membrana se efectuaron lavados sucesivos con 2xSSC, 1%SDS a temperatura ambiente, 50°C y 60°C. En algunas ocasiones fue necesario utilizar condiciones más astringentes llegando a 0.1xSSC, 1% SDS.

Las membranas se someten a autoradiografía introduciéndolas en los chasis con pantallas intensificadoras y película Hyperfilm MP (Amersham) o X-Omat (Kodak).

Una vez reveladas las placas, las membranas se trataron con 0.1% SDS para eliminar la sonda y volver a hibridarlos con una nueva sonda.

3.3.- OBTENCION DE LAS SONDAS

El proceso que se siguió con cada uno de los plásmidos fue el siguiente:



3.4.- MARCAJE DE LAS SONDAS

Los insertos de cDNA fueron marcados radiactivamente con ^{32}P - α -dCTP bien por el método denominado random priming o bien por nick translation (Ambos de Amersham). El DNA marcado fue separado del nucleótido no incorporado mediante cromatografía de exclusión en columna de Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech). Se realizó una curva de elución y se utilizaron las fracciones correspondientes al pico de DNA marcado.

3.5.- SOLUCIONES

Todas las soluciones, a excepción del TRIS, se preparan con agua tratada con DEPC 0,1% y se autoclavan (a excepción de aquellas que contienen algún detergente).

3.5.1.- Extracción de RNA (AGPC)

- a) Solución desnaturalizante (D): tiocianato de guanidina 4M, citrato sódico 25mM, sarcosil 0,5%, 2-mercaptoetanol 0,1M.
- b) Solución de extracción: Solución D, acetato sódico 0,2M, fenol, cloroformo

3.5.2.- Electroforesis

- a) Gel desnaturalizante: agarosa 1%, formaldehido 0,82M, 1XMOPS
- b) Tampón desnaturalización muestras: 1XMOPS, formamida 50%, formaldehido 6,2%, bromuro de etidio 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- c) Tampón de carga: glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,4%
- d) 10XMOPS: MOPS 0,4M, Acetato sódico 0,1M, EDTA 20mM pH=7

3.5.3.- Transferencia

20XSSC: Cloruro sódico 3M, citrato sódico 0,3M

3.5.4.- Prehibridación/Hibridación

Formamida 50%, sulfato dextrano 10%, cloruro sódico 1M, SDS 1%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ssDNA

3.5.5.- Medio LB

Bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro sódico 1% pH=7

4.- TECNICAS HISTOLOGICAS

La interpretación de los resultados obtenidos por estas técnicas se realizó con la ayuda y criterio de un anatomopatólogo.

4.1. INMUNOCITOQUIMICA PARA LA DETERMINACION DE RECEPTORES HORMONALES

Se selecciona masa tumoral de unas dimensiones aproximadas: 1x0,5x0,3 cm y se congela en N₂ líquido. En un microtomo de congelación se realizan secciones de tejido de 5-8 µm de espesor, que se fijan para la localización inmunocitoquímica (ICA) de ER y PR (Abbott).

Se utiliza suero normal de cabra como agente bloqueante para reducir la unión inespecífica. A continuación las secciones se incuban secuencialmente con un anticuerpo monoclonal de rata anti-ER o anti-PR, una IgG anti-rata de cabra y un complejo peroxidasa-antiperoxidasa de rata. La unión específica se visualiza por la adición del cromógeno DAB y peróxido de hidrógeno. Como control negativo, una sección adyacente se tiñe por el mismo procedimiento pero sustituyendo el primer anticuerpo por una IgG normal de rata.

4.2.- TINCION CON HEMATOXILINA-EOSINA

El resto de la pieza se incluye en parafina y se procesa automáticamente para el estudio con microscopio óptico. Se determinan así el tipo histológico del tumor, el grado de diferenciación y la naturaleza de las estructuras ganglionares aisladas.

5.- METODO ESTADISTICO

Para estudiar la existencia de asociación entre variables cualitativas utilizamos el test de chi cuadrado (χ^2) con la corrección de Yates cuando son tablas de contingencia 2x2. Consideramos que la asociación tiene significación estadística cuando $p < 0,05$. Cualquier valor superior lo designamos como NS [157].

Los valores de χ^2 y p se obtienen del tratamiento estadístico de las muestras con los programas Statworks y BMDP 4F.

RESULTADOS

1.- CARACTERISTICAS DESCRIPTIVAS DE LAS MUESTRAS

El estudio cuyos resultados se expondrán a continuación tiene como sistema experimental biopsias de 53 tumores sólidos humanos de cáncer de mama. Se ha elegido este sistema porque, aunque en estado estacionario, supone una aproximación más precisa que las líneas celulares de lo que sucede "in vivo" en cuanto a heterogeneidad celular dentro del tumor e influencia de distintos componentes (epitelio, estroma, vascularización,...). Dado que nuestro objetivo fundamental es aportar algún dato referente al comportamiento del cáncer de mama en cuanto a su dependencia hormonal y progresión tumoral, consideramos importante describir ciertas características histológicas propias del tumor que ya implican por sí mismas un determinado comportamiento y que son el tipo histológico, grado de diferenciación, existencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares y edad de la paciente en el momento de la obtención de la muestra. El tipo histológico y el grado de diferenciación han sido determinados en los cortes de tejido donde se ha confirmado la naturaleza neoplásica de la muestra a estudiar. La existencia de ganglios linfáticos afectados ha sido confirmada en la pieza quirúrgica de mastectomía analizando cada estructura ganglionar aislada y la edad procede de los datos de la historia de la paciente.

1.1. TIPO HISTOLOGICO

Las 53 muestras estudiadas se clasifican en cuatro categorías definidas por el tipo histológico:

- Formas de buen pronóstico: incluyen los carcinomas "in situ", las formas tubulares y carcinomas mucinosos o coloides ya que todas ellas representan formas más diferenciadas, de menor actividad, mejor supervivencia y, en el caso del carcinoma "in situ", no invasivas.

- Carcinoma ductal infiltrante: es el tipo de lesión más frecuente dentro de los cánceres de mama, dato confirmado por los resultados de este estudio según se observa en la figura 17.

- Carcinoma lobulillar infiltrante

- Formas mixtas con zonas de crecimiento tanto ductal como lobulillar.

El aspecto histológico que presentan algunos tipos de los tumores estudiados puede apreciarse en las figuras 18-23.

La distribución de las muestras en tipos histológicos se representa en la figura 17:

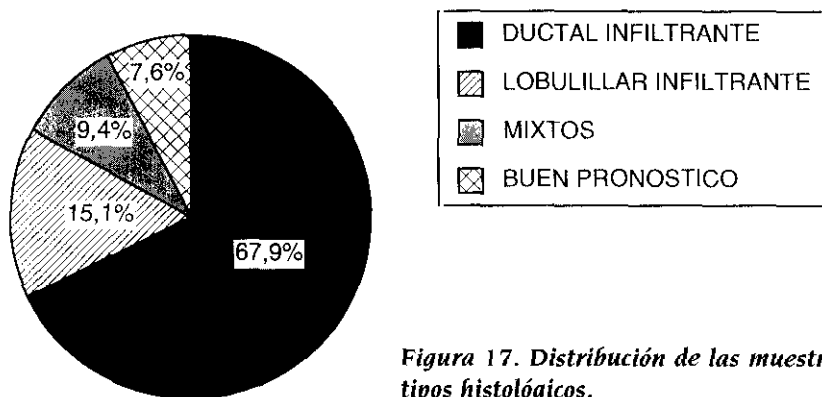


Figura 17. Distribución de las muestras en tipos histológicos.

Estos resultados son un reflejo de la realidad según datos epidemiológicos y de otras series de tumores.

1.2. GRADO DE DIFERENCIACION

El grado de diferenciación tumoral se estableció según los criterios descritos en la introducción. En nuestras muestras los tumores se presentaron en la siguiente proporción:

Grado I:	7,6%
Grado II:	49%
Grado III:	43,4%

La distribución de las muestras en función del tipo histológico y del grado de diferenciación queda recogida en la figura 24:

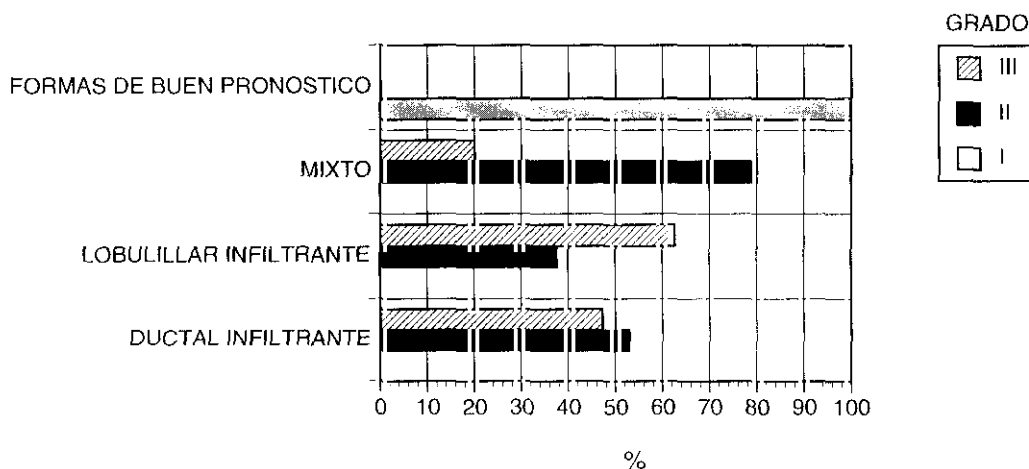


Figura 24. Distribución de las muestras en función del tipo histológico y del grado de diferenciación.

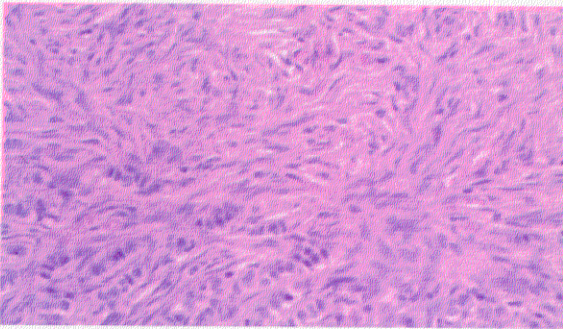


Figura 18.- Carcinoma ductal infiltrante.
Grado II de diferenciación. Las células neoplásicas se disponen en cordones separados por un estroma muy denso.

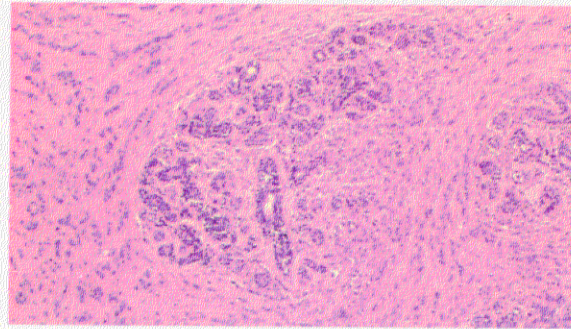


Figura 19.- Carcinoma lobulillar infiltrante.
Forma clásica con crecimiento celular en hilera.

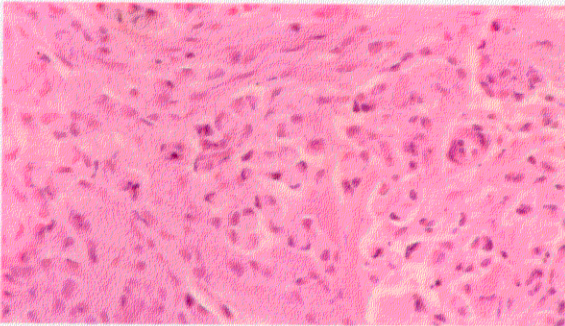


Figura 20.- Carcinoma lobulillar infiltrante.
Se identifica una zona de células en "anillo de sello".

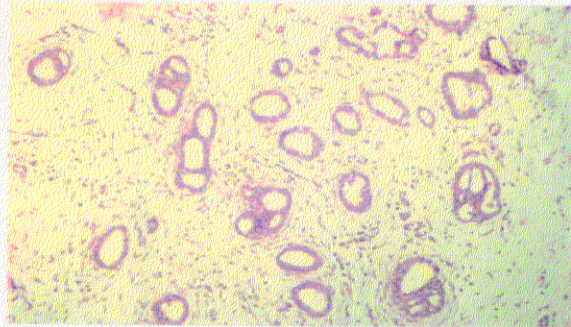


Figura 21.- Carcinoma tubular.
Forma de buen grado de diferenciación.

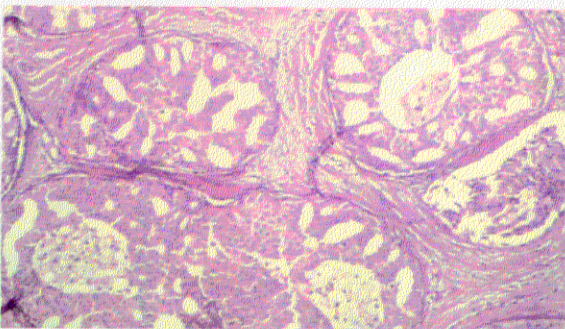


Figura 22.- Carcinoma intraductal.
Las células neoplásicas se disponen en el interior de los conductos sin traspasar la basal de los mismos.

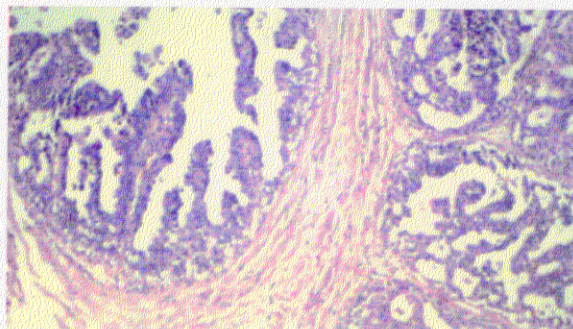


Figura 23.- Carcinoma intraductal.
Se aprecia crecimiento micropapilar

Todos los tumores clasificados como formas de buen pronóstico se corresponden con un grado I de diferenciación histológica, confirmando su condición de formas bien diferenciadas.

El resto de los tipos histológicos estudiados que representan formas invasivas, se corresponden con grados II y III de diferenciación.

En el caso de los carcinomas ductales infiltrantes, el 52,8% corresponde con un grado II y el 48,2% se corresponde con un grado III.

Los carcinomas lobulillares han sido, igualmente, clasificados en grado II y III, pero no tanto en el concepto de clasificación de los ductales sino como formas que responden al patrón clásico de crecimiento lobulillar (grado II) y formas que no se ajustan a este patrón clásico (grado III), entre las que se incluyen los tipos de "célula pequeña" y los de "anillo de sello". Teniendo en cuenta esta salvedad, encontramos que el 62% de los lobulillares infiltrantes corresponden a un grado III.

Referente a las formas mixtas, el 80% se corresponde con un grado II y el 20% con un grado III.

1.3.- EDAD

La edad media de las pacientes incluídas en este estudio es de $61,46 \pm 12,9$ (media \pm SD), en un rango desde 33 años a 87 años.

Se considera el punto de corte de 50 años como criterio para clasificar las muestras en dos categorías que representan el estado menopaúsico:

Premenopaúsicas: ≤ 50 años (25% de las muestras)

Postmenopaúsicas: > 50 años (75% de las muestras)

La asociación entre la edad y el grado de diferenciación o el tipo histológico se puede observar en las figuras 25 y 26.

Es importante destacar que ningún tumor de pacientes premenopaúsicas pertenece al grupo I de diferenciación o grupo de tumores de buen pronóstico. En términos generales, teniendo en cuenta todas las categorías de tipo o grado con respecto a la edad, las asociaciones no tienen significación estadística.

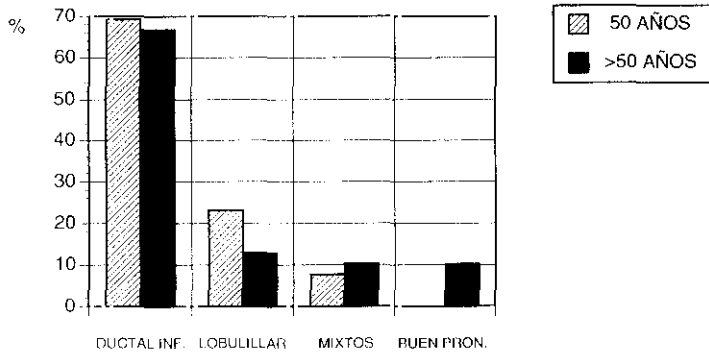


Figura 25. Asociación entre la edad y el tipo histológico.

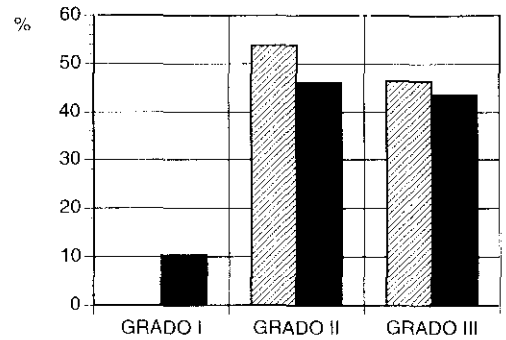


Figura 26. Asociación entre la edad y el grado de diferenciación.

1.4.- METASTASIS LINFOGANGLIONARES

Consideramos la existencia de neoplasia en los ganglios linfáticos como criterio de metástasis y, por tanto, de progresión de la enfermedad hacia un estadio más avanzado. Esto permite clasificar las muestras en dos grupos:

- N-: no existe evidencia de metástasis en ninguno de los ganglios analizados
- N+: se detectaron metástasis en al menos uno de los ganglios analizados

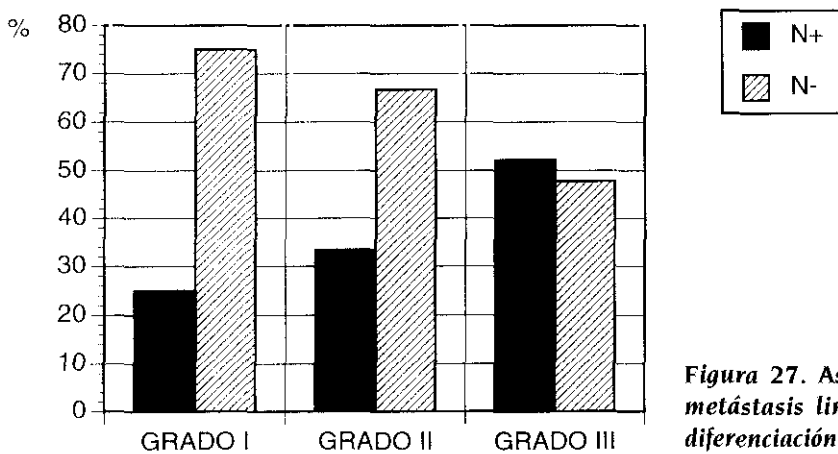


Figura 27. Asociación entre la existencia de metástasis linfoganglionares, y el grado de diferenciación.

En la gráfica 27 se muestra la correlación entre N y el grado de diferenciación. El porcentaje de ganglios afectados aumenta con la pérdida de diferenciación.

La correlación entre la existencia de ganglios afectados y el tipo histológico queda reflejada en la tabla II.

Un único tumor clasificado como de buen pronóstico presenta metástasis axilares, el resto de las asociaciones no son significativas.

	N+ (n=21)	N- (n=30)
Ductal infiltrante	14/34 (41%)	20/34 (59%)
Lobulillar infiltrante	4/8 (50%)	4/8 (50%)
Mixtos	2/5 (40%)	3/5 (60%)
Formas de Buen Pronóstico	1/4 (25%)	3/4 (75%)

Tabla II. Asociación entre la existencia de metástasis linfoganglionares y el tipo histológico.

2.- ESTUDIO DE EXPRESION

En el estudio de los genes implicados en la regulación del crecimiento del cáncer de mama es importante caracterizar las proteínas secretadas funcionalmente activas y su expresión génica a nivel de mensajero para obtener datos acerca de su traducción o existencia de algún mecanismo de regulación adicional. Este tipo de estudio está especialmente justificado en algunos de los genes estudiados como es el caso del receptor de estrógenos, receptor de EGF y factores de crecimiento.

La fracción de tejido tumoral destinada para el estudio proteico oscila entre 56 mg y 808 mg ($250,7 \text{ mg} \pm 135,1$). De su procesamiento se obtienen las distintas fracciones celulares en las que se llevan a cabo las determinaciones de los niveles de proteína.

Según se detalla en Materiales y Métodos, se extrae el RNA total de las muestras tumorales previamente pulverizadas partiendo de fracciones de tejido entre 55,5 y 494 mg ($142 \pm 62,5$). La variabilidad en el rendimiento que se obtiene en nuestras muestras ($0,8 \pm 0,6 \mu\text{g RNA/mg tejido}$), se justifica por la diferente celularidad de los tumores.

Existe una limitación, cuando se trabaja con tumores sólidos relativa al tamaño de las biopsias cada vez más reducido debido al diagnóstico precoz de esta patología.

Esto impide purificar el RNA total para obtener polyA⁺-RNA y por tanto la sensibilidad del Northern no alcanza los niveles deseados en algunas circunstancias.

La calidad del RNA obtenido se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% previa al análisis de Northern. Un ejemplo de la tinción con bromuro de etidio se muestra en la figura 28.

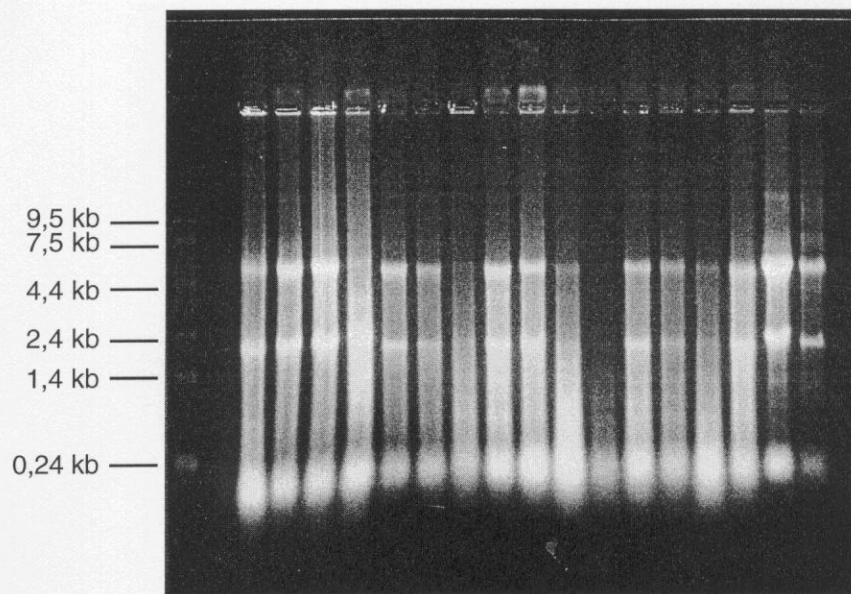


Figura 28. Tinción con bromuro de etidio de uno de los geles.

La tinción con Bromuro de Etidio demuestra la presencia de rRNAs intactos que da información acerca de posibles diferencias al cargar el RNA y de la eficiencia de la transferencia

Los tamaños de los mRNAs detectados con cada sonda se han determinado comparando con un marcador de RNA analizado en cada gel junto con las muestras.

2.1.- RECEPTORES HORMONALES: ER Y PR

2.1.1.- Estudio de niveles de proteína

Nuestro grupo de trabajo pertenece desde 1988 al Grupo para el Estudio de Receptores de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) que desarrolla un programa de validación de protocolos para la determinación de parámetros útiles en el estudio del cáncer de mama. Además, el grupo dirige un programa de control de calidad para varios de estos factores entre los que se incluyen los receptores hormonales y el receptor de EGF [158]

La determinación del contenido de ER y PR por enzimoimmunoensayo (EIA) presenta ciertas ventajas con respecto a la técnica de unión de ligandos tritiados (LBA), técnica utilizada tradicionalmente. En primer lugar, se necesita menor cantidad de citosol, factor limitante en nuestro estudio por el tamaño pequeño de algunos de los tumores y por la cantidad de variables que nos planteamos determinar en cada muestra. Otra de las ventajas del EIA es que detecta los receptores tanto ocupados como libres obviando las posibles interferencias en el ensayo con los ligandos endógenos.

Para validar los resultados que se obtiene por EIA con respecto a los que se venían obteniendo por LBA se realizó un estudio multilaboratorio en el que encontramos que la correlación entre EIA y LBA es muy buena con pendientes cercanas a la unidad ($r=0.976$; $Y=0.92X + 0.125$; $n=73$).

Para clasificar las muestras como positivas o negativas se asigna un punto de corte basado en consideraciones de aplicabilidad del parámetro para diferenciar grupos con alta o baja expresión o bien con niveles normales o sobreexpresados. Estos puntos de corte se determinan generalmente como el valor medio de un percentil particular [159]. En el caso de ER y PR es internacionalmente admitido el punto de corte de 20 fmol/mg cuando la técnica utilizada es el enzimoimmunoensayo.

	ER-	ER+
n(%)	16 (30,2%)	37 (69,8%)
Rango fmol/mg	0 - 11	22,3 - 1258
Media \pm SD fmol/mg	2,7 \pm 3,2	281,5 \pm 298,8

Tabla III. Distribución de las muestras en cuanto al contenido de ER

	PR-	PR+
n(%)	24 (45,3%)	29 (54,7%)
Rango fmol/mg	0 - 17,6	22,6 - 905
Media \pm SD fmol/mg	3,4 \pm 5	207,6 \pm 211

Tabla IV. Distribución de las muestras en cuanto al contenido de PR

resultados en las 53 biopsias estudiadas se distribuyen:

La presencia de receptores de progesterona es un indicador importante de la respuesta a la terapia endocrina . La distribución de las 53 muestras según la presencia concomitante de ER y PR es la siguiente:

ER+ / PR+	ER+ / PR-	ER- / PR+	ER- / PR-
28/53	9/53	1/53	15/53
52,8%	17%	1,9%	28,3%

Tabla IV. Distribución de las muestras según la presencia concomitante de ambos receptores.

2.1.2.- Estudio de expresión génica

Se detecta una única banda que se corresponde con un tamaño de 6,5 Kb (fig 29). No se encuentran transcritos de tamaños diferentes en ninguna de las muestras analizadas.

La existencia de esta banda específica se ha detectado en un 26% de las muestras analizadas (13/50) con tiempos relativamente largos de exposición (5-7 días). Todas estas muestras son también positivas para la proteína ER determinada por enzimoimmunoensayo con un valor medio de 443 ± 344 fmol/mg. Esto indica que los límites de sensibilidad del Northern son menores que los de la determinación bioquímica ya que no se detecta hibridación en ninguna muestra con valores de ER inferiores a 68,6 fmol/mg. Hay algunos tumores con valores altos cuyos RNA no se detectaron y no existe ninguna muestra en la que la proteína no se haya traducido a partir de un mRNA detectable

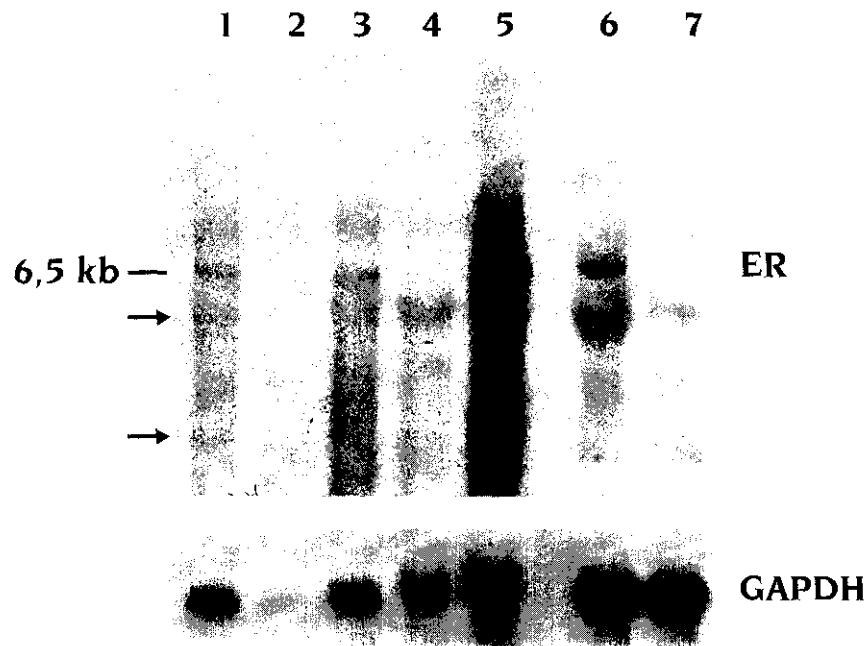


Figura 29. Análisis de Northern del receptor de estrógenos.

30 µg. de RNA total procedente de tumores (1-5) y de líneas celulares (6 y 7) se separan mediante electroforesis y se hibridan con una sonda específica para ER. Se detecta una banda específica de 6,5 kb en tres de los tumores y en el control positivo (6:MCF-7). Como control negativo (7) se utiliza la línea celular MDA-MB-231. Las membranas se hibridaron con la sonda de GAPDH para comprobar diferencias en la carga y en la transferencia. Las flechas representan la posición de los RNAs ribosómicos.

2.1.3.- Correlaciones con las características de los tumores

a) Edad

Los tumores de pacientes postmenopáusicas contienen valores mayores de ER y son positivos en una proporción mayor que las pacientes premenopáusicas (tabla VI), sin embargo, el contenido de PR no es dependiente de la edad en este estudio (tabla VII)

	ER-	ER+	Media ER+ fmol/mg	Rango fmol/mg
PREMENOPAUSICAS	6/13 46%	7/13 54%	96,4	22,3-229
POSTMENOPAUSICAS	10/39 26%	29/39 74%	333	24,5-1258

Tabla VI. Distribución de ER en las muestras de pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas

	PR-	PR+	Media[PR+] fmol/mg	Rango fmol/mg
PREMENOPAUSICAS	5/13 38,5%	8/13 61,5%	178,4	22,6-538
POSTMENOPAUSICAS	18/39 46%	21/39 54%	218,8	23-905

Tabla VII. Distribución de PR en las muestras de pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas

b) Grado de diferenciación

En la distribución de los tumores con respecto al estado de receptores de estrógenos y progesterona y el grado de diferenciación (figuras 30 y 31), se observa una pérdida simultánea de receptores de estrógenos y diferenciación histológica del tumor. Para PR no hay diferencias en los tumores de grado I, sin embargo la tendencia a perder los receptores de progesterona con la pérdida de diferenciación histológica es mucho más marcada que en el caso de ER y tiene significación estadística ($p < 0,05$)

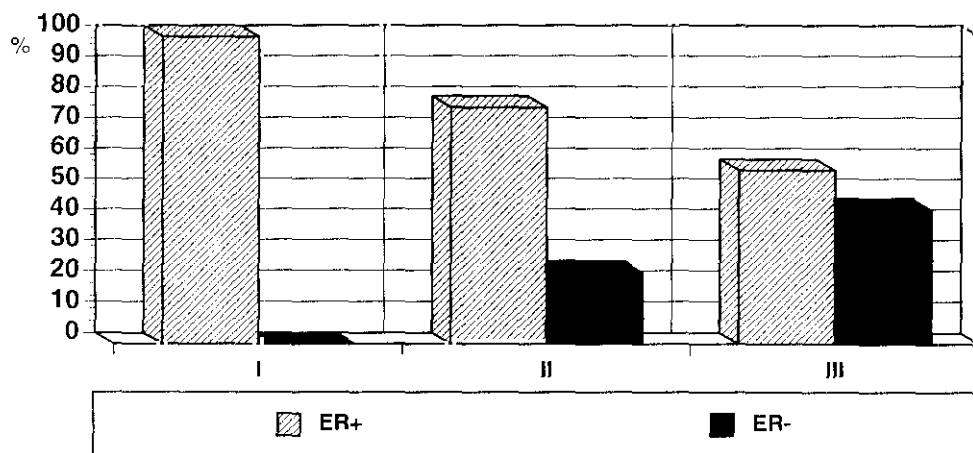


Figura 30. Asociación entre el grado de diferenciación y el contenido de ER.
La proporción de tumores ER- con la pérdida de diferenciación ($p = NS$)

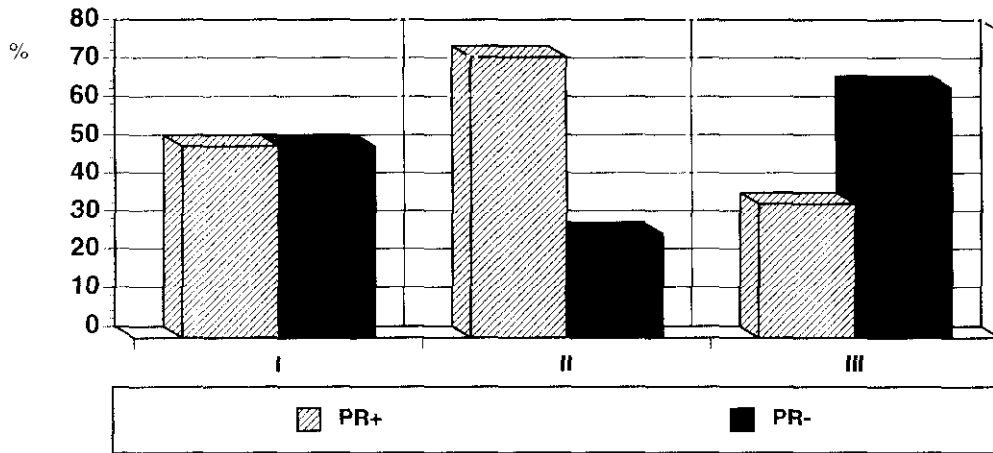


Figura 31. Asociación entre PR y el grado de diferenciación.
 Exceptuando el grupo de pacientes con grado I, el aumento del porcentaje de tumores PR- con la pérdida de diferenciación tiene significación estadística ($p < 0,05$)

c) Tipo histológico

Es de resaltar las formas de buen pronóstico que son positivas para ER en el 100% de los casos y los carcinomas lobulillares infiltrantes que, a pesar de su escasa diferenciación, presentan receptores de estrógenos en un 87,5% de las muestras tal y como se observa en la figura 32. Para los otros tipos no existe ninguna tendencia ni asociación.

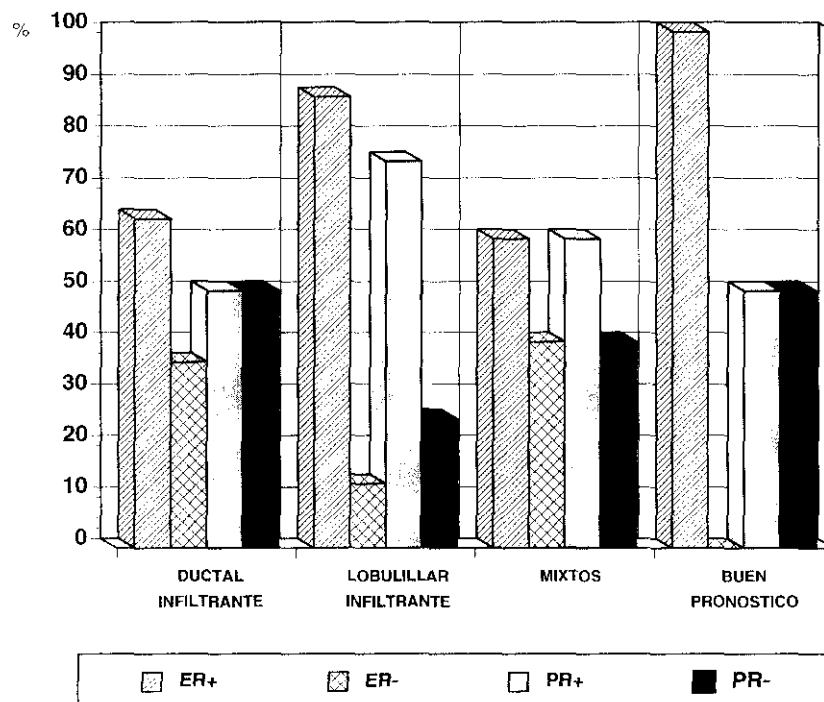


Figura 32. Asociación entre el contenido de receptores y el tipo histológico.

En el caso de PR la independencia entre las variables es mayor y únicamente hay diferencias significativas en el grupo de los lobulillares donde un 75% son PR+.

2.1.4.- Correlación enzoinmunoensayo (EIA)/inmunocitoquímica (ICA)

La determinación inmunohistoquímica de los receptores hormonales en cortes de tejidos permite definir la localización celular y la distribución de los mismos así como realizar una estimación cualitativa de sus niveles de expresión.

Se han analizado 24 muestras por ICA, en las que de forma paralela se ha determinado el contenido de receptores por enzoinmunoensayo. La estimación del índice de expresión de receptores por inmunocitoquímica se realiza calculando el porcentaje de células teñidas. El criterio de clasificación que se ha seguido en este estudio es:

<u>Categoría</u>	<u>% de células positivas</u>
-	<10%
+	10-30%
++	30-70%
+++	>70%

La localización de los receptores es fundamentalmente nuclear, tal y como se puede observar en la figura 33:

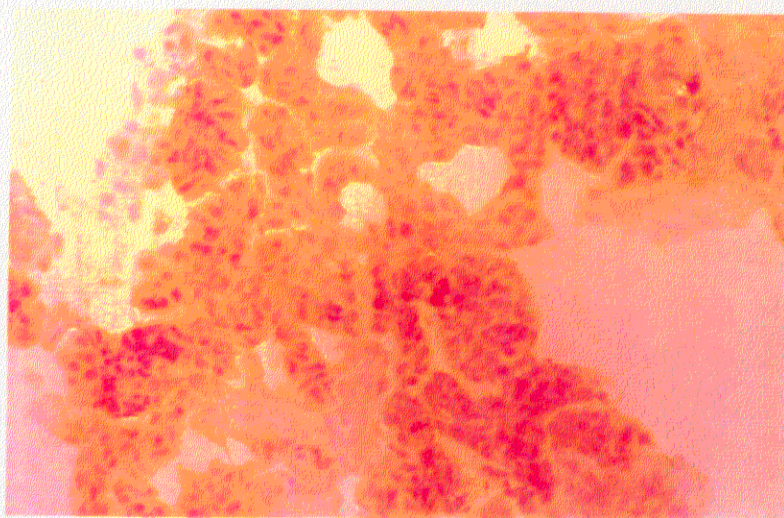


Figura 33. Tinción de receptores hormonales en cáncer de mama por inmunocitoquímica.

El método permite diferenciar la población celular que expresa receptores dentro del tumor así como comprobar la localización nuclear de los receptores en la célula intacta.

Se ha estimado la correlación existente entre ambas metodologías, en el caso del receptor de estrógenos existen algunos casos discrepantes en los que la proteína se detecta bioquímicamente y sin embargo no hay tinción positiva en los cortes de tejido tumoral. En la determinación del receptor de progesterona la correlación es perfecta con un único caso discrepante. Los resultados de este estudio se recogen en las figuras 34 y 35, y en las tablas de frecuencia del contenido de receptores por ambos métodos.

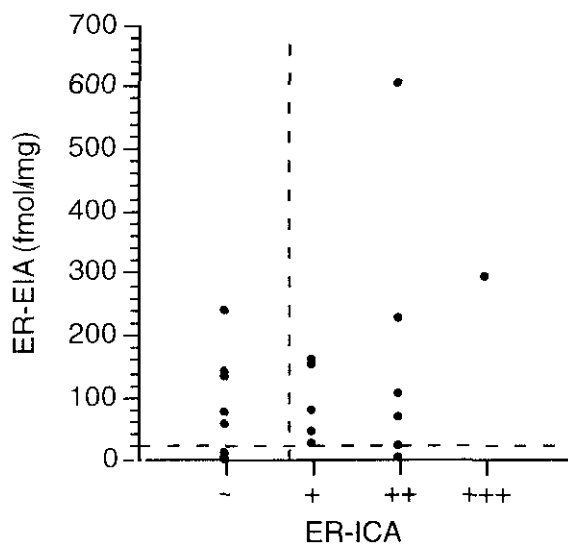


Figura 34. Asociación entre los valores de ER obtenidos por enzimoimmunoensayo (EIA) y por inmunocitoquímica (ICA). El punto de corte para EIA es de 20 fmol/mg y para ICA es un 10% de células teñidas.

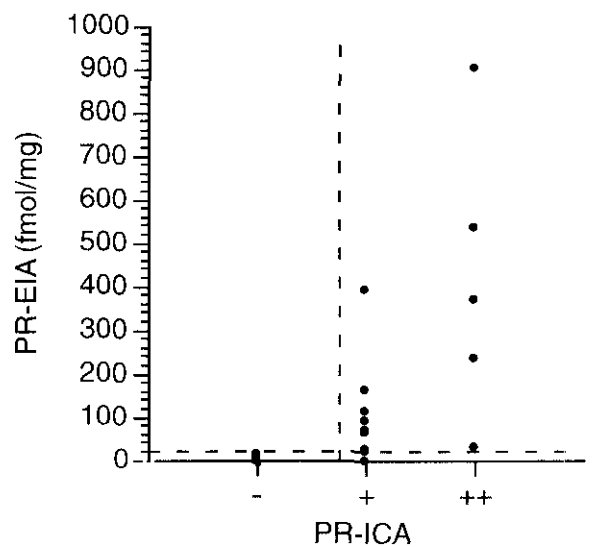


Figura 35. Asociación entre los valores de PR obtenidos por enzimoimmunoensayo (EIA) y por inmunocitoquímica (ICA). El punto de corte para EIA es de 20 fmol/mg y para ICA es un 10% de células teñidas.

	ER-EIA+	ER-EIA-
ER-ICA+	11	1
ER-ICA-	5	7

Tabla VIII. Tabla de contingencia de ER determinado por ambas metodologías. Se expresan número de casos y la asociación es estadísticamente significativa ($p=0,01$).

	PR-EIA+	PR-EIA-
PR-ICA+	14	1
PR-ICA-	0	9

Tabla IX. Tabla de contingencia de PR determinado por ambas metodologías. Únicamente hay un caso discrepante y la correlación es estadísticamente significativa ($p=0,001$).

2.2.- RECEPTORES DE EGF

2.2.1.- Estudio de niveles de proteína

a) Marcaje del EGF

La actividad específica (S.A) del EGF marcado se determinó según se explica en Materiales y Métodos . La media de los valores obtenidos en seis marcajes diferentes es de $787,4 \pm 300$ cpm/fmol.

b) Ensayo de unión al ligando.

Los resultados se analizan por el método de Scatchard de acuerdo con la modificación de van Zoelen [160]. Este método de cálculo nos aporta los datos de sitios de unión (B) y constante de disociación (Kd), un parámetro de la afinidad de la unión ligando-receptor cuyos valores para las muestras con valores positivos (15,1%) se muestra en la tabla X.

Una preparación de membrana se clasifica como EGFR+ cuando la concentración de receptores es mayor de 3 fmol/mg.

EGFR+		
B	Rango (fmol/mg)	3-774
	Media \pm SD	119 \pm 267
Kd	Rango (nM)	0,24-1,98
	Media \pm SD	0,66 \pm 0,66

Tabla X.

Rango de valores para el nº de receptores de EGF (B) y constante de disociación (Kd) en las muestras de cáncer de mama que expresan EGFR.

2.2.2.- Estudio de expresión génica

La hibridación con la sonda que reconoce los dominios transmembrana y extracelular de la molécula EGFR aporta como resultado dos bandas específicas de tamaños alrededor de 11 Kb y 6 Kb (figura 36).

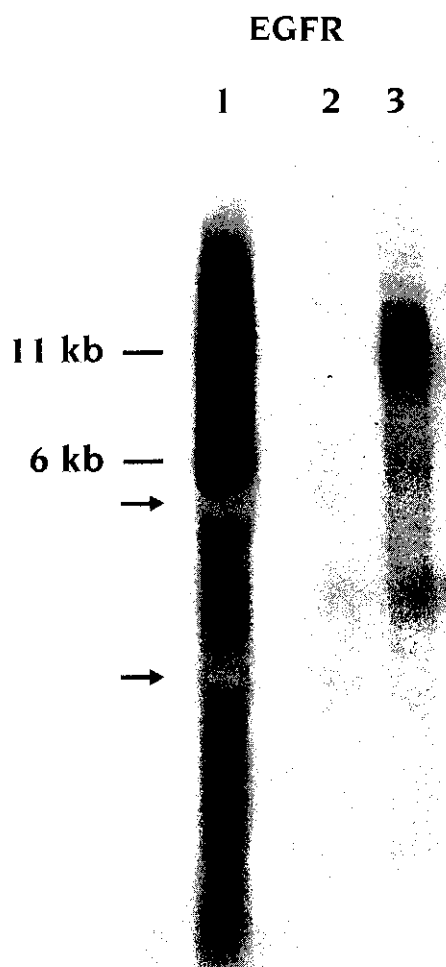


Figura 36. Análisis de Northern para EGFR.

30 μ g de RNA total se sometieron a electroforesis hibridando con una sonda específica para este gen. Unicamente detectamos hibridación en uno de los tumores analizados (1), mostrando una banda mucho mas intensa que la del control positivo (3). en la posición (2) se representa el control negativo. Se detectan dos bandas para el tumor, pero la linea celular MDA-MB-231 solo expresa la banda de mayor peso molecular. La flecha indica la posición del RNA ribosómico de 28S

Unicamente se detecta mRNA para EGFR en uno de los tumores con valores positivos para la proteína con un número de receptores de 774 fmol/mg. Son suficientes unas horas de exposición para visualizar las bandas y no es posible detectar ningún otro tumor positivo aun incrementando los tiempos de exposición hasta 10 días.

El siguiente valor positivo en rango determinado bioquímicamente es de 20 fmol/mg

2.2.3.- Correlaciones con las características de los tumores

a) Receptores hormonales

La correlación entre EGFR y los receptores hormonales queda expresada en las siguientes tablas de frecuencia:

	EGFR+	EGFR-
ER+	3	34
ER-	5	11

Tabla XI. Análisis de contingencia entre ER y EGFR.

Existe una correlación inversa entre la expresión de ER y EGFR ($p < 0.05$)

	EGFR+	EGFR-
PR+	4	25
PR-	4	20

Tabla XII. Análisis de contingencia entre PR y EGFR.

No existe en este estudio ninguna asociación entre ambos factores

Se manifiesta una relación inversa entre el contenido de EGFR y ER estadísticamente significativa ($p < 0,05$). No existe dependencia de la presencia EGFR con la de receptores de progesterona.

b) Correlación con parámetros histológicos

La asociación entre la expresión de EGFR y los parámetros histológicos se expresan en la tabla XIII. No existe dependencia con ninguno de los factores estudiados.

<i>Factor</i>	EGFR +	EGFR-	<i>valor de p</i>
Tipo histológico			
Ductales infiltrantes	5/8 (62,5%)	31/45 (69%)	NS
Lobulillares infiltrantes	1/8 (12,5%)	7/45 (15,5%)	
Mixtos	0/8 (0%)	5/45 (11,1%)	
Buen Pronóstico	2/8 (25%)	2/45 (4,4%)	
Grado de diferenciación			
Grado I	2/8 (25%)	2/45 (4,4%)	NS
Grado II	3/8 (37,5%)	23/45 (51,1%)	
Grado III	3/8 (37,5%)	20/45 (44,4%)	
Ganglios afectados			
N-	5/8 (62,5%)	25/43 (58,1%)	NS
N+	3/8 (37,5%)	18/43 (41,9%)	
Edad			
≤50 años	2/8 (25%)	11/44 (25%)	NS
>50 años	6/8 (75%)	33/44 (75%)	

Tabla XIII. Correlación entre parámetros histológicos de diferenciación y progresión tumoral y la expresión de EGFR.

No existe asociación entre EGFR y ninguno de los factores estudiados.

2.3.- FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- α (TGF- α)

2.3.1.- Estudio de niveles de proteína

Se ha analizado la actividad TGF- α en un total de 37 muestras y se han obtenido valores detectables por encima del límite de sensibilidad del ensayo en 12 muestras. Los valores se expresan en ng de actividad TGF- α por gramo de proteína de citosol (tabla XIV.).

	TGF- α detectable
n(%)	12 (32,4%)
Rango ng/g	4,7-78
Media \pm SD ng/g	21,07 \pm 20,3

Tabla XIV. Niveles de expresión de TGF- α en las muestras analizadas.

Los valores se expresan en ng/g de proteína de citosol

La sensibilidad definida como dos desviaciones estándar respecto del nivel cero de la curva de calibración es para TGF- α de 0,014 ng/ml (fig. 37) con un coeficiente de variación (CV) representado en la figura 38. En cuanto a la especificidad, el ensayo ha demostrado no tener reacción cruzada con EGF, TGF- α de rata, insulina y transferrina.

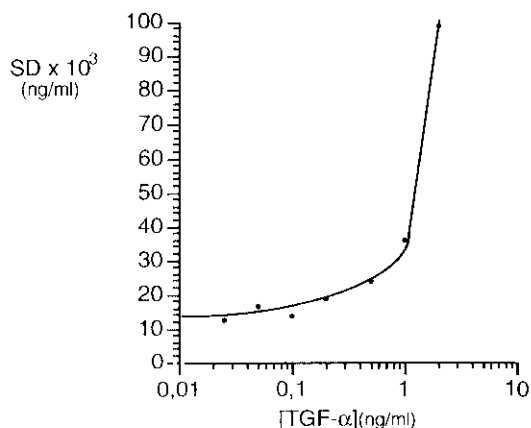


Figura 37

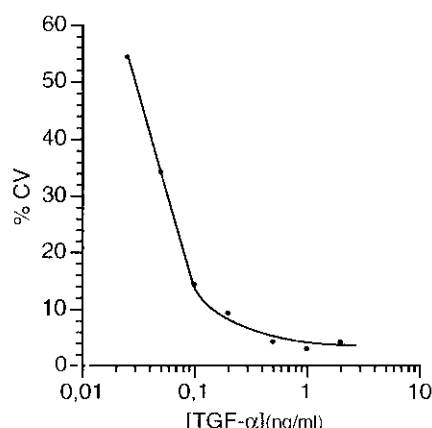


Figura 38

Sensibilidad y precisión del RIA de TGF α .

El valor de sensibilidad se obtiene del punto de corte con el eje de ordenadas al representar SD frente a dosis. Los coeficientes de variación disminuyen a dosis mayores de TGF α .

2.3.2.- Correlaciones con otros parámetros

a) Receptores hormonales (ER y PR)

La pérdida de dependencia hormonal y transición hacia un estado de crecimiento autónomo podría estar mediada por la expresión constitutiva de factores de crecimiento. En contra de esta hipótesis, en las muestras analizadas, la expresión de TGF- α es mayoritaria en tumores con receptores hormonales positivos aunque la diferencia con el grupo de tumores que carecen de receptores no es estadísticamente significativa (figuras 39 y 40)

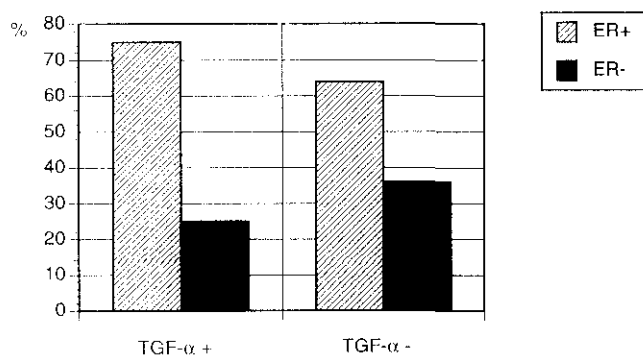


Figura 39. Asociación entre la expresión de TGF- α y los receptores estrogénicos.

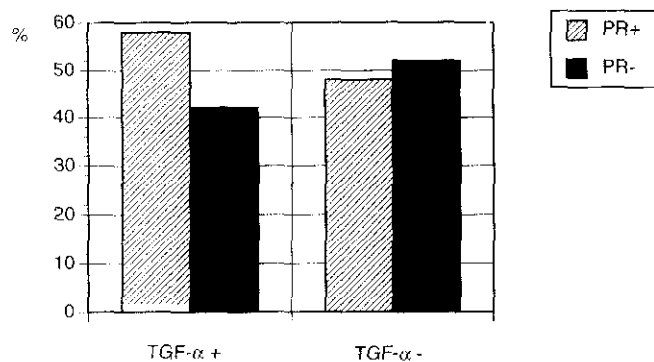


Figura 40. Asociación entre la expresión de TGF- α y los receptores de progesterona.

Tampoco existen diferencias en los niveles de expresión de TGF- α en los grupos ER+(21,8 \pm 22,9 ng/g) y ER- (18,8 \pm 12,8 ng/g).

b) Receptores de EGF

El TGF- α ejerce sus efectos biológicos a través de la unión a su receptor (EGFR). La presencia simultánea de ambas proteínas se postula como requisito para la existencia de un posible mecanismo de regulación autocrino. Sin embargo, en nuestro estudio, el análisis de contingencia indica que no existe asociación en la expresión de ambas moléculas (tabla XV).

	TGF- α +	TGF- α -
EGFR+	2	4
EGFR-	10	21

Tabla XV. Análisis de contingencia entre la expresión de TGF- α y EGFR

c) Correlación con parámetros histológicos

Si la síntesis de factores de crecimiento está implicada en el mecanismo de tumorigénesis en cáncer de mama, es importante también ver su relación con características estructurales de las muestras que nos aportan datos acerca del grado de progresión de la enfermedad. Las distintas asociaciones entre la expresión de TGF- α y algunos de estos factores se detallan en la tabla XVI.

<i>Factor</i>	<i>TGF-α detectable</i>	<i>TGF-α indetectable</i>	<i>valor de p</i>
Tipo histológico			
Ductales infiltrantes	6/12 (50%)	18/25 (72%)	NS
Lobulillares infiltrantes	3/12 (25%)	3/25 (12%)	
Mixtos	2/12 (17%)	2/25 (8%)	
Buen Pronóstico	1/12 (8%)	2/25 (8%)	
Grado de diferenciación			
Grado I	1/12 (8%)	2/25 (8%)	NS
Grado II	5/12 (42%)	13/25 (52%)	
Grado III	6/12 (50%)	10/25 (40%)	
Ganglios afectados			
N-	7/12 (58%)	14/24 (58%)	NS
N+	5/12 (42%)	10/24 (42%)	
Edad			
≤50 años	7/12 (58%)	3/24 (12,5%)	p<0,05
>50 años	5/12 (42%)	21/24 (87,5%)	

Tabla XVI. Correlación entre TGF- α y parámetros histológicos.

2.4. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- β (TGF- β)

2.4.1.- Estudio de niveles de proteína

En el estudio de la expresión de esta proteína nos planteamos como objetivo el desarrollo y validación de un ensayo lo suficientemente sensible como para detectar los niveles de TGF- β presentes en la fracción citosólica de las muestras. Utilizamos como control positivo el medio condicionado de la línea celular A549 preparado tal y como se describe en Materiales y Métodos. De nuevo hay que tener en cuenta la limitación existente por el pequeño tamaño de la muestra tumoral de partida.

Las condiciones finales del RIA supone un incremento en sensibilidad y precisión con respecto a las condiciones de incubación recomendadas por el fabricante.

Se consigue una sensibilidad de 7,5 pg/100 μ l (figura 41) con un CV adecuado (figura 42).

Para comprobar la linealidad del ensayo se realiza una curva de dilución del medio condicionado por A549. El paralelismo existente entre la curva estándar y la curva de dilución significativo de una buena detección se observa en la figura 43.

No es posible detectar actividad TGF- β en ninguna de las muestras analizadas ni siquiera en los límites de sensibilidad. En este caso hemos podido utilizar los niveles de expresión de mRNA para TGF- β como medida de la presencia de esta molécula.

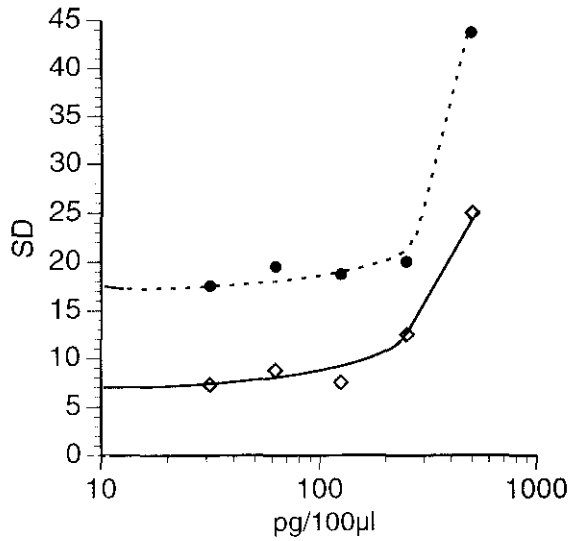


Figura 41

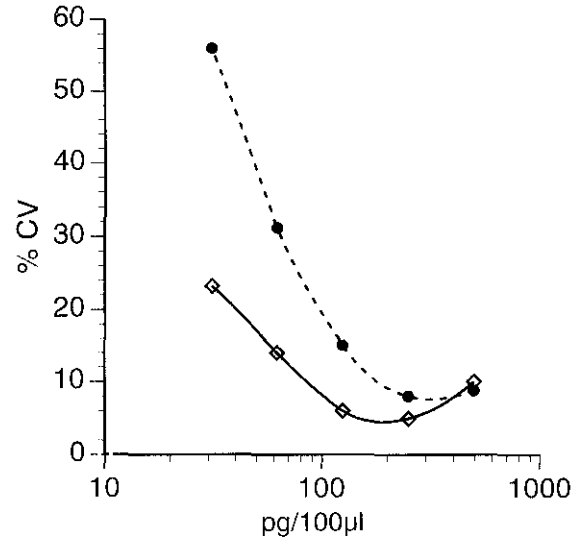


Figura 42

Sensibilidad y precisión del RIA de TGF-β.

La línea punteada representa SD y CV para el protocolo recomendado por el fabricante. La línea continua representa SD y CV para el protocolo validado para este estudio.

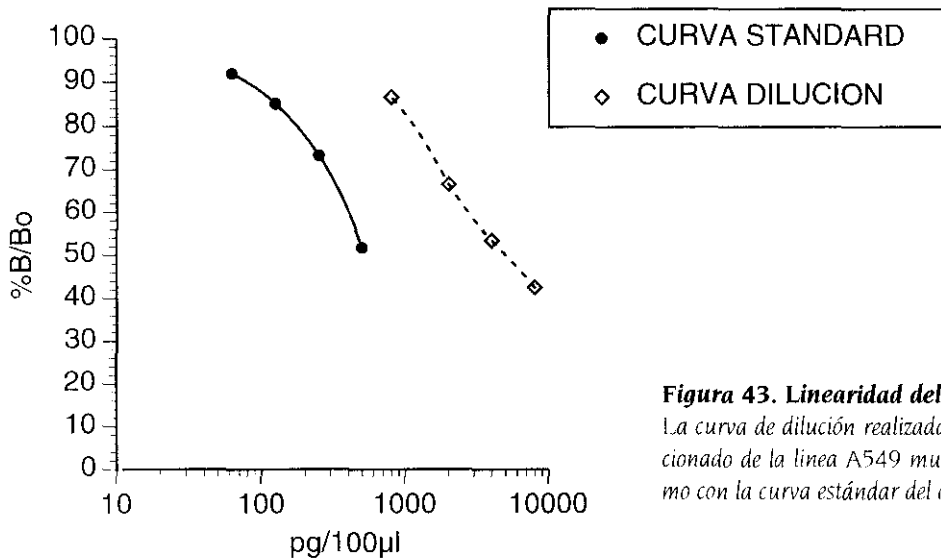


Figura 43. Linealidad del RIA de TGF-β.

La curva de dilución realizada con medio condicionado de la línea A549 muestra un paralelismo con la curva estándar del ensayo.

2.4.2.- Estudio de expresión génica

El patrón de hibridación obtenido con la sonda adecuada revela la existencia de una banda de 2,5 Kb descrita en estudios precedentes y de una banda ancha de 0,6 Kb que, en principio, no parece debida a degradación inespecífica del RNA si se compara con la tinción con bromuro de etidio de los geles (figura 44).

El hecho de que las membranas hayan sido hibridadas secuencialmente con sondas diferentes y que en ningún otro caso se haya detectado esa banda de bajo peso molecular sugiere que se trata de una circunstancia específica para el TGF- β compatible con una degradación más rápida de este mRNA en relación a otros RNAs celulares.

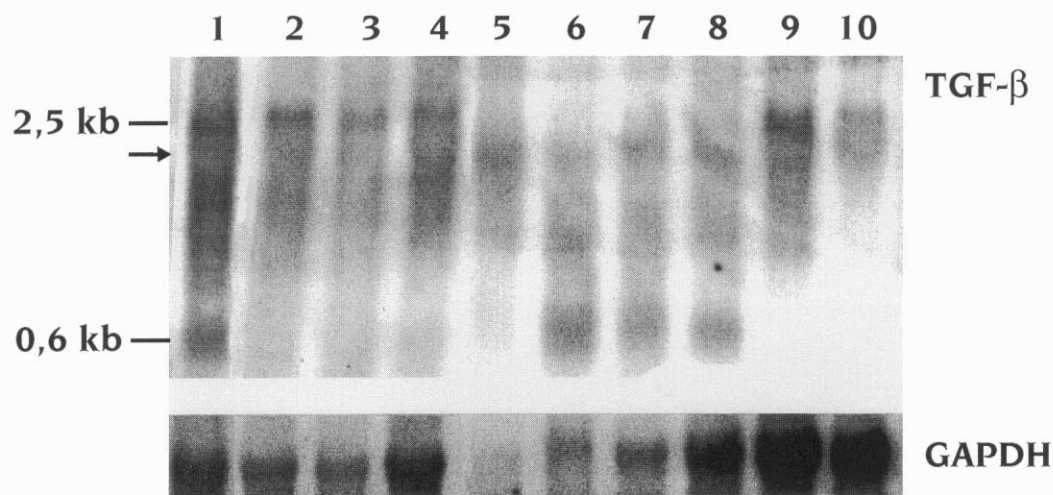


Figura 44. Análisis de Northern para el TGF- β 1.

Se representa el patrón de hibridación para ocho muestras tumorales (1-8) y dos líneas celulares de cáncer de mama (9:MCF-7, 10:MDA-MB-231).Se detecta una banda específica de 2,5 kb y en algunos tumores una banda ancha de 0,6 kb. La flecha indica la posición del RNA ribosómico 18S.

De las 39 muestras analizadas un 69% expresan mRNA para TGF- β . Consideramos positivas las muestras que presentan la banda de 2,5 Kb, la de 0,6 Kb o ambas. No hay diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión ya que la intensidad de las bandas no difiere mucho de unas muestras a otras, se opta por un análisis cualitativo considerando las muestras como positivas o negativas.

2.4.3.- Correlaciones con las características de los tumores

a) Receptores hormonales

La expresión de TGF-β no está restringida a un grupo de tumores con determinadas características en cuanto al contenido de receptores hormonales. Los porcentajes de expresión de TGF-β respecto al contenido de ER y PR se representan en las figuras 45 y 46.

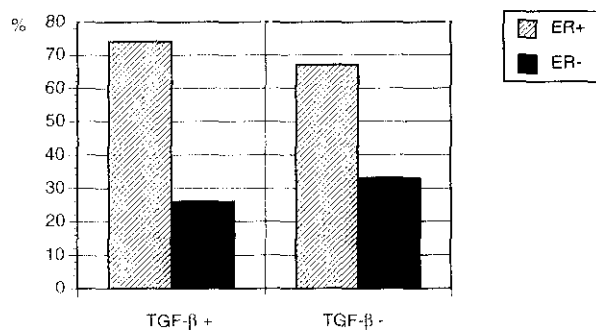


Figura 45. Asociación entre la expresión de TGF-β y los receptores estrogénicos.

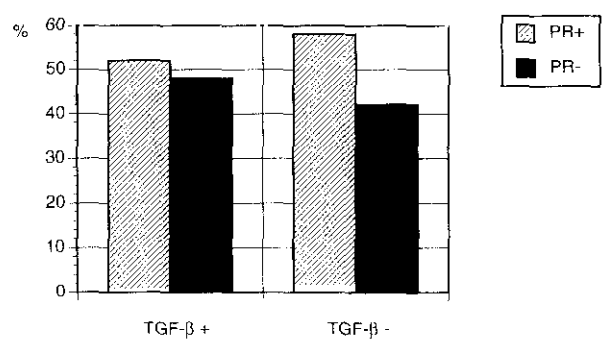


Figura 45. Asociación entre la expresión de TGF-β y los receptores de progesterona.

b) Factor de crecimiento transformante-α

No existe tampoco una tendencia definida en cuanto a la expresión de ambos factores de crecimiento (TGF-α y TGF-β) (tabla XVII).

	TGF-β+	TGF-β-
TGF-α+	6	3
TGF-α-	13	7

Tabla XVII. Análisis de contingencia entre la expresión de ambos factores transformantes (p=NS).

c) Receptor de EGF

La asociación entre el EGFR y TGF- β se expresa en la tabla XVIII:

	TGF- β +	TGF- β -
EGFR+	4	1
EGFR-	23	11

Tabla XVIII. Tabla de frecuencia de la expresión de TGF- β y EGFR.

d) Correlación con parámetros histológicos

Los datos obtenidos del análisis de contingencia entre las variables se expresan en la siguiente tabla:

Factor	TGF- β +	TGF- β -	valor de p
Tipo histológico			
Ductales infiltrantes	19/27 (70,4%)	7/12 (58,3%)	NS
Lobulillares infiltrantes	3/27 (11,1%)	3/12 (25%)	
Mixtos	2/27 (7,4%)	1/12 (8,3%)	
Buen Pronóstico	3/27 (11,1%)	1/12 (8,3%)	
Grado de diferenciación			
Grado I	3/27 (11,2%)	1/12 (8%)	NS
Grado II	12/27 (44,4%)	6/12 (50%)	
Grado III	12/27 (44,4%)	5/12 (42%)	
Ganglios afectados			
N-	16/27 (59%)	7/11 (64%)	NS
N+	11/27 (41%)	4/11 (36%)	
Edad			
≤50 años	4/26 (15%)	6/12 (50%)	p<0,05
>50 años	22/26 (85%)	6/12 (50%)	

Tabla XIX. Correlación entre la expresión de TGF- β y parámetros histológicos

Tal y como se puede observar, el 85% de los tumores que expresan TGF- β corresponden con significado estadístico a mujeres postmenopáusicas.

2.5.- PROTEINA p185

2.5.1.- Estudio de niveles de proteína

El desarrollo de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra la oncoproteína codificada por *c-erbB-2/HER-2/neu* ha permitido su detección inmunológica, en extractos celulares y en secciones de tejido, que frecuentemente se correlaciona con la amplificación del gen y expresión de su mRNA [161][162]

En un estudio comparativo entre muestras neoplásicas de mama y tejido normal se ha determinado el punto de corte de valores de oncoproteína detectada en tejido homogeneizado (Piffanelly, A. Comunicación personal). De esta forma se establece el valor de 150 fmol/mg como punto de corte por debajo del cual se encuentran todos los valores detectados en tejido normal considerando los valores superiores a este punto como sobreexpresión de la oncoproteína.

Los valores obtenidos por interpolación en la curva estándar se normalizan por la concentración en mg/ml del homogeneizado para expresarlos finalmente en fmol/mg.

Los valores obtenidos para las 43 muestras analizadas son:

	p185<150	p185>150
n(%)	36 (84%)	7 (16%)
Rango fmol/mg	17-134,1	187,4-2566
Media±SD fmol/mg	66,02±31,9	731,1±843,7

Tabla XX. Niveles de expresión de p185 en las muestras analizadas.

2.5.2.- Correlaciones con las características de los tumores

a) Receptores hormonales

La correlación con el contenido de receptores hormonales (ER y PR) se muestra en las figuras 47 y 48:

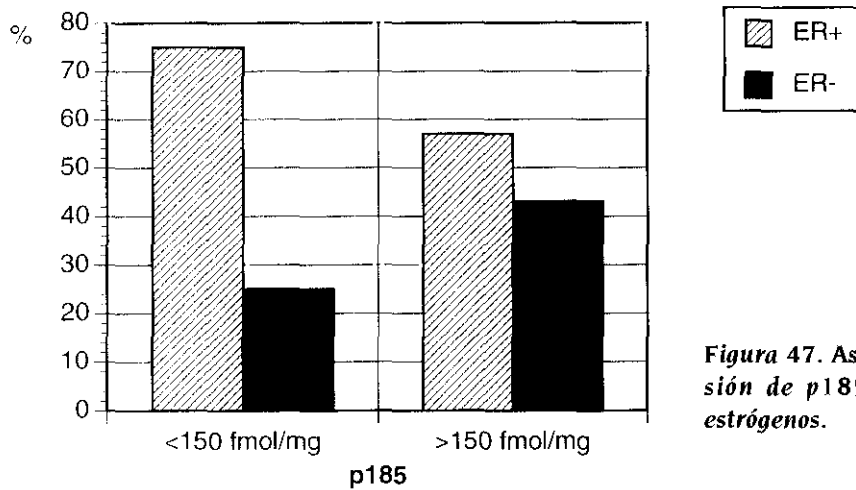


Figura 47. Asociación entre la expresión de p185 y los receptores de estrógenos.

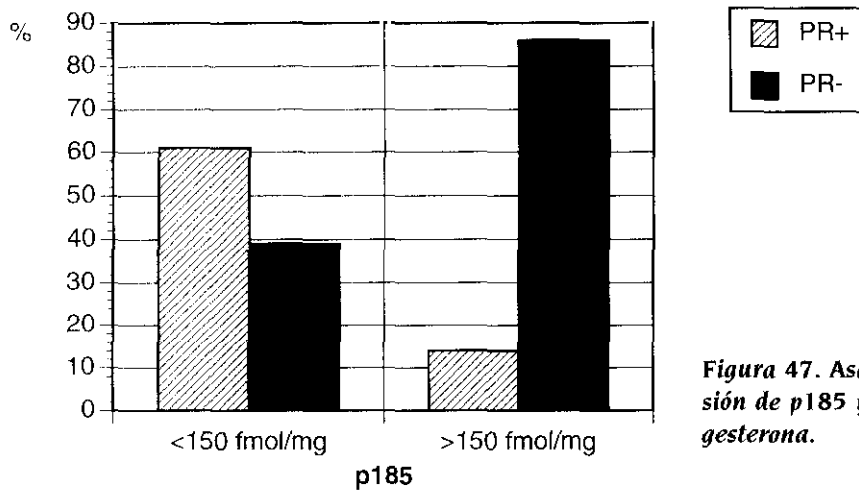


Figura 47. Asociación entre la expresión de p185 y los receptores de progesterona.

En los tumores que sobreexpresan p185 hay una tendencia a que los receptores hormonales sean negativos en una proporción mayor que en las muestras con niveles normales de oncoproteína. Esta tendencia, observada claramente en las figuras, no llega a ser estadísticamente significativa para ER pero sí lo es para PR ($p < 0,05$).

b) Receptores de EGF

Tanto p185 como EGFR son receptores con actividad tirosín-quinasa y, aunque se activan por la unión de distintos ligandos, es interesante analizar si existe algún tipo de dependencia entre la expresión de ambas proteínas. La conclusión se obtiene del análisis de contingencia a partir de la tabla de frecuencia XXI.

	p185+	p185-
EGFR+	0	6
EGFR-	7	30

Tabla XXI. Tabla de contingencia entre los dos receptores tirosin-quinasa.

No hay ninguna muestra que sobreexpresa p185 y que presente niveles detectables de EGFR.

c) Factor de crecimiento transformante- α

En cuanto a la expresión de TGF- α , únicamente en uno de los tumores con p185>150 fmol/mg hay niveles detectables del factor de crecimiento transformante, curiosamente en el máximo del rango de valores detectados (78 ng/g) lo cual sugiere que no hay relación entre ambos parámetros

d) Correlación con parámetros histológicos

Los datos deducidos del análisis comparativo entre los distintos grupos se recogen en la tabla XXII.

Factor	p185>150 [fmol/mg]	p185<150 [fmol/mg]	valor de p
Tipo histológico			
Ductales infiltrantes	6/7 (50%)	22/36 (61,1%)	NS
Lobulillares infiltrantes	1/7 (25%)	7/36 (19,4%)	
Mixtos	0	3/36 (8,3%)	
Buen Pronóstico	0	4/36 (11,1%)	
Grado de diferenciación			
Grado I	0	4/36 (11%)	NS
Grado II	2/7 (29%)	19/36 (53%)	
Grado III	5/7 (71%)	13/36 (36%)	
Ganglios afectados			
N-	3/7 (43%)	22/34 (65%)	NS
N+	4/7 (57%)	12/34 (35%)	
Edad			
≤50 años	1/7 (14%)	10/35 (29%)	NS
>50 años	6/7 (84%)	25/35 (71%)	

La sobreexpresión de p185 queda prácticamente restringida al grupo de los carcinomas ductales infiltrantes. Nuestros datos indican que con la pérdida de diferenciación tumoral aumenta el porcentaje de tumores con sobreexpresión de *neu* y además el porcentaje de ganglios afectados también aumenta si p185 está sobreexpresada, atribuyéndole una posible relación con la agresividad tumoral.

DISCUSSION

Gran parte de los resultados obtenidos en el estudio de los mecanismos que controlan el crecimiento en cáncer de mama proceden de la utilización de líneas celulares en cultivo. Prácticamente todas las líneas celulares de cáncer de mama se han establecido a partir de efusiones pleurales o ascíticas y, por tanto, representan un subgrupo de la población tumoral que ha tenido la capacidad de metastatizar y crecer en un entorno específico completamente distinto del tumor primario. No hay discusión acerca de las ventajas de este modelo experimental pero hay que ser cautos a la hora de extrapolar los resultados que con ellas se obtienen a la situación *in vivo*. Incluso los cultivos primarios de cáncer de mama muestran patrones anormales de secreción proteica *in vitro* en respuesta a hormonas y, además, esta secreción está fuertemente influenciada por el medio de cultivo [163].

Los tumores de mama son un sistema complejo constituido por células epiteliales, estroma intercelular, elementos vasculares y otros componentes que pueden ser fundamentales en la expresión de factores mitogénicos reguladores, comunicación intercelular e interacciones de tipo paracrino [164]. Las biopsias de tumores sólidos son un fiel reflejo de la situación real *in vivo* en cuanto a heterogeneidad celular aunque los estudios basados en su utilización están limitados, sobre todo, por la disponibilidad de tejido.

En el estudio objeto de esta tesis se ha elegido como sistema experimental el tejido tumoral procedente de biopsias de cáncer de mama. En la elección de la pieza a estudiar se ha eliminado, de acuerdo con criterios patológicos, el tejido normal adyacente, tejido adiposo, sangre y otros componentes que podrían interferir en la determinación de los parámetros a estudiar. Las muestras no han sido seleccionadas según ningún criterio previo y de todas las que se procesaron se han considerado válidas un número total de 53.

Los resultados obtenidos referentes a la distribución de las muestras por tipos histológicos están de acuerdo con los datos publicados a nivel epidemiológico en general [119, 133] y en series más pequeñas de tumores. En todos estos estudios las formas de cáncer de mama más comunes son los ductales infiltrantes seguidos de los lobulillares infiltrantes. De forma específica en este estudio y debido al poco número de casos de cada uno, se han agrupado en una categoría denominada "formas de buen pronóstico" a los carcinomas "in situ" o intraductales en los que el crecimiento neoplásico queda restringido a los conductos de las células epiteliales sin invadir el estroma que las rodea; carcinomas mucinosos caracterizados por la acumulación de mucina

extracelular alrededor de grupos de células tumorales y carcinomas tubulares, también considerados de mejor pronóstico que los ductales y lobulillares infiltrantes [133, 134]. Este grupo, constituye el 7,6% de nuestras muestras y el criterio de su clasificación como de “buen pronóstico” se ve avalado por el hallazgo de que todas ellas son formas bien diferenciadas correspondientes a un grado I de diferenciación histológica.

La pérdida de diferenciación celular implica que las estructuras tubulares no están bien formadas, las células presentan un marcado polimorfismo con gran variedad en cuanto a forma y tamaño, los núcleos no son uniformes y hay un aumento del grado mitótico celular [137]. El grado de diferenciación es, por tanto, un parámetro de progresión tumoral y su correlación con la expresión de genes específicos nos puede dar idea de su implicación en el cáncer de mama. El 92,5% de los tumores analizados en este estudio son moderada (grado II) o escasamente (grado III) diferenciados.

Los receptores hormonales han sido utilizados desde hace tiempo como los principales marcadores de respuesta a la terapia endocrina. La existencia de un determinado nivel de receptores en la muestra tumoral es un requisito necesario para el tratamiento anti-estrogénico inhibidor del crecimiento tumoral. Debido a que los cánceres de mama son dependientes de estrógenos para su crecimiento, la mayoría de los estudios se centraron en el receptor de estrógenos (ER) tanto en su implicación en el control de la expresión génica y mitosis [15] como en su utilidad como marcador de respuesta hormonal y pronóstico [16]. El receptor de progesterona (PR) tiene importancia como mediador de las respuestas hormonales y como producto de la acción estrogénica en las células de cáncer de mama y se ha estudiado tanto como marcador tumoral [17] como en términos de su regulación por agonistas y antagonistas estrogénicos [18]. Aunque no se conoce la función de PR en cáncer de mama, su presencia y su inducción por estrógenos se asocia con las respuestas de proliferación inducidas por estrógenos en las células neoplásicas y con la funcionalidad de ER.

En términos generales, aproximadamente el 70% de los tumores primarios son positivos para ER y aproximadamente el 50% son positivos para PR [165]. En nuestro estudio los porcentajes obtenidos son el 69,8% para ER y el 54,7% para PR.

Los resultados obtenidos en cuanto a la distribución concomitante de ambos receptores se recogen en la tabla V. Estos porcentajes también se corresponden con los descritos por otros autores [165]. La probabilidad de encontrar PR en un tumor es directamente proporcional a la concentración de ER presente [17] y el contenido de PR incrementa el índice predictivo de ER. El grupo de tumores ER+/PR-, sin embargo, es relativamente común (en nuestro estudio representa el 17% de las muestras). Se postula que estos tumores podrían expresar una forma de ER incapaz de inducir la transcripción de PR [166]. Esta isoforma, generada por procesamiento alternativo, interfiere en el

proceso normal de unión al DNA y activación de la transcripción aunque no se descarta que pudiera también interferir en la asociación a factores de transcripción necesarios para la actividad de ER.

La mayoría de los investigadores coinciden en que los tumores primarios y metastásicos de mujeres postmenopáusicas contienen valores mayores de ER y son ER positivos en una proporción mayor que los tumores de pacientes premenopáusicas [167]. En el presente estudio, el 54% de los tumores procedentes de pacientes premenopáusicas son ER positivos frente al 74% de los tumores de mujeres postmenopáusicas y, en cuanto a los niveles, la media del contenido de ER en los tumores definidos como positivos es mucho mayor en el grupo de postmenopáusicas que en el premenopáusicas (333 fmol/mg frente a 96,4 fmol/mg). Se postula que el menor nivel absoluto de ER encontrado en premenopáusicas puede ser debido a cambios en la accesibilidad consecuencia del procesamiento y a los grandes niveles de progesterona circulante en estas pacientes que podría inhibir la síntesis de ER.

Existe un gran número de trabajos que describen un incremento del número de tumores negativos para ER con grado III de diferenciación en relación a los grados I y II [136, 167]. Esto está de acuerdo con los hallazgos encontrados en el grupo de tumores analizado por nosotros (Figuras 30 y 31) en el que el número de tumores ER negativos aumenta considerablemente hasta alcanzar un 43,5% en el grado III. La asociación entre PR y el grado de diferenciación tiene, además, significación estadística. El hecho de que los tumores bien diferenciados sean más frecuentemente ER positivos que los tumores poco diferenciados sugiere que el contenido de ER podría representar un aspecto bioquímico de la diferenciación celular. Este concepto está ligado al hecho de que los tumores ER positivos tienen un mejor pronóstico [168].

En cuanto a las características histológicas, resulta evidente que los tumores definidos como "formas de buen pronóstico" deberían expresar ER más frecuentemente. Esto se confirma en nuestro estudio (figura 32) donde el 100% de las muestras de esa categoría expresan ER. Además el 87,5% de los de tipo lobulillar también expresan ER de acuerdo con otros estudios [165] a pesar de que se le atribuye un mal pronóstico.

Estudios inmunohistoquímicos señalan que la localización subcelular de los receptores hormonales en la célula intacta es nuclear [147, 148] aunque tras la homogeneización del tejido una fracción aparece en el citosol donde son determinados bioquímicamente [167, 169]. El método inmunohistoquímico permite, además de localizar el receptor, determinar la heterogeneidad tumoral en cuanto a qué tipo celular expresa receptores y qué porcentaje de células neoplásicas son positivas. Este tipo de información es importante para la interpretación de los resultados obtenidos por ensayos

cuantitativos. Otra aplicación importante de esta técnica es la determinación del contenido de receptores en biopsias de mama obtenidas por punción con aguja fina partiendo de poco material celular [170]. Sin embargo todavía no es probable que la técnica ICA sustituya a los ensayos de receptores en citosol porque a pesar de sus ventajas indiscutibles tiene el inconveniente de tratarse de una valoración cualitativa dependiente de los criterios del observador.

Hay un gran número de trabajos que hacen referencia a la buena correlación existente entre los resultados obtenidos por ICA y los obtenidos por métodos bioquímicos, fundamentalmente por ensayo de unión al ligando (LBA) [171-176]. En nuestro estudio encontramos también una correlación altamente significativa entre los resultados obtenidos por EIA y los obtenidos por ICA (figuras 34 y 35; tablas VIII y IX) sobre todo en el caso de PR ($p < 0,001$).

Encontramos un caso discrepante con tinción positiva y contenido de receptores negativos en EIA tanto para ER como para PR. Esto puede explicarse por la heterogeneidad dentro de la muestra tumoral de manera que el citosol puede diluirse con material ER- o PR- dentro del propio tumor. También existe la posibilidad de detectar falsos positivos por ICA cuando el fondo es muy intenso.

En el caso de ER hay cinco tumores que no presentan tinción por ICA y sin embargo tienen receptores cuantificables por EIA. Esto podría interpretarse como la existencia de poblaciones de células normales positivas para receptores dentro del tumor que no son consideradas en la valoración por ICA.

La regulación de los niveles de mRNA y de proteína para ER en células de cáncer de mama es compleja y parece depender de la historia hormonal de las propias células [28]. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo en líneas celulares hormono-dependientes (MCF-7) e independientes (MDA-MB-231, T47D). Se ha descrito regulación de ER por hormonas esteroideas y sus antagonistas mientras que los factores de crecimiento ejercen efectos mínimos sobre los niveles de ER [38]. Esto apunta a que los estrógenos y la progesterona son los factores dominantes en la regulación de ER, al menos en las líneas celulares estudiadas. También se ha demostrado una regulación negativa de ER mediada por estrógenos en células MCF-7 [177] y mediada por progestinas en MCF-7 y T-47D [30]. En estos estudios se ha observado una estrecha correlación entre los niveles de mRNA y los de proteína lo que parece indicar que la regulación es transcripcional o incluso a nivel post-transcripcional como también se ha postulado [177].

En las muestras que hemos analizado no encontramos una buena correlación entre los niveles de mRNA y los de proteína a diferencia de otros autores [35, 36]. Se

detecta una banda específica de 6,5 Kb en un 37% (13/35) de las muestras con valores de proteína positivos. La media del contenido de proteína determinada por EIA es de 443 fmol/mg. No se detecta hibridación en ninguno de los seis tumores que tienen un contenido de proteína inferior a 68,6 fmol/mg ni en un grupo de 16 tumores con valores de proteína superiores a 68,6 fmol/mg. No hay ningún caso en el que exista expresión a nivel de RNA y la proteína no se haya traducido.

En estos resultados hay que tener en cuenta que el análisis de expresión génica se realiza con RNA total. Los autores mencionados utilizan poli-A⁺-RNA o bien hibridación por "dot blot" que a nuestro criterio puede inducir a errores de interpretación por la existencia de hibridación inespecífica. La utilización de poli-A⁺-RNA, sin embargo, incrementa la sensibilidad de detección del Northern y obvia los problemas de hibridaciones cruzadas con los RNAs ribosómicos, problema frecuente en nuestro estudio pero dada la cantidad limitada de muestra disponible no es posible purificar el RNA total.

No encontramos la presencia de alguna banda adicional descrita por otros autores [35, 37] ni en las biopsias ni en la línea celular MCF-7 utilizada como control positivo, descartando la existencia de alguna forma adicional de ER.

Las diferencias entre expresión de RNA y niveles de proteína en los seis tumores con valores de ER inferiores a 68,6 fmol/mg, parecen indicar que el ensayo de inmunoensayo es más sensible que el Northern. Además, probablemente exista algún otro mecanismo que justifique que determinados RNAs se traduzcan a una tasa más alta. La regulación a nivel de traducción es un mecanismo descrito en eucariotas en secuencias de cDNA de genes que codifican oncoproteínas, factores de crecimiento, factores de transcripción, receptores y otras proteínas reguladoras [178]. Estas secuencias se caracterizan por la existencia de un segundo codon ATG en posición 5' en el mismo marco de lectura y flanqueado por nucleótidos compatibles con la secuencia consenso de Kozak. Esto ha sido descrito para ER [27] y aunque no se conoce de qué forma puede afectar la existencia de estos codones en posición 5' a la eficiencia de traducción del mRNA de ER se piensa que estas pequeñas secuencias corresponden a mRNAs funcionales que pudieran estar sometidos a un mecanismo de control de la reiniciación [178].

Respecto a la expresión génica de PR, ya había sido previamente descrita la dificultad para detectar el patrón de transcritos de mRNA (2,8-11,4 Kb) característicos de este gen partiendo de RNA total [30]. En nuestro estudio, la expresión de PR queda descrita por el estudio a nivel proteico con la ya comentada asociación casi perfecta entre los resultados obtenidos por ensayo de inmunoensayo y por inmunocitoquímica.

En los últimos años se han descrito distintos trabajos que parecen arguir la acción indirecta de los estrógenos a través de genes reguladores del crecimiento sobre-

expresados (oncogenes) [56] y a través de la estimulación o inhibición de la síntesis y liberación de factores de crecimiento que son capaces a su vez de regular el crecimiento de la célula que los produce (control autocrino) o de las células adyacentes tanto epiteliales como del estroma (control paracrino).

Un gran número de estudios tienen como sistema de experimentación *in vitro* líneas celulares de cáncer de mama con el objetivo de establecer su capacidad para sintetizar y secretar factores de crecimiento inmunoreactivos activos biológicamente.

Se ha detectado TGF- α biológicamente activo en el medio condicionado de diferentes líneas celulares [15, 179]. La secreción de este factor y la expresión de su mRNA son inducidas por estradiol [53, 72, 180, 181] y a su vez pueden ser inhibidas por el antiestrógeno tamoxifen [72, 180, 182]. Los mayores niveles de actividad se encuentran generalmente en líneas celulares negativas para ER.

El TGF- α puede actuar como un factor de crecimiento autocrino en células MCF-7 ya que cuando se utilizan anticuerpos anti-TGF- α se inhibe parcialmente el crecimiento de estas células [72]. Sin embargo existe una gran controversia acerca de la función de este factor de crecimiento como posible mediador de los efectos estrogénicos [53] con claras evidencias en contra de esta hipótesis. Las células MCF-7 transfectadas con un vector de expresión para TGF- α producen niveles de este factor equivalentes o superiores a los producidos por estimulación estrogénica y, sin embargo, estas células que expresan constitutivamente TGF- α responden a la estimulación estrogénica *in vitro* incrementando la proliferación celular y la inducción de la síntesis de PR. Además estos clones celulares transfectados no inducen la formación de tumores *in vivo* en ratones desnudos ovariectomizados atímicos sin la suplementación de estradiol [52] lo que lleva a los autores a concluir que la expresión de TGF- α debe ser necesaria pero no suficiente para inducir un fenotipo completamente hormono-independiente. Si el TGF- α secretado fuera mediador de los efectos de los estrógenos, el bloqueo de su receptor (EGFR) provocaría la inhibición de la estimulación estrogénica y sin embargo cuando esto se realiza en células de cáncer de mama hormono-dependiente no se altera el crecimiento regulado por estrógenos sugiriendo que el TGF- α no es un mediador primario de los efectos estrogénicos [53].

El TGF- β se sintetiza también por líneas celulares de cáncer de mama y de forma similar al TGF- α , los niveles basales de TGF- β son generalmente mayores en líneas celulares negativas para ER que en las líneas que responden a hormonas [183, 184]. Una fracción significativa de este factor en el medio condicionado de MCF-7 se encuentra en la forma activa [184]. El tratamiento con anti-estrógenos de estas células produce un incremento de los niveles de TGF- β activo en el medio condicionado sugiriendo

que el efecto inhibitor de los anti-estrógenos podría estar justificado por la estimulación de factores negativos como el TGF- β y la inhibición de factores estimuladores como el TGF- α [180, 182-184]. El tratamiento estrogénico de líneas celulares ER+ produce un descenso de los niveles de TGF- β en el medio condicionado en condiciones en las que la producción de TGF- α es estimulada [179].

En las líneas celulares que secretan actividad TGF- β también se detecta expresión de su mRNA y los niveles de expresión génica no son modulados por anti-estrógenos sugiriendo que la regulación de la producción de TGF- β en estas células debe ser a nivel *post-transcripcional* [184].

Los trabajos en tumores sólidos aportan también resultados dispares debido a las distintas técnicas de detección, tipo de material a ensayar y rango de valores obtenidos. Uno de los primeros trabajos publicados estudia la detección de TGF- α inmunoreactivo en extractos de tejidos preparados a partir de tejido normal, fibroadenomas, lesiones fibroquísticas y carcinomas ductales infiltrantes [181]. El rango de valores obtenidos para las muestras tumorales fue de 1,5-6 ng/mg proteína celular y aproximadamente el 50% expresa niveles superiores a los detectados en el tejido normal. No se observó correlación con el contenido de ER o PR. Un trabajo posterior muestra que la expresión de TGF- α es mayor en las metástasis ganglionares que en los tumores primarios [71]. En el 31% de los carcinomas analizados fue posible detectar actividad TGF- α expresada como ng equivalente de EGF/mg proteína del extracto tumoral. Tampoco se describió relación con el contenido de receptores.

Se ha descrito expresión de mRNA para TGF- α y TGF- β en tumores sólidos por análisis de Northern y "dot blot" [70, 185-187] pero, debido a las limitaciones ya comentadas de sensibilidad, esto no ha sido posible en este caso.

En nuestro estudio detectamos actividad TGF- α en un 32,4% de las muestras analizadas medida por un RIA con una buena sensibilidad y especificidad. El rango de valores obtenido oscila entre 4,7 y 78 ng/g de proteína de citosol. Aunque los resultados no son comparables, los niveles menores de expresión encontrado en nuestro estudio respecto a otros previos puede justificarse porque en el citosol sólo detectamos las moléculas de TGF- α en tránsito de secreción. De hecho, se ha descrito la existencia de actividad TGF- α asociada a la membrana celular que no secreta al medio [188] y se postula que tanto el precursor asociado a la célula como el péptido secretado son biológicamente activos [189]. Estos factores de crecimiento anclados a membrana se pueden acumular en la superficie celular debido a limitaciones en el proceso proteolítico que los convierte en factores solubles. La inmovilización de estos factores es un mecanismo general para concentrarlos y mantenerlos al alcance de células adyacentes favoreciendo

interacciones célula-célula, el factor asociado a la membrana puede interactuar con su receptor por un mecanismo juxtacrino, que ha sido demostrado para el proTGF- α , y que puede inducir autofosforilación del receptor y respuesta mitogénica [4].

La producción de TGF- α no está circunscrita a un grupo determinado de tumores, pero un porcentaje muy alto de las muestras con TGF- α detectable tiene receptores hormonales (figuras 39 y 40). Las diferencias con el grupo de tumores que no expresan TGF- α no son significativas argumentando a favor de la independencia entre la expresión de TGF- α y el estado hormonal del tumor ya descrita por otros autores [71, 72, 180, 186, 190].

Estos datos no son concluyentes de la expresión constitutiva de TGF- α en la transición de un estado hormono-dependiente a la independencia hormonal y están de acuerdo con otros trabajos que argumentan en contra de la asunción de un modelo simplista acerca de la implicación de los factores de crecimiento en la progresión tumoral [180, 182, 191]. Únicamente se ha descrito la existencia de correlación entre la expresión de TGF- α y ausencia de receptores de los tumores en los trabajos de Barrett-Lee [185] y Travers [187] y en efusiones de pacientes con cáncer de mama [192].

Tampoco se describe en estos estudios ninguna correlación de la expresión (mRNA, inmunológica o inmunohistoquímica) de TGF- α con parámetros histológicos resultados coincidentes con los del presente estudio (tabla XVI) y confirmados por estudio recientes [193]. Únicamente detectamos una asociación significativa ($p < 0,05$) entre TGF- α y el estado menopáusico de forma que el grupo de tumores que expresan TGF- α pertenecen mayoritariamente a mujeres premenopáusicas mientras que el 87,5% de los tumores con TGF- α indetectable son de pacientes postmenopáusicas. Podría asociarse la expresión elevada de TGF- α con una mayor agresividad tumoral pero los datos no son suficientemente concluyentes.

El TGF- α ejerce sus acciones biológicas mediante la unión al receptor de EGF induciendo su fosforilación y desencadenando una señal mitogénica. Se han descrito sistemas fundamentalmente de líneas celulares en los que se postula la existencia de un mecanismo de regulación autocrino responsable, en parte, de la transición a un fenotipo de independencia hormonal. También hay autores que han visto en tumores sólidos la expresión concomitante del ligando y su receptor [185, 187] más frecuentemente en carcinomas hormono-independientes sugiriendo la existencia de un mecanismo autocrino que regule el crecimiento de estos tumores.

En nuestro estudio, según los resultados recogidos en la tabla XV, de los 12 tumores que expresan TGF- α , 10 no tienen receptores de EGF y de éstos, 9 son ER+. Estos datos sugieren que estos tumores ER+ que no expresan EGFR, producen mayores cantidades de TGF- α que regulan de forma negativa el número de receptores expresa-

dos en estas células [188]. Cuando esta expresión del factor de crecimiento se hace autónoma, este grupo de tumores podría representar la situación de pacientes con tumores ER+ que no responden a la terapia endocrina [181, 190, 194, 195]. Estos datos no avalan la hipótesis de la acción directa de los factores de crecimiento transformantes como moduladores autocrinos.

El estudio del TGF- β es todavía más complejo debido a la naturaleza multifuncional de este factor y a la existencia de mecanismos de regulación adicionales con respecto a otros factores de crecimiento. La expresión y actividad del TGF- β están controladas por la regulación de su transcripción y por regulación a nivel de activación [80]. El TGF- β se secreta por las células en una forma latente, inactiva, incapaz de interaccionar con los receptores celulares y es precisamente la activación de esta forma latente el principal sitio de regulación de la acción de este factor [196].

El proceso de activación *in vitro* implica el tratamiento de la forma inactiva con agentes que modifiquen la estructura terciaria del complejo, en este estudio la activación se consigue por acidificación.

Prácticamente todos los trabajos publicados sobre el estudio de este factor de crecimiento en tumores sólidos se han realizado a nivel de expresión de su mRNA o por estudios inmunohistoquímicos. La presencia de mRNA no implica necesariamente producción de proteína secretada, tanto en forma latente como activa [197] y, por otro lado, la distribución inmunohistológica de una forma particular de TGF- β no siempre se corresponde con la distribución de su mRNA debido a que la proteína se puede acumular y difundir lejos de los sitios de síntesis, a regulación traduccional o a reactividad cruzada con otras formas de TGF- β [80]. Los inmunoensayos son más específicos que los ensayos de receptores y permiten diferenciar la expresión de las distintas isoformas, pero estos ensayos no son sensibles a la forma latente probablemente porque la cadena amino-terminal del precursor enmascara el epítipo presente en la forma madura reconocido por el anticuerpo.

Para este estudio desarrollamos un radioinmunoensayo específico para la isoforma TGF- β 1 con el objetivo de detectar expresión de este factor en el citosol de las muestras tumorales. Para validarlo utilizamos como control positivo el medio condicionado de la línea celular A549 que secreta cantidades altas de TGF- β 1. No fue posible detectar actividad en ninguna de las muestras analizadas probablemente debido a la baja concentración de este factor en el citosol o incluso a algún problema en el mecanismo de activación. Los resultados de expresión a nivel de mRNA para este gen son concluyentes, al menos, de la producción de este factor por las células aunque no pueda afirmarse nada acerca de su actividad biológica.

Con estas premisas, detectamos expresión de TGF- β 1 en un 69% de las muestras estudiadas, estos niveles elevados están descritos por otros autores [185, 187, 198] así como la ausencia de correlación con el contenido de receptores y otros parámetros histológicos.

La hibridación del RNA celular total extraído de las muestras tumorales con la sonda específica para TGF- β 1 revela la existencia de una banda específica de 2,5 kb, ampliamente descrita por otros autores, y, en algunos tumores, de una banda ancha de 0,6 kb que interpretamos como una circunstancia específica de este gen compatible con una degradación más rápida de este mRNA en relación a otros RNAs celulares. Esta banda no parece ser producto de degradación inespecífica del RNA si se compara la autoradiografía con la tinción del gel con bromuro de etidio. Además, el hecho de que las membranas se hayan rehibridado con distintas sondas y esta banda sólo se haya detectado para este gen parece indicar que es específica de TGF- β y no un artefacto metodológico. Consideramos positivas todas las muestras que expresan alguna de las dos bandas o ambas.

En las muestras estudiadas existe una asociación significativa entre la expresión de TGF- β 1 y el estado menopáusico de las pacientes (tabla XIX) ya que el 85% de los tumores con expresión de este gen corresponden a mujeres postmenopáusicas ($p=0,05$). Estos resultados difieren de los encontrados por Thompson y col. [99] consistentes con una correlación positiva entre la expresión de TGF- β 1 y los tumores de pacientes premenopáusicas.

Tampoco existe, en nuestro estudio, una tendencia definida en cuanto a la expresión de ambos factores de crecimiento (tabla XVII).

Se ha hecho referencia al receptor de EGF en términos de su interacción con uno de su ligando, el TGF- α , como posible mecanismo de regulación del crecimiento y progresión del cáncer de mama, pero este factor tiene importancia por sí mismo debido a estudios que demuestran su existencia en tumores primarios y metástasis y asocian un aumento de su expresión con un cáncer más agresivo y hormono-independiente [51, 199-201].

Se ha descrito una correlación inversa entre el contenido de EGFR y de receptores hormonales [202-205] pero hasta el momento está establecido el valor pronóstico y verdadera implicación clínica de este factor.

Los resultados, además, son dispares por el empleo de distintos métodos para la determinación del número de receptores como ensayos de unión del ligando, inmunohistoquímica, ensayos inmunoenzimáticos, determinación de los transcritos de EGFR o cuantificación de la actividad tirosín-quinasa asociada al receptor [206] y tam-

poco hay un acuerdo claro en la definición del punto de corte que discrimine entre tumores positivos o negativos.

En el presente estudio se han seguido las recomendaciones de la E.O.R.T.C. (European Organization for Research and Treatment of Cancer) para la detección a nivel de proteína de este factor. Se ha utilizado un ensayo de unión del ligando con EGF marcado radiactivamente y, mediante un análisis de Scatchard, obtenemos el número de receptores en la preparación de membrana y el valor de la constante de disociación que caracteriza la unión ligando-receptor. El ensayo no presenta interferencias con la posible presencia de ligandos endógenos (TGF- α y EGF) [207].

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla X. El porcentaje de positividad obtenido en esta serie de tumores es del 15,1%, menor que el habitual descrito para esta técnica y que el que obtuvimos en un estudio anterior con otra serie de tumores [204]. Sin embargo, en una revisión de 40 grupos de investigación con un total de 5232 pacientes analizados [206], el rango de positividad de los diferentes estudios es del 14-91%, lo que supone una gran heterogeneidad en cuanto a resultados.

Obtenemos valores de la constante de disociación (Kd) entre 0,24 y 1,98 nM correspondientes a los sitios de alta afinidad.

Hemos determinado la existencia de transcritos para EGFR en las mismas muestras por análisis de Northern y se detectan dos bandas de aproximadamente 11 kb y 6 kb (figura 36) de acuerdo con otros autores [82, 203]. En el control positivo (línea celular MDA-MB-231) sólo aparece la banda de mayor peso molecular.

En nuestro estudio no encontramos asociación entre la expresión de EGFR y la diferenciación tumoral o la incidencia de metástasis ganglionares, aspecto con resultados controvertidos [206].

Es interesante estudiar la posible relación entre la expresión de EGFR y *neu* dada la homología estructural entre ambos y su funcionalidad como receptores con actividad tirosín-quinasa aunque para ligandos diferentes. Es tentador postular la posible implicación del EGFR y *neu* como componentes, más que simples marcadores, de mecanismos responsables de progresión tumoral [199]. La unión del ligando a receptores constitutivamente funcionales o presentes en mayores cantidades, podría conducir, incrementando la actividad tirosín-quinasa a promover la replicación celular y el proceso de metástasis. Además se ha demostrado la fosforilación de p185 inducida por EGF sugiriendo la posible interacción entre ambos factores

La amplificación del gen *c-erbB-2* o sobreexpresión de la proteína codificada por él ha sido descrita en un 20-30% de los cánceres primarios de mama [208] y se correlaciona con una mayor agresividad tumoral y peor pronóstico [130]. En el estudio objeto de esta tesis el porcentaje de tumores con sobreexpresión de p185 es del 16%. La

mayoría de los estudios relativos a la expresión de esta oncoproteína se han realizado por inmunohistoquímica. La determinación por ELISA permite detectar niveles altos de actividad en el homogeneizado del tejido previamente a la separación de las fracciones citosólicas y de membrana. Para establecer un criterio acerca de los niveles equivalentes a sobreexpresión, se realizó un estudio en colaboración con el Pr. A. Pifanelly con muestras de tejido tumoral y tejido normal determinando la expresión del oncogén *neu* por análisis de Northern, Southern y ELISA. Se ha llegado así a considerar el valor de 150 fmol/mg como punto de corte indicativo de sobreexpresión del producto codificado por el oncogén.

En este estudio existe una tendencia, que en el caso del receptor de progesterona, tiene significación estadística a que el grupo de tumores que sobreexpresan p185 son en un mayor porcentaje negativos para los receptores hormonales, sugiriendo la implicación de la oncoproteína en el escape del control estrogénico.

Además de detecta una cierta asociación de la sobreexpresión de p185 con la invasividad de los tumores, grado de diferenciación y metástasis linfoganglionares (tabla XXIII) confirmando la implicación de este factor en la agresividad tumoral.

No es posible, sin embargo, establecer alguna relación entre la expresión de ambos receptores tirosín-quinasa ya que en ninguna de las muestras estudiadas encontramos expresión simultánea de ambos descartando, en principio, la existencia de acciones mediadas por ambos.

CONCLUSIONES

1.- Se caracteriza la expresión de receptores hormonales esteroideos, factores de crecimiento transformantes, receptor de EGF y oncogén neu de forma simultánea en biopsias de cáncer de mama como sistema experimental. La tipificación de las muestras tumorales con parámetros histológicos proporciona criterios valorables de progresión tumoral con los que correlacionar la expresión de los genes implicados.

2.- Se confirma que la transición a un fenotipo hormono-independiente, definido por la ausencia de receptores hormonales, se caracteriza por una pérdida de diferenciación. Esto sugiere que el contenido celular de receptores de estrógenos y progesterona podría representar un aspecto bioquímico de la diferenciación celular.

3.- La pérdida de sensibilidad hormonal no está mediada por la expresión constitutiva de factores de crecimiento transformantes. No existe correlación entre el contenido de receptores de estrógenos y progesterona y la expresión de estos factores.

4.- Se detecta expresión de TGF- α en un 32,4% de las muestras y expresión de TGF- β en un 69%. Ambos factores no están implicados en la diferenciación y progresión tumoral ya que sus niveles de expresión no se correlacionan con parámetros histológicos.

5.- Se obtiene una correlación inversa entre el contenido de ER y el receptor de EGF (EGFR) lo que confirma la asociación, descrita por numerosos autores, entre la expresión elevada de EGFR y el potencial metastásico y peor pronóstico en cáncer de mama. Sin embargo, en este estudio, no hemos encontrado una clara asociación entre la expresión del receptor tirosín-quinasa y la diferenciación tumoral o presencia de metástasis ganglionares.

6.- En este estudio no existe relación entre la expresión de TGF- α y su receptor, EGFR, descartando la hipótesis de un mecanismo de regulación autocrino. Los resultados sugieren una posible regulación negativa del receptor mediada por TGF- α .

7.- Se detecta sobreexpresión de la proteína p185 *c-erbB-2* en un 16% de las muestras estudiadas y está relacionada con la pérdida de sensibilidad hormonal mediada, fundamentalmente, por el receptor de progesterona. El grupo de tumores que sobreexpresan p185 muestran una tendencia a ser invasivos, más indiferenciados y a metastatizar a ganglios atribuyéndoles un peor pronóstico.

En resumen, el presente estudio demuestra la asociación entre los receptores hormonales y la diferenciación tumoral. La pérdida de sensibilidad hormonal y transición hacia un estado de crecimiento autónomo no está mediada por la expresión constitutiva de factores de crecimiento autocrinos pero parece estar relacionada con la sobreexpresión de los productos codificados por oncogenes con actividad tirosín-quinasa.

BIBLIOGRAFIA

1. Forsyth, I.A., *The mammary gland*. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 1991. **5**(4): p. 809-832.
2. Petersen, O.W., Høyer, P.E. and van Deurs, B., *Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue*. Cancer Res, 1987. **47**: p. 5748-5751.
3. Jacquemier, I.D., Hassouin, J., Torrente, M. and Martin, P.-M., *Distribution of estrogen and progesterone receptors in healthy tissue adjacent to breast lesions at various stages-immunohistochemical study of 107 cases*. Breast Cancer Res Treat, 1990. **15**: p. 109-117.
4. Massagué, J. and Pandiella, A., *Membrane-anchored growth factors*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 515-541.
5. Dickson, R.B. and Lippman, M.E., *Molecular determinants of growth, angiogenesis, and metastases in breast cancer*. Seminars in Oncology, 1992. **19**(3): p. 286-298.
6. Dickson, R.B., Johnson, M.D., Bano, M., Shi, E., Kurebayashi, J., Ziff, B., Martínez-Lacaci, I., Amundadottir, L.T. and Lippman, M.E., *Growth factors in breast cancer: mitogenesis to transformation*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **43**(1-3): p. 69-78.
7. Clarke, R., Dickson, R.B. and Lippman, M.E., *Hormonal aspects of breast cancer*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 1992. **12**: p. 1-23.
8. Lippman, M.E., Monaco, M.E. and Bolan, G., *Effects of estrone, estradiol, and estriol on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture*. Cancer Res, 1977. **37**: p. 1901-1907.
9. Jordan, V.C., Ieng, M.-H., Jiang, S.-Y., Yingling, J. and Stella, A.L., *Hormonal strategies for breast cancer: a new focus on the estrogen receptor as a therapeutic target*. Seminars in Oncology, 1992. **19**(3): p. 299-307.
10. Jordan, V.C., *Targeted hormone therapy for breast cancer*, in Hospital Practice. 1993, p. 55-62.
11. Osborne, C.K., *Polypeptide growth factors: their potential value in the management of breast cancer patients*, in *Adjuvant therapy of breast cancer*, I.C. Henderson, Editor. 1992, Kluwer Academic: p. 315-329.
12. Osborne, C.K., Hamilton, B. and Nover, M., *Receptor binding and processing of epidermal growth factor by human breast cancer cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1982. **55**(1): p. 86-93.

-
13. Osborne, C.K., Hamilton, B., Titus, G. and Livingston, R.B., *Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture*. *Cancer Res*, 1980. **40**: p. 2361-2366.
 14. Koga, M., Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L., *Modulation of the growth-inhibitory effects of progestins and the antiestrogen hydroxyclomiphene on human breast cancer cells by epidermal growth factor and insulin*. *Cancer Res*, 1989. **49**: p. 112-116.
 15. Dickson, R.B. and Lippman, M.E., *Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma*. *Endocr Rev*, 1987. **8**(1): p. 29-43.
 16. DeSombre, E.R., Greene, G.L., King, W.J. and Jensen, E.V., *Estrogen receptors, antibodies and hormone dependent cancer*, in *Hormones and Cancer*. 1984, Alan R. Liss, Inc: New York. p. 1-21.
 17. Horwitz, K.B. and McGuire, W.L., *Specific progesterone receptors in human breast cancer*. *Steroid*, 1975. **25**(4): p. 497-505.
 18. Read, L.D., Snider, C.E., Miller, J.S., Greene, G.L. and Katzenellenbogen, B.S., *Ligand-modulated regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in human breast cancer cell lines*. *Mol Endocrinol*, 1988. **2**: p. 263-271.
 19. Beato, M., *Gene regulation by steroid hormones*. *Cell*, 1989. **56**: p. 335-344.
 20. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. *Science*, 1988. **240**: p. 889-895.
 21. Forman, B.M. and Samuels, H.H., *Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model*. *Mol Endocrinol*, 1990. **4**: p. 1293-1301.
 22. Smith, D.F. and Toft, D.O., *Steroid receptors and their associated proteins*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**: p. 4-11.
 23. Truss, M. and Beato, M., *Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors*. *Endocr Rev*, 1993. **14**(4): p. 459-479.
 24. Beekman, J.M., Allan, G.F., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W., *Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**: p. 1266-1274.

-
25. Klein-Hitpass, L., Tsai, S.Y., Greene, G.L., Clark, J.H., Tsai, M.-J. and B.W., O., *Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response elements*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(1): p. 43-49.
26. Beck, C.A. and Edwards, D.P., *Progesterone receptors in breast cancer*, in *Genes, oncogenes, and hormones: advances in cellular and molecular biology of breast cancer*, R.B.D.a.M.E. Lippman, Editor. 1991, Kluwer Academic: Boston. p. 317-352.
27. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P. and Chambon, P., *Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A*. Nature, 1986. **320**(13): p. 134-139.
28. Bettuzzi, S., Robinson, A., Fuchs-Young, R. and Greene, G.L., *Estrogen and progesterone receptor structure and action in breast cancer cells*, in *Genes, Oncogenes, and Hormones: Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer*, R.B.D.a.M.E. Lippman, Editor. 1991, Kluwer Academic Publishers: Boston. p. 301-315.
29. Wei, L.L., Krett, N.L., Francis, M.D., Gordon, D.F., Wood, W.M., O'Malley, B.W. and Horwith, K.B., *Multiple human progesterone receptor messenger ribonucleic acids and their autoregulation by progestin agonists and antagonists in breast cancer cells*. Mol Endocrinol, 1988. **2**: p. 62-72.
30. Alexander, I.E., Clarke, C.L., Shine, J. and Sutherland, R.L., *Progestin inhibition of progesterone receptor gene expression in human breast cancer cells*. Mol Endocrinol, 1989. **3**: p. 1377-1386.
31. Cho, H., Aronica, S.M. and Katzenellenbogen, B.S., *Regulation of progesterone receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells: a comparison of the effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, estradiol, insulin-like growth factor-1, and serum factors*. Endocrinology, 1994. **134**(2): p. 658-664.
32. Conneely, O.M., Maxwell, B.L., Toft, D.O., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W., *The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternative initiation of translation of a unique mRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **149**: p. 493-501.
33. Kastner, P., Bocquel, M.-T., Turcotte, B., Garnier, J.-M., Horwitz, K.B., Chambon, P. and Gronemeyer, H., *Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translation initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12163-12167.

-
34. Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W. and McDonnell, D.P., *Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**: p. 1244-1255.
35. Barrett-Lee, P.I., Travers, M.T., McClelland, R.A., Luqmani, Y. and Coombes, R.C., *Characterization of estrogen receptor messenger RNA in human breast cancer*. *Cancer Res*, 1987. **47**: p. 6653-6659.
36. Henry, J.A., Nicholson, S., Farndon, J.R., Westley, B.R. and May, F.E.B., *Measurement of oestrogen receptor mRNA levels in human breast tumours*. *Br J Cancer*, 1988. **58**: p. 600-605.
37. Murphy, L.C. and Dotzlaw, H., *Variant estrogen receptor mRNA species detected in human breast cancer biopsy samples*. *Mol Endocrinol*, 1989. **3**: p. 687-693.
38. Read, L.D., Greene, G.L. and Katzenellenbogen, B.S., *Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in human breast cancer cell lines by sex steroid hormones, their antagonists, and growth factors*. *Mol Endocrinol*, 1989. **3**: p. 295-304.
39. Read, L.D. and Katzenellenbogen, B.S., *Characterization and regulation of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*, in *Genes, Oncogenes, and Hormones: Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer.*, R.B.D.a.M.E. Lippman, Editor. 1991, Kluwer Academic Publishers: Boston. p. 277-299.
40. Joyeux, C., Rochefort, H. and Chabos, D., *Progesterin increases gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of fatty acid synthetase in breast cancer cells*. *Mol Endocrinol*, 1989. **4**: p. 681-686.
41. Murphy, L.J., Sutherland, R.L., Stead, B., Murphy, L.C. and Lazarus, L., *Progesterin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells*. *Cancer Res*, 1986. **46**: p. 728-734.
42. McGuire, W.L., *Prognostic factors in primary breast cancer*. *Cancer Surveys*, 1986. **5**: p. 527-536.
43. King, R.J.B., *Receptors, growth factors and steroid insensitivity of tumours*. *J Endocrinol*, 1990. **124**: p. 179-181.

-
44. Walker, K.J., Bouzubar, N. and Robertson, J., *Immunocytochemical localization of estrogen receptor in human breast tissue*. *Cancer Res*, 1988. **48**: p. 6517-6522.
45. Scott, G.K., Kushner, P., Vigne, J.-L. and Benz, C.C., *Truncated forms of DNA-binding estrogen receptors in human breast cancer*. *J Clin Invest*, 1991. **88**: p. 700-706.
46. Dotzlaw, H., Alkhalaf, M. and Murphy, L.C., *Characterization of estrogen receptor variant mRNAs from human breast cancers*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**: p. 773-785.
47. Murphy, L.C., *Estrogen receptor variants in human breast cancer*. *Mol Cell Endocrinol*, 1990. **74**(83-86).
48. Rennie, P.S., Mawji, N.R., Coldman, A.J., Godolphin, W., Jones, E.C., Vielkind, J.R. and Bruchofsky, N., *Relationship between variants forms of estrogen receptor RNA and an apoptosis-related RNA, TRPM-2, with survival in patients with breast cancer*. *Cancer*, 1993. **72**: p. 3648-3654.
49. Mirza, M.R., *Anti-estrogen induced synthesis of transforming growth factor-beta in breast cancer patients*. *Cancer Treat Rev*, 1991. **18**: p. 145-148.
50. Knabbe, C., Zugmaier, G., Schmahl, M., Dietel, M., Lippman, M.E. and Dickson, R.B., *Induction of transforming growth factor β by the antiestrogens Droloxifene, Tamoxifen, and Toremifene in MCF-7 cells*. *Am J Clin Oncol*, 1991. **14 (Suppl. 2)**: p. S15-S20.
51. Sainsbury, J.R.C., Farndon, J.R., Needham, G.K., Malcolm, A.J. and Harris, A.L., *Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer*. *The Lancet*, 1987. **June 20**: p. 1398-1402.
52. Clarke, R., Brünner, N., Katz, D., Glanz, P., Dickson, R.B., Lippman, M.E. and Kern, F.G., *The effects of a constitutive expression of transforming growth factor- α on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo*. *Mol Endocrinol*, 1989. **3**: p. 372-380.
53. Arteaga, C.L., Coronado, E. and Osborne, C.K., *Blockade of the Epidermal Growth Factor Receptor inhibits Transforming Growth Factor α -Induced but not estrogen-induced growth of hormone-dependent human breast cancer*. *Mol Endocrinol*, 1988. **2**: p. 1064-1069.
54. Aaronson, S.A., *Growth factors and cancer*. *Science*, 1991. **254**: p. 1146-1153.

-
55. Ponzetto, C., *Growth factors and oncogenes*. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 1991. **5**(4): p. 655-669.
56. Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D. and Moses, H.L., *Growth factors and cancer*. Cancer Res, 1986. **46**: p. 1015-1029.
57. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M.D., *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences*. Nature, 1984. **307**(9): p. 521-527.
58. Sporn, M.B. and Roberts, A.B., *Autocrine growth factors and cancer*. Nature, 1985. **313**(28): p. 745-747.
59. Lippman, M.E., Dickson, R.B., Kasid, A., Gelmann, E., Davidson, N., McManaway, M., Huff, K., Bronzert, D., Bates, S., Swain, S. and Knabbe, C., *Autocrine and paracrine regulation of human breast cancer*. J Steroid Biochem, 1986. **24**: p. 147-154.
60. Bano, M., Kidwell, W.R., Lippman, M.E. and Dickson, R.B., *Characterization of MDGF-1 receptor in human mammary epithelial cell lines*. J Biol Chem, 1990. **265**: p. 1874-1880.
61. Bano, M., Lupu, R., Kidwell, W.R., Lippman, M.E. and Dickson, R.B., *Production and characterization of mammary-derived growth factor-1 in mammary epithelial cells*. Biochemistry, 1992. **31**: p. 610-616.
62. Fisher, D.A. and Lakshmanan, J., *Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals*. Endocr Rev, 1990. **11**(3): p. 418-442.
63. Gregory, H., *Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor*. Nature, 1975. **275**: p. 325-327.
64. De Larco, J.E. and Todaro, G.J., *Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells*. PNAS, 1978. **75**: p. 4001-4005.
65. Marquardt, H., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. and Todaro, G.J., *Rat transforming growth factor type I: structure and relation to epidermal growth factor*. Science, 1984. **223**: p. 1079-1082.

-
66. Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y. and Goeddel, D.V., *Human transforming growth factor- α : precursor structure and expression in E. coli*. Cell, 1984. **38**: p. 287-297.
67. Linsley, P.S., Hargreaves, W.R., Twardzik, D.R. and Todaro, G.I., *Detection of larger polypeptides structurally and functionally related to type I transforming growth factor*. PNAS, 1985. **82**: p. 356-360.
68. Derynck, R., *Transforming growth factor α* . Cell, 1988. **54**: p. 593-595.
69. Hamburger, A.W., White, C.P. and Dunn, F.E., *Secretion of transforming growth factors by primary human tumours*. Br J Cancer, 1985. **51**: p. 9-14.
70. Derynck, R., D.V., G., Ullrich, A., Gutterman, J.U., Williams, R.D., Bringman, T.S. and Berger, W.H., *Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factor α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors*. Cancer Res, 1987. **47**: p. 707-712.
71. Macias, A., Pérez, R., Hägerstrom, T. and Skoog, L., *Transforming growth factor alpha in human mammary carcinomas and their metastases*. Anticancer Res, 1989. **9**: p. 177-180.
72. Bates, S.E., Davidson, N.E., Valverius, E.M., Freter, C.E., Dickson, R.B., Tam, J.P., Kudlow, J.E., Lippman, M.E. and Salomon, D.S., *Expression of transforming growth factor α and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its regulation by estrogen and its possible functional significance*. Mol Endocrinol, 1988. **2**: p. 543-555.
73. Salomon, D.S., Zwiebel, J.A., Bano, M., Losonczy, I., Fehnel, P. and Kidwell, W.R., *Presence of transforming growth factors in human breast cancer cells*. Cancer Res, 1984. **44**: p. 4069-4077.
74. Ciardello, F., McGeady, M.-L., Kim, N., Basolo, F., Hynes, N., Langton, B.C., Yokozaki, H., Saeki, T., Elliot, J.W., Masui, H., Mendelsohn, J., Soule, H., Russo, J. and Salomon, D.S., *Transforming growth factor- α expression is enhanced in human mammary epithelial cells transformed by an activated c-Ha-ras protooncogene but not by the c-neu protooncogene, and overexpression of the transforming growth factor- α complementary DNA leads to transformation*. Cell Growth Different, 1990. **1**: p. 407-420.
75. Salomon, D.S., Perroteau, I., Kidwell, W.R., Tam, J. and Derynck, R., *Loss of growth responsiveness to epidermal growth factor and enhanced production of alpha-transforming growth factors in ras-transformed mouse mammary epithelial cells*. J Cell Physiol, 1987. **130**: p. 397-409.

-
76. Coffey, R.J., Derynck, R., Wilcox, J.N., Bringman, T.S., Goustin, A.S., Moses, H.L. and Pterlkw, M.R., *Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes*. Nature, 1987. **328**: p. 817-820.
77. Burgess, A.W., *Epidermal growth factor and transforming growth factor α* . Br Med Bull, 1989. **45**(2): p. 401-424.
78. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Duli, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D. and Seeburg, P.H., *Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells*. Nature, 1984. **309**(31): p. 418-425.
79. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M. and Assoian, R.K., *Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure*. Science, 1986. **233**: p. 532-534.
80. Massagué, J., *The Transforming growth factor- β family*. Annu Rev Cell Biol., 1990. **6**: p. 597-641.
81. Robertson, D.M., *Transforming growth factor β /inhibin family*. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 1991. **5**(4): p. 615-635.
82. Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B. and Goeddel, D.V., *Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells*. Nature, 1985. **316**: p. 701-705.
83. Derynck, R., Lindquist, P.B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J.L., Rhee, L., Mason, A.J., Miller, D.A., Coffey, R.J., Moses, H.L. and Chen, E.Y., *A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3*. EMBO Journal, 1988. **7**: p. 3237-3743.
84. Miller, D.A., Lee, A., Matsui, Y., Chen, E.Y., Moses, H.L. and Derynck, R., *Complementary DNA cloning of the murine transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) precursor and the comparative expression of TGF- β 3 and TGF- β 1 messenger RNA in murine embryos and adult tissues*. Mol Endocrinol, 1989. **3**: p. 1926-1934.
85. Denhez, F., Lafyatis, R., Kondaiah, P., Roberts, A.B. and Sporn, M.B., *Cloning by polymerase chain reaction of a new mouse TGF- β , mTGF- β 3*. Growth Factors, 1990. **3**: p. 139-146.

86. Jakowlew, S.B., Dillard, P.J., Sporn, M.B. and Roberts, A.B., *Complementary deoxyribonucleic acid cloning of an mRNA encoding transforming growth factor- β 4 from chicken embryo chondrocytes*. *Mol Endocrinol*, 1988. **2**: p. 1186-1195.
87. Burt, D.W. and Jakowlew, S.B., *Correction: a new interpretation of a chicken transforming growth factor- β 4 complementary DNA*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**(6): p. 989-992.
88. Graycar, J.L., Miller, D.A., Arrick, B.A., Lyons, R.M., Moses, H.L. and Derynck, R., *Human transforming growth factor- β 3: recombinant expression, purification, and biological activities in comparison with transforming growth factors- β 1 and β 2*. *Mol Endocrinol*, 1989. **3**: p. 1977-1986.
89. Wakefield, L.M., Smith, D.M., Flanders, K.C. and Sporn, M.B., *Latent transforming growth factor- β from human platelets*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(16): p. 7646-7654.
90. Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. and Heldin, C.-H., *Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(13): p. 6407-6415.
91. Wakefield, L.M., Colletta, A.A., McCune, B.K. and Sporn, M.B., *Roles for transforming growth factors- β in the genesis, prevention, and treatment of breast cancer*, in *Genes, Oncogenes, and Hormones: Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer*, R.B.D.a.M.E. Lippman, Editor. 1991, Kluwer Academic Publishers: Boston. p. 97-136.
92. Lyons, R.M., Keski-Oja, J. and Moses, H.L., *Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium*. *J Cell Biol*, 1988. **106**: p. 1659-1665.
93. Wakefield, L.M., Smith, D.M., Masui, T., Harris, C.C. and Sporn, M.B., *Distribution and modulation of the cellular receptor for transforming growth factor- β* . *J Cell Biol*, 1987. **105**: p. 965-975.
94. Segarini, P.R., Rosen, D.M. and Seyedin, S.M., *Binding of Transforming growth factor- β to cell surface proteins varies with cell type*. *Mol Endocrinol*, 1989. **3**: p. 261-272.
95. Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M. and Sporn, M.B., *Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- β in normal rat kidney fibroblasts*. *J Biol Chem*, 1984. **259**: p. 10995-11000.

-
96. ten Dijke, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Franzén, P., Laiho, M., Miyazono, K. and Heldin, C.-H., *Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin*. Science, 1994. **264**: p. 101-104.
97. Bronzert, D.A., Bates, S.E., Sheridan, J.P., Lindsey, R., Valverius, E.M., Stampfer, M.R., Lippman, M.E. and Dickson, R.B., *Transforming growth factor- β induces Platelet-derived growth factor (PDGF) messenger RNA and PDGF secretion while inhibiting growth in normal human mammary epithelial cells*. Mol Endocrinol, 1990. **4**: p. 981-989.
98. Laiho, M., DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Livingston, D.M. and Massagué, J., *Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation*. Cell, 1990. **62**: p. 175-185.
99. Thompson, A.M., Kerr, D.J. and Steel, C.M., *Transforming growth factor β 1 is implicated in the failure of tamoxifen therapy in human breast cancer*. Br J Cancer, 1991. **63**: p. 609-614.
100. Ong, G., Sikora, K. and Gullick, W.J., *Inactivation of the retinoblastoma gene does not lead to loss of TGF- β receptors or response to TGF- β in breast cancer cell lines*. Oncogene, 1991. **6**: p. 761-763.
101. Schwartz, L.C., Wright, J.A., Gingras, M.-C., Kondaiah, P., Danielpour, D., Pimentel, M., Sporn, M.B. and Greenberg, A.H., *Aberrant TGF- β production and regulation in metastatic malignant*. Growth Factors, 1990. **3**: p. 115-127.
102. Yarden, Y. and Ullrich, A., *Growth factor receptor tyrosine kinases*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 443-478.
103. Fantl, W.J., Johnson, D.E. and Williams, L.T., *Signalling by receptor tyrosine kinases*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 453-481.
104. Hunter, T., *The epidermal growth factor receptor gene and its product*. Nature, 1984. **311**: p. 414-416.
105. Carpenter, G., *Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 881-914.
106. Ullrich, A. and Schlessinger, J., *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. **61**: p. 203-212.

107. Browne, C.A., *Epidermal growth factor and transforming growth factor α* . Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 1991. **5**(4): p. 553-569.
108. Helin, K., Velu, T., Martin, P., Vass, W.C., Allevato, G., Lowy, D.R. and Beguinot, L., *The biological activity of the human epidermal growth factor receptor is positively regulated by its C-terminal tyrosines*. Oncogene, 1991. **6**: p. 825-832.
109. Downward, J., Parker, P. and Waterfield, M.D., *Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor*. Nature, 1984. **311**: p. 483-485.
110. Evans, H.J., *Molecular genetics aspects of human cancers: the 1993 Frank Rose Lecture*. Br J Cancer, 1993. **68**: p. 1051-1060.
111. Carbone, D.P., *Oncogenes and tumor suppressor genes*. Hospital Practice, 1993. **June 15**: p. 145-161.
112. Bishop, J.M., *Molecular themes in oncogenesis*. Cell, 1991. **64**: p. 235-248.
113. Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B. and King, M.-C., *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Science, 1990. **250**: p. 1684-1689.
114. Leslie, K.O. and Howard, P., *Oncogenes and antioncogenes in human breast carcinoma*. Pathology Annual, 1992. **27**: p. 321-342.
115. Hennessy, C., Henry, J.A., May, F.E.B., Westley, B.R., Angus, B. and Lennard, T.W.J., *Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis*. J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(4): p. 281-285.
116. Bevilacqua, G., Sobel, M.E. and Liotta, L.A., *Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential*. Cancer Res, 1989. **49**: p. 5185-5190.
117. Bishop, J.M., *Cellular oncogenes and retroviruses*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 301-354.
118. Barbacid, M., *From retroviral to human oncogenes: the molecular basis of human cancer*, *Retroviruses and Disease*. 1989, p. 66-94.

119. Clark, G.M. and McGuire, W.L., *Defining the high-risk breast cancer patient.*, in *Adjuvant therapy of breast cancer*. I.C. Henderson, Editor. 1992, Kluwer Academic: p. 161-187.
120. Van de Vijver, M.J. and Nusse, R., *The molecular biology of breast cancer*. *Biochem Biophys Acta*, 1991. **1072**: p. 33-50.
121. Bargmann, C.I. and Weinberg, R.A., *Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene*. *PNAS*, 1988. **85**: p. 5394-5398.
122. Bargmann, C.I. and Weinberg, R.A., *Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion*. *EMBO J*, 1988. **7**: p. 2043-2052.
123. Lupu, R., Colomer, R., Zugmaier, G., Sarup, J., Shepard, M., Slamon, D. and Lippman, M.E., *Direct interaction of a ligand for the erbB-2 oncogene product with the EGF receptor and p185^{erbB2}*. *Science*, 1990. **249**: p. 1552-1555.
124. Lupu, R., Colomer, R., Kannan, B. and Lippman, M.E., *Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses*. *PNAS*, 1992. **89**: p. 2287-2291.
125. Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W., Yansura, D., Abadi, N., Rabb, H., Lewis, G.D., Shepard, H.M., Kuang, W.-J., Wood, W.I., Goeddel, D.V. and Vandlen, R.L., *Identification of heregulin, a specific activator of p185^{erbB-2}*. *Science*, 1992. **256**: p. 1205-1210.
126. Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S.V., Bacus, S.S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S.M., Levy, R.B., Koski, R.A., Lu, H.S. and Yarden, Y., *Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit*. *Cell*, 1992. **69**: p. 559-572.
127. Dobashi, K., Davis, J.G., Mikami, Y., Freeman, J.K., Hamuro, J. and Greene, M.I., *Characterization of neu/c-erbB-2 protein-specific activating factor*. *PNAS*, 1991. **88**: p. 8582-8586.
128. Kraus, M.H., Popescu, N.C., Amsbaugh, S.C. and King, C.R., *Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms*. *EMBO J*, 1987. **6**(3): p. 605-610.

129. Lemoine, N.R., Staddon, S., Dickson, C., Barnes, D.M. and Gullick, W.J., *Absence of activating transmembrane mutations in the c-erbB-2 proto-oncogene in human breast cancer*. *Oncogene*, 1990. **5**: p. 237-239.
130. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. **235**: p. 177-182.
131. Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. and Aaronson, S.A., *Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors*. *PNAS*, 1989. **86**: p. 9193-9197.
132. *Staging for carcinoma of the breast*, in *Manual for staging of cancer*, O. Beahrs, et al., Editor. 1988, Lippincott, J.B.: Philadelphia. p. 145-150.
133. Harris, J.R., Lippman, M.E., Veronesi, U. and Willett, W., *Breast Cancer (Second of Three Parts)*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(6): p. 390-398.
134. Tejerina, F. and Tejerina, A., *Tratamiento del cáncer de mama*. ed. S.A. Salvat Editores. 1986, Barcelona (España): . 689.
135. Bloom, H.J. and Richardson, W.W., *Histological grading and prognosis in breast cancer*. *Br J Cancer*, 1957. **11**: p. 359-377.
136. Fisher, E.R., Redmond, C. and Fisher, B., *Histologic grading of breast cancer*. *Pathol Ann*, 1980. **15**: p. 239-251.
137. Russo, J. and Ruso, I.H., *The pathology of breast cancer: staging and prognostic indicators*. *JAMWA*, 1992. **47**(5): p. 181-187.
138. Bartkova, J., Barnes, D.M., Millis, R.R. and Gullick, W.J., *Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 protein in mammary ductal carcinoma in situ*. *Hum Pathol*, 1990. **21**: p. 1164-1167.
139. Patchefsky, A.S., Schwartz, G.F. and S.D., F., *Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast*. *Cancer*, 1989. **63**: p. 731-741.
140. Robbins, G.F. and Berg, J.W., *Bilateral primary breast cancers: a prospective clinicopathological study*. *Cancer*, 1964. **17**: p. 1501-1527.

-
141. Lagios, M.D., Margolin, F.R., Westdahl, P.R. and Rose, M.R., *Mammographically detected duct carcinoma in situ: frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence*. *Cancer*, 1989. **63**: p. 618-624.
142. Page, D.L., Kidd, T.E., Dupont, W.D., Simpson, J.F. and Rogers, L.W., *Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease*. *Hum Pathol*, 1991. **22**: p. 1232-1239.
143. Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Arkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z. and Koprowski, H., *Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor: immunologically mediated and effector cell-independent effects*. *Cancer Res*, 1987. **47**: p. 3692-3696.
144. Reddy, K.B., Mangold, G., Tandon, A.K., Yoneda, T., Mundy, G.R., Zilberstein, A. and Osborne, C.K., *Inhibition of breast cancer cell growth in vitro by a tyrosine kinase inhibitor*. *Cancer Res*, 1992. **52**: p. 3636-3641.
145. Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1409-1416.
146. King, W.J. and Weigand, R.A., *Estrogen receptor detection and measurement using monoclonal antibodies to human estrogen receptor*. *Pathologist*, 1986. **40**(4).
147. King, W.J. and Greene, G.L., *Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells*. *Nature*, 1984. **307**(5953): p. 745-747.
148. Greene, G.L., Sobel, N.B., King, W.J. and Jensen, E.V., *Immunochemical studies of estrogen receptors*. *J Steroid Biochem*, 1984. **20**(1): p. 51-56.
149. Benraad, T.J. and Foekens, J.A., *Hydroxyapatite assay to measure epidermal growth factor receptor in human primary breast tumours*. *Ann Clin Biochem*, 1990. **27**: p. 272-273.
150. Kienhuis, C.B.M., Heuvel, J.J.T.M., Ross, H.A., Swinkels, L.M.J.W., Foekens, J.A. and Benraad, T.J., *High performance liquid chromatography of ¹²⁵I-labeled mouse epidermal growth factor radiolabeled by six different methods*. *Clin Chem*, 1992. **38**: p. 661-668.

151. Kienhuis, C.B.M., Heuvel, J.J.T.M., Ross, H.A., Swinkels, L.M.J.W., Foekens, J.A. and Benraad, T.J., *Six methods for direct iodination of mouse epidermal growth factor compared: effect of nonequivalence in binding behavior between labeled and unlabeled ligand*. Clin Chem, 1991. **37**: p. 1749-1755.
152. Contreras, M.A., Bale, W.F. and Spar, J.L., *Iodine monochloride (ICl) iodination techniques*. Methods Enzymol, 1983. **92**: p. 277-292.
153. Calvo, J.C., Radicelli, J.P. and Charreau, E.H., *Measurement of specific radioactivities in labelled hormones by self-displacement analysis*. Biochem. J., 1983. **212**: p. 259-264.
154. Gregory, H., Thomas, C.E., Willshire, I.R., Young, J.A., Anderson, H., Baildam, A. and Howell, A., *Epidermal and transforming growth factor α in patients with breast tumours*. Br J Cancer, 1989. **59**: p. 605-609.
155. Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**: p. 156-159.
156. Thomas, P.S., *Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose*. PNAS, 1980. **77**(9): p. 5201-5205.
157. Carrasco, J.L., *El método estadístico en la investigación básica*. 5ª Edición corregida ed. 1992, Madrid: Editorial Ciencia 3, S.A.
158. Blankenstein, M.A. and Benraad, T.J., *Multilaboratory assessment of tissue prognostic factors in breast cancer: the EORTC Receptor Study Group experience*. in First International September Breast Conference. 1992. London, Ontario: Rodar Publishing Inc, Montreal.
159. McGuire, W.L., *Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines*. J Natl Cancer Inst, 1990. **83**(3): p. 154-155.
160. van Zoelen, J.J., *Receptor-ligand interaction: a new method for determining binding parameters without a priori assumptions on non-specific binding*. Biochem J, 1989. **262**: p. 549-556.
161. van de Vijver, M., van de Berselaar, R., Devilee, P., Cornelisse, C., Peterse, J. and Nusse, R., *Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(5): p. 2019-2023.

162. Venter, D.J., Tuzi, N.I., Kumar, S. and Gullick, W.I., *Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification.* The Lancet, 1987. **July 11**: p. 69-72.
163. Forsyth, I.A., *Growth factors in mammary gland function.* J Reprod Fert, 1989. **85**: p. 759-770.
164. Cullen, K.J., Smith, H.S., Hill, S., Rosen, N. and Lippman, M.E., *Growth factor messenger RNA expression by human breast fibroblasts from benign and malignant lesions.* Cancer Res, 1991. **51**: p. 4978-4985.
165. Rayter, Z., *Steroid receptors in breast cancer.* Br J Surg, 1991. **78**: p. 528-535.
166. Fuqua, S.A.W., Fitzgerald, S.D., Allred, D.C., Elledge, R.M., Nawaz, Z., McDonnell, D.P., O'Malley, B.W., Greene, G.L. and McGuire, W.L., *Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors.* Cancer Res, 1992. **52**: p. 483-486.
167. Seibert, K. and Lippman, M., *Hormone receptors in breast cancer.* Clinics in Oncology, 1982. **1**(3): p. 735-793.
168. Wittliff, J.L., *Steroid-hormone receptors in breast cancer.* Cancer, 1984. **53**: p. 630-643.
169. Scholl, S.M. and Lippman, M.E., *Methods and clinical use of receptor assay*, in *Breast Cancer: Diagnosis and Management*, G. Bonadonna, Editor. 1984, John Wiley & Sons, Ltd: p. 75-107.
170. Marrazo, A., La Bara, G., Taormina, P. and Bazan, P., *Determination of estrogen receptors with monoclonal antibodies in fine needle aspirates of breast carcinomas.* Br J Cancer, 1989. **59**: p. 426-428.
171. Scheres, H.M., De Goeij, A.F.P.M., Rousch, M.J.M., Hondius, G.G., Willebrand, D.D., Gijzen, A.H. and Bosman, F.T., *Quantification of oestrogen receptors in breast cancer: radiochemical assay on cytosols and cryostat sections compared with semiquantitative immunocytochemical analysis.* J Clin Pathol, 1988. **41**: p. 623-632.
172. King, W.J., DeSombre, E.R., Jensen, E.V. and Greene, G.L., *Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors.* Cancer Res, 1985. **45**: p. 293-304.

173. McCarty, K.S., Miller, L.S., Cox, E.B., Konrath, J. and McCarty, K.S., *Estrogen receptor analyses*. Arch Pathol Lab Med, 1985. **109**: p. 716-721.
174. Sharma, A.K., Horgan, K., Douglas-Jones, A., McClelland, R., Gee, J. and Nicholson, R., *Dual immunocytochemical analysis of estrogen and epidermal growth factor receptors in human breast cancer*. Br J Cancer, 1994. **69**: p. 1032-1037.
175. Beck, T., Weikel, W., Brumm, C., Wilkens, C., Pollow, K. and Knapstein, P.-G., *Immunohistochemical detection of hormone receptors in breast carcinomas (ER-ICA, PR-ICA): prognostic usefulness and comparison with the biochemical radioactive-ligand binding assay (DCC)*. Gynecol Oncol, 1994. **53**: p. 220-227.
176. Kinsel, L.B., Szabo, E., Greene, G.L., Konrath, J., Leight, G.S. and McCarty Jr., K.S., *Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods*. Cancer Res, 1989. **49**: p. 1052-1056.
177. Saceda, M., Lippman, M.E., Chambon, P., Lindsey, R., Ponglikitmongkol, M., Puente, M. and Martín, M., *Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol*. Mol Endocrinol, 1988. **2**: p. 1157-1163.
178. Kozak, M., *Regulation of translation in eukaryotic systems*. Annu Rev Cell Biol., 1992. **8**: p. 197-225.
179. Dickson, R.B., Bates, S.E., McManaway, M.E. and Lippman, M.E., *Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines*. Cancer Res, 1986. **46**: p. 1707.
180. Murphy, L.C. and Dotzlaw, H., *Regulation of transforming growth factor α and transforming growth factor β messenger ribonucleic acid abundance in T-47D, human breast cancer cells*. Mol Endocrinol, 1989. **3**: p. 611-617.
181. Perroteau, I., Salomon, D., DeBortoli, M., Kidwell, W., Hazarika, P., Pardue, R., Dedman, J. and Tam, J., *Immunological detection and quantitation of alpha transforming growth factors in human breast carcinoma cells*. Breast Cancer Res Treat, 1986. **7**: p. 201-210.
182. Murphy, L.C. and Dotzlaw, H., *Endogenous growth factor expression in T-47D, human breast cancer cells, associated with reduced sensitivity to antiproliferative effects of progestins and antiestrogens*. Cancer Res, 1989. **49**: p. 599-604.

-
183. Arteaga, C.L., Tandon, A.K., Von Hoff, D.D. and Osborne, C.K., *Transforming growth factor β : Potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells.* Cancer Res, 1988. **48**: p. 3898-3904.
184. Knabbe, C., Lippman, M.E., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Kasid, A., Derynck, R. and Dickson, R.B., *Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells.* Cell, 1987. **48**: p. 417-428.
185. Barrett-Lee, P., Travers, M., Luqmani, Y. and Coombes, R.C., *Transcripts for transforming growth factors in human breast cancer: clinical correlates.* Br J Cancer, 1990. **61**: p. 612-617.
186. Ciardello, F., Kim, N., Liscia, D.S., Bianco, C., Lidereau, R., Merlo, G., Callahan, R., Greiner, J., Szpak, C., Kidwell, W., Schlom, J. and Salomon, D.S., *mRNA expression of transforming growth factor alpha in human breast carcinomas and its activity in effusions of breast cancer patients.* J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(15): p. 1165-1171.
187. Travers, M.T., Barrett-Lee, P.J., Berger, U., Luqmani, Y.A., Gazet, J.-C., Powles, T.J. and Coombes, R.C., *Growth factor expression in normal, benign, and malignant breast tissue.* Br Med J, 1988. **296**: p. 1621-1624.
188. Stoscheck, C.M. and King Jr., L.E., *Role of epidermal growth factor in carcinogenesis.* Cancer Res, 1986. **46**: p. 1030-1037.
189. Brachmann, R., Lindquist, P.B., Nagashima, M., Kohr, W., Lipari, T., Napier, M. and Derynck, R., *Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF- α receptors.* Cell, 1989. **56**: p. 691-700.
190. Lundy, J., Schuss, A., Stanick, D., McCormack, E.S., Kramer, S. and Sorvillo, J.M., *Expression of neu protein, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor alpha in breast cancer.* Am J Pathol, 1991. **138**(6): p. 1527-1534.
191. King, R.B.J., Wang, D.Y., Daly, R.J. and Darbre, P.D., *Approaches to studying the role of growth factors in the progression of breast tumours from the steroid sensitive to insensitive state.* J Steroid Biochem, 1989. **34**(1-6): p. 133-138.
192. Arteaga, C.L., Hanauske, A.R., Clark, G.M., Osborne, C.K., Hazarika, P., Pardue, R.L., Tio, F. and Von Hoff, D.D., *Immunoreactive α transforming growth factor activity in effusions*

from cancer patients as a marker of tumor burden and patient prognosis. *Cancer Res*, 1988. **48**: p. 5023-5028.

193. Qi, C.-F., Liscia, D.S., Normanno, N., Merlo, G., Johnson, G.R., Gullick, W.J., Ciardello, F., Saeki, T., Brandt, R., Kim, N., Kenney, N. and Salomon, D.S., *Expression of transforming growth factor α , amphiregulin and cripto-1 in human breast carcinomas*. *Br J Cancer*, 1994. **69**: p. 903-910.

194. Foekens, J.A., Portengen, H., van Putten, W.L.J., Trapman, A.M.A.C., Reubi, J.-C., Alexieva-Figusch, J. and Klijn, J.G.M., *Prognostic value of receptors for insulin-like growth factor I, somatostatin, and epidermal growth factor in human breast cancer*. *Cancer Res*, 1989. **49**: p. 7002-7009.

195. Prime, S.S., Game, S.M., Matthews, J.B., Stone, A., Donnelly, M.J., Yeudall, W.A., Patel, V., Sposto, R., Silverthorne, A. and Scully, C., *Epidermal growth factor and transforming growth factor α characteristics of human oral carcinoma cell lines*. *Br J Cancer*, 1994. **69**: p. 8-15.

196. Laiho, M. and Keski-Oja, J., *Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review*. *Cancer Res*, 1989. **49**: p. 2533-2553.

197. MacCallum, J., Bartlett, J.M.S., Thompson, A.M., Keen, J.C., Dixon, J.M. and Miller, W.R., *Expression of transforming growth factor beta mRNA isoforms in human breast cancer*. *Br J Cancer*, 1994. **69**: p. 1006-1009.

198. Delvenne, C.G., Winkler-Gol, R.A., Piccart, M.J., Hustin, I., Michaux, D., Leclercq, G., Nogaret, J.M. and Autier, P., *Expression of c-erbB-2, TGF- β 1 and pS2 genes in primary human breast cancers*. *Eur J Cancer*, 1992. **28**(2/3): p. 700-705.

199. Harris, A.L., Nicholson, S., Sainsbury, J.R.C., Farndon, J. and Wright, C., *Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu*. *J Steroid Biochem*, 1989. **34**(1-6): p. 123-131.

200. Gasparini, G., Bevilacqua, P., Pozza, F., Meli, S., Boracchi, P., Marabini, E. and Sainsbury, J.R.C., *Value of epidermal growth factor receptor status compared with growth fraction and other factors for prognosis in early breast cancer*. *Br J Cancer*, 1992. **66**: p. 970-976.

201. King, I. and Sartorelli, A.C., *Epidermal growth factor receptor gene expression, protein kinase activity, and terminal differentiation of human malignant epidermal cells*. *Cancer Res*, 1989. **49**: p. 5677-5681.

202. Capelletti, V., Brivio, M., Miodini, P., Granata, G., Coradini, D. and Di Fronzo, G., *Simultaneous estimation of epidermal growth factor receptors and steroid receptors in a series of 136 resectable primary breast tumors*. *Tumor Biol*, 1988. **9**: p. 200-211.
203. Lee, C.S.L., Hall, R.E., Alexander, I.E., Koga, M., Shine, J. and Sutherland, R.L., *Inverse relationship between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor mRNA levels in human breast cancer cell lines*. *Growth Factors*, 1990. **3**: p. 97-103.
204. Llorens, M.A., Bermejo, M.J., Salcedo, M.C., Charro, A.L. and Puente, M., *Epidermal growth factor receptors in human breast and endometrial carcinomas*. *J Steroid Biochem*, 1989. **34**(1-6): p. 505-509.
205. Koenders, P.G., Beex, L.V.A.M., Geurts-Moespot, A., Heuvel, J.J.T.M., Kienhuis, C.B.M. and Benraad, T.J., *Epidermal growth factor receptor-negative tumors are predominantly confined to the subgroup of estradiol receptor-positive human primary breast cancers*. *Cancer Res*, 1991. **51**: p. 4544-4548.
206. Klijn, J.G.M., Berns, P.M.J.J., Schmitz, P.I.M. and Foekens, J.A., *The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients*. *Endocr Rev*, 1992. **13**(1): p. 3-17.
207. Kienhuis, C.B., Koenders, P.G., Klominska, H. and Benraad, T.J., *Endogenous ligands for the epidermal growth factor receptor in human breast tumors do not interfere in an epidermal growth factor receptor radioligand binding assay*. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. **27**(3): p. 271-275.
208. Gasparini, G., Gullick, W.J., Bevilacqua, P., Sainsbury, R.C., Meli, S., Boracchi, P., Testolin, A., La Malfa, G. and Pozza, F., *Human breast cancer: prognostic significance of the c-erbB-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy, and conventional pathologic features*. *J Clin Oncol*, 1992. **10**(5): p. 686-695.