

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL ONCOGEN
HER-2/NEU EN CÁNCER DE MAMA: CORRELACIÓN
CON PARÁMETROS CLÍNICOS Y CON RECEPTORES
DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA**

JOSEFA PILAR FERNÁNDEZ VALERÓN

Las Palmas de Gran Canaria, Julio de 1994

Título de la tesis:

***METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL ONCOGEN
HER-2/NEU EN CÁNCER DE MAMA: CORRELACIÓN
CON PARÁMETROS CLÍNICOS Y CON RECEPTORES
DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA***

Thesis title:

***METHODOLOGY TO STUDY OF ONCOGEN HER-2/NEU
IN BREAST CANCER: CORRELATION WITH CLINIC
PARAMETERS AND BOTH ESTROGEN AND
PROGESTERONE RECEPTORS***

ABSTRACT

HER-2/neu oncogene status and total cellular p185HER-2 content were simultaneously analyzed in 415 invasive breast-cancer specimens by differential PCR and ELISA respectively. Mathematical analysis of the data led us to establish a cut-off value of 1.7 for the ratio between the intensity of the HER-2/neu gene band and the reference gene band, to consider the HER-2/neu gene amplified, and of 260 fmol/mg protein, to consider p185HER-2 over-expressed. Of the 415 tumours studied, 15% showed a diverse degree of HER-2/neu gene amplification. Of these tumours, 87% showed over-expression of the p185HER-2. Of the remaining 352 specimens that did not display HER-2/neu gene amplification, 97% showed no p185HER-2 over-expression ($p < 0.0001$). In 40 selected samples with a p185HER-2 level lower than 260 fmol/mg protein, the degree of p185HER-2 phosphorylation was very low or undetectable. Conversely, 38 of 46 selected tumours with a p185HER-2 level higher than 260 fmol/mg protein exhibited a considerable degree of p185HER-2 phosphorylation ($p < 0.0001$).

Furthermore, these results were compared with those of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, pS2 and Cathepsin D (Cat D) content, in 346 invasive primary breast cancers. At a cut-off level of 260 fmol/mg protein, 53 of the 346 tumours (15%) were p185-positive. A significant positive correlation was observed between p185 levels and those of Cat D, and a weaker, though significant, positive correlation with ER, and pS2 levels, but not with those of PR. However, when only the 293 p185-negative tumours were considered, the correlation between p185 and ER improved substantially, and statistical significance was reached for PR. p185-positive tumours exhibited lower ER and PR content and higher Cat D content than p185-negative tumours. The pS2 content, in contrast, did not undergo significant variation. Tumours considered to be p185-positive were significantly more frequently positive for Cat D at the cut-off of 45 pmol/mg protein, and were more frequently negative for ER and/or PR, but only significant at the cut-off of 15 fmol/mg or higher for both steroid receptors. Finally, p185 status was not associated with menopausal status, tumour size, axillary-lymph-node invasiveness or distant metastases. These results suggest that 260 fmol/mg protein. Our data suggest that: (i) differential PCR and ELISA, which are relatively simple procedures, give similar information on HER-2/neu status in breast cancer; and (ii) given the large series analyzed, the cut-off values established can be considered as safe values for determining whether, in a given tumour, the HER-2/neu oncogene is amplified or p185HER-2 is over-expressed and (iii) as the cut-off for p185 allows the identification of a tumour sub-population with a more aggressive phenotype.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORANDO EN MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO:

ONCOLOGIA BASICA Y CLINICA

TITULO DE LA TESIS:

***"METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DEL ONCOGEN
HER-2/neu EN CANCER DE MAMA:CORRELACION
CON PARAMETROS CLINICOS Y CON RECEPTORES
DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA"***

Tesis doctoral presentada por Dña. Pilar Fernández Valerón
Dirigida por el Dr. Juan Carlos Díaz-Chico y el Dr. Ricardo Chirino Godoy

El Director

Codirector

La Doctoranda:

Las Palmas de Gran Canaria, 15 de Julio de 1994

D. JUAN CARLOS DIAZ CHICO, PROFESOR TITULAR DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado *"METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DEL ONCOGEN HER-2/neu EN CANCER DE MAMA: CORRELACION CON PARAMETROS CLINICOS Y CON RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA"*, ha sido realizado por Dña. Pilar Fernández Valerón en el Laboratorio de Fisiología del mencionado Departamento bajo su dirección y asesoramiento técnico y, una vez revisada, la presente Memoria la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a quince de julio de mil novecientos noventa y cuatro.

Fdo. Juan Carlos Díaz Chico

D. RICARDO CHIRINO GODOY, PROFESOR TITULAR INTERINO DE FISIOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado *"METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DEL ONCOGEN HER-2/neu EN CANCER DE MAMA: CORRELACION CON PARAMETROS CLINICOS Y CON RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA"*, ha sido realizado por Dña. Pilar Fernández Valerón en el Laboratorio de Fisiología del mencionado Departamento bajo su dirección y asesoramiento técnico y, una vez revisada, la presente Memoria la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a quince de julio de mil novecientos noventa y cuatro.

Fdo. Ricardo Chirino Godoy

A mi madre

Indice

1. INTRODUCCION	1
1.1. EL PROTO-ONCOGEN HER-2/neu	2
1.1.1. INTRODUCCION	2
1.1.2. ACTIVACION DEL PROTO-ONCOGEN	4
1.1.3. TRANSDUCCION DE LA SEÑAL	8
1.1.4. LIGANDOS QUE INTERACTUAN CON LA p185 ^{HER-2/neu}	10
1.1.5. LA FAMILIA DE LIGANDOS	13
1.1.5.a. El extremo N-terminal y el dominio "kringle"	15
1.1.5.b. El dominio Ig	15
1.1.5.c. El dominio espaciador	16
1.1.5.d. El dominio EGF	16
1.1.5.e. La cola citoplásmica	17
1.1.6. EXPRESION DE LAS NRGs	17
1.2. EL CANCER DE MAMA: GENERALIDADES	19
1.2.1. ANATOMIA PATOLOGICA DEL CANCER DE MAMA	22
1.2.1.a. Carcinomas "in situ"	23
1.2.1.b. Carcinomas infiltrantes	23
1.2.2. ESTADIAJE CLINICO DEL CANCER DE MAMA	23
1.2.2.a. Tamaño del tumor	24
1.2.2.b. Afectación ganglionar	24
1.2.2.c. Metástasis a distancia	24
1.2.2.d. Clasificación por Estadíos Clínicos	25

Indice

1.3. FACTORES PRONOSTICOS EN EL CANCER DE MAMA	26
1.3.1. TAMAÑO DEL TUMOR	26
1.3.2. AFECTACION GANGLIONAR	27
1.3.3. GRADO HISTOLOGICO	28
1.3.4. INDICE PROLIFERATIVO Y PLOIDIA	28
1.3.5. RECEPTORES DE ESTROGENOS Y DE PROGESTERONA	29
1.3.6. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO	31
1.3.7. CATEPSINA D	32
1.3.8. LA p52	33
1.3.9. GENES SUPRESORES (ANTI-ONCOGENES)	34
1.3.10. ONCOGENES	36
1.3.10.a. Oncogenes jun y fos	36
1.3.10.b. Oncogén myc	37
1.3.10.c. Oncogén ras	37
1.3.10.d. El oncogén HER-2/neu	39
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	43
3. MATERIAL Y METODOS	46
3.1. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	47
3.1.1. RECOGIDA DE MUESTRAS	47
3.1.1.a. Protocolo de recogida de datos	47
3.1.1.b. Obtención y almacenamiento de las muestras	48
3.1.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	49
3.1.2.a. Material	50

Indice

3.1.2.b. Soluciones	51
3.1.2.c. Protocolo	51
3.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE RE Y RP	53
3.2.1. INTRODUCCION	53
3.2.2. PROCEDIMIENTO	55
3.2.2.a. Material y reactivos	55
3.2.2.b. Protocolo	56
3.3. ESTUDIO DEL PROTO-ONCOGEN HER-2/neu	56
3.3.1. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION MEDIANTE	
SOUTHERN BLOT	56
3.3.1.a. Material y reactivos	57
3.3.1.b. Soluciones	58
3.3.1.c. Digestión y electroforesis	61
3.3.1.d. Transferencia de ADN desde agarosa a membranas	
de nylon	63
3.3.1.e. Marcaje de la sonda con digoxigenina	66
3.3.1.f. Hibridación de la sonda	68
3.3.1.g. Detección y revelado	69
3.3.2. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION MEDIANTE PCR	
DIFERENCIAL	70
3.3.2.a. Material y reactivos	78
3.3.2.b. Soluciones	79
3.3.2.c. Procedimiento de extracción de ADN	80

Indice

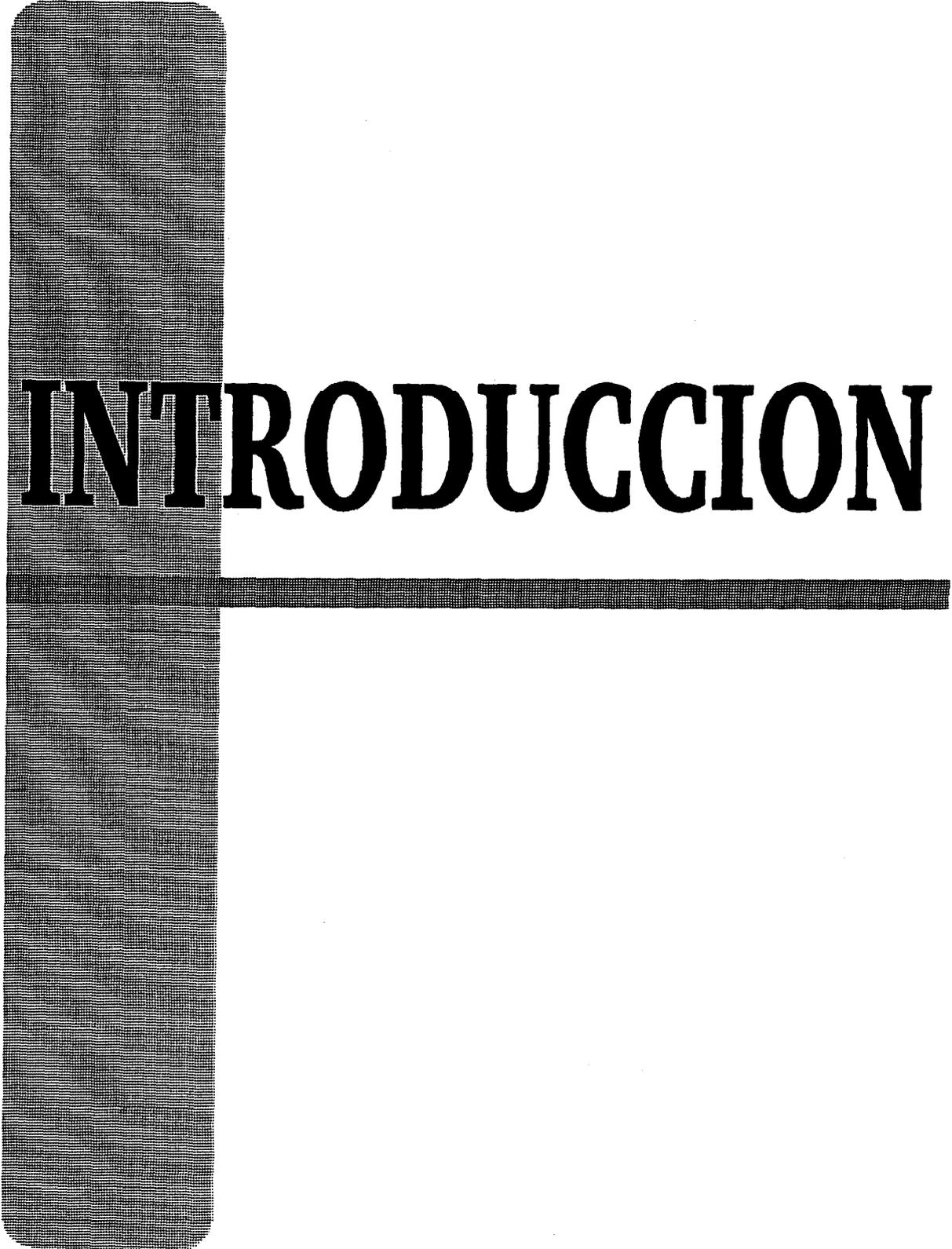
3.3.2.d. Procedimiento de PCR diferencial	82
3.4. ESTUDIO DE LA PROTEINA p185 ^{HER-2/neu}	84
3.4.1. ESTIMACION CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE LA ONCO- PROTEINA p185 ^{HER-2/neu} MEDIANTE ELISA	84
3.4.1.a. Material y reactivos	86
3.4.1.b. Protocolo	86
3.4.2. ESTUDIO DE LA PROTEINA p185 ^{HER-2/neu} MEDIANTE WESTERN	88
3.4.2.a. Material y reactivos	88
3.4.2.b. Soluciones	89
3.4.2.c. Electroforesis SDS-PAGE	92
3.4.2.d. Transferencia de proteínas desde acrilamida a membranas de polivinilo	93
3.4.2.e. Determinación semicuantitativa de la expresión de la onco- proteína p185 ^{HER-2/neu}	95
3.4.2.f. Estimación del grado de fosforilación de la oncoproteína p185 ^{HER-2/neu}	97
3.4.2.g. Detección y revelado	98
3.4.3. VALIDACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LAS TECNICAS DE WESTERN BLOT MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN	99
3.4.3a. Procedimiento	99
3.5. CULTIVOS CELULARES	101
3.5.1. LINEAS CELULARES	101

Indice

3.5.2. CULTIVO Y OBTENCION	101
3.6. ANALISIS ESTADISTICO	102
4. RESULTADOS	103
4.1. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION DEL GEN HER-2/neu Y DE LOS NIVELES CUANTITATIVOS DE EXPRESION DE LA p185 ^{HER-2/neu}	104
4.1.1. DESARROLLO DE LA METODOLOGIA PARA LA ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION DEL ONCOGEN HER-2/neu MEDIANTE PCR DIFERENCIAL	104
4.1.2. AMPLIFICACION DEL HER-2/neu EN EL CANCER DE MAMA	112
4.1.3. ESTIMACION CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE LA ONCOPROTEINA p185 ^{HER-2/neu}	117
4.1.4. ESTADO DE FOSFORILACION DE LA p185 ^{HER-2/neu}	121
4.1.5. CORRELACION ENTRE LA AMPLIFICACION GENICA DEL HER-2/neu Y LOS NIVELES DE EXPRESION DE LA p185 ^{HER-2/neu}	125
4.2. RELACION DE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu CON MARCADORES TUMORALES	128
4.2.1. HER-2/neu versus EDAD	128
4.2.2. HER-2/neu versus MENOPAUSIA	130
4.2.3. HER-2/neu versus TAMAÑO DEL TUMOR	132
4.2.4. HER-2/neu versus AFECTACION GANGLIONAR	133
4.2.5. HER-2/neu versus METASTASIS A DISTANCIA	136
4.2.6. HER-2/neu versus ESTADIAJE CLINICO	137

Indice

4.2.7. HER-2/neu versus TIPO HISTOLOGICO	139
4.3. RELACION ENTRE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu Y LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS	141
4.4. RELACION DE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu CON LA EVOLUCION CLINICA DE LAS PACIENTES	152
5. DISCUSION	154
5.1. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION DEL HER-2/neu MEDIANTE PCR DIFERENCIAL	155
5.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE LA p185 ^{HER-2/neu}	161
5.3. RELACION ENTRE EL ESTADO DEL GEN HER-2/neu Y LA EXPRESION DE LA p185 ^{HER-2/neu}	164
5.4. ESTIMACION DE LA ACTIVIDAD DE LA p185 ^{HER-2/neu}	165
5.5. RELACION ENTRE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu Y LOS FACTORES PRONOSTICOS	167
5.6. RELACION ENTRE ACTIVACION DEL HER-2/neu Y LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS	168
6. CONCLUSIONES	171
7. AGRADECIMIENTOS	175
8. BIBLIOGRAFIA	178



INTRODUCCION

Los receptores TK pueden ser clasificados en varios grupos en base a su similitud de secuencia y a diversas características funcionales. Uno de estos grupos incluye al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), y a los productos de los proto-oncogenes HER-2/neu (también llamado Erb-B2), ErbB-3/HER-3, y ErbB-4/HER-4 (1). El proto-oncogén HER-2/neu se encuentra localizado en el cromosoma 17 humano (2,3) y codifica una glicoproteína transmembranal de 185 kDa, denominada p185^{HER-2/neu} (4). Todos estas proteínas poseen una estructura molecular muy similar, con un gran dominio extracelular glicosilado donde se une el ligando, una sencilla región hidrofóbica transmembranal y un dominio citoplasmático donde radica la actividad TK (5).

Hay un 40-50% de homología entre la p185^{HER-2/neu} y el resto de los miembros de esta familia, y es el dominio citoplasmático el que está más intensamente conservado. A pesar de su parecido estructural y funcional con el EGFR, la p185^{HER-2/neu} no une ningún ligando de éste, y los del Erb-B3 y Erb-B4 no se conocen. Esto aumenta la posibilidad de que cada receptor de esta familia una un ligando distinto. En la Figura 1 se esquematiza la estructura de la p185^{HER-2/neu} y su relación con los otros miembros de esta familia.

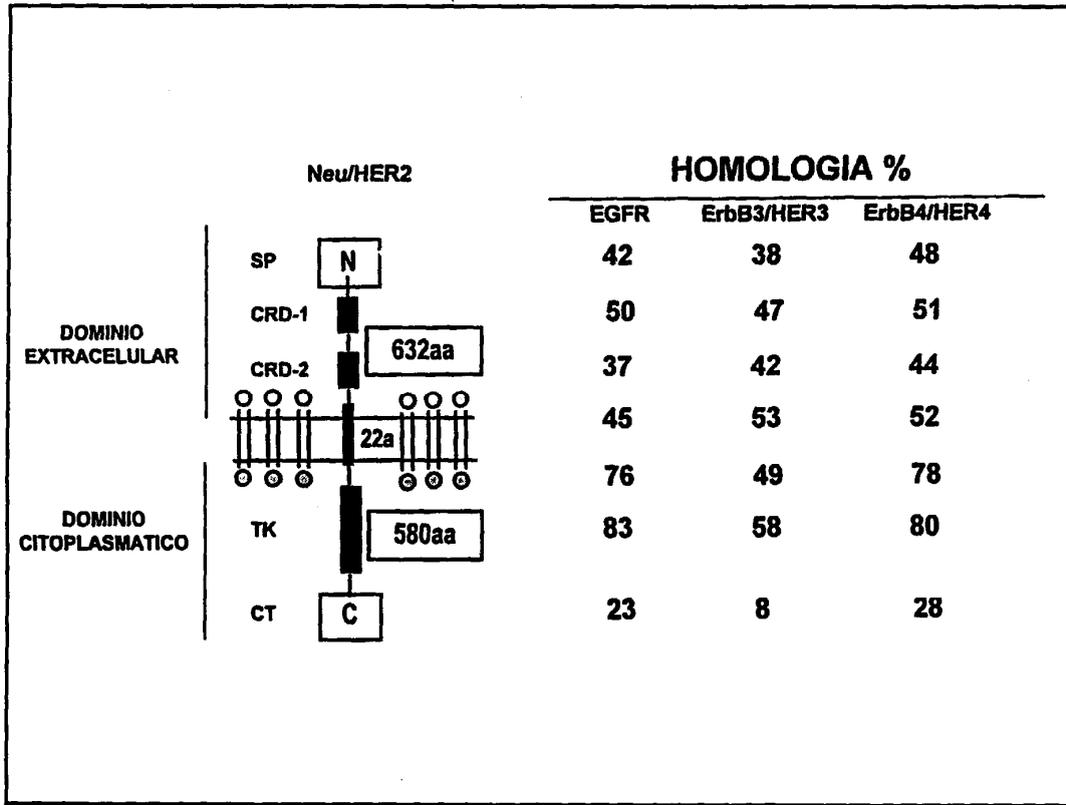


FIGURA 1. Estructura de la p185^{HER-2/neu} y homología con los restantes miembros de su familia.

1.1.2. ACTIVACION DEL PROTO-ONCOGEN

La activación del HER-2/neu se descubrió mediante experimentos en ratas preñadas, en las que se indujeron a los 15 días de gestación mutaciones puntuales con el carcinógeno etílnitrosourea, lo que trajo como resultado la aparición en la descendencia de neuroblastomas y glioblastomas, de ahí su nombre (6).

El alelo transformado manifiesta un único cambio en el nucleótido 2012 (T→A)

respecto al normal. Esta mutación puntual provoca el cambio de un residuo de valina por uno de glutamato en la posición 664, correspondiente al dominio transmembranal (7). La mutación es altamente específica puesto que ella sola genera una total transformación de la proteína. Mutaciones análogas no han sido encontradas en el gen humano, aunque mutagénesis dirigidas han demostrado que un cambio similar puede activarlo. Experimentos con ratones transgénicos han demostrado el potencial transformante del gen HER-2/neu. Cuando se dirige la transformación con el promotor vírico de tumores mamarios de ratón, la versión transformada de HER-2/neu de rata induce adenocarcinomas de mama (8). Asimismo, con el HER-2/neu humano mutado conducido por inmunoglobulinas y con el SV40 como promotor, se inducen linfomas en animales transgénicos (9).

La consecuencia funcional más notable de la mutación transformante es un incremento de la actividad TK de la p185^{HER-2/neu} y de la tasa de recambio (10). Lo más probable es que la mutación afecte a las interacciones intermoleculares que son esenciales para el incremento de la actividad kinasa, no obstante, el mecanismo íntimo por el cual la actividad kinasa se incrementa, no se conoce con exactitud. Se ha postulado que este tipo de activación se produce por el cambio conformacional que origina la mutación en el receptor (11), de manera que se posibilita su agregación (dimerización) y/o estabilidad (12), lo que nunca ocurriría en la proteína normal, en ausencia de ligando (13).

Por analogía con otros receptores de factores de crecimiento, la dimerización del HER-2/neu tiende a elevar su actividad kinasa y a inducir autofosforilación de los residuos de tirosina (14). En este sentido, la p185^{HER-2/neu}, como otros receptores de factores de crecimiento, puede ser considerada como una enzima alostérica cuyas partes no catalíticas

regulan su actividad intrínseca TK.

Un segundo mecanismo descrito de activación del HER-2/neu lo constituye la delección artificial, del dominio N-terminal, lo que se traduce en un incremento de su actividad TK lo que lo hace ser de 10 a 20 veces más efectivo en su actividad transformante que el gen completo (15).

Sin embargo, el mecanismo de activación oncogénica del gen HER-2/neu más relevante en el cáncer humano, radica en la amplificación y/o la sobreexpresión del gen salvaje humano, el cual, se vuelve capaz de provocar transformación fenotípica "in vitro" en fibroblastos de ratón, y tumorigénesis "in vivo" (16). El gen HER-2/neu se halla amplificado en una gran variedad de adenocarcinomas humanos tales como el de mama, colon o estómago (17). En el cáncer de mama (18), o en el de ovario (19), se encuentra amplificado en un 25% de los casos, y esta amplificación se ha correlacionado con una recidiva temprana y una menor supervivencia. Por ello, el HER-2/neu parece ser un valioso factor pronóstico independiente.

Además de la amplificación del HER-2/neu en tumores humanos, también se ha encontrado sobreexpresión de su ARNm y de la p185^{HER-2/neu} en ausencia de amplificación génica, lo que hace suponer que en estos tumores existen desórdenes transcripcionales y/o postrcripcionales (20), que podrían estar involucrados en la oncogénesis.

Además del papel del HER-2/neu en la tumorigénesis, otro aspecto que también ha sido investigado es su participación en la diseminación metastásica del cáncer humano,

concretamente en tumores gástricos (21). En este sentido, se ha demostrado que la activación del HER-2/neu por mutación es suficiente para desarrollar metástasis experimentales. Además, la sobreexpresión del gen normal en el epitelio mamario de ratones transgénicos provoca tumores que metastatizan con alta frecuencia.

La sobreexpresión del HER-2/neu está asociada con una actividad alta de TK y autofosforilación de residuos de tirosina (22). Así, los tumores inducidos tienen esta actividad más alta que el epitelio normal adyacente. Esto implica que la función TK juega un papel muy importante en la transformación, no sólo en modelos animales sino en cáncer humano.

Además de los tres mecanismos anteriores de activación del HER-2/neu, previamente comentados, existe un cuarto mecanismo de transformación que es altamente inusual, y que consiste en la formación de heterodímeros entre la p185^{HER-2/neu} y el EGFR (23). Usando una p185^{HER-2/neu} defectuosa en actividad TK, se ha podido demostrar que esta proteína es un sustrato de la actividad TK del EGFR (24). Por otra parte, la formación de estos heterodímeros, potencia la autofosforilación de los mismos (25). Este fenómeno se caracteriza por un aumento de afinidad del EGFR por su ligando, y por una alta actividad TK, que podría conferirle ventajas a la célula a la hora de crecer con relativamente bajas concentraciones de ligando. Curiosamente, la p185^{HER-2/neu} y el EGFR se sobreexpresan conjuntamente en una alta proporción de carcinomas de mama.

1.1.3. TRANSDUCCION DE LA SEÑAL

La unión del ligando a la parte extracelular de los receptores TK produce una dimerización de los mismos, que conlleva a una transmisión de señal a través de la membrana, y la activación del dominio intracelular TK. Esto se continúa con una autofosforilación de los residuos de tirosina, que de esta manera acomodan los lugares para las moléculas de transmisión. Cada receptor se caracteriza por una única combinación de moléculas que son responsables colectivamente de los distintos efectos específicos de cada factor en las células diana.

Debido al desconocimiento que se tenía de sus posibles ligandos, el estudio de la señal de transducción del HER-2/neu se llevó a cabo mediante anticuerpos monoclonales, capaces de bloquear el dominio extracelular de la molécula (10,26), y de receptores quiméricos cuya parte extracelular correspondía al EGFR y la intracelular a la p185^{HER 2/neu} (27,28). La posibilidad de que la proteína transformante fuera bioquímicamente equivalente al receptor activado promovió la comparación entre el tipo salvaje y mutado de la proteína.

Cuando estos receptores quiméricos eran estimulados con ligandos heterólogos, se producía un aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ y del potencial de membrana, seguido de un incremento de la actividad TK (29). Además, se aceleraba el movimiento de los lípidos de inositol así como el transporte de glucosa a través de la membrana (30). Otros eventos transcripcionales que siguen a la activación del HER-2/neu son la rápida inducción de la expresión de los genes "fos" y "jun" junto con la de otros genes de respuesta temprana.

Esta serie de eventos antes comentados están probablemente provocados por un grupo de proteínas que sufren rápida fosforilación (31,32). Algunas de éstas forman también complejos no covalentes con el receptor y su identidad es sólo parcialmente conocida. Entre ellas se incluyen la fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ), la proteína activante de GTPasa de ras (ras-GAP) y la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3' kinasa (PI3K) (33,34). Estos sustratos muestran todos un mismo motivo en la secuencia, llamada "src homology 2" (SH2), que permite la unión de estas proteínas a residuos de tirosina fosforilados del receptor activo. Con estas observaciones se predijo que el HER-2/neu cataliza la actividad de la proteína Kinasa C, afecta la actividad de las proteínas del ras y eleva los niveles de lípidos de inositol fosforilados. Análisis con anticuerpos monoclonales revelan también la estimulación de un fosfatidilinositol 4'-kinasa.

Es interesante destacar que la inhibición de la desfosforilación induce la aparición de sustratos similares en líneas celulares de mama humana (33), mientras que la sobreexpresión del HER-2/neu normal lleva a la fosforilación constitutiva de la PLC γ (22). Estos hallazgos sugieren el papel de los posibles sustratos en cánceres que expresan el receptor.

Aunque existen sitios de fosforilación de tirosina homólogos entre el EGFR y el HER-2/neu, éstos tienen diferencias funcionales cualitativas y cuantitativas. Mediante receptores quiméricos entre ambos se ha visto que esta cierta especificidad se debe a un simple aminoácido en la región yuxtamembranal, lo que sugiere que esta región podría ser la que confiere el acoplamiento distinto al sistema efector post-receptor.

La Figura 2 muestra uno de los modelos de la cascada de reacciones que se producen

en la célula tras la activación de los receptores TK.

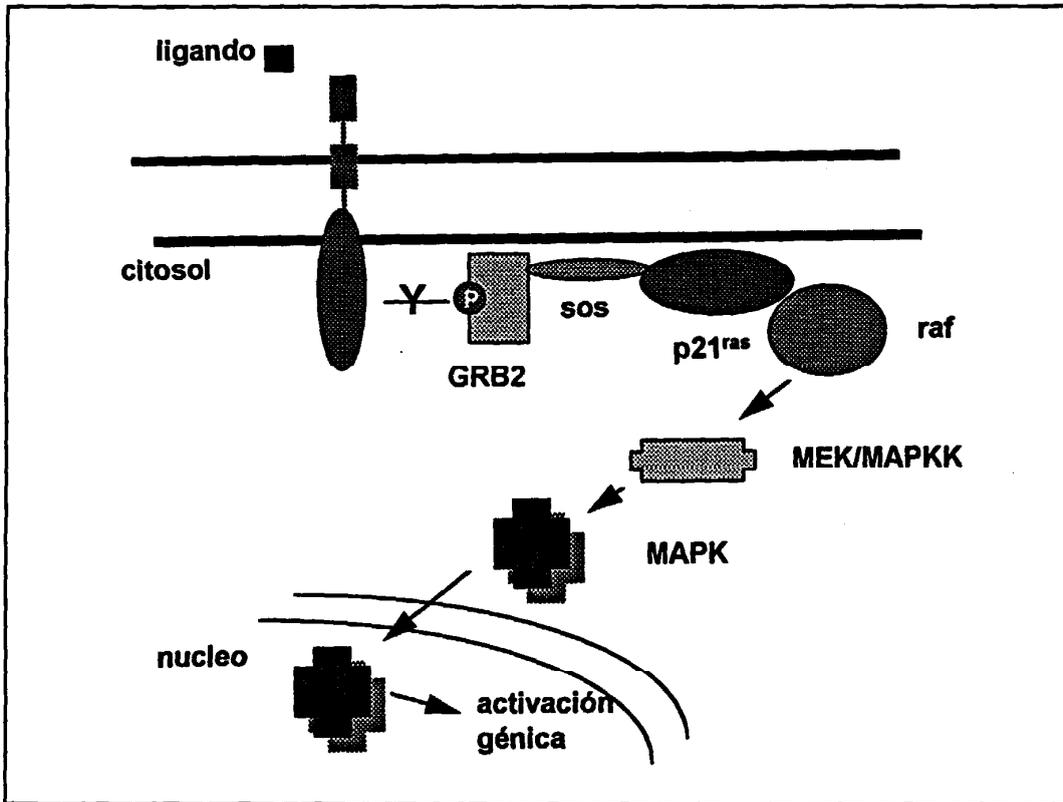


FIGURA 2. Cascada de reacciones tras la activación de los receptores TK.

1.1.4 LIGANDOS QUE INTERACTUAN CON LA p185^{HER-2/neu}

La existencia de un ligando natural para HER-2/neu fue deducida sobre la base de la homología estructural y funcional con otros receptores conocidos de factores de crecimiento. Debido al fracaso para identificar un activador específico, y a su alta actividad basal TK, se barajó la posibilidad de que la p185^{HER-2/neu} podía ser un receptor atípico, capaz de funcionar sin necesidad de ligando. Una acción estimulante de la actividad de la p185^{HER-2/neu}

fue detectada en varias fuentes biológicas tales como el medio de crecimiento de fibroblastos transformados con ras (35), el de líneas celulares de cáncer de mama (36,37,38) y de células hematopoyéticas (células T y macrófagos activados) (39,40), o en el suero de ternero neonato y en extractos de riñón bovino (41).

La inducción de fosforilación en tirosina en células intactas mamarias fue utilizada para detectar el factor de diferenciación en rata de Neu (NDF) (42) y su homólogo humano, heregulina (HRG) (38), mientras la activación kinasa "in vitro" hizo posible la detección del factor activante de Neu (NAF) (39) y el factor de crecimiento ligante de Neu (NEL-GF) (41). Igualmente, la habilidad para la "regulación a la baja" de la $p185^{HER-2/neu}$ de la membrana plasmática fue empleada durante la purificación de un posible ligando de 25 kDa (40), y la competición con anticuerpos monoclonales para dos glicoproteínas, gp30 (36) y gp75 (37).

En base a las masas moleculares y otras propiedades bioquímicas de estos candidatos, parece que al menos pueden existir tres factores distintos. Esto no debería sorprender debido a la multiplicidad de ligandos observada para el EGFR. De cualquier manera, la determinación indirecta de la relación receptor-ligando, y la ausencia de moléculas clonadas (excepto NDF/HRG) dan la posibilidad de que no todos estos factores sean de hecho ligandos de la $p185^{HER-2/neu}$. Hasta en el caso del NDF/HRG donde el factor recombinante es posible y puede sufrir una unión cruzada a la ya relatada molécula de $p185^{HER-2/neu}$ no existe una completa seguridad, debido en parte a que son moléculas descubiertas recientemente (43). A pesar de esta cuestión, merece la pena considerar los efectos biológicos de un ligando puntual. Por ejemplo, ambos NAF (39) y NEL-GF (41) son mitógenos para células que expresan $p185^{HER-2/neu}$, pero no afectan la síntesis de ADN en aquellas células que no expresan

esta proteína. De forma similar, bajas concentraciones, de gp30 y gp75 estimulan el crecimiento de ciertas líneas celulares, pero a altas concentraciones el efecto es justamente el opuesto. Esta dualidad se da también con NDF/HRG. Cuando se aplican estos factores a ciertas células tumorales mamarias (por ejemplo: AU-565 y MDA-MB453), se induce una diferenciación fenotípica que incluye cambios morfológicos y síntesis de componentes lácteos, acompañado de una detención de crecimiento (42,44). Además, la aparición del fenotipo maduro lleva a un incremento del área nuclear, inducción de poliploidías en el ADN y traslocación de la p185^{HER-2/neu} desde la membrana hasta el núcleo. Efectos similares fueron producidos por relativamente altas concentraciones de gp30. Sin embargo, el NDF/HRG ejerce un efecto mitogénico sobre otras líneas celulares mamarias, tales como SKBR-3 y MCF-7 (38).

Recientemente han sido clonados dos factores neurales, un factor de crecimiento glial bovino (GGF) (45) y un factor inductor de la actividad del receptor de acetil colina del ovario (ARIA) (46), que han sido identificados como variantes del NDF/HRG. Mientras que GGF ha sido aislado en base a su actividad mitogénica en las células de Schwann, el ARIA está involucrado en un proceso de diferenciación: la síntesis y concentración de receptores de neurotransmisores, en las células musculares, inervadas por neuronas motoras.

Por último, esta dualidad funcional del NDF que es capaz de actuar como un factor de diferenciación o como un mitógeno, dependiendo de su concentración y del tipo celular sobre el que actúa, se da en muchos otros factores polipeptídicos. Esto podría deberse a la existencia de múltiples formas del NDF. Alternativamente, los niveles de expresión de la p185^{HER-2/neu} y la de sus homólogos como el EGFR, pueden determinar la naturaleza de la

respuesta biológica al NDF. Evidencias derivadas del uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la p185^{HER-2/neu} indican que efectos biológicos opuestos pueden ser mostrados por este receptor, hasta en un mismo tipo celular (31,47).

1.1.5. LA FAMILIA DE LIGANDOS.

La clonación de NDF (44), HRG (38), GGF (45) y ARIA (46) reveló que todos estos factores pertenecen a una misma familia de factores polipeptídicos, razón por la que han sido denominados NEUREGULINAS (NRGs). Esta serie de proteínas parecen estar codificadas por un único gen, localizado en el brazo corto del cromosoma 8 humano (48). A partir de una maduración ("splicing") alternativa del ARNm surgen varias combinaciones de moléculas de ligando, las cuales han sido identificadas primeramente a nivel de sus respectivos ARNm (38,45).

La variedad de motivos estructurales reconocidos en esta familia es muy amplia, e incluye un dominio "EGF", un motivo como Inmunoglobulina (Ig), un dominio "kringle", una región espaciadora rica en glicosilación, y 2 regiones hidrofóbicas, un péptido señal N-terminal y un tramo transmembranal.

Se proponen dos tipos mayoritarios de NRGs, los α y β , que se clasifican de acuerdo a su dominio EGF. Los subtipos 1 y 2 de los dos grupos mayoritarios difieren por la presencia o no de un tramo de 8 aminoácidos que conectan el dominio "EGF" con el dominio transmembranal. El subtipo 3 no tiene dominio transmembranal, es decir, acaba en el extremo C terminal del dominio EGF. Las variantes que incluyen el dominio "kringle" se les

da la letra K. El esquema de esta nomenclatura se observa en la Figura 3.

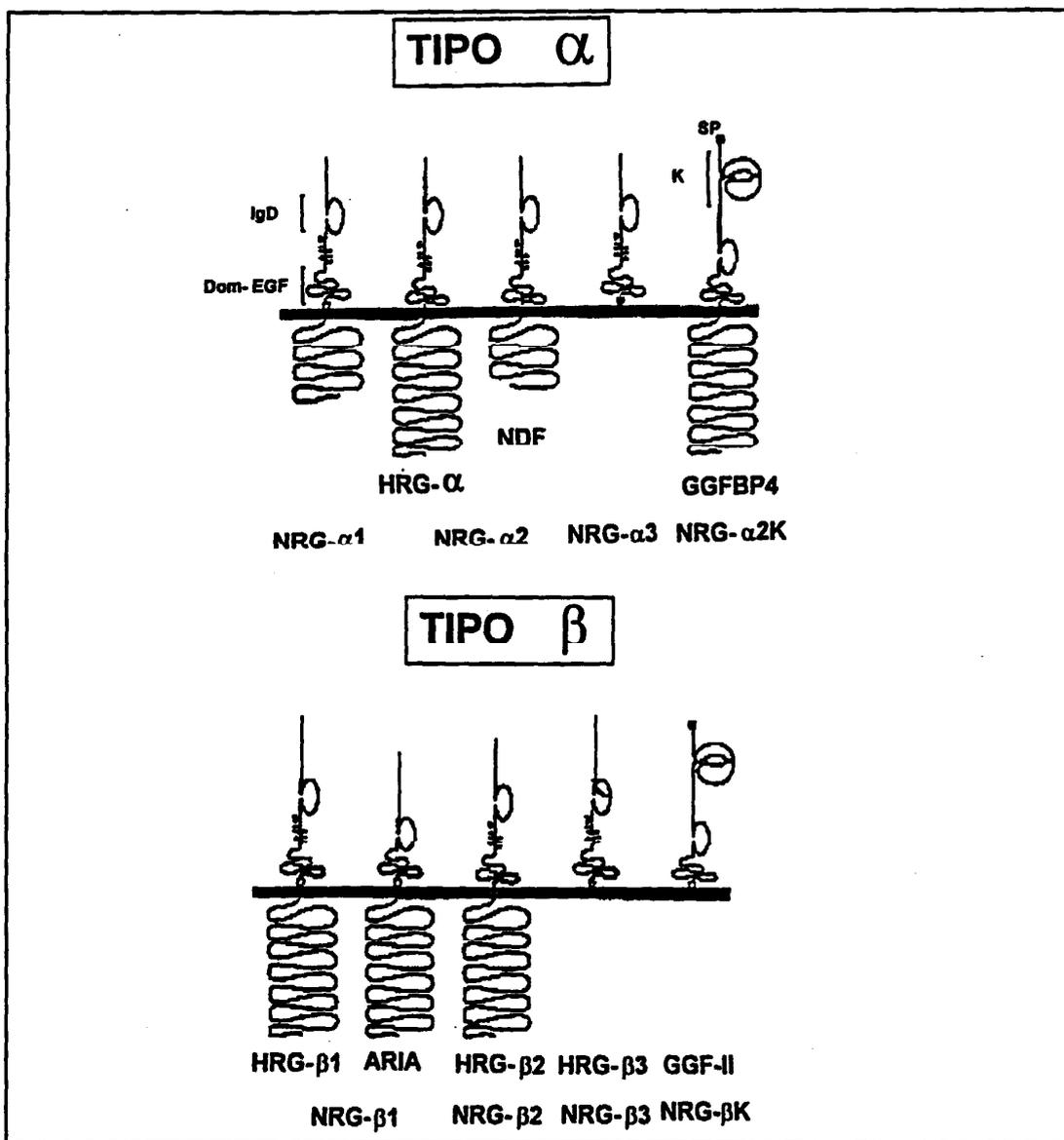


FIGURA 3. Estructura de los diversos ligandos de la p185^{HER-2/neu}.

1.1.5.a. El extremo N-terminal y el dominio "kringle"

Todas las NRGs contienen en su extremo N terminal secuencias que son codificadas por dos exones cuyo orden no ha sido determinado (49). El dominio "kringle" está precedido por un péptido señal (PS) hidrofóbico, y a continuación hay unos 50 aminoácidos hidrofílicos que sufren el corte en la maduración de la molécula de pro-NRG. Presumiblemente, la presencia del PS hace posible la secreción de la molécula, como es el caso de NRG- β K, pero en su ausencia, la secuencia alternativa del N-terminal, en combinación con el dominio transmembranal, permite el transporte del precursor a través de la membrana, como ocurre en la secreción de NDF.

El papel funcional del dominio "kringle" es desconocido, pero puede mediar la interacción proteína-proteína o afectar al procesamiento de las NRGs por proteasas específicas. El N-terminal de los NRGs no neuronales es rico en aminoácidos cargados positivamente. Estas secuencias se piensa que están involucradas en la interacción, basada en la carga, de los factores de crecimiento con los proteoglicanos heparán-sulfatos asociados a la matriz (HSPG). Potencialmente, la interacción de las NRGs con los HSPG podría dar como resultado su presencia e incremento de concentración en sitios específicos.

1.1.5.b. El dominio como Ig

Todas las NRGs conocidas contienen esta región, la cual se transcribe de dos exones separados. Los residuos conservados de cisteína y los aminoácidos que los rodean sugieren que éstas pertenecen al tipo C2 de las Ig. Este motivo se encuentra en receptores de

membrana para factores de crecimiento (PDGF-receptor) y linfocinas (interleukin-1 receptor), moléculas de adhesión celular y en la proteína con heparán-sulfato de la membrana basal.

Este dominio parece estar involucrado en estabilizar la interacción homofílica proteína-proteína. Por ejemplo, puede promover dimerización de moléculas solubles de NDF o causar adhesión de células nacientes que expresen la forma membranal de NDF. La presencia y ubicación de este dominio sugiere que tiene una función esencial.

1.1.5.c. El dominio espaciador

Esta región conecta el dominio Ig con el dominio EGF. Tiene tres sitios potenciales de glicosilación y flanquea al N-terminal. Una porción de 34 aminoácidos de este dominio está ausente en las formas neuronales de la NRGs, incluido el ARIA, y esto resulta en una *disminución de los sitios de glicosilación*.

Se especula que podría inducir al núcleo del péptido a adoptar una conformación rígida y extendida, esta conformación mantiene los dominios funcionales adyacentes, Ig y EGF, expuestos y accesibles a las interacciones moleculares.

1.1.5.d. El dominio EGF

Esta región está definida por 6 residuos de cisteína que se disponen característicamente sobre una secuencia de 35-40 aminoácidos, y están predispuestas a doblarse en una estructura típica con 3 puentes disulfuros. La configuración de las cisteínas

es similar en todas las NRGs. No obstante, hay 2 tipos distintos de dominio EGF, α y β , que difieren sólo en el lazo C-terminal.

Es importante el espacio entre la 5^a y 6^a cisteína así como la localización de un residuo esencial de glicina que está conservado en toda la familia de NRGs. Además, el espacio entre la 3^a y 4^a cisteína es más largo que en otros miembros de las proteínas-EGF (incluyendo en éstas aquellas que se unen al EGF-Receptor). Esta diferencia es probablemente responsable de la aparente pérdida de interacción entre las NRGs y el EGFR.

La función de este dominio EGF es de sitio de unión al receptor.

1.1.5.e. La cola citoplásmica

Las formas transmembranales de los NRGs muestran 4 diferentes dominios hidrofílicos citoplasmáticos que probablemente provienen de la maduración alternativa de 3 exones. El aminoácido C-terminal de algunas formas es una valina. Esto es relevante porque la localización similar de las valinas en el TGF α está involucrada en la regulación del procesamiento proteolítico del factor.

1.1.6. EXPRESION DE LAS NRGs.

Por técnicas de Northern blot se han observado diversos transcritos de las NRGs, siendo el más largo de 6,8 kb. Esto probablemente se debe a maduración alternativa de su ARNm. El nivel de expresión más alto de estos transcritos se encuentra en la médula espinal,

pero patrones específicos de expresión se han observado en otros órganos. La expresión de NRG en embrión de pollo se observa desde el día 4, y desde el día 10,5-11 en embrión de ratón. Por medio de experimentos de hibridación "in situ", ha podido demostrarse que la expresión de los NRGs en ratón está confinada mayoritariamente al Sistema Nervioso Central y Periférico, incluyendo los ganglios de las raíces dorsales y los cuernos ventrales adyacentes de la médula espinal, los neuroepitelios de los ventrículos laterales del cerebro, y las neuronas que se están diferenciando en el encéfalo. Los patrones de expresión en la médula espinal y en los ganglios dorsales no cambian significativamente en los estados posteriores del desarrollo embrionario. Patrones similares a estos han sido también observados en el embrión de pollo.

Es interesante que la expresión de las NRGs en el Sistema Nervioso Central y Periférico puede corresponder al periodo de susceptibilidad del proto-oncogén HER-2/neu a carcinogénesis química. Este gen se expresa durante la gestación media y tardía en el cerebro, pero su expresión disminuye drásticamente después del nacimiento. Presumiblemente, la mutación oncogénica de HER-2/neu, la cual mimetiza la acción de un ligando, conlleva un aumento de tumores neurogénicos porque ocurre durante una etapa en la cual las NRGs afectan en mayor medida a las funciones neuronales.

Otra conexión entre las NRGs y el cáncer es una dramática activación transcripcional de los genes que sufren transformación por el oncogén ras. Además, la expresión del factor fue observada en varias líneas celulares tumorales, incluyendo un fibrosarcoma, melanomas y adenocarcinomas. Significativamente, un tercio de los carcinomas mamarios humanos expresan el factor, pero la relevancia para la progresión del tumor está en estudio.

Actualmente, no existe una certeza absoluta acerca de que las NRGs sean ligandos de p185^{HER-2/neu}. Si bien es cierto que cumplen muchos de los requisitos indispensables para ello, también resulta igualmente cierto que algunos experimentos de interacción han llevado a la conclusión de que, como mínimo, se requeriría una molécula, desconocida por ahora, del tipo receptor TK, que funcionaría como un correceptor de las NRGs.

Los estudios anteriormente comentados, han llevado a descubrir una nueva familia de factores de diferenciación y/o crecimiento neuronales. La elucidación del papel fisiológico que estos factores desarrollan sobre las células, es un gran desafío, ya que podría revelar ciertas similitudes funcionales entre la biología de los epitelios secretores y la de las células neuronales, así como explicar de qué manera, estos factores pueden ejercer distintos efectos biológicos sobre diferentes líneas celulares.

1.2. EL CÁNCER DE MAMA: GENERALIDADES

El cáncer de mama constituye el tumor maligno más frecuente en la mujer. Así, en determinados países como Estados Unidos y Canadá, o en aquellos de la Europa del Norte, se calcula que aproximadamente 1 de cada 10 mujeres desarrollará esta enfermedad a lo largo de su vida (50).

En España, la incidencia del cáncer de mama es sensiblemente inferior a la registrada en los países norteamericanos y en los del norte de Europa, aunque, al igual que en ellos, se observa un inquietante aumento de la misma con el transcurso de los años.

En Canarias, los datos de que se disponen son parciales, pero a falta de estudios más exhaustivos, desarrollados en el ámbito global de la Comunidad, puede concluirse que la incidencia viene a ser similar a la registrada en otras comunidades de España, situándose en torno a 18-20 nuevos casos diagnosticados por cada 100.000 habitantes y año (51).

Los estudios epidemiológicos han permitido detectar una serie de factores que entrañan un mayor o menor riesgo de contraer cáncer de mama. Aunque un estudio exhaustivo de los mismos excedería el propósito de este trabajo, bueno será comentar sucintamente aquellos más destacados.

- **Edad.** En general, la incidencia de cáncer aumenta de forma exponencial con la edad. Esta aseveración es perfectamente válida para el caso concreto del cáncer de mama; así, esta enfermedad es extraordinariamente rara por debajo de los veinticinco años de edad. A continuación, aumenta rápidamente de incidencia entre los veinticinco y cincuenta años, para luego estabilizarse y volver a aumentar por encima de los sesenta años. La edad media de la paciente en el momento del diagnóstico se sitúa en torno a los 50 ó 60 años de edad (52).
- **Antecedentes familiares.** En general la probabilidad de desarrollar cáncer de mama aumenta si hay antecedentes previos de cáncer de mama en familiares directos, tales como madre o hermanas (53).
- **Historia menstrual.** Según algunos estudios, la probabilidad de desarrollar cáncer de

mama aumentaría si la menarquia es temprana, o si la menopausia es tardía; es decir, si el tiempo de exposición a los estrógenos está incrementado (54).

- Fertilidad. El riesgo de padecer cáncer de mama disminuye en aquellas mujeres que han tenido su primer hijo antes de los veinte años de edad. Por el contrario, este efecto protector se pierde en las primíparas añosas. En las nulíparas, la probabilidad de desarrollar cáncer de mama está aumentada (55). Asimismo, la lactación parece tener un efecto protector frente al cáncer de mama (56).

- Enfermedad benigna previa de la mama. Este tema ha sido objeto de gran controversia, motivada tal vez porque bajo la denominación de enfermedad benigna de la mama, se incluyen una gran variedad de entidades clínicas diferentes. Actualmente se acepta que sólo las pacientes que presentan hiperplasia atípica tienen una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de mama (57).

- Factores dietéticos. Existe una correlación positiva entre el consumo de grasa y de proteína animal y la incidencia de diversos cánceres, entre ellos el de mama (58). En este sentido, resulta interesante comentar que la incidencia de cáncer de mama es muy bajo entre las japonesas, cuya dieta posee un bajo contenido en grasa. Sin embargo, las mujeres americanas de origen asiático, cuya dieta es ya similar a la del resto de la población, presentan una incidencia de cáncer de mama también similar (59).

- Exposición a los estrógenos. El papel que las hormonas sexuales desempeñan en la

patogenia del cáncer de mama es indiscutible, lo que puede quedar patente si se toman en consideración las dos observaciones siguientes: a) la incidencia de cáncer de mama en el varón es sumamente baja; y, b) la ovariectomía en edades tempranas disminuye sensiblemente el riesgo de padecer cáncer de mama (60). No debe olvidarse que el cáncer de mama es un tumor hormonodependiente, y por consiguiente el papel que desempeñan las hormonas sexuales en su patogenia es crucial.

En lo que respecta a los estrógenos endógenos, hay estudios que indican que las mujeres con cáncer de mama presentan unas cifras urinarias de estrógenos más altas que mujeres sin esta patología (61). Respecto a los estrógenos exógenos, existe una gran controversia acerca de su posible papel carcinogénico, debido especialmente al uso extendido de los anovulatorios entre las mujeres fértiles, o al uso de terapia estrogénica sustitutiva tras la menopausia, para combatir ciertas anomalías tales como atrofia de la mucosa vaginal, o para prevenir la osteoporosis. Según ha sido publicado en fechas relativamente recientes, la toma de anovulatorios no aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer de mama (62).

1.2.1. ANATOMIA PATOLOGICA DEL CANCER DE MAMA

El examen histológico del cáncer de mama es de suma utilidad de cara a establecer el diagnóstico de la lesión y su pronóstico.

Aunque una exposición detallada de la anatomía patológica del tumor excedería los

objetivos del presente trabajo, bueno será hacer una breve reseña de la misma.

1.2.1.a. Carcinomas in situ.

Corresponde a las formas tumorales diagnosticadas precozmente, y por consiguiente presentan un buen pronóstico. En este estado, el tumor aún no ha rebasado la membrana basal y por tanto, no ha invadido el estroma adyacente. Existen dos variedades principales: la forma ductal y la forma lobulillar.

1.2.1.b. Carcinomas infiltrantes.

De entre ellos pueden distinguirse diversos tipos, tales como el carcinoma ductal infiltrante, que es el tipo más común de cáncer de mama, el carcinoma lobulillar, el medular, mucinoso, papilar, etc

1.2.2. ESTADIAJE CLINICO DEL CANCER DE MAMA

La progresión de la enfermedad tumoral, permite clasificarla en diversos estados, basados en el estudio de tres parámetros significativos, tales como tamaño del tumor, infiltración a ganglios linfáticos regionales, y metástasis a distancia (clasificación TNM). En base a estos parámetros, se han definido los siguientes estados (63):

1.2.2.a. Tamaño del tumor

- T0:** Tumor "in situ".
- T1:** Tumor con diámetro igual o menor a 2 cm.
- T2:** Tumor con diámetro entre 2 y 5 cm.
- T3:** Tumor con diámetro mayor de 5 cm.
- T4:** Tumor de cualquier diámetro con infiltración de la pared torácica o de la piel.

1.2.2.b. Afectación ganglionar

- N0:** Ganglios axilares homolaterales no afectados.
- N1:** Ganglios axilares afectados.
- N2:** Ganglios axilares afectados, fijos unos a otros o a otras estructuras.
- N3:** Ganglios supraclaviculares o infraclaviculares homolaterales afectados, así como los de la arteria mamaria interna.

1.2.2.c. Metástasis a distancia

- M0:** Ausencia de metástasis objetivables radiológicamente.
- M1:** Presencia de metástasis.

1.2.2.d. Clasificación por Estadíos Clínicos

Estadío I:	T1	N0	M0
Estadío IIA:	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadío IIB:	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadío IIIA:	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Estadío IIIB:	T4	N0-N3	M0
	T1-T4	N3	M0
Estadío IV:	T1-T4	N0-N3	M1

1.3. FACTORES PRONOSTICOS EN EL CANCER DE MAMA

Aproximadamente un 50% de las pacientes con cáncer de mama operable se mantendrán en remisión durante un largo periodo de tiempo, o incluso se curarán. Una adecuada diferenciación del grupo de mejor pronóstico de aquel otro destinado a recurrir, es importante de cara a identificar aquellas pacientes que deben someterse a un tratamiento más agresivo y separar a aquellas otras que no precisan terapia adicional (50).

Al objeto de intentar predecir con una cierta probabilidad qué pacientes tendrán una buena o mala evolución, se ha realizado un enorme esfuerzo investigador en los últimos años, al objeto de poder precisar qué factores son los que influyen en la evolución de esta enfermedad. Entre estos factores de riesgo, los que merecen una mayor consideración son los siguientes:

1.3.1. TAMAÑO DEL TUMOR

El tamaño del tumor está fuertemente correlacionado con la supervivencia. Así, pacientes con tumores de menos de 1 cm de diámetro presentan un 98% de probabilidad de supervivencia a los cinco años. Por el contrario, las pacientes con tumores de más de 5 cm de diámetro presentan una probabilidad de supervivencia del 82% (64). El efecto del tamaño tumoral quizá quede aún más patente si se hace un seguimiento de las pacientes por un periodo de tiempo más prolongado. Así, tras 20 años de seguimiento, ha podido demostrarse que las pacientes con tumores de menos de 1 cm presentan una probabilidad de supervivencia sin recaída del 88%. Por contra, esta cifra se reduce considerablemente con diámetros entre

1 y 2 cm. (65).

En general, puede decirse que el tamaño de un tumor predice el riesgo de su diseminación. No obstante, con bastante frecuencia se observan excepciones a esa regla. Así, es relativamente común encontrar en clínica tumores pequeños con diseminación linfática, o tumores grandes sin afectación ganglionar. Obviamente, otros factores además del tamaño del tumor, contribuyen al potencial metastásico del cáncer, aunque puede admitirse que aquellas pacientes con un tumor de menos de 1 cm de diámetro, y cuyos ganglios son negativos, tienen un excelente pronóstico a largo plazo.

1.3.2. AFECTACION GANGLIONAR

En ausencia de metástasis a distancia, la afectación ganglionar constituye el principal factor pronóstico en el cáncer de mama (66,67). Es por ello que la mayoría de las investigaciones sobre factores pronósticos en cáncer de mama han sido realizadas en el subgrupo de pacientes sin afectación ganglionar.

Tal y como se apuntó antes, existe una cierta correlación entre tamaño tumoral y afectación ganglionar. Ambos parámetros, más la presencia o no de metástasis a distancia, permiten clasificar al tumor en los diversos estadios clínicos antes comentados. Resulta evidente que, cuanto más precoz sea el estadio, mejor será el pronóstico de la enfermedad. En nuestra Comunidad, aproximadamente la mitad de los cánceres de mama se encuentran, en el momento del diagnóstico, en estadio II (51), lo cual evidencia la necesidad de realizar campañas de mentalización ciudadana al objeto de intentar acceder al diagnóstico de esta

enfermedad en etapas más tempranas, lo que sin duda redundará en una mayor probabilidad de supervivencia de la paciente.

1.3.3. GRADO HISTOLOGICO

El grado histológico refleja el estado de diferenciación del tumor. Diversos estudios indican que los tumores con mayor grado de diferenciación presentan un mejor pronóstico que aquellos más indiferenciados (68). En general, existe cierta unanimidad en admitir que los tumores con un alto grado histológico (grado 3), presentan un comportamiento más agresivo que aquellos más diferenciados (grados 1 y 2). Sin embargo, el principal problema que surge al determinar el grado de diferenciación tumoral es la reproducibilidad del diagnóstico. En un estudio hecho al respecto, seis patólogos distintos coincidieron en su criterio en tan sólo el 15% de las muestras estudiadas (69), lo que podría explicar algunas de las contradicciones encontradas en la literatura.

1.3.4. INDICE PROLIFERATIVO Y PLOIDIA

La citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de gran aplicabilidad en Oncología, razón por la que cada vez son más los laboratorios de Anatomía Patológica que la están incorporando. Aunque esta técnica posee numerosas aplicaciones, en el ámbito concreto de la Oncología quizá sea el estudio del contenido de ADN, el parámetro más comunmente utilizado.

Entre los tumores mamarios, algo más de la mitad presentan grados diversos de

aneuploidías, con índices de ADN superiores al normal (70). Asimismo, la aneuploidía es más frecuente en las pacientes con afectación ganglionar. En pacientes sin afectación ganglionar, la existencia de aneuploidía está correlacionada con un menor intervalo libre de enfermedad (71). La aneuploidía además se ha asociado con altos grados histológicos y con ausencia de expresión de receptores estrógenicos (72), todo lo cual se traducirá en una más precoz afectación ganglionar y en un peor pronóstico.

El estudio del ADN también permite valorar las células en fase S, cuyo porcentaje tiene valor pronóstico, al asociarse a un menor intervalo libre de enfermedad y a una menor supervivencia (71). Aneuploidía y fase S no son parámetros independientes, ya que los tumores aeuroides suelen presentar también altos valores de fase S (70).

1.3.5. RECEPTORES DE ESTROGENOS Y DE PROGESTERONA

Desde hace mucho tiempo se sabe que la mama es un órgano hormonodependiente, es decir, depende para su desarrollo de diversas hormonas, especialmente de las hormonas sexuales femeninas. No obstante, no fue hasta 1977 cuando pudo demostrarse que la determinación de receptores de estrógeno (RE) en muestras de cáncer de mama, poseía una indudable utilidad pronóstica (73).

El RE es una proteína nuclear de 65 KDa que, en su forma nativa, se encuentra formando complejos con diversas proteínas del tipo "heat shock". Este receptor nativo puede ser fácilmente detectado mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, pues presenta un coeficiente de sedimentación de 8S. Tras su unión a la hormona, el receptor se libera de

las proteínas heat shock y presenta un coeficiente de sedimentación de 4S. A continuación, sufre un proceso de dimerización, adquiriendo un coeficiente de sedimentación de 5S. Estos dímeros son ya capaces de interactuar, a través de regiones de la proteína ricas en cisteína y estabilizadas por zinc (zinc fingers), con secuencias específicas de ADN conocidas como "Elementos de Respuesta a los Estrógenos" (ERE), localizados en la vecindad de diversos genes sujetos a regulación estrogénica. Tras la unión del complejo dimérico hormona-receptor al ERE, se produce la síntesis de ARN mensajeros, lo que se traducirá posteriormente en la síntesis de proteínas. El efecto que estas proteínas desarrollan sobre el funcionalismo celular constituye, en última instancia, la respuesta de la célula a la hormona (74). Una de estas proteínas inducidas por el estradiol, y que merece ser comentada, es el Receptor de Progesterona (RP) (75), que está formado por dos proteínas de 80 y 110 KDa, y que tras su unión a la hormona actúa sobre el ADN de la misma forma que lo hace el RE.

La presencia de RE en un tumor de mama tiene un interés doble; por una parte refleja la dependencia hormonal del crecimiento del tumor que, aunque puede no ser exclusiva del estradiol, sí es evidente que esta hormona favorece su desarrollo. Ello explicaría porqué un alto porcentaje de tumores RE positivos (aproximadamente un 70%), responden al bloqueo terapéutico con antiestrógenos, en proporción directa al nivel del receptor y a la simultánea presencia de RP. Por otra parte, aunque aún hay controversia en este punto, parece que la presencia de RE anuncia una recidiva, si existe, más tardía (76).

Respecto a la asociación de los receptores hormonales con otras variables de interés pronóstico, se ha podido demostrar que la presencia de RE y RP en un tumor dado, se asocia con un menor grado histológico (77), lo que se traduce clínicamente en un mejor

pronóstico.

1.3.6. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

Los factores de crecimiento son moléculas que están involucradas en el crecimiento de diversos tejidos. En el caso concreto de la mama, quizás el de mayor interés sea el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), que es un polipéptido de 53 aminoácidos, y cuya síntesis está regulada por el estradiol, tanto en tejido mamario sano como en líneas celulares de cáncer de mama hormono-dependiente. Por contra, en líneas celulares hormono-independientes, se expresa de forma constitutiva.

Los eventos celulares que tienen lugar debido a la estimulación del EGF, son mediados por su receptor de membrana (EGFR). El EGFR es una glicoproteína de 170 KDa que posee un dominio extracelular, capaz de reconocer, no sólo al EGF, sino también a otro factor de crecimiento denominado Factor de Crecimiento Transformante alfa ($TGF\alpha$), un pequeño dominio transmembranal y un dominio intracelular que tiene actividad tirosina-kinasa. Este dominio intracelular presenta una alta homología de secuencia con el mismo dominio del producto del proto-oncogén HER-2/neu, lo que los hace formar parte de una misma familia comentada en profundidad anteriormente.

El EGF estimula la proliferación de células de cáncer de mama *in vitro* (78). Por otra parte, se han descrito incrementos en la expresión del EGFR en una amplia variedad de tumores, entre ellos el de mama, y ello se ha asociado a una mayor agresividad en su comportamiento (79). Además, hay una clara correlación negativa entre el contenido de

EGFR y el de receptores para hormonas sexuales (RE, RP), siendo el porcentaje de tumores EGFR-positivos más alto en los tumores RE o RP-negativos que en los RE o RP-positivos (~ 50-60% vs. 30%) (80). Ya fue previamente comentado el efecto positivo del RE y RP en el pronóstico del tumor; por ello, no debe extrañar que un marcador con efectos negativos claros, tal como el EGFR, sea expresado con más frecuencia por aquellos tumores carentes de RE o de RP.

Respecto a su asociación con otros marcadores además de los receptores esteroideos, diversos estudios han demostrado que los tumores EGFR positivos presentan una mayor incidencia de infiltración linfática (80), y se asocian a un alto grado histológico (81), parámetros ambos que son de por sí indicativos de mal pronóstico.

Tomando en consideración todos los hallazgos antes mencionados, puede deducirse que el EGFR, por sí mismo, es un marcador de mal pronóstico en el cáncer de mama, circunstancia que se ve agravada por el hecho de que suele además asociarse con otros marcadores del mismo signo.

1.3.7. CATEPSINA D

La catepsina D (cat-D) es una aspártico proteasa de localización lisosómica y distribución generalizada en los tejidos de organismo, tanto normales como neoplásicos. Por su acción proteolítica, tiene capacidad para degradar, en medio ácido, a la matriz extracelular, membrana basal y proteoglicanos, propiedad esta que podría contribuir a incrementar el potencial metastásico de las células tumorales. Además, la cat-D posee

actividad mitogénica (82).

En líneas celulares de cáncer de mama hormonodependientes, la expresión de cat-D es inducida por los estrógenos. Por el contrario, en aquellas líneas que no expresan RE, la cat-D se produce de forma constitutiva. Por ello, no existe una adecuada correlación entre el contenido de RE y la concentración de cat-D en tumores de mama (82).

La determinación de este enzima a nivel citosólico en neoplasias mamarias tiene interés pronóstico, porque niveles elevados de la misma se corresponden con una mayor afectación ganglionar, mayor frecuencia de aneuploidía, periodos más cortos de intervalo libre de enfermedad, y menor supervivencia (83,84).

Debido a la asociación observada entre niveles de cat-D e infiltración linfática, y dadas las propiedades biológicas de esta enzima, pudiera deducirse que la misma facilitaría la diseminación linfática del tumor, lo cual se traduciría en un pronóstico más sombrío.

1.3.8. LA pS2

Esta proteína se descubrió estudiando la expresión de genes inducibles por estrógenos en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (85), y su función por ahora se desconoce. La transcripción del pS2 es controlada directamente por estrógenos, y ocurre en un periodo muy corto de tiempo. La proteína resultante es un polipeptido de 60 aminoácidos, aunque su mRNA codifica para 84 puesto que incluye un péptido señal. Su expresión no es exclusiva del tejido mamario sino que acontece también en otros tejidos, tales como mucosa gástrica,

aparentemente sin dependencia del estrógeno.

La elevada expresión y síntesis del pS2 no requiere amplificación del gen (al menos en líneas celulares tumorales comparadas con células normales en cultivo). Pese a su dependencia hormonal, pS2, y cat-D no guardan relación cuantitativa.

En relación con su posible valor pronóstico en cáncer de mama, resulta evidente que los tumores pS2 positivos casi siempre son además RE positivos. Recientemente, ha podido demostrarse que las pacientes de cáncer de mama con tumores RE y pS2 positivos, tienen un mejor pronóstico a los cinco años, que aquellas pacientes con tumores sólo RE positivos o aquellas con tumores RE negativos. Asimismo, las pacientes con tumores pS2 positivos manifiestan una mejor respuesta a tratamiento hormonal (86). Lo mismo ocurre, en cuanto a supervivencia, si se consideran subgrupos de pacientes pS2 positivo o negativo, con o sin afectación ganglionar.

Por último, la capacidad de producción de pS2 permite predecir con una cierta probabilidad, la respuesta de tumores avanzados a la terapia hormonal con tamoxifeno.

1.3.9. GENES SUPRESORES (ANTI-ONCOGENES)

En contraste con los proto-oncogenes, relacionados siempre con la estimulación de los mecanismos implicados en el crecimiento y diferenciación celular, los genes supresores codifican proteínas que actúan inhibiendo la proliferación celular.

El primer gen supresor de tumor que fue bien caracterizado fue el gen del retinoblastoma (87). Mediante el estudio de familias que padecían esta enfermedad, Knudson pudo demostrar que la mutación en este gen le privaba de su efecto supresor de la proliferación celular, dando origen a una neoplasia (retinoblastoma).

De los genes supresores, el más estudiado en el cáncer de mama es el de la p53. En el ser humano, este gen está localizado en el cromosoma 17 y codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos.

Diversos estudios revelaron que existía una correlación positiva entre los niveles intracelulares de la proteína p53 y el estado de transformación celular (88); sin embargo, la interpretación de estos resultados cambió radicalmente cuando se observó que el gen original estaba mutado, y que el tipo salvaje de p53, en contraste con el mutado, no era transformante.

En estudios posteriores se ha observado que el tipo salvaje de la p53 no sólo inhibe la transformación por oncogenes (ras y E1a) de líneas celulares de roedores, sino que, lo que es más importante, inhibe el crecimiento celular en algunos carcinomas humanos, por el contrario, su forma mutada no funcional se encuentra en niveles elevados en tejidos malignos de mama, colon, pulmón y esófago (89). Por todo ello, esta proteína comenzó a ser considerada como una anti-oncoproteína o proteína supresora de la tumorigénesis.

La p53 se encuentra generalmente mutada en la fase temprana del cáncer de mama, sugiriendo que podría ser uno de los primeros eventos genéticos que ocurren en la progresión

del tumor (90). Altos niveles de la p53 mutada se han asociado a un más alto grado histológico, y a un más avanzado estadio clínico, lo que convierte a esta proteína en un claro factor pronóstico de agresividad tumoral (90).

1.3.10 ONCOGENES

Mediante experimentación animal se ha demostrado que los proto-oncogenes juegan un papel muy importante en la regulación de los procesos moleculares que tienen lugar durante la diferenciación y proliferación celular. Así, la expresión anómala de algunos proto-oncogenes, o la expresión patológica de su correspondiente oncogén, pueden perturbar la diferenciación celular y las propiedades de crecimiento de muchos tipos diferentes de líneas celulares.

Entre los oncogenes destacados como factores de interés pronóstico en el cáncer de mama, pueden citarse los oncogenes jun, fos y myc, la familia de los oncogenes ras y el HER-2/neu, del que ya se ha hablado previamente, pero sobre el que insistiremos más adelante.

1.3.10.a. Oncogenes jun y fos

En el mecanismo de acción de receptores de membrana tales como el EGFR, y los productos de los oncogenes con actividad tirosin-kinasa, interviene la protein-kinasa C (PKC), cuya activación estimula la transcripción del proto-oncogén jun, que codifica para el factor transcripcional AP-1 (91). La proteína AP-1 a su vez estimula la transcripción de genes que

incluyen en su región reguladora la secuencia consenso TGA₃CTCA, que recibe el nombre de TRE ("Elemento de Respuesta Transcripcional").

La interacción entre AP-1/TRE es potenciada por la unión de la AP-1 al producto del proto-oncogén fos, con formación de complejos AP-1/fos y la aparición de leucinas "en cremallera". Uno de los genes inducibles por estos factores de transcripción con esta característica es la colagenasa y por tanto pudiera ser que la actuación de jun y fos forme parte de los mecanismos básicos de inducción de un fenotipo agresivo en las células neoplásicas de mama.

1.3.10.b. Oncogén myc

El oncogén c-myc codifica para proteínas nucleares de unión al ADN cuya expresión es estimulada por estrógenos y regulada por tamoxifen en cáncer de mama humano hormonodependiente "in vitro" (92). Este oncogén se encuentra amplificado en un 20% de los tumores mamarios. Aunque actualmente su valor pronóstico en mama se discute, debido principalmente a que los estudios realizados sobre su amplificación se han llevado a cabo en series cortas de pacientes, se tiende a estudiar su amplificación conjuntamente con la del HER-2/neu con el que parece mantener una fuerte correlación negativa.

1.3.10.c. Oncogén ras

La familia de proto-oncogenes ras está constituida por tres genes: H-ras, K-ras y N-ras, que poseen un alto grado de homología estructural. Codifican proteínas de 21 kDa con

actividad GTPasa que juegan un importante papel como mediadores en la transducción al interior de la célula de señales externas que regulan el comportamiento celular, en particular su crecimiento, división y diferenciación (93).

La activación de los miembros de la familia ras se produce por mutaciones puntuales que se producen en el ADN genómico y que se concentran en tres codones: el 12 y el 13, localizados en el exón 1, y el 61 en el exón 2. Los cambios de cualquiera de las dos primeras bases de estos codones provocan la sustitución de un aminoácido por otro, resultando una proteína con distinta afinidad por el GTP (caso de sustitución en el exón 1) o con distinta actividad GTPasa (caso de sustitución en el exón 2).

Se ha descrito que la p21 del H-ras se encuentra incrementada de 4-15 veces en células de cáncer de mama, comparadas con las del tejido normal adyacente. A la vez, en estudios con líneas celulares de mama estrógeno-dependientes (MCF-7), transfectadas con v-H-ras que expresan una p21 mutante, se ha observado que tienen un tiempo menor de duplicación, son resistentes al efecto inhibitor del crecimiento de los antiestrógenos, y generan tumores en el ratón desnudo independientemente del aporte exógeno de estrógenos. También existe en esas líneas celulares una secreción constitutiva de los factores de crecimiento, cuya producción es estimulada normalmente por los estrógenos, favoreciendo así la hipótesis de que v-H-ras hace que estas células pasen a un estadio estrógeno independiente (94). Así mismo, se ha asociado la pérdida de un alelo H-ras con el desarrollo de metástasis.

1.3.10.d. El oncogén HER-2/neu

El proto-oncogén HER-2/neu se encuentra amplificado de 2 a 30 veces en un 10 a 30% de los tumores de mama (95). La asociación entre la amplificación de este gen y un mal pronóstico en el cáncer de mama es un hecho bastante aceptado, aunque cuestionado en algunos trabajos. Así de los 33 estudios que han sido publicados hasta octubre de 1993 (96) sobre la relación entre amplificación y/o sobreexpresión del HER-2/neu y el intervalo libre de enfermedad (ILE) o supervivencia en el cáncer de mama, la gran mayoría relatan la existencia de una correlación negativa (18,19,95-109), mientras unos pocos no observan esta correlación (110-112). Como supuesto origen de estas discrepancias se han sugerido: diferencias en la metodología utilizada, series demasiado pequeñas y un seguimiento clínico desigual.

Según la literatura, se ha encontrado también correlación entre la amplificación y/o sobreexpresión del HER-2/neu y algún otro parámetro establecido de mal pronóstico, entre los que se incluyen ER negativo (113), afectación de los ganglios linfáticos axilares (113-116), tamaño del tumor (116), grado histológico pobre (116,117), aneuploidía (115), alta actividad mitótica (118), presencia de metástasis (119) y juventud de las pacientes (120)

Sin duda una de las asociaciones que más se han estudiado es la del estatus del HER-2/neu con la afectación ganglionar. Dado que las pacientes con nódulos negativos (N-), si bien tienen un pronóstico más favorable que aquellas con nódulos positivos (N+), muestran un porcentaje del 20-30% de recidiva, la posibilidad de que el HER-2/neu solo, o en combinación con otros factores pronósticos, pueda identificar a aquellas pacientes N- con un

mayor riesgo de recidiva ha motivado a un buen número de autores a estudiar este subgrupo.

De lo publicado actualmente, puede concluirse que, aunque existe cierta contradicción en los resultados obtenidos por los diferentes autores, la opinión más extendida es que la sobreexpresión del HER-2/neu es indicativa de mal pronóstico, tanto en tumores sin afectación ganglionar como en aquellos con afectación, cuando el número de casos estudiados es el adecuado. Lo cierto es que muy pocos estudios cumplen estos requerimientos, lo que hace difícil realizar una estadística fiable (96)

En el subgrupo de pacientes con afectación ganglionar, existe una mayor unanimidad en la literatura, pues la mayoría de los trabajos encuentran una correlación directa entre la sobreexpresión del HER-2/neu y un menor intervalo libre de enfermedad y de supervivencia (95,108). Además, se ha sugerido que en este subgrupo, la activación del HER-2/neu puede ser útil como marcador de sensibilidad a quimioterapia adyuvante (121).

La relación negativa sugerida por algunos autores, entre la activación del HER-2/neu y la expresión de receptores de hormonas esteroideas (113), y el hecho de que recientemente se haya descrito la capacidad del 17- β -estradiol para mimetizar la actividad de los ligandos de la p185^{HER-2/neu} (122), abre nuevas perspectivas de trabajo con este protooncogén en cánceres hormono-dependientes, que complementarían la que ya se ha iniciado con la caracterización de sus posibles ligandos y anticuerpos que bloquean este receptor.

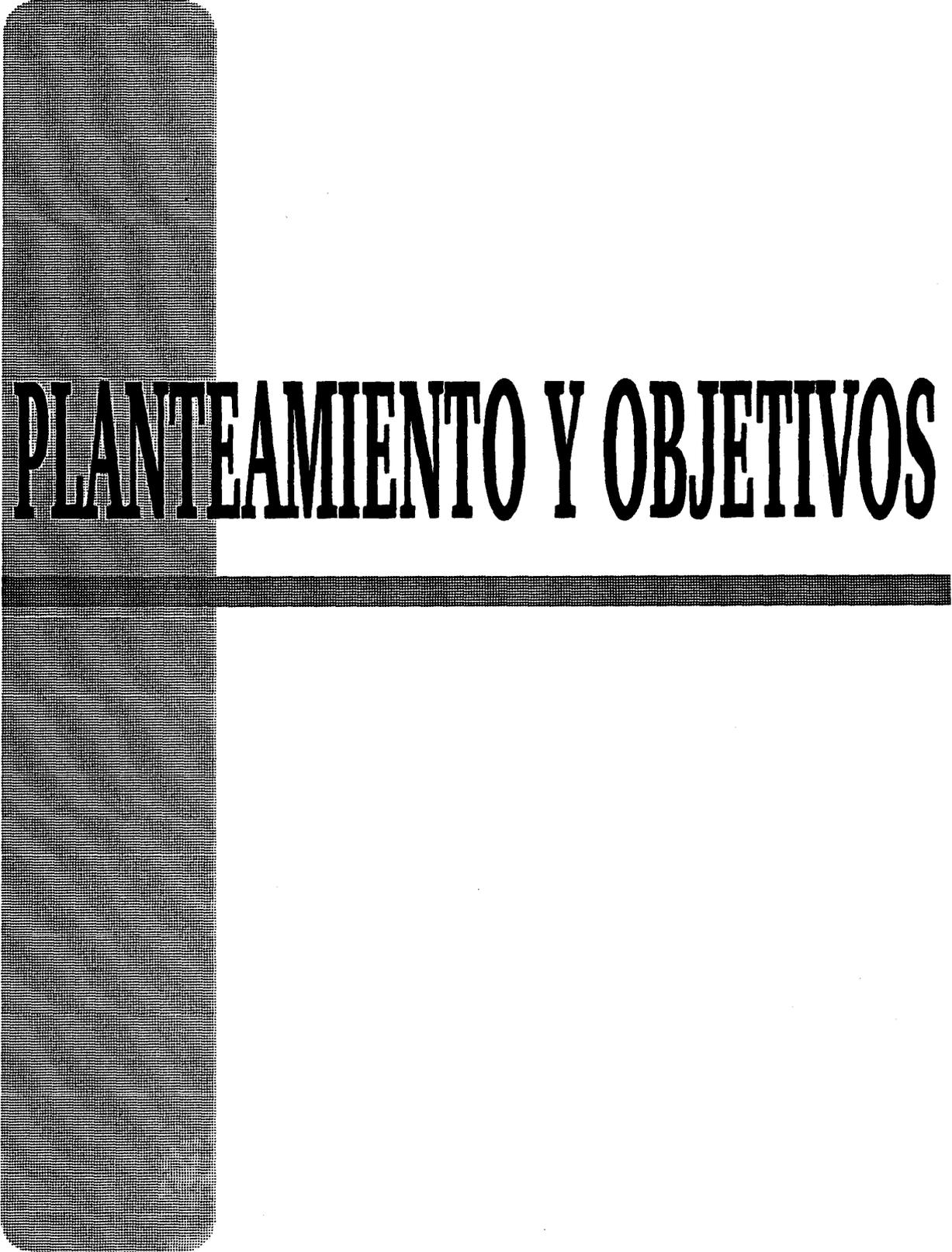
.....

De todo lo anteriormente comentado, pueden deducirse algunas conclusiones importantes. En primer lugar, el estudio de los factores pronósticos antes aludidos sirve para diferenciar aquellos cánceres de mama que tienen una alta probabilidad de presentar una evolución más agresiva, de aquellos otros que posiblemente tendrán una evolución más benigna. Ello permitirá instaurar terapias más o menos agresivas en función de estos resultados. En segundo lugar, el estudio de las bases moleculares que subyacen en la tumorigénesis, permitirá, no sólo, la incorporación de nuevos marcadores pronósticos, sino la incorporación de nuevos fármacos, dirigidos a neutralizar aquellos mecanismos implicados en la progresión tumoral. Un ejemplo de ello puede ser el tamoxifén que, merced a su efecto bloqueante de los receptores estrogénicos, tiene un indudable efecto terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama, especialmente en aquellas pacientes con tumores RE positivo. Una posibilidad futura, la constituyen los fármacos inhibidores de la farnesiltransferasa, que, a priori, podrán ser de gran utilidad en aquellos tumores en los que hay mutación del oncogén ras, tales como el cáncer de páncreas, el de colon, o incluso el de mama.

Y ya para terminar la exposición de los factores pronósticos, y a modo de resumen, se sumariza en la siguiente Tabla el efecto previsible que los mismos desempeñan sobre la evolución del tumor:

**RIESGO DE RECURRENCIA DEL CANCER DE MAMA, EN FUNCION DE LOS
DIFERENTES FACTORES PRONOSTICOS**

FACTOR	BAJO RIESGO	ALTO RIESGO
TAMAÑO DEL TUMOR	≤1cm	> 2 cm
AFECTACION GANGLIONAR	-	+
GRADO HISTOLOGICO	1	2-3
PLOIDIA	DIPLOIDE	ANEUPLOIDE
FASE S	BAJA	ALTA
RE	POSITIVO	NEGATIVO
RP	POSITIVO	NEGATIVO
EGFR	BAJO	ALTO
CAT-D	BAJO	ALTO
PS2	ALTO	BAJO
P53	BAJO	ALTO
HER-2	BAJO	ALTO



PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

En relación con el estudio del oncogén HER-2/neu, nos propusimos los siguientes objetivos para este trabajo:

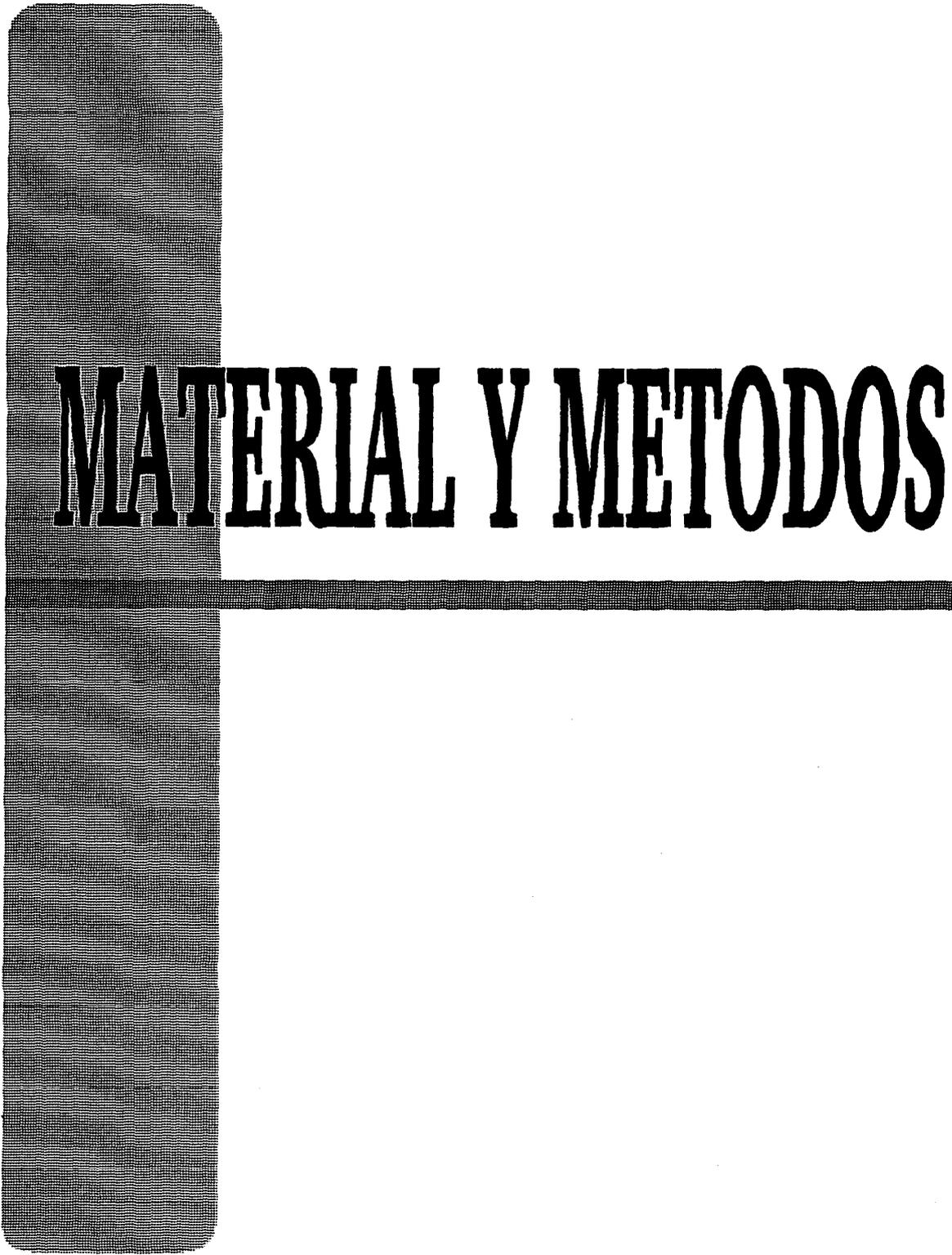
1. Desarrollar la metodología necesaria para el conocimiento del estado de amplificación del oncogén HER-2/neu en cáncer de mama, basándonos en los métodos de PCR cuantitativa, y que cumpliera los requisitos de:
 - a) bajo consumo de muestra tumoral;
 - b) procedimientos no radiactivos;
 - c) fiabilidad, reproducibilidad, precisión y rapidez de ejecución compatibles con la de un buen análisis de uso frecuente, aplicable al estudio de series amplias de pacientes.
2. Conocer la relación cuantitativa en cáncer de mama entre la amplificación génica de HER-2/neu y su grado de expresión, mediante el estudio de los niveles de p185^{HER-2/neu} a través de un procedimiento tipo ELISA.
3. Establecer un punto de corte seguro para determinar que en un espécimen concreto el oncogén HER-2/neu se halla amplificado y/o está sobreexpresando su producto, la p185^{HER-2/neu}, basándonos en la comparación de ambos parámetros en una serie grande de tumores.
4. Conocer el estado de fosforilación de la p185^{HER-2/neu} presente en especímenes de cáncer de mama, y estudiar su correlación con la abundancia de dicha proteína.

5. Establecer la correlación entre la activación del oncogén HER-2/neu y los parámetros clínico-patológicos del tumor.

6. Conocer el estado de los tumores en cuanto a contenido de los receptores de estrógenos y de progesterona, y su correlación con los parámetros clínico patológicos del tumor.

7. Establecer la correlación entre amplificación del oncogén HER-2/neu y la presencia de receptor de estrógenos y de receptor de progesterona en el tumor.

8. Como objetivo a más largo plazo, pretenderemos además correlacionar los parámetros objeto de este estudio con la evolución de las pacientes.



MATERIAL Y METODOS

3.1. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.1.1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Se estudiaron prospectivamente y de forma consecutiva 415 pacientes afectas de cáncer de mama, procedentes de los Hospitales de la Red del INSALUD de la provincia de Las Palmas de Gran Canaria.

Las pacientes fueron intervenidas quirúrgicamente, como primer paso del tratamiento, realizándoseles una mastectomía radical modificada o cirugía conservadora, previa confirmación histológica de su cáncer de mama. La atención y seguimiento de las pacientes fue realizada por los Servicios de Oncología, Radioterapia, y Cirugía General de los Hospitales.

3.1.1.a. Protocolo de recogida de datos

En el protocolo de este estudio se consideraron aquellas pacientes con una historia clínica completa, en la que figuraran, entre otros, los siguientes parámetros: edad de la paciente en el momento del diagnóstico, estado menopáusico, tamaño del tumor, tipo histológico del mismo, número de ganglios axilares extirpados así como número de los afectados por la diseminación tumoral, tiempo en meses de la recidiva (si la hubiese) y su localización, aparición de metástasis, localización de las mismas, y muerte.

Una vez realizado el tratamiento, las pacientes fueron sometidas a revisiones periódicas cada cuatro meses durante los dos primeros años, y cada seis meses durante los siguientes.

3.1.1.b. Obtención y almacenamiento de las muestras

Tras la palpación del tumor, las pacientes fueron remitidas al Servicio de Radiodiagnóstico donde se les realizó una mamografía y/o ecografía, al objeto de valorar la lesión sospechosa. En el caso de que los resultados de estas exploraciones así lo indicasen, las pacientes fueron sometidas a punción-aspiración con aguja fina de la lesión tumoral para su diagnóstico citológico. En el caso de que éste fuera positivo, las pacientes fueron remitidas posteriormente al servicio de Cirugía General para intervención quirúrgica, que consistió en mastectomía radical o cirugía conservadora, dependiendo del tamaño de tumor. En aquellos carcinomas de mama localmente avanzados y/o con metástasis, el tratamiento quirúrgico fue excluído.

Los especímenes tumorales obtenidos tras la cirugía, fueron enviados inmediatamente al respectivo Servicio de Anatomía Patológica de cada Hospital. Tras la identificación macroscópica de la tumoración, las piezas fueron congeladas en nitrógeno líquido, y una parte de cada pieza fue enviada a la Unidad de Tumores Sólidos del Departamento de Endocrinología Celular y Molecular de esta Universidad, donde fueron almacenadas a -70 °C y fueron incluídas posteriormente en el protocolo de procesamiento de tumores.

3.1.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Desde principio de los años 80 en nuestro laboratorio se ha establecido una Unidad de Tumores Sólidos, cuyo objetivo principal era establecer un Banco de Tumores bien definido y clasificado para un estudio prospectivo de los mismos.

Con este fin, el procesamiento de la muestra siempre ha intentado seguir un protocolo que facilite el máximo aprovechamiento de la misma para la determinación de los distintos marcadores que se propongan de posible utilidad en el transcurso de los años.

De esta forma la filosofía actual consiste en almacenar, siempre que sea posible, parte de la muestra tumoral para determinaciones que puedan plantearse en un futuro, y de la parte que se procesa, obtener todas las fracciones celulares en las que se ensayan los marcadores que actualmente tenemos a nuestra disposición. En la Figura 4 se detalla este esquema.

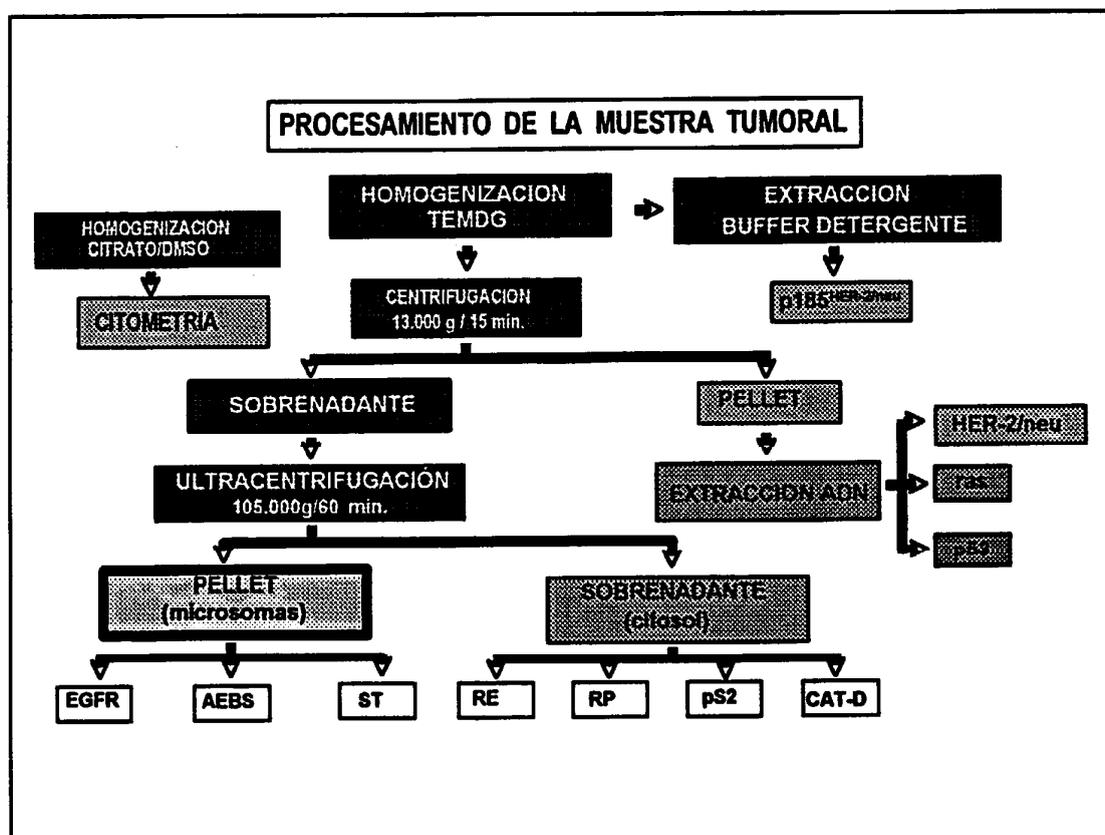


FIGURA 4. Esquema de las determinaciones de los distintos marcadores tumorales realizadas en la actualidad.

3.1.2.a. Material

Homogenizador Polytron PT 3000

Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5

Ultracentrífuga Beckmann L7-65

Rotor de ángulo fijo Sorvall SE-12

Rotor de ángulo fijo Beckmann 70 ITI

3.1.2.b. Soluciones

- Tampón de tumores

Tris-HCl pH 7.4 (10 mM)

EDTA Na₂ (1.5 mM)

Molibdato Sódico (20 mM)

Ortovanadato Sódico (1 mM)

Aprotinina (100 µg/ml)

Monioglicerol (0.1%, vol/vol)

Glicerol (10%, vol/vol)

Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM)

3.1.2.c. Protocolo

Se utiliza una porción de aproximadamente 100-200 mg del tejido almacenado a -70 °C, libre de grasa y troceado, para su homogenización en 20 volúmenes de tampón de tumores. Otra pequeña porción de tejido, aproximadamente unos 50 mg, se utiliza para la determinación del índice de ploidía y porcentaje de células en fase S mediante Citometría de Flujo.

Una vez obtenido el homogeneizado, se toman alícuotas de éste para la determinación de la p53 y de lap185^{HER-2/neu}. El resto del homogeneizado es centrifugado a 1.000 g durante

15 min. para obtener la fracción nuclear, que se utilizará para obtener el ADN. El sobrenadante vuelve a centrifugarse a 105.000 g durante 60 min., con lo que se obtienen la fracción citosólica (sobrenadante) y microsomal (sedimento).

En la fracción citosólica se llevan a cabo las determinaciones de los niveles de receptor de estrógeno (RE) y de progesterona (RP), pS2, y Catepsina-D, mientras que la fracción microsomal se emplea principalmente para la estimación semicuantitativa de la expresión de la oncoproteína p185^{HER-2/neu}, así como del grado de fosforilación de la misma mediante técnicas de Western Blot.

Todo este proceso se resume en la Figura 5.

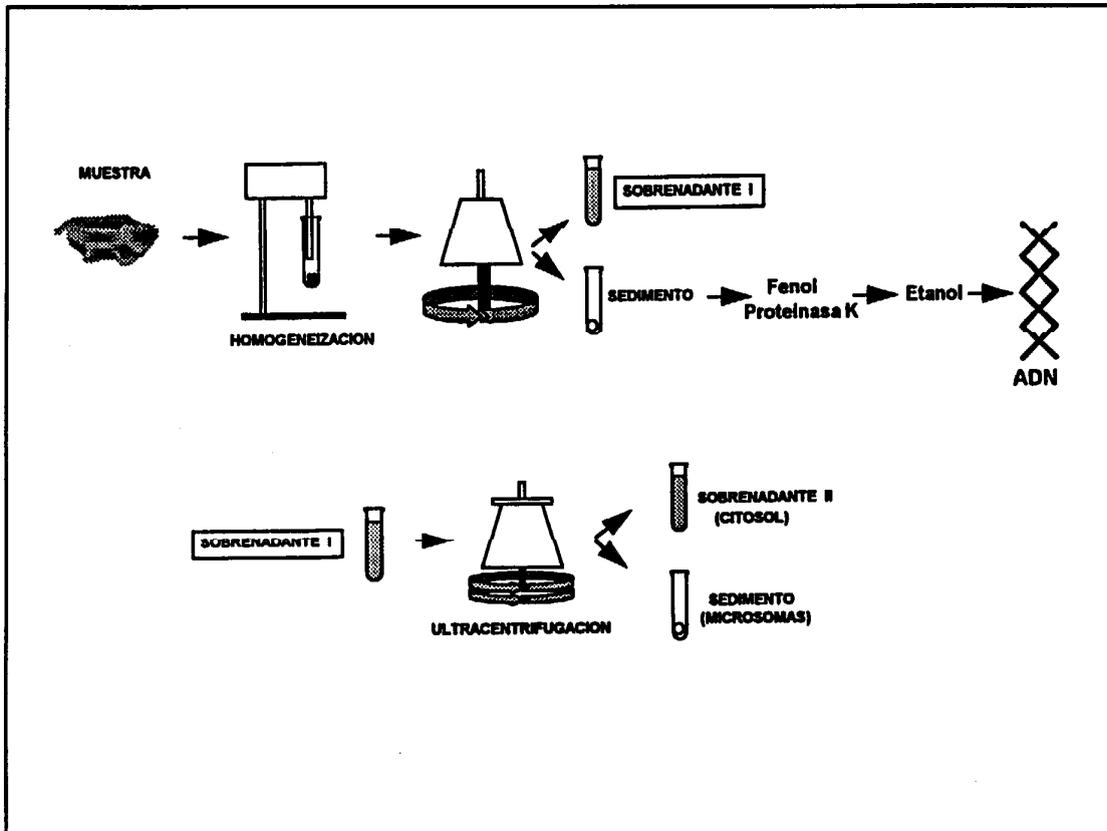


FIGURA 5. Esquema de obtención de las subfracciones celulares realizado en el procesamiento de tumores.

3.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE RE Y RP

3.2.1. INTRODUCCION

La estimación cuantitativa de los receptores de estrógenos y progesterona se realizó por el método de intercambio con hormona marcada. Este consiste en la incubación de la muestra (habitualmente citosol) con ligando marcado radiactivamente, en ausencia o en

presencia de un exceso de competidor no marcado, que generalmente es la misma hormona. La hormona no ligada se elimina con carbón-dextrano y la que permanece unida se cuantifica mediante la valoración de las radiaciones emitidas por el radioisótopo.

La resta de las cuentas totales (obtenidas tras la incubación con hormona marcada) de las inespecíficas (obtenidas tras la incubación con hormona marcada en presencia de un exceso de hormona fría), nos dará las cuentas específicas, correspondientes a la unión del receptor con su ligando.

En el caso del RE se plantea el problema de la posible contaminación del citosol con la Globulina Ligadora de Hormonas Sexuales (SHBG), que, al poseer afinidad por el estradiol, podría interferir en la cuantificación total del RE, en el caso de utilizar esta hormona fría como competidor, ya que desplazaría al estradiol marcado unido a ella, y por tanto, esta fijación no se manifestaría como unión inespecífica. Ej:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Citosol} + \text{E}^* & = & \text{RE-E}^* + \text{Pi-E}^* + \text{SHBG-E}^*: \text{Fijación Total} \\
 \\
 \text{Citosol} + \text{E}^* + \text{E} & = & \text{RE-E} + \text{Pi-E}^* + \text{SHBG-E}: \text{Fijación Inespecífica} \\
 \\
 & & \text{-----} \\
 \text{Resta} & = & \text{ER-E}^* + \text{SHBG-E}^*: \text{Fijación Específicas}
 \end{array}$$

Pi: Proteínas inespecíficas

Por este motivo, se utiliza un análogo del estradiol, el Dietilestilbestrol (DES), que carece de afinidad por la SHBG. Así:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Citosol} + \text{E}^* & = & \text{RE-E}^* + \text{Pi-E}^* + \text{SHBG-E}^*: \text{Fijación Total} \\
 \\
 \text{Citosol} + \text{E}^* + \text{DES} & = & \text{RE-DES} + \text{Pi-E}^* + \text{SHBG-E}^*: \text{Fij. Inespecífica} \\
 \\
 \text{-----} & & \\
 \text{Resta} & = & \text{RE-E}^*: \text{Fij. Específica}
 \end{array}$$

3.2.2. PROCEDIMIENTO

3.2.2.a. Material y reactivos

Contador de centelleo líquido (β) Packard Tri-Carb 2500 TR

[2,4,6,7- ^3H] 17- β -Estradiol, NEN (New England Nuclear)

DES (Dietilestilbestrol), Sigma

^3H -R5020 (Promegestona), NEN (New England Nuclear)

R5020 (Promegestona), NEN(New England Nuclear)

Carbón activado, Sigma

Dextrano, Sigma

Líquido de centelleo Opti Phase "Hi-safe II" (Pharmacia)

3.2.2.b. Protocolo

Alícuotas de 100 μ l de citosol (por duplicado) se incubaron, a 4 °C y durante 18 hrs, con 5 nM de 3 H-estradiol (en el caso de RE) y 10 nM de 3 H-R5020 (en el caso de RP), en presencia o ausencia de un exceso (200 veces) de competidor no marcado, DES y R5020 respectivamente.

Tras la incubación, la hormona no fijada se eliminó por el método de carbón-dextrano, que consiste en añadir a la incubación una solución de 0.8% de carbón y 0.08% de dextrano en tampón de tumores. Tras una incubación adicional de 10 min. a 4 °C, el carbón-dextrano y la hormona no fijada que éste arrastra se eliminaron por centrifugación. Del sobrenadante de esta centrifugación se recogieron alícuotas de 100 μ l que se mezclaron vigorosamente con 2 ml de líquido de centelleo y se contaron. Los resultados se expresan en fmol de receptor / mg proteína citosólica.

3.3. ESTUDIO DEL PROTO-ONCOGEN HER-2/neu

3.3.1. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION MEDIANTE SOUTHERN BLOT

El método del Southern es uno de los más usuales en el estudio de regiones específicas del ADN genómico. Este método en sí se refiere únicamente a la transferencia por capilaridad del ADN desde geles de electroforesis a membranas (123), pero nosotros englobaremos bajo esta denominación, la digestión por enzimas de restricción de ADN, su separación mediante electroforesis, su transferencia a soportes sólidos y su estudio mediante

sondas.

La electroforesis en gel de agarosa es un método clásico para la identificación, separación y aislamiento de ADN (124). Dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar se utilizan geles de varias concentraciones de agarosa, entre 0.2% y 3%, en los cuales la velocidad de migración del ADN es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular.

El objetivo de la digestión con enzimas de restricción consiste en fraccionar el ADN génomico por ciertos locis que marcan las dianas de estas enzimas, para separarlos a posteriori mediante electroforesis y proceder al estudio del gen o fracción que nos interese mediante sondas.

La enzima de restricción utilizada fue la EcoRI, y como sonda utilizamos un fragmento del dominio citosólico de 180 pares de bases (pb) del proto-oncogén HER-2/neu, capaz de hibridar, y por tanto detectar, un fragmento de 1.8 kb del gen.

3.3.1.a. Material y reactivos

Cubetas de electroforesis en agarosa. Hoeffler

Sistema de transferencia por presión. Stratagene

Iluminador ultravioleta UV. Stratagene

Trasiluminador de luz ultravioleta. Fotodyne

Membranas de nylon. Biotodyne

EcoRI. Boehringer

Agarosa. Sigma

Bromuro de Eddio. Sigma

Marcador de peso molecular "Lambda DNA/Hind III Fragments". Consiste en 8 fragmentos resultantes de la digestión del fago Lambda. El tamaño de los fragmentos es de : 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pares de bases (pb).

Kit de marcaje de ADN. Boehringer

AMPPD. Boehringer

3.3.1.b. Soluciones

- Tampón de electroforesis (TAE)

Tris-acetate (0.04 M)

EDTA pH 8.0 (0.001 M)

- Tampón de carga 5X

Ficoll 70 (25%)

EDTA pH 8.0 (125 mM)

Azul de bromofenol (0.15%)

Xilencianol (0.15%)

- Solución de desnaturalización

NaCl (1.5 M)

NaOH (0.5 N)

- Solución de neutralización

TrisHCl pH 7.4 (1 M)

NaCl (1.5 M)

- Tampón de transferencia

20X SSC

- Solución EDTA

EDTA pH 8.0 (0.2 M)

- Solución de pre-hibridación.

SSC (5X)

Agente bloqueante (2% p/v)

N-Lauril-sarcosina (0.1% v/v)

SDS (0.02% v/v)

- Solución de hibridación

Solución de pre-hibridación

Formamida (40%)

Sonda (20 ng/ml)

- Solución I

SSC (2X)

SDS (0.1%)

- Solución II

SSC (0.1%)

SDS (0.1%)

- Tampón 1

Acido maleico (100 mM)

NaCl pH 7.5 (150 mM)

- Tampón de lavado

Tampón 1

Tween 20 (0.3% v/v)

- Tampón 2

Tampón 1

Agente bloqueante (1% p/v)

-Tampón 3

Tris HCl pH 9.5 (100 mM)

NaCl (100mM)

MgCl₂ (50 mM)

-Solución de AMPPD

AMPPD 10 mg/ml.

3.3.1.c. Digestión y electroforesis

Se digieren 10 µg de ADN total con EcoRI (3 U) a 37 °C durante aproximadamente 6-7 horas. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se someten a electroforesis.

1) Calentar hasta la ebullición la cantidad adecuada de agarosa (0.8%) en TAE.

- 2) Cuando la temperatura descienda hasta 55 °C, verter la solución en una cubeta, en la cual se habrá colocado el peine que dará forma a los pocillos.
- 3) Una vez gelificado, sumergir el gel en la cubeta de electroforesis que contiene TAE.
- 4) Añadir tampón de carga 5X a cada una de las muestras de ADN digerido, dejando la solución a una concentración 1X.
- 5) Cargar las muestras y los marcadores en los pocillos del gel.
- 6) Iniciar la electroforesis, aplicando una diferencia de potencial de 27 V durante 12-14 horas. La electroforesis se detiene teniendo en cuenta que para un gel de estas características el azul de bromofenol migra a una velocidad equivalente a un tamaño de ADN de 1 Kb y el xilencianol a uno de 4,5 Kb.
- 7) Teñir el gel durante unos 15 min. con bromuro de etidio, a una concentración de 1 µg/ml, agitando suavemente.
- 8) Visualizar las bandas de ADN con un trasiluminador. Fotografar el gel con regla, de tal forma que la distancia que migra cada banda de ADN pueda ser leída directamente de la imagen fotográfica.

3.3.1.d. Transferencia de ADN desde agarosa a membranas de nylon.

Se utilizaron el método de transferencia por capilaridad (Southern) y el método de transferencia por presión.

- Método de Southern

- 1) Después de la electroforesis, eliminar la zona del origen del gel y marcarlo con el fin de orientarlo durante las operaciones sucesivas.
- 2) Desnaturalizar el ADN sumergiendo el gel en la solución de desnaturalización durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación moderada.
- 3) Lavar el gel con agua y neutralizar sumergiéndolo en la solución de neutralización durante 30 min. con agitación moderada, repetir una vez más.
- 4) Mientras el gel se encuentre en la solución anterior, cortar varias piezas de papel Whatman 3MM. Dos de estas tendrán las dimensiones del gel, y otra será mayor para poder ser utilizada como puente.
- 5) Cortar una pieza de membrana de nylon aproximadamente 1 mm más largo que las dimensiones del gel.
- 6) Humedecer la membrana en agua y sumergirla en el tampón de transferencia durante unos

5 min.

7) Retirar el gel de la solución de neutralización y colocarlo sobre el papel 3MM que servirá de puente, y que previamente se habrá humedecido en el tampón de transferencia. Asegurarse que no quedan burbujas entre el papel y el filtro.

8) Colocar el filtro sobre el gel y sobre este los dos 3MM con su mismo tamaño.

9) Cortar papel de filtro con las dimensiones del gel y formar un bloque de aproximadamente 8 cm. Colocar este bloque sobre los 3MM y encima una pieza de cristal y un peso de 400-500 gr.

10) Dejar que se realice la transferencia de 10 a 24 h.

11) Retirar todos los papeles que se encuentran sobre el filtro. Lavar el filtro en 6X SSC.

- Método de transferencia por presión

1) Después de la electroforesis preparar el gel siguiendo los pasos 1-3 del método anterior.

2) Ver Figura 6. Cortar un rectángulo en la máscara de plástico (5), que debe ser inferior a las dimensiones del gel.

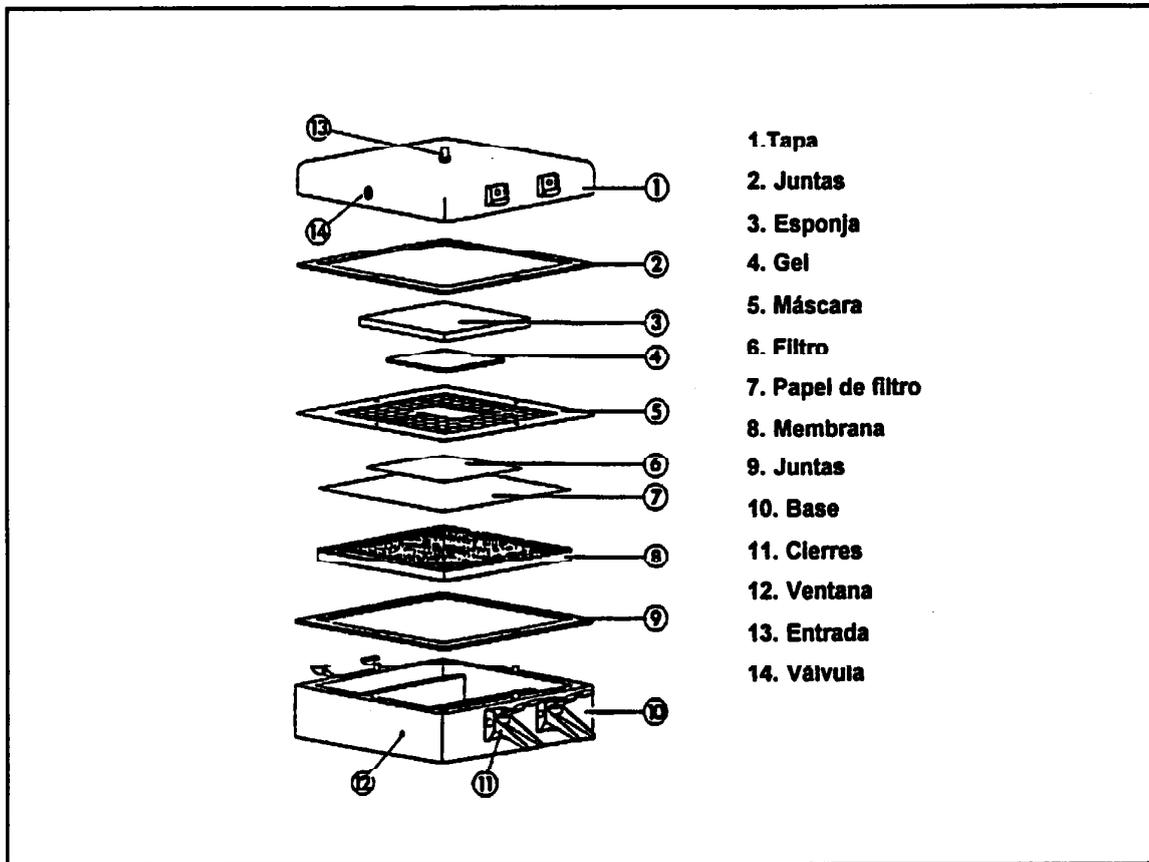


FIGURA 6. *Transferencia de ADN por presión (Posi-blot).*

3) Colocar sobre la base (10) la membrana (8)

4) Cortar una pieza de nylon y otra de papel 3MM de dimensiones mayores que la ventana abierta en la máscara de plástico. Humedecer en agua y sumergirlas en el tampón de transferencia.

5) Colocar ambas piezas sobre la membrana (8), primero el papel 3MM y luego el nylon.

- 6) Colocar la máscara de plástico (5) sobre la base, asegurándose que queda perfectamente alineada con el filtro.
- 7) Retirar el gel de la solución de neutralización y colocarlo sobre el filtro.
- 8) Colocar la esponja de celulosa (3), saturada con el tampón de transferencia, sobre el gel.
- 9) Cerrar bien el aparato.
- 10) Encender la bomba y ajustar la presión a 75 mm Hg.
- 11) Dejar que se transfiera 1 h..
- 12) Desconectar la bomba. retirar la tapa, la esponja y el gel. Recoger el filtro y lavar con 6X SSC.

Ambos métodos se continúan con la fijación covalente del ADN a la membrana de nylon mediante auto cross link en el iluminador ultravioleta.

3.3.1.e. Marcaje de la sonda de ADN con digoxigenina

- 1) Preparar una solución de 15 μ l de agua que contenga de 100 ng a 1 μ g de ADN linearizado.

- 2) Desnaturalizar por calor en un baño de agua a 95 °C durante 10 min.
- 3) Enfriar rápidamente en un baño de hielo y sal.
- 4) Añadir:
 - 2 μ l de mezcla de hexanucleotidos, Boehringer.
 - 2 μ l de mezcla de dNTP marcado, Boehringer.
 - 1 μ l de enzima Klenow, 2 U/ μ l, Boehringer.
- 5) Incubar 20 h. a 37 °C.
- 6) Parar la reacción por adición de 2 μ l de EDTA
- 7) Precipitar el ADN marcado con 2.5 μ l de LiCl 4M y 75 μ l de etanol al 100% a -20 °C.
Mezclar bien.
- 8) Dejar 30 min. a -70 °C.
- 9) Centrifugar 20 min. a 8000 rpm.
- 10) Lavar con etanol al 80%, secar y resuspender en 50 μ l de TE.
- 11) Conservar a -20 °C.

3.3.1.f. Hibridación de la sonda

Una vez marcada la sonda de la región de estudio, se procede a hibridarla al ADN genómico desnaturalizado y fraccionado de los especímenes de mama que estudiamos de acuerdo con los puntos de corte de la enzima de restricción utilizada, y que se encuentra fijado a los filtros de nylon.

La sonda hibridará con los fragmentos de ADN del filtro cuando encuentre homología, y así, en las autorradiografías o sobre el propio filtro, dependiendo del método de revelado elegido, sólo se observarán las bandas correspondientes a la región en estudio.

- 1) Humedecer los filtros en 6X SSC.
- 2) Colocar los filtros en bolsas de plástico y añadir 20 ml de solución de pre-hibridación, por cada 100 cm² de filtro. Incubar con agitación urante al menos 30 min. a 65 °C.
- 3) Desnaturalizar la sonda en un baño en ebullición durante 10 min.
- 4) Desechar la solución de pre-hibridación y añadir 3 ml de solución de hibridación por cada 100 cm².
- 5) Incubar con agitación de 12 a 24 h. a 37 °C.
- 6) Desechar la solución de hibridación.

- 7) Hacer 2 lavados de 15 min. cada uno en solución I, a temperatura ambiente (50 ml por cada 100 cm²)

- 8) Hacer 2 lavados de 15 min. cada uno, en solución II a 60 °C.

- 9) Los filtros pueden ser usados directamente para su detección o bien secarse al aire para su uso posterior.

3.3.1.g. Detección y revelado

Después de la hibridación con sondas marcadas con digoxigenina, se procede a la detección del ADN utilizando Anti-digoxigenina-Fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP-conjugado). El conjugado contra la digoxigenina reconoce de esta manera a la sonda marcada. Dependiendo del sustrato de la fosfatasa alcalina utilizado, obtendremos una reacción de color (NBT y BCIP) o bien una reacción fluorescente (AMPPD).

- 1) Los filtros son lavados en tampón de lavado durante 5 min.

- 2) Incubar 30 min. en 100 ml de tampón 2.

- 3) Diluir el anti-DIG-AP-conjugado, en tampón 2, a 75 mU/ml (1:10000).

- 4) Incubar los filtros 30 min. en 20 ml de la solución anterior.

- 5) Lavar 2 veces 15 min. en 100 ml de tampón de lavado.
- 6) Equilibrar 2-5 min. en 20 ml de tampón 3.
- 7) Diluir la solución de AMPPD 1:100 en tampón 3.
- 8) Incubar en oscuridad los filtros 5 min. en 10 ml de la solución anterior.
- 9) Quitar el exceso de líquido de los filtros, colocandolos entre dos papeles 3MM, sin llegar a secarlos totalmente.
- 10) Colocar los filtro en una bolsa plástica y sellarla.
- 11) Preincubar 5-15 min. a 37 °C.
- 12) Exponer durante 20-60 min. a temperatura ambiente una placa de rayos X.

3.3.2. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION MEDIANTE PCR DIFERENCIAL

El ADN es una delicada molécula compuesta por 4 tipos de desoxinucleótidos: desoxiadenilato (A), desoxitimidilato (T), desoxiguanilato (G) y desoxicitidilato (C) que forman dos cadenas con secuencias complementarias enrolladas en hélice. En la combinación de la secuencia de estos nucleótidos radica la información genética.

Cuando se intenta aislar el ADN del resto de fracciones celulares, éste es tan largo y delgado que hasta los tratamientos más suaves la rompen aleatoriamente en múltiples pedazos y el número de copias de un gen en concreto es muy pequeño (1 por cada célula de la muestra) lo que dificulta en gran medida el estudio de una determinada secuencia.

En 1955, Arthur Kornberg descubrió la polimerasa de ADN. Estas enzimas celulares desempeñan varias funciones, entre ellas, la reparación y replicación del ADN, es decir, pueden elongar un breve oligonucleótido "cebador" o "primer" (secuencias cortas de nucleótidos monocatenarios) que hibridan con el ADN molde dejando libre su extremo 3' donde la polimerasa incorpora los nucleótidos complementarios.

De esta manera en una reacción en que intervenga la polimerasa, junto a una mezcla de los 4 nucleótidos que constituyen el ADN y unos cebadores adecuados, se consigue copiar la molécula, mediante cambios de temperatura que permiten; 1) la desnaturalización de la doble cadena a cadenas sencillas y linealizadas ($T \approx 90$ °C), 2) la hibridación del primer a su secuencia complementaria en la molécula de ADN (temperaturas entre 40-60 °C dependiendo de la secuencia) y 3) la elongación o adición por parte de la polimerasa de los nucleótidos ($T = 70$ °C) . Véase Figura 7.

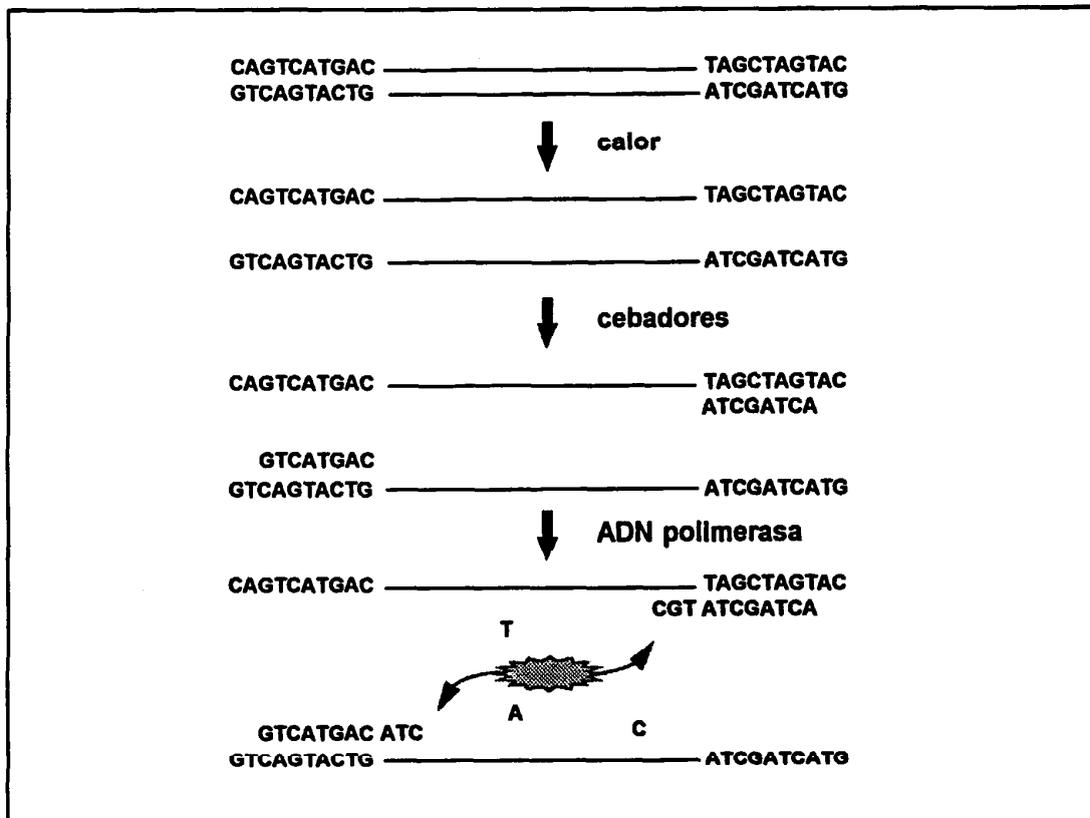


FIGURA 7. *Replicación del ADN por la ADN polimerasa.*

Basándose en esta técnica, en 1985 Kary B. Mullis describió lo que se denomina "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR, de sus siglas en inglés) que consiste básicamente en copiar repetidas veces un fragmento del ADN molde mediante la elección de unos primers determinados en base a la secuencia objeto de la amplificación. Estos primers delimitan esa secuencia con sus extremos 5', dónde la polimerasa no puede incluir nucleótidos y así en la primera reacción se obtiene una copia del fragmento deseado.

Repitiendo sucesivamente esta reacción el número de copias que se obtienen es siempre el doble del de partida, por tanto, es una reacción exponencial en la que se obtienen

un número de copias del ADN deseado igual a 2^n , siendo n el número de ciclos de amplificación a los que se ha sometido el ADN original (Figura 8).

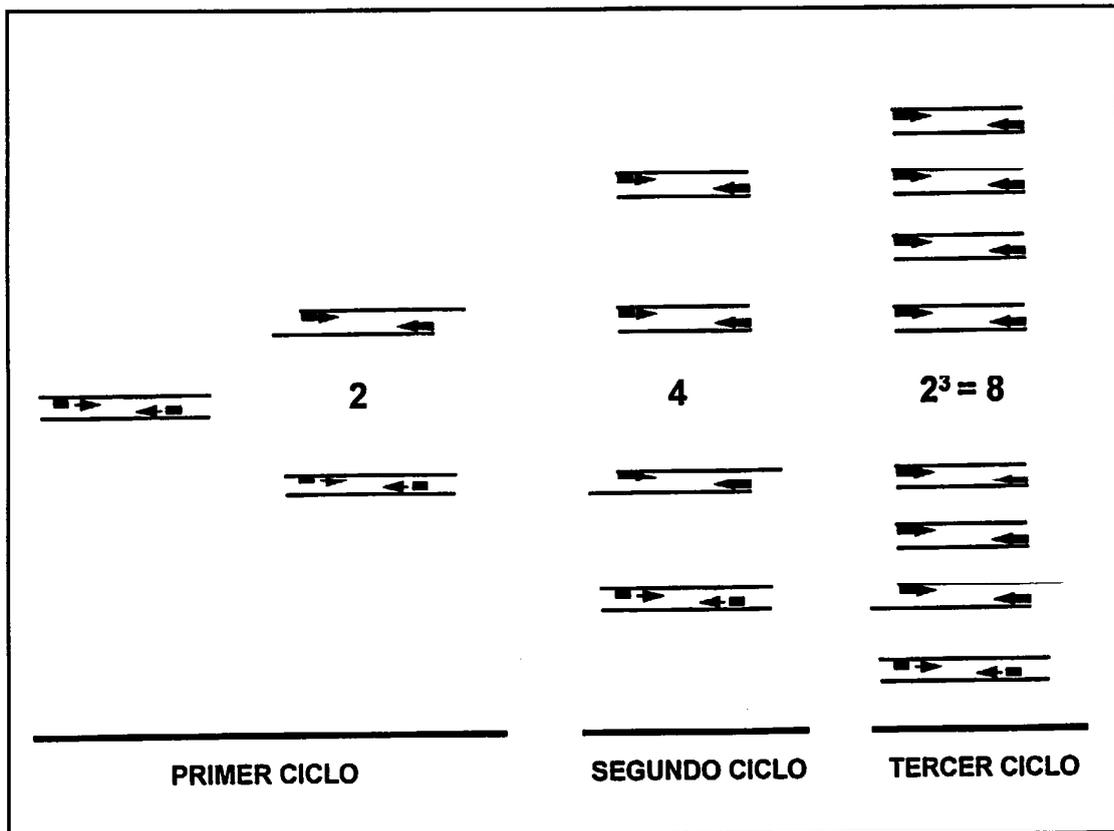


FIGURA 8. *Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)*

Con el descubrimiento de la Taq polimerasa del microorganismo *Thermophilus aquaticus*, la técnica mejoró considerablemente pudiéndose llevar a cabo esta amplificación en un único paso ya que esta enzima, a diferencia de las utilizadas hasta entonces es estable a temperaturas altas y no era necesario reponer los componentes de la amplificación en cada reacción.

Recientemente se ha puesto a punto un método (semi)cuantitativo para estimar el número de copias de un gen en concreto, basado en esta técnica y denominado PCR diferencial. Esta consiste en la coamplificación por PCR de un fragmento del gen objeto de estudio y uno de referencia en el mismo tubo de reacción. Si el número de copias del gen en cuestión, es mayor que el número de copias del gen de referencia, que debe ser conocido ($2n$), cuando separemos el producto de la reacción mediante electroforesis, su banda en el gel será más intensa que la del gen de referencia.

Algunos autores han descrito que la habilidad de la PCR diferencial para detectar amplificación génica es relativamente independiente del número de ciclos de PCR y la cantidad inicial de ADN del que se parte, e incluso de la fragmentación de este causada por la parafinización de los tejidos, siempre que la talla del fragmento escogido para la amplificación no sea mayor de 300 pb. Además posee otras grandes cualidades como el bajo consumo de muestra y tiempo de reacción, es sencilla y no precisa el uso de radioactividad con lo que se perfila como una técnica de gran utilidad en el estudio de la activación por amplificación génica del HER-2/neu y otros proto-oncogenes que pudieran tener interés pronóstico en distintos tipos de tumores sólidos.

En nuestros primeros estudios con esta técnica se utilizaron un fragmento de 180 pb del dominio citosólico del proto-oncogén HER-2/neu (125) y como genes de referencia un fragmento de 632 pb de la región 3' del gen de la β -globina (β G) y uno de 102 pb del dominio de unión del ADN del receptor de estrógenos (ER) (126) indistintamente. De esta manera al separar los productos de la electroforesis en un gel de agarosa (1.5%), la banda posiblemente amplificada del proto-oncogén quedaría comparada con un fragmento de mayor

tamaño y con uno menor.

Las secuencias de estos primers son las siguientes:

NEU 180

* 5' - AAG CAT ACG TGA TGG CTG GT -3'

* 5' - CAA TCT GCA TAC ACC AGT TC -3'

βG 632

* 5' - ATA CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC -3'

* 5' - GTA TTT TCC CAA GGT TTG AAC TAG CTC -3'

RE 102

* 5' - ACA CAA GCG CCA GAG AGA TG -3'

* 5' - AAG GCA CTG ACC ATC TGG TC -3'

Debido a encontrar ciertas dificultades, nos replanteamos la metodología a seguir. De esta manera estimamos que un procedimiento más correcto sería, someter a cada muestra a dos reacciones en las que por una parte se coamplificaba el fragmento de 180 pb ya citado del HER-2/neu con un fragmento del β-interferón de 119 pb (127) como gen de referencia de manera que la banda correspondiente al HER-2/neu cuando el producto de la reacción se

corra en un gel de electroforesis quede por encima, al ser de mayor tamaño (Figura 9), y por otra parte, en una segunda coamplificación se utiliza un fragmento de 98 pb distinto al anterior y del dominio transmembranal del HER-2/neu (128), y como referencia un fragmento de 150 pb del gen γ -interferón (129), quedando en este caso la banda correspondiente al HER-2/neu por debajo (Figura 10). Además, los geles de agarosa fueron sustituidos por geles de acrilamida al 12% y de un grosor de 0.75 mm que dan una mejor resolución de la imagen.

Los genes elegidos y sus primers son los siguientes:

NEU 98

* 5' - CCT CTG ACG TCC ATC ATC TC -3'

* 5' - ATC TTC TGC TGC CGT CGC TT -3'

BETA-IFN 119

* 5' - GTG TCT CCT CCA AAT TGC TC -3'

* 5' - GCC ACA GGA GCT TCT GAC AC -3'

GAMMA-IFN 150

* 5' - TCT TTT CTT TCC CGA TAG GT -3'

* 5' - CTG GGA TGC TCT TCG ACC TC -3'

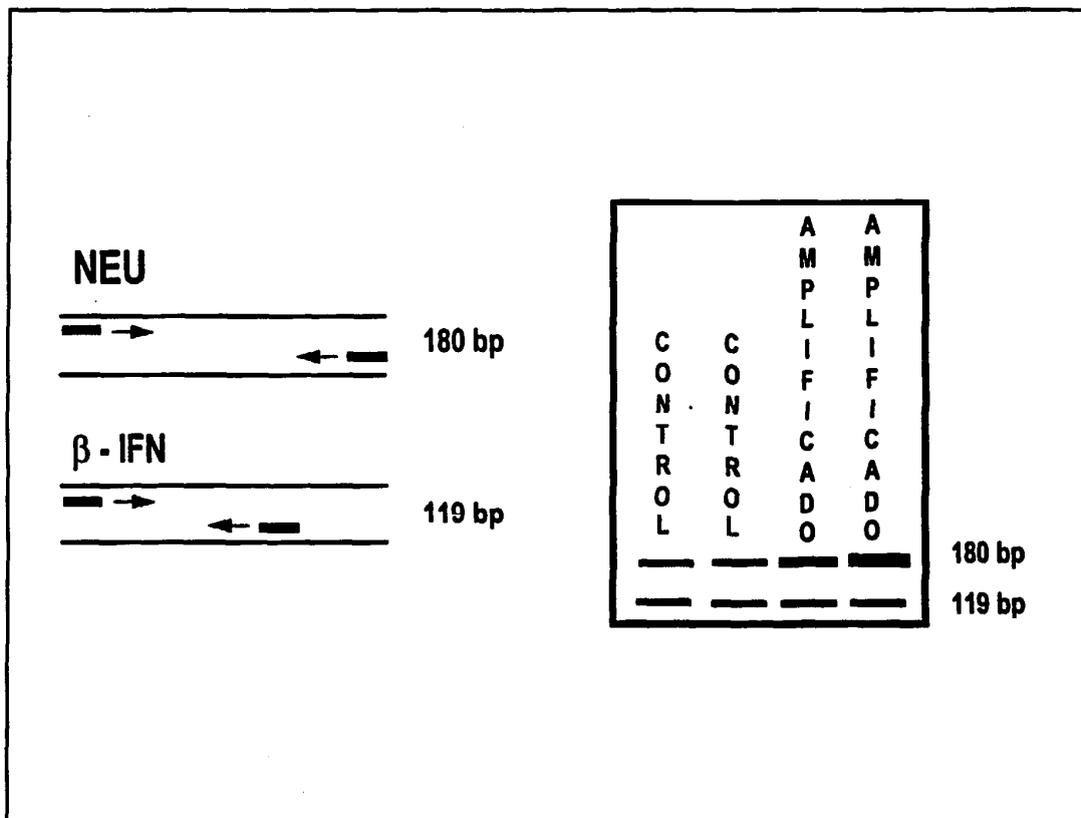


FIGURA 9. *Imagen obtenida tras separar los productos de PCR diferencial en geles de electroforesis cuando se realiza con un fragmento del gen de referencia de menor tamaño que el HER-2/neu.*

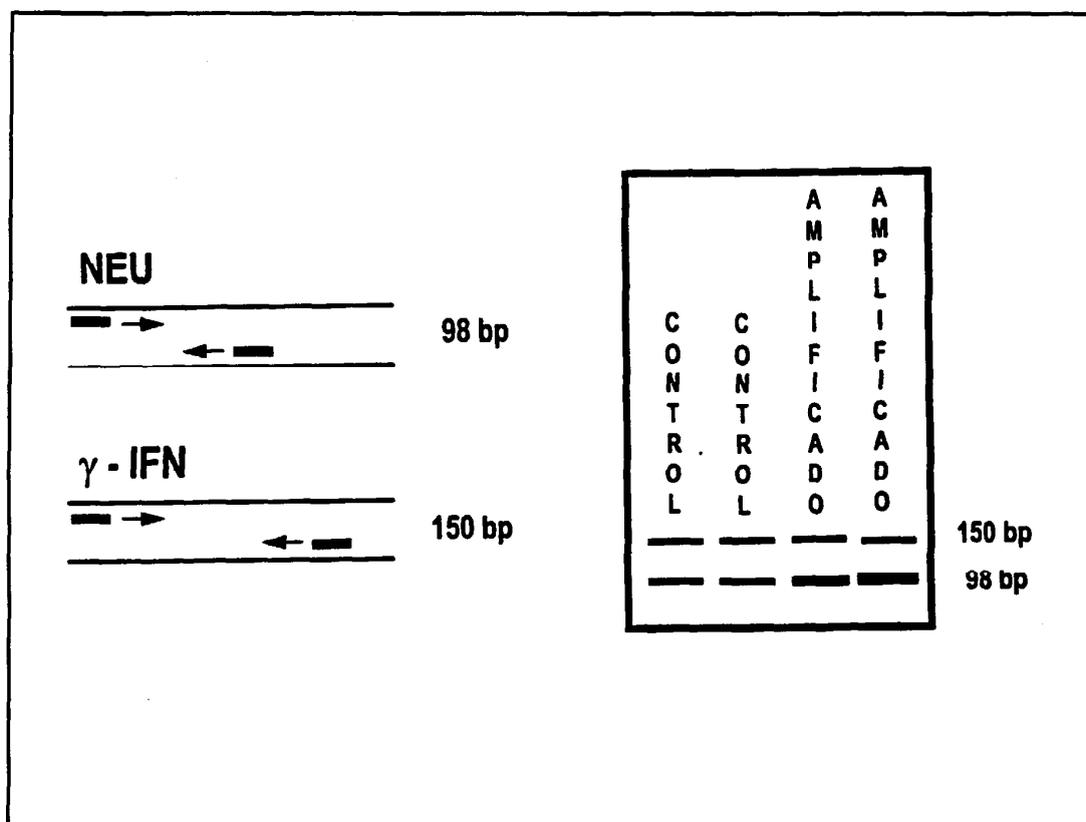


FIGURA 10. Imagen obtenida tras separar los productos de PCR diferencial en geles de electroforesis cuando se realiza con un fragmento del gen de referencia de mayor tamaño que el HER-2/neu.

3.3.2.a. Material y reactivos

Tubos 10 ml cristal. Dupont

Tubos eppendorf 1.5 ml. Sigma

Tubos eppendorf 0.5 ml. Perkin

Pipetas pasteur

Puntas de pipetas automáticas varias medidas.

Espectrofotómetro UV-160A. Shimadzu

Speed Vac Concentrator. Savant

Termociclador DNA Thermal Cycler. Perkin

Densitómetro DU 7500. Beckman

Proteinase K. Boehringer

Fenol saturado pH 8.0. Sigma

Etanol 100% y 80%. Merck

SDS 0.1%. Sigma

Taq Polymerase. Perkin

Marcador de peso molecular " ϕ X-174-RF DNA Hae III Digest". Consiste en 11 fragmentos resultantes de la digestión del fago ϕ X-174. El tamaño de los fragmentos es de : 1358, 1018, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pares de bases (pb).

3.3.2.b. Soluciones

- Tampón proteinasa

Tris-HCl, pH 7.4 (0.5 M)

EDTA Na₂ (20 mM)

NaCl (10 mM)

SDS (1 %)

- Tampón TE

Tris-HCl, pH 7.5 (10 mM)

EDTA Na₂ (0.1 mM)

- Solución A

Cloroformo:isoamilalcohol (24:1 vol/vol)

- Solución PCR

KCl (50 mM)

Tris-HCl, pH 8.3 (10 mM)

MgCl₂ (2.25 mM)

dNTPs (0.25 mM c/u)

Formamida (5 %)

Primers (1 μM- exepo γ-IFN que se utiliza 2 μM-)

3.3.2.c. Procedimiento de extracción de ADN.

A partir de los núcleos obtenidos en el procesamiento de tumores se lleva a cabo la extracción de ADN, mediante el método del fenol-proteinasa K (123), que consiste en resuspender los núcleos en 5 ml de tampón proteinasa, añadiéndoles entonces 1.5 mg de proteinasa K e incubándolos de 1 a 2 días a 37 °C con agitación ocasional hasta que se

observe que la digestión de los núcleos es total.

La extracción continua con los siguientes pasos:

- 1) Añadir 2.5 ml de Fenol saturado y 2.5 ml de la solución A, agitar suavemente y centrifugar a 6000 rpm durante 30 min.
- 2) Recoger la fase superior (acuosa) y añadirle otros 5 ml de la solución A para eliminar los restos de Fenol, volviendo a centrifugar a 6000 rpm durante 30 min.
- 3) Recoger la fase superior evitando la interfase (donde se encuentran restos de proteínas y Fenol). Precipitar el ADN por la adición de 2-3 volúmenes de etanol 100% frío guardándolos a -70°C durante 1-2 días para después centrifugarlo a 11000 rpm, 30 min.
- 4) Con el fin de eliminar posibles restos de sales se somete al sedimento a un par de lavados con etanol al 80%, recogiendo el mismo mediante centrifugación a 7000 rpm, 15 min.
- 5) Por último, el sedimento se resuspende en 500-600 μ l de TE. Una alícuota de este se utiliza para medir la concentración con SDS 0.1% y a una longitud onda (λ) de 260 nm por espectrofotometría. Una vez obtenida, la concentración se ajusta a 1 μ g/10 μ l para llevar a cabo la PCR diferencial.

3.3.2.d. Procedimiento de PCR diferencial

En la coamplificación se utilizó 1 μg de ADN en un volumen final de reacción de 100 μl de la solución de PCR.

Una vez añadidos estos componentes se agita y se les da un pulso a cada uno de los tubos sometiéndolos a una serie de temperaturas y tiempos que permitirán la total desnaturalización de las moléculas de ADN.

Programa A

SEG I	T= 95 °C	t = 10 min
SEG II	T= 4 °C	t = 10 min
CICLOS	1 ciclo	

En este punto se les da un pulso a los tubos con el fin de recolectar todo el líquido evaporado y manteniéndolos en hielo se les añade la enzima:

TAQ POLIMERASA	0.5 μL (5 U/ μL) 2.5 U
----------------	--

Se vuelve a agitar y centrifugar a la vez que se cubre el volumen de cada tubo con un volumen igual de aceite vegetal para evitar la evaporación en los sucesivos ciclos de la

reacción:

Programa B

SEG I	T= 94 °C	t = 5 min
SEG II	T= 50 °C	t = 1 min
SEG III	T= 72 °C	t = 1 min
CICLOS	1 ciclo	UNIDO C

Programa C

SEG I	T= 94 °C	t = 1 min
SEG II	T= 50 °C	t = 1 min
SEG III	T= 72 °C	t = 1 min
CICLOS	34 ciclos	UNIDO D

Programa D

SEG I	T= 94 °C	t = 1 min
SEG II	T= 60 °C	t = 10 min
SEG III	T= 4°C	t = 1 min

CICLOS	1 ciclo	UNIDO E
--------	---------	---------

El programa E consiste en mantener las muestras a 4°C hasta su utilización, momento en el que se extrae la capa superior de aceite y se utiliza un 10% del producto de la reacción que se carga junto al marcador de peso molecular para separarlo mediante electroforesis en un gel de acrilamida al 12% y de un grosor de 0.75 mm. Este se tiñe con Bromuro de etidio, que es un agente intercalante del ADN, visible con luz ultravioleta, de manera que bajo estas condiciones pueden ser fotografiados (Polaroid 665) y se establece el rango de amplificación del gen HER-2/neu por comparación de la intensidad relativa, medida por densitometría de los negativos, de las dos bandas de una misma muestra.

3.4. ESTUDIO DE LA PROTEINA p185^{HER-2/neu}

3.4.1. ESTIMACION CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE LA ONCOPROTEINA p185^{HER-2/neu} MEDIANTE ELISA

La expresión total celular de la p185^{HER-2/neu} fue estimada cuantitativamente mediante un ELISA comercial (Oncogene Science) que se basa en la utilización de dos anticuerpos monoclonales de ratón específicos para la proteína producto del oncogén HER-2/neu humano (demostrado mediante inmunoprecipitación) y que reaccionan con epitopos independientes del dominio extracelular de la p185^{HER-2/neu}

El primer anticuerpo NB-3 (captura) se encuentra inmovilizado en los pocillos del

microplato donde se realiza la incubación del homogenado, permitiendo de esta forma que el antígeno específico sea capturado. El segundo anticuerpo TA-1 (detector) es un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-Neu de ratón, que reconoce a la proteína por un determinante antigénico distinto al anterior haciendo posible su detección mediante revelado con estreptavidina-peroxidasa, este conjugado cataliza la reacción de un sustrato cromogénico (o-fenilenediamina, OPD) a un producto coloreado que produce una absorbancia a una longitud de onda (λ) de 490 nm que se puede cuantificar. Ver Figura 11.

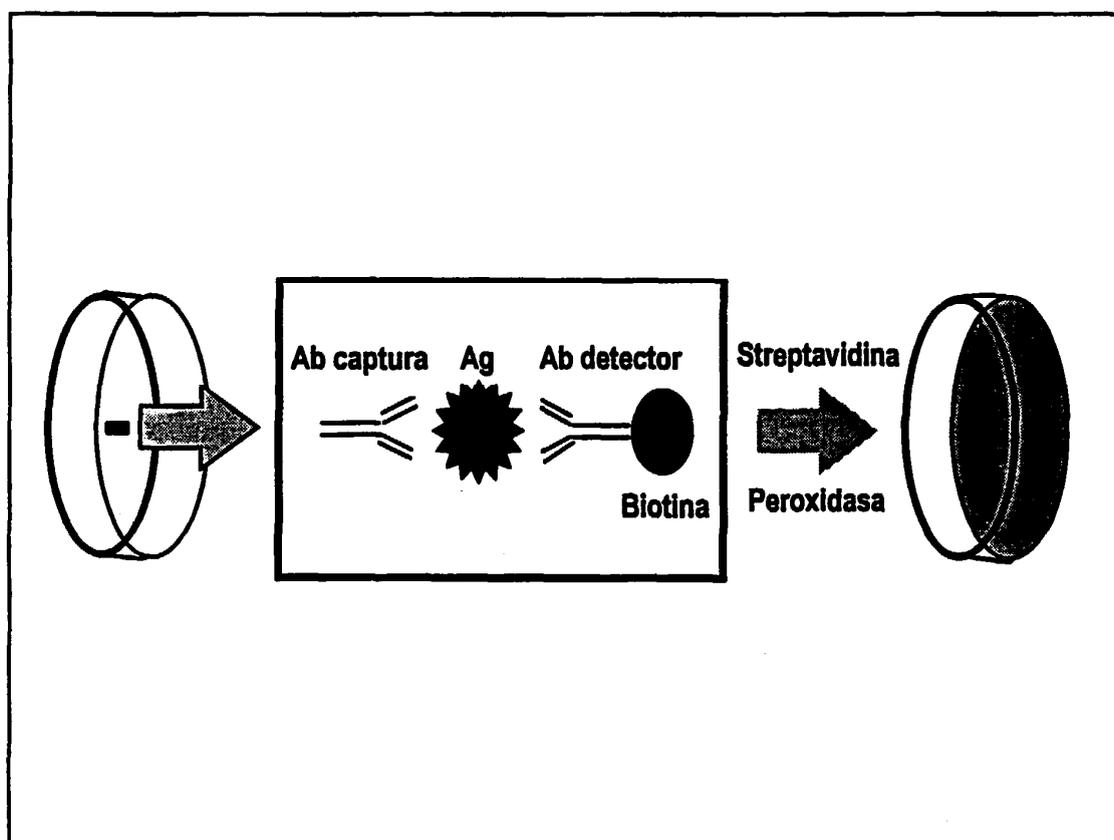


FIGURA 11. Esquema de la estimación cuantitativa de los niveles de p185^{HER-2/neu} mediante ELISA

3.4.1.a. Material y reactivos

Lector de placas

Agente de extracción del antígeno (AEA). Oncogene

Diluyente de muestra (0.01 M tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4, albumina de suero bovino (BSA), surfactante y 0.1 % azida sódica). Oncogene

Tampón de lavado (Plate Wash, 2-Cloroacetamida). Oncogene

Solución del Segundo Anticuerpo (TA1 en 0.01 M PBS pH 7.4, suero de conejo, estabilizante y 0.1% azida sódica)

Solución de revelado (estreptavidina-peroxidasa de caballo en 0.01 M PBS pH 7.4, BSA y 0.01% cloroacetamida). Oncogene

Sustrato de revelado (tabletas de OPD disueltas en 0.1 M de tampón citrato pH 5.0 y 0.01% de H₂O₂). Oncogene

Solución Stop (4N de H₂SO₄). Oncogene

3.4.1.b. Protocolo

1) Una alícuota de 50 μ l del homogeneizado se incuba con 10 μ l AEA durante 5 min. a temperatura ambiente con agitación ocasional, para después centrifugarlo a 2500 rpm durante 10 min.

2) Se recoge el sobrenadante y la concentración de proteínas de este se ajusta a 10 μ g/ml con diluyente de muestra.

- 3) La reacción se lleva a cabo añadiendo 100 μ l de la dilución anterior de cada muestra por duplicado en los pocillos del microplato dónde está anclado el primer anticuerpo (NB-3), reservando 14 de estos para los componentes de la curva estándar.
- 4) Incubar durante 12 a 18 horas a temperatura ambiente.
- 5) Lavar cada pocillo 6 veces con 300 μ l de Plate Wash.
- 6) Añadir a cada pocillo 100 μ l de la solución con el segundo anticuerpo, e incubar durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 7) Repetir punto 5.
- 8) Añadir 100 μ l de la solución de revelado e incubar 15 min.
- 9) Repetir el punto 5.
- 10) Añadir a cada pocillo 100 μ l del sustrato de revelado e incubar en la oscuridad durante 60 min.
- 11) Parar la reacción añadiéndole a cada pocillo 100 μ l de la solución stop y leer la absorbancia a 490 nm (con un filtro de referencia de 620 nm si es posible) antes de que transcurran 30 min.

Interpolando la media de los valores de la absorbancia de cada muestra, ya que se realiza la prueba por duplicado, en la curva que obtenemos de los estándares sabremos la concentración de p185^{HER-2/neu} que se expresa en fmol/mg de proteína.

3.4.2. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA p185^{HER-2/neu} MEDIANTE WESTERN

El método de Western Blot (123) consiste básicamente en la transferencia de proteínas desde geles de electroforesis a soportes sólidos. Nosotros englobaremos en este apartado, como ya hicimos con el Southern, todos los procesos que van desde la separación de proteínas mediante geles de acrilamida, a su transferencia a soportes sólidos, y a la posterior detección de la proteína de interés mediante anticuerpos.

3.4.2.a. Material y reactivos

Cubetas de electroforesis. Hoeffler.

Aparato de transferencia húmeda. Hoeffler.

Membranas de polivinilo (Inmobilon-P). Amersham.

Marcador de peso molecular "SDS-PAGE Standar High Range", Bio-Rad. Consiste en la siguiente mezcla de proteínas:

Miosina (200 kDa)

β -Galactosidasa (116.5 kDa)

BSA (80 kDa)

Ovoalbúmina (49.5 kDa)

TEMED. Amresco

Tritón X-100 (1%)

Proteína A o Proteína B Shepharosa

3.4.2.b. Soluciones

-Solución acrilamida (30%)

Acrilamida:bisacrilamida (29.2:0.8)

-Tampón de electroforesis

Trizma Base pH 8.8 (25 mM)

Glicina (200 mM)

SDS (0.1 %)

Persulfato amónico al 10% (p/v)

SDS al 10% (p/v)

-Tampón separador

Trizma Base pH 8.8 (1.5 M)

-Tampón concentrador

Trizma Base pH 6.8 (0.5 M)

-Tampón de muestra

Trizma base pH 6.8 (100 mM)

SDS (3% p/v)

2-mercaptoetanol (200 mM)

Glicerol (20% v/v)

Comassie blue G-250 (0.01 % p/v)

-Solución del gel separador (7%)

Acrilamida 30% (23%)

Agua (49%)

Tampón separador (25.2%)

Persulfato (1%)

SDS (1%)

TEMED (0.08%)

-Solución del gel concentrador (5%)

Acrilamida 30% (17%)

Agua (67%)

Tampón concentrador (13%)

Persulfato (1%)

SDS (1%)

TEMED (0.08%)

-Tampón de lavado del gel

Trizma base (10 mM)

Glicina (195 mM)

Metanol (20% v/v)

-Tampón de transferencia

Trizma base (10 mM)

Glicina (195 mM)

SDS (0.1%)

Metanol (20% v/v)

-Tampón de bloqueo

Trizma base pH 7.4 (20 mM)

Albúmina (3%)

Tween 20 (0.05%)

NaCl (150 mM)

-Tampón de lavado de la membrana

Trizma base pH 7.4 (20 mM)

Tween 20 (0.05 %)

NaCl (150 mM)

-Tampón de lisis

PBS (1 %)

NaF (50 mM)

EDTA pH 8.0 (2 mM)

-Tampón de lavado de inmunoprecipitación

PBS (1 %)

Triton X-100 (1 %)

EDTA (2mM)

3.4.2.c. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en SDS es un método rápido, relativamente sencillo y altamente eficaz en el estudio de mezclas proteicas para su análisis posterior. La base de esta técnica está en el proceso de desnaturalización a que son sometidas las proteínas antes de aplicarlas al proceso de separación.

Esta desnaturalización consiste en hervir las proteínas con un detergente aniónico, el

lauril sulfato sódico (SDS), dotándolas de cargas negativas, que las hará migrar en un campo eléctrico a través de una matriz de poliacrilamida, separándose así en función de sus diferentes pesos moleculares. Las muestras son tratadas con β -mercaptoetanol como agente reductor de los puentes disulfuro.

1) Se prepara un gel con su parte separadora y sobre esta la concentradora dónde se carga la muestra.

2) A una cantidad equivalente a 100 μ g de proteínas microsomales se le añade igual volumen de tampón de muestra y se hierven durante 5 min. a 100 °C con el fin de desnaturalizar las proteínas.

3) Cargar la muestra en los pocillos junto al marcador de peso molecular y un control que consiste en un extracto de la línea celular epidermoide A431 que contienen una gran cantidad de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y una baja expresión de p185^{HER-2/neu}. La electroforesis tiene lugar durante 10 horas a 150 V en tampón de electroforesis.

3.4.2.d. Transferencia de proteínas desde acrilamida a membranas de polivinilo

Una vez realizada la electroforesis se procede a la transferencia de las proteínas a un soporte sólido dónde puedan estudiarse mediante reactividad inmunológica. El proceso consiste:

- 1) Sumergir el gel durante 1 h. en tampón de lavado.

- 2) Preparar la membrana de polivinilo según las instrucciones del fabricante.

- 3) Colocar el gel sobre la membrana entre papeles 3MM empapados en tampón de transferencia.

- 4) Llenar el recipiente hasta el límite del soporte dónde tiene lugar la transferencia con tampón y aplicar 200 mA durante 16 h. a 4 °C.

- 5) Una vez acabado este proceso la membrana está preparada para las distintas reacciones con anticuerpos que deseemos utilizar según la característica que queramos estudiar de la proteína. Este proceso se esquematiza en la Figura 12.

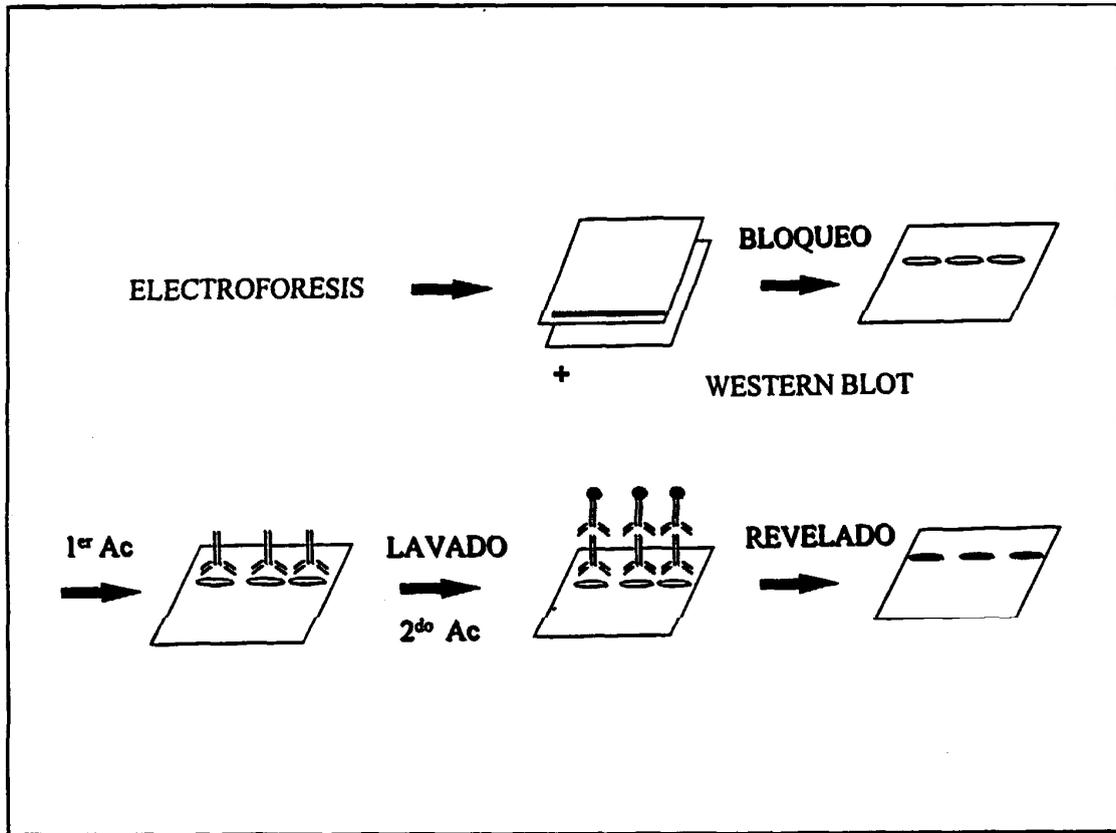


FIGURA 12. Proceso de transferencia de proteínas desde geles de acrilamida a soportes sólidos (membranas).

3.4.2.e. Determinación semicuantitativa de la expresión de la oncoproteína p185^{HER-2/neu}

El siguiente paso es la detección de la proteína en estudio con anticuerpos, en nuestro caso utilizamos un anticuerpo monoclonal, el c-neu (AB-3) (Oncogene, Science) que es específico para la p185^{HER-2/neu} de humanos y ratón y proviene de la inmunización de ratones con péptidos del dominio carboxil de la p185^{HER-2/neu} humana (T A E N P E Y L G L D V P V). Puede ser utilizado en reacciones de inmunoprecipitación, western blot, tinción celular

y tinción de secciones de parafina. El proceso consiste:

1) Acabada la transferencia, las membranas se incuban durante al menos 1 hora en tampón de bloqueo.

2) El siguiente paso es la incubación con el anticuerpo específico para la proteína de estudio. La cantidad de anticuerpo que se utiliza depende del tamaño de las membranas. La preparación del AB-3 es de $1\mu\text{g}$ por 10 ml de tampón de bloqueo. La incubación se mantiene durante 3 horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y siempre con agitación. Concluido este periodo, se retira la solución con el anticuerpo y se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ya que ésta puede ser reutilizado.

3) A continuación las membranas son sometidas a 4 lavados con tampón de lavado durante 10 min. cada uno y en agitación.

4) Las membranas se incuban con un segundo anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa y dirigido contra anticuerpos de ratón (Dako), con lo que detectará el AB-3 que se ha unido específicamente a la $\text{p185}^{\text{HER-2/neu}}$. Este anticuerpo se utiliza a una dilución 1:10000 en tampón de bloqueo y la incubación de las membranas se mantiene durante 45-60 min. a temperatura ambiente.

5) Repetir el punto 3.

3.4.2.f. Estimación del grado de fosforilación de la oncoproteína p185^{HER-2/neu}

Debido a los datos citados por varios autores ya expuestos en la Introducción de esta Memoria, sabemos que la activación de la oncoproteína p185^{HER-2/neu} desencadena una autofosforilación de la misma en sus residuos de tirosina. Por esto y porque uno de los mecanismos de activación más frecuente en muestras tumorales es la sobreexpresión de la p185^{HER-2/neu}, decidimos estudiar la posible relación entre las muestras que ya por técnicas de Western Blot, o por ELISA manifestaban un alto nivel de la proteína y el estado de la misma en cuanto a su grado de fosforilación.

El proceso consistió en una determinación semicuantitativa del grado de fosforilación de la p185^{HER-2/neu} mediante técnicas de western blot. Se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido a residuos de tirosina fosforilados, el PY20 (ICN), con el que además se pueden llevar a cabo reacciones de inmunoprecipitación, ELISA y métodos de inmunocitoquímica.

- 1) Acabada la transferencia las membranas se incuban durante al menos 1 hora en tampón de bloqueo.
- 2) La cantidad de anticuerpo que se utiliza es de 5 μ g por 10 ml de tampón de bloqueo. La incubación fué durante 3 horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C y siempre con agitación, concluido este periodo se retira la solución con el anticuerpo y se almacena a 4 °C ya que esta puede ser reutilizado.
- 3) A continuación las membranas son sometidas a 4 lavados con tampón de lavado durante

10 min. cada uno y en agitación.

4) Las membranas se incuban con un segundo anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa y dirigido contra anticuerpos de ratón (Dako), con lo que detectará el PY20 que se ha unido a la p185^{HER-2/neu} que se encuentre fosforilada en sus residuos de tirosina así como a otras moléculas que tengan esta característica. Este anticuerpo se utiliza a una dilución 1:10000 en tampón de bloqueo y se incuban las membranas de 45-60 min. a temperatura ambiente.

5) Repetir el punto 3.

3.4.2.g. Detección y revelado

El revelado de los anticuerpos unidos a la p185^{HER-2/neu} se lleva a cabo por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) poniendo las membranas en contacto con este reactivo que posee un sustrato que reacciona con la peroxidasa del segundo anticuerpo y emite luz. Esta emisión se recoge exponiendo las membranas a placas de Hyperfilm-ECL (Amersham) en oscuridad durante 20 min. Estas placas se someten al proceso de revelado convencional de negativos (Valca), lo que proporciona directamente una imagen permanente.

3.4.3. VALIDACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LAS TECNICAS DE WESTERN BLOT MEDIANTE INMUNOPRECIPITACION.

La técnica consiste en inmunoprecipitar la p185^{HER-2/neu} de la muestra en cuestión, mediante un anticuerpo específico (AB-3). En este proceso obtendremos por un lado la proteína inmunoprecipitada selectivamente (sedimento) y el resto de las proteínas microsomales (sobrenadante) pudiendo estudiarlas mediante técnicas de western blot con un segundo anticuerpo distinto del anterior que reconozca a la proteína, o en nuestro caso una propiedad intrínseca de la misma, ya que se utilizó el PY20 que reconoce residuos de tirosina fosforilados que como se ha mencionado anteriormente aparecen en la proteína cuando está activada.

De esta manera se comprueba que las cualidades de la proteína (PM, nivel de expresión y grado de fosforilación de la misma) concuerdan con lo esperado, así como la no existencia de reacciones cruzadas por parte del anticuerpo utilizado con otras proteínas de gran parecido estructural, caso del EGFR. Esto se llevó a cabo mediante la utilización de extractos de líneas celulares epidermoides A431 que expresan niveles elevados de EGFR.

3.4.3.a. Procedimiento

1) Se utiliza la cantidad equivalente a 150 μg de proteínas que se diluyen con un volumen de tampón de lisis en función de lo denso que esten los microsomas, lo normal es llevarlo a unos 100-200 μl .

- 2) Añadir Tritón X-100 a una concentración final de 1% y mantener a 4 °C durante 20 min.

- 3) Centrifugar a 4 °C y 14000 rpm durante 10 min.

- 4) Recoger el sobrenadante y a este añadirle 5 µg de anticuerpo dejándolo en incubación durante 1 hora como mínimo, en frío y en agitación.

- 5) En este paso hay que tener en cuenta las características del anticuerpo que se está utilizando para la inmunoprecipitación, ya que según sea su afinidad se utilizará para su captura prot-A sepharosa (IgG₂), prot-B sepharosa (IgG₁) o un segundo anticuerpo que nos permita utilizar una de estas dos según la especificidad de la IgG. La cantidad de 2º Ab debe ser mayor al utilizado para la captura (≈ 30 µg) y la de prot-A/B sepharosa unos 30 µl concentrada según como vaya el proceso.

- 6) Mantener en incubación unos 30 min. a 4°C agitando.

- 7) Centrifugar brevemente y recuperar el sobrenadante. Lavar 4 veces el sedimento con tampón de lavado de inmunoprecipitación.

- 8) Una vez hecho esto, se procede a realizar todo el proceso de Western anteriormente citado -utilizando como carga tanto el inmunoprecipitado como el sobrenadante- de las muestras problemas y de los extractos celulares utilizados como control.

3.5. CULTIVOS CELULARES

3.5.1. LINEAS CELULARES

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- MCF-7: derivada de cáncer de mama humano; tiene la característica de ser hemicigótica para el proto-oncogén HER-2/neu.
- MDA-MB468: línea derivada de mama, utilizada como control normal.
- A431: línea celular derivada de un carcinoma epidermoide vulvar, que sobreexpresa el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

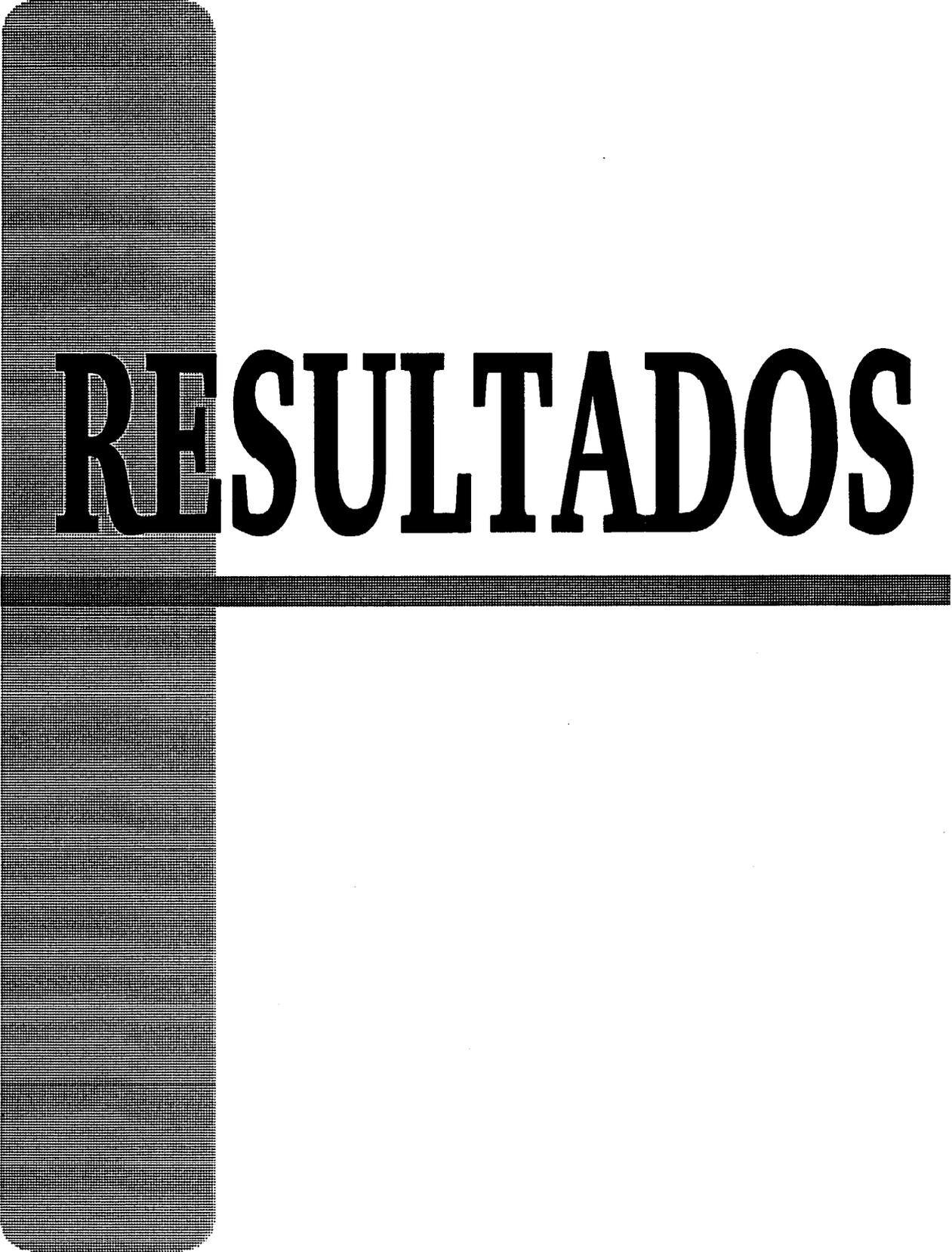
3.5.2 CULTIVO Y OBTENCIÓN

Estas líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma), suplementado con un 19% de FBS (Fetal Bovine Serum, Whittaker) en incubador humidificado (Haereus), a 37 °C con un 5% de CO₂. Cuando estuvieron a una confluencia apropiada (80-90%), se les retiró el medio de cultivo y se tripsinizaron (tripsina-EDTA). A continuación se procedió a su recolección, mediante centrifugación a 800 g, y a su almacenamiento a - 70 °C hasta el momento de su uso.

3.6. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos referidos a variables cuantitativas se expresan por medio de la mediana, la media \pm ESM (error estándar de la media) y rango.

Los test estadísticos utilizados en este estudio fueron los de comparación aplicados a variables binomiales (test Chi-cuadrado y test exacto de Fisher). La significación estadística fue considerada siempre que se obtuviera una $P < 0.05$.



RESULTADOS

4.1. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION DEL GEN HER-2/neu Y DE LOS NIVELES CUANTITATIVOS DE EXPRESION DE LA p185^{HER-2/neu}

4.1.1. DESARROLLO DE LA METODOLOGIA PARA LA ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION DEL ONCOGEN HER-2/neu MEDIANTE PCR DIFERENCIAL

La estrategia inicial consistió en la realización de dos PCR diferenciales para establecer el estatus génico del HER-2/neu, utilizando dos genes de referencia distintos situados en diferentes cromosomas entre sí y con relación al HER-2/neu. Esto es importante tanto para confirmar el resultado de cada PCR, como para minimizar los efectos enmascaradores que pudiera ejercer la aneuploidía de algunas muestras sobre la estimación densitométrica del número de copias génicas.

Los primeros estudios se realizaron co-amplificando un fragmento de 180 bp del dominio citosólico del proto-oncogén HER-2/neu, bien con un fragmento de 630 bp de la región 3' del gen de la beta-globina (cuyos cebadores fueron un regalo del Dr. T. Huisman, Dept. Molecular Biology, Medical College of Georgia, Augusta, USA), bien con un fragmento de 102 bp del dominio de unión al ADN del gen del receptor de estrógenos. Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa del 1-1,5%, que, una vez teñido, fué fotografiado. Mediante densitometría de los negativos fotográficos se obtuvo la intensidad relativa de las dos bandas (la del HER-2/neu y el gen de referencia) de cada una de las calles del gel. Las Figuras 13 y 14 muestran resultados representativos de las 90 muestras estudiadas.

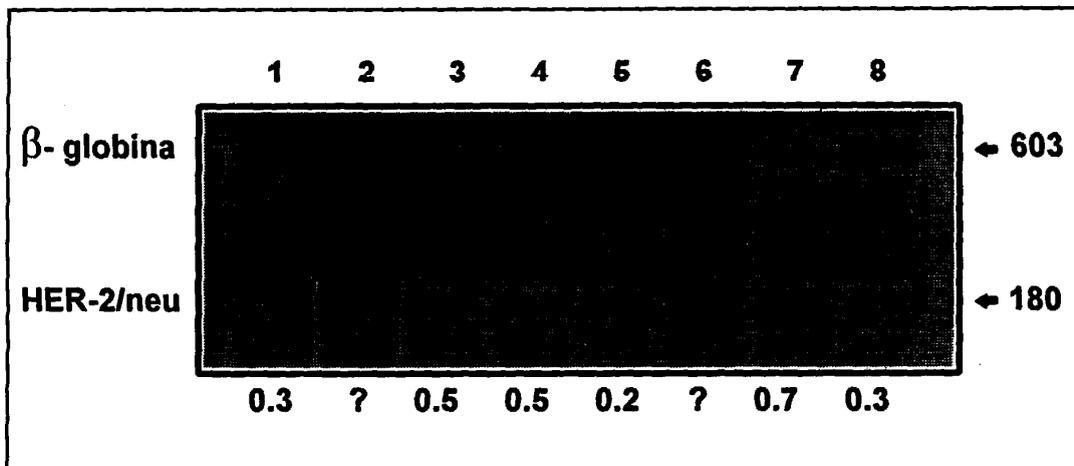


FIGURA 13. Estimación de la amplificación del gen HER-2/neu mediante PCR diferencial utilizando el gen de la β -globina como gen de referencia y gel de agarosa. Las calles 1, 3 y 5 son tejido de mama sano.

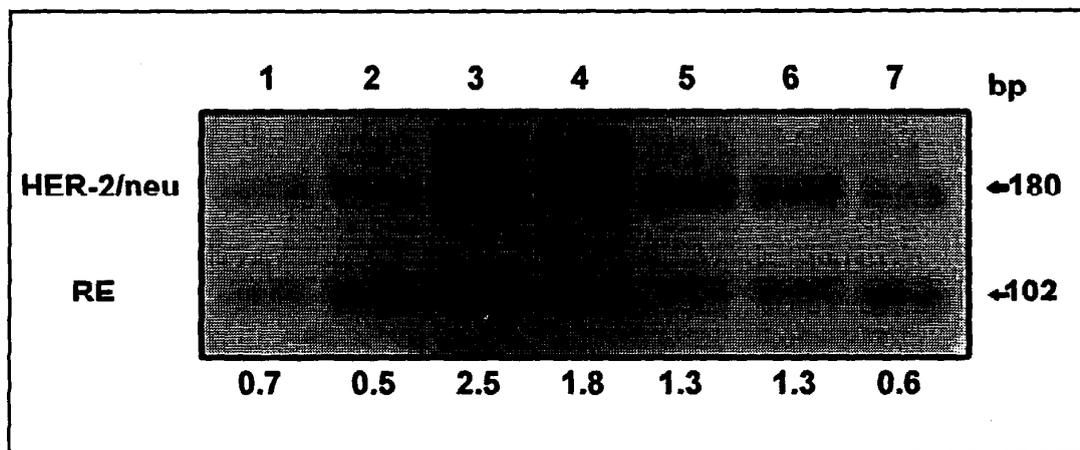


FIGURA 14. Estimación de la amplificación del gen HER-2/neu mediante PCR diferencial utilizando el gen del RE como gen de referencia y gel de agarosa. Las calles 1, 3 y 5 son tejido de mama sano.

Los resultados obtenidos no fueron suficientemente satisfactorios, y nos obligaron a modificar esta primera aproximación metodológica. Las razones principales de ello fueron las siguientes:

- 1.- En el caso de la co-amplificación del HER-2/neu con el gen de la beta-globina, la longitud de los fragmentos amplificados era muy diferente (180 bp versus 630 bp). Ello hacía que en muestras normales (control) la banda del gen de la beta-globina fuese mucho más intensa -por la incorporación de una mayor cantidad del agente intercalante, bromuro de etidíó, en el ADN, al fragmento génico de mayor longitud- que la banda del HER-2/neu (véase la Figura 13). En esas condiciones la estimación densitométrica del número de copias génicas resultaba difícil.

- 2.- La elección del gen del receptor de estrógenos, como uno de los genes de referencia, parecía que no había sido muy afortunada. La razón principal que fundamentó nuestra elección de este gen como uno de los de referencia fué la larga tradición que tenía nuestro laboratorio en el estudio del receptor de estrógenos, y, en consecuencia, la posibilidad de utilizar los cebadores en otras líneas de investigación relacionadas con los mismos. Sin embargo, en el transcurso de nuestra experimentación se publicaron dos artículos que indicaban que este gen estaba amplificado en un cierto porcentaje de tumores de mama, lo cual cuestionaba lo adecuado de su elección como gen de referencia (número diploide de copias) para la PCR.

- 3.- La utilización del gel de agarosa para separar los productos de la PCR y obtener un negativo fotográfico que permitiera estimar las intensidades relativas de las bandas mediante densitometría, no resultó tampoco ser la idónea. La agarosa es el soporte estandar utilizado en los estudios del ADN mediante la técnica del Southern blot. Sin embargo, su utilización en la separación de los productos de la PCR no permitía obtener imágenes lo suficientemente nítidas como para conseguir datos de densitometría fiables (véanse las Figuras 13 y 14).

Por todo lo anterior se decidió modificar la metodología de la PCR, en el siguiente sentido:

- 1.- Se eligieron dos nuevos genes de referencia muy estudiados y que, de acuerdo con la literatura, están presentes en un número diploide de copias en el cáncer de mama: el beta-interferón y el gamma-interferón. Estos dos genes cumplían además la condición de estar situados en diferentes cromosomas entre sí (el cromosoma 9, el beta interferón, y el cromosoma 12, el gamma-interferón) y con respecto al HER-2/neu (cromosoma 17), cumpliendo así la condición necesaria para evitar los efectos enmascaradores de la aneuploidía.
- 2.- Se seleccionaron tamaños muy similares de fragmentos génicos a amplificar. Así, en una PCR se co-amplificaron un fragmento de 180 bp del HER-2/neu y un fragmento de 119 bp del gen del beta-interferón, mientras que en otra PCR se co-amplificaron un fragmento de 98 bp del dominio transmembranal

del HER-2/neu y un fragmento de 150 bp del gen del gamma-interferón. Como se puede apreciar, en la selección de los tamaños de los fragmentos a co-amplificar se tuvo además la precaución de seleccionar los fragmentos de forma que: en una PCR el fragmento a amplificar del HER-2/neu fuese ligeramente más largo que el fragmento del correspondiente gen de referencia, mientras que en la otra el fragmento del HER-2/neu fuese ligeramente más corto.

3.- Se utilizó gel de poliacrilamida para la separación electroforética de los productos de la PCR, al comprobarse que producían una mayor nitidez en las imágenes fotográficas.

4.- Un punto importante de la metodología desarrollada consistió en estandarizar las condiciones de la PCR diferencial, de manera que:

A) la relación de intensidades densitométricas entre las bandas co-amplificadas del HER-2/neu y el gen de referencia estuviese próxima a 1 en muestras de mama normales y en líneas celulares con un número diploide conocido para los genes en estudio;

B) conociéramos la sensibilidad de la técnica, es decir, el número mínimo de copias extra que éramos capaces de detectar.

Por lo que respecta al punto A, las condiciones idóneas para la PCR se establecieron con 20 mamas normales y las líneas celulares A431 y MDA-MB468 (Figuras 15 y 16). Las relaciones de intensidades conseguidas entre el HER-2/neu y el gen de referencia, estuvieron siempre entre 0,8 y 1,2, lo que se consideró como aceptable.

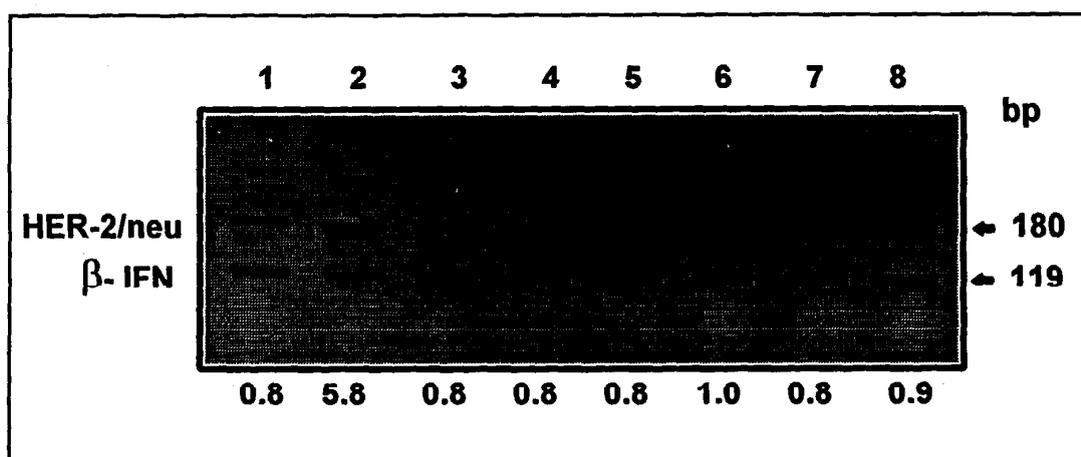


FIGURA 15. Estimación de la amplificación del gen HER-2/neu mediante PCR diferencial utilizando el gen del β -interferón como gen de referencia. Las calles 1 y 3-8 son líneas celulares y tejido de mama sano. La calle 2 es tumor de mama con el gen HER-2/neu amplificado.

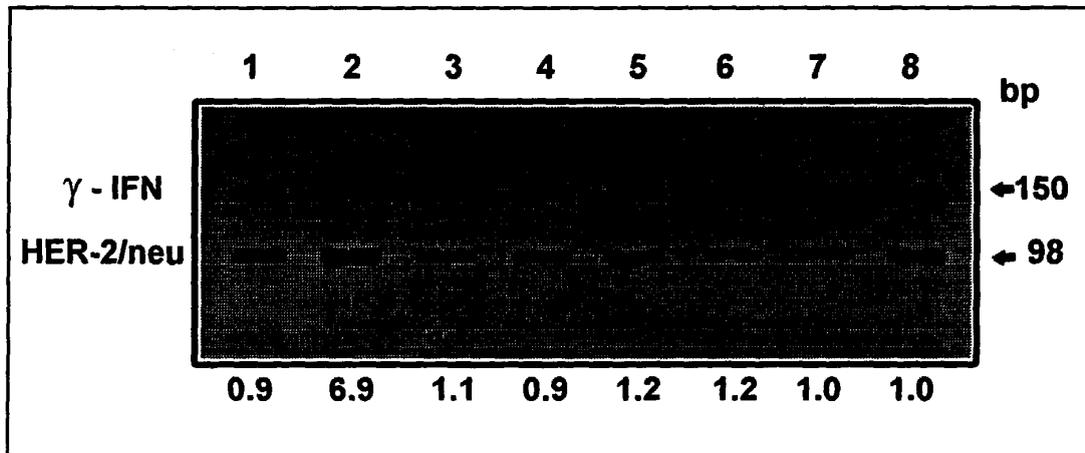


FIGURA 16. Estimación de la amplificación del gen *HER-2/neu* mediante PCR diferencial utilizando el gen del γ -interferón como gen de referencia. Las calles 1 y 3-8 son líneas celulares y tejido de mama sano. La calle 2 es tumor de mama con el gen *HER-2/neu* amplificado.

En relación al punto B, se utilizó ADN de la línea celular de tumor de mama MCF-7, que es hemicigota para el HER-2/neu. La Figura 17 muestra que para esta línea celular la relación de intensidad HER-2/neu vs. gen de referencia era 0.5. En consecuencia, la PCR diferencial era capaz de distinguir, al menos, entre situaciones en las cuales el número de copias del HER-2/neu y el gen de referencia diferían por un factor de 2.

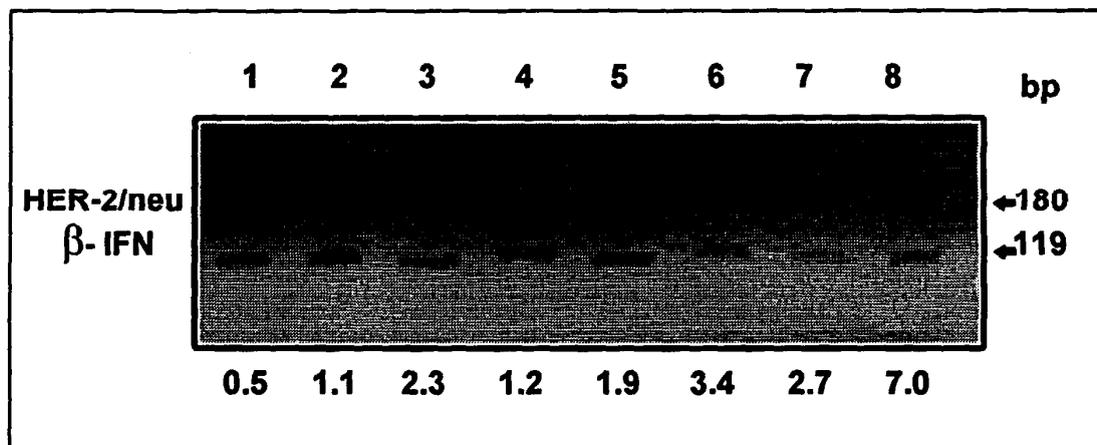


FIGURA 17. Estimación de la amplificación del gen HER-2/neu mediante PCR diferencial en la línea celular MCF-7 (calle 1) y distintos especímenes tumorales (calles 2, 3 y 5-8). La calle 4 es tejido mamario sano.

Naturalmente, la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante una metodología novedosa como la PCR diferencial requiere, además de una puesta a punto adecuada, de la validación de sus resultados mediante otra metodología más clásica y de uso más cotidiano en laboratorios especializados. En nuestro caso, esto se realizó estudiando paralelamente, mediante PCR diferencial y Southern blot, 42 muestras seleccionadas de tumores de mama. Como sonda para el Southern se empleó el fragmento de 180 bp del gen HER-2/neu generado

mediante PCR. Los resultados fueron altamente coincidentes. La Figura 18 es representativa de los resultados obtenidos por Southern blot.

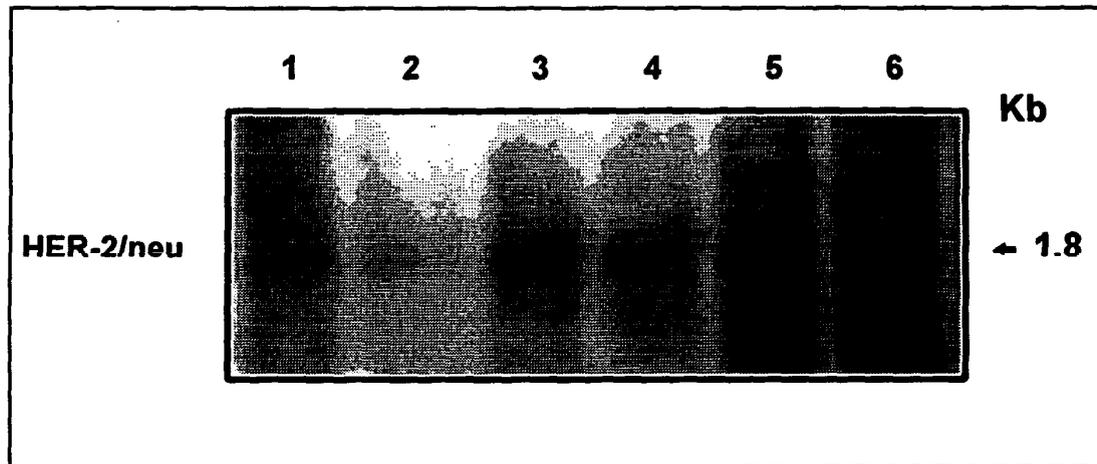


FIGURA 18. *Estimación de la amplificación del gen HER-2/neu mediante PCR diferencial en especímenes tumorales mediante Southern blot. La calle 1 es tejido mamario sano.*

4.1.2. AMPLIFICACION DEL HER-2/NEU EN EL CANCER DE MAMA

Una vez puesta a punto la técnica de la PCR diferencial, se procedió a su aplicación en el estudio del número de copias del HER-2/neu en 415 especímenes de cáncer de mama primarios infiltrantes disponibles en el Banco de Tumores de la Unidad de Tumores Sólidos del Departamento de Endocrinología Celular y Molecular.

Resultados representativos se muestran en las Figuras 19 y 20. En los pies de esas figuras aparecen, para cada una de las calles, los valores densitométricos de las relaciones de intensidades entre las bandas del HER-2/neu y el gen de referencia. Como norma cada PCR diferencial incluyó la amplificación de dos muestras de tejido mamario sano, además

de los problemas. También, como norma, en cada electroforesis se incluyó (en la calle 1) los productos de PCR de un tejido mamario sano (control negativo).

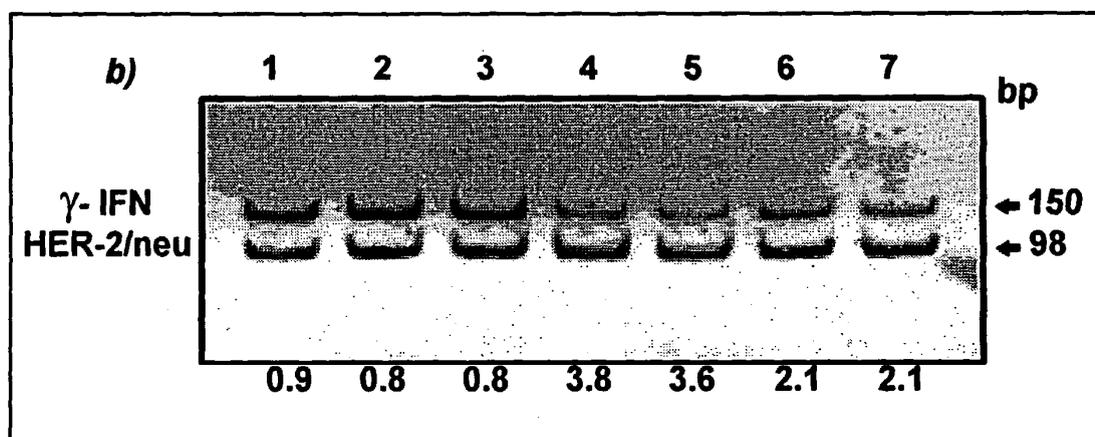
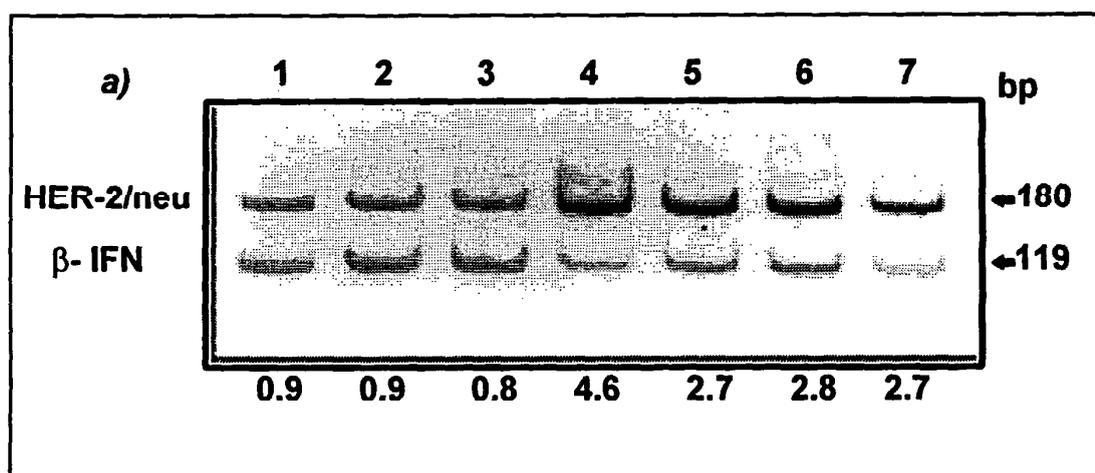


FIGURA 19. Estimación de la amplificación del gen *HER-2/neu* mediante PCR diferencial en distintos especímenes tumorales. La calle 1 es tejido mamario sano.

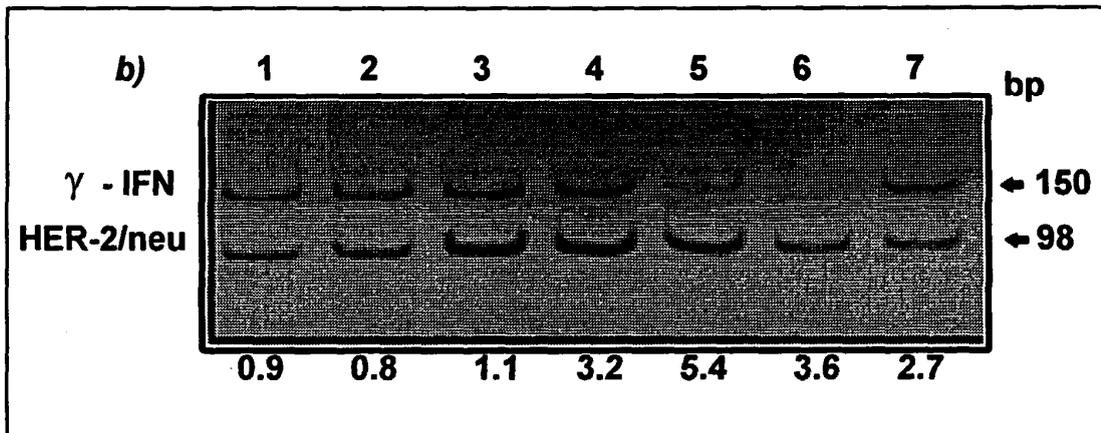
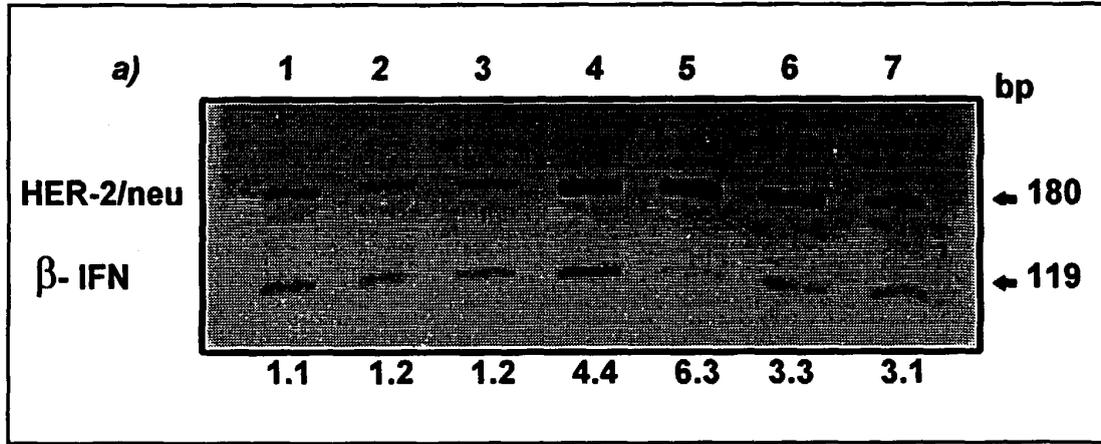


FIGURA 20. Estimación de la amplificación del gen *HER-2/neu* mediante PCR diferencial en distintos especímenes tumorales. La calle 1 es tejido mamario sano.

Las relaciones de intensidades de las bandas del HER-2/neu/gen de referencia de los tumores de mama estudiados oscilaron entre 0,4 a más de 8. Una decisión importante fué la de establecer cual era la relación de intensidad a partir de la cual se tenía la completa certeza de la presencia de un número extra de copias del HER-2/neu. A ese respecto, un punto de referencia importante era el conocimiento que teníamos de que para tejido mamario sano la relación de intensidades oscilaba entre 0,8 y 1,2.

Dos aspectos más fueron determinantes en el momento de tomar la decisión. El primero fué el conocimiento que las piezas tumorales estudiadas incluían, además del tejido tumoral propiamente dicho, un porcentaje no despreciable de tejido sano, el cual ejercería un efecto diluyente variable y no cuantificable de un modo preciso para cada muestra. Efecto, por otra parte, ya apuntado por Slamon y col. (18,19) en sus artículos ya clásicos sobre la amplificación del HER-2/neu en el cáncer de mama.

El segundo fué el dato referido por el grupo de Liu y col. - único grupo, por otra parte, que ha estudiado la amplificación del HER-2/neu en cáncer de mama mediante PCR diferencial -, quienes encontraron, utilizando condiciones de PCR diferencial muy similares a las empleadas por nosotros, una relación densitométrica de 1,8 entre el HER-2/neu y el gen de referencia en la línea celular de tumor de mama SK-BR-3, la cuál es sabido que contiene entre 4 y 8 copias del gen HER-2/neu (128).

Todo lo expuesto nos llevó a considerar - quizás de un modo excesivamente conservador, pero a la vez extremadamente fiable -, que una relación de intensidades $\geq 1,7$ era la adecuada como punto de corte para considerar la presencia de un número extra de

copias del gen HER-2/neu en la muestra tumoral. Además, y con objeto de reforzar la seguridad de nuestra decisión, consideramos que ese valor de $\geq 1,7$ debería de ser cumplido cuando comparáramos la intensidad de la banda del HER-2/neu con los dos genes de referencia. Dicho de otro modo, siempre que la relación de intensidad del HER-2/neu con al menos un gen de referencia fuera de 1,6 o inferior, consideráramos que la muestra contenía un número diploide de copias del gen HER-2/neu.

Como se muestra en la Figura 21, de los 415 tumores estudiados, 63 (15%) mostraron algún grado de amplificación del gen HER-2/neu.

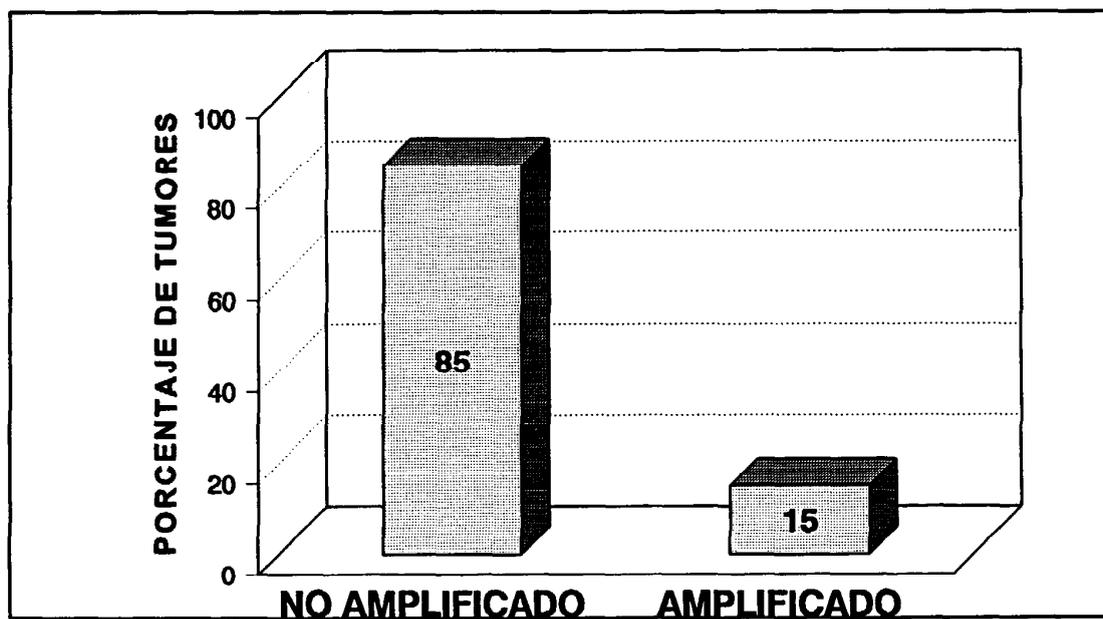


FIGURA 21. Número de tumores con el gen HER-2/neu amplificado en los 415 especímenes tumorales estudiados.

4.1.3. ESTIMACION CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE LA ONCOPROTEINA p185^{HER-2/neu}

Un objetivo importante de nuestro trabajo fué el utilizar un método que nos permitiera determinar cuantitativamente la expresión de la p185^{HER-2/neu}. Hasta la fecha en que se escribe esta Memoria (julio de 1994) no tenemos conocimiento de ninguna publicación al respecto aplicada a una serie amplia de especímenes de cáncer de mama.

La clonación del oncogén HER-2/neu y la purificación de la p185^{HER-2/neu} a finales de los años 80, permitió generar anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra distintos epitopos de la proteína. Entre ellos, dos anticuerpos monoclonales, el NB-3 y el TA-1, dirigidos contra distintos epítomos del dominio extracelular de la proteína fueron estudiados en profundidad y caracterizados, comprobándose que no producían reacción cruzada con proteínas homólogas, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (130). A partir de esos dos anticuerpos Oncogene Science, Inc. desarrolló y comercializó un ELISA, único procedimiento disponible en el mercado para la determinación cuantitativa de los niveles de la p185^{HER-2/neu}, y que es el que nosotros hemos utilizado en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos sobre la distribución de los niveles de la p185^{HER-2/neu} en los 415 especímenes tumorales se muestra en la Figura 22. Los valores oscilaron entre 0 y 1945 fmol/mg de proteína, mediana: 89 fmol/mg proteína, media \pm ESM: 169,1 \pm 12,4 fmol/mg proteína.

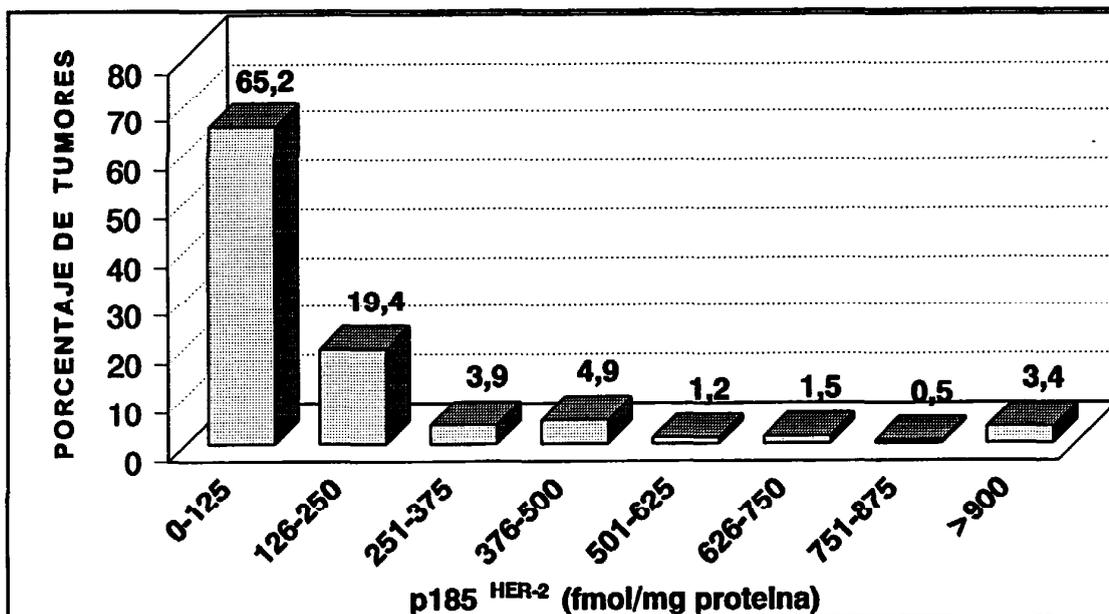


FIGURA 22. Distribución de los niveles de expresión de la p185^{HER-2/neu} en los 415 especímenes tumorales estudiados.

La p185^{HER-2/neu} es una proteína transmembranal de la membrana plasmática de las células y, en consecuencia, debe de estar presente tanto en el homogenado del tejido como, y más específicamente, en la fracción microsomal del mismo (que incluye la membranas plasmática, del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi). En el procedimiento de ELISA utilizado, la p185^{HER-2/neu} se extraía del homogenado tisular, del que era disuelta por el detergente presente en el tampón de extracción. Con la idea de conocer la posible correlación de los niveles de expresión de oncoproteína tal y como era medida, a partir del homogenado, con aquellos que presentes en la fracción microsomal, se realizó, en 30 especímenes seleccionados (20 con un nivel bajo de expresión de la p185^{HER-2/neu} y 10 con la oncoproteína sobreexpresada), un ELISA paralelo para estimar el nivel de expresión de la p185^{HER-2/neu} extraída a partir de la fracción microsomal. La Figura 23 muestra los resultados obtenidos.

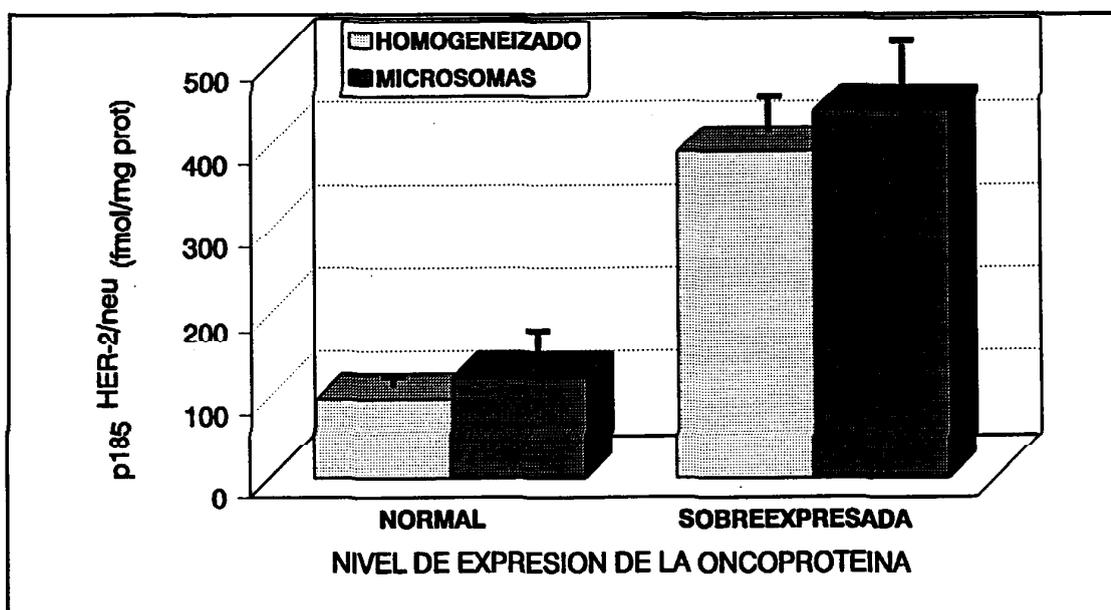


FIGURA 23. Comparación de los niveles de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$ en homogeneizado y microsomas de 30 especímenes tumorales.

Como se puede apreciar se encontró una alta correlación al comparar ambas aproximaciones experimentales, siendo los niveles de la $p185^{HER-2/neu}$ estimados a partir de la fracción microsomal siempre ligeramente más elevados que los obtenidos a partir del homogenado.

Dado lo novedoso de este método de estimación cuantitativa de la expresión de la $p185^{HER-2/neu}$, y al igual que se hizo cuando se desarrolló metodológicamente la PCR diferencial, consideramos oportuno y necesario validar el ELISA mediante otro procedimiento. En este caso elegimos el Western blot, que es un procedimiento de determinación semicuantitativa de la concentración de una proteína y ampliamente utilizado

por los laboratorios de biología molecular, si bien su utilización en el estudio de los niveles de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$ es más bien escaso.

Como anticuerpo elegimos el Ab-3 comercializado por Oncogene Science, Inc. y que ha sido ampliamente caracterizado (131). El Ab-3 es un anticuerpo monoclonal generado en ratón y que se desarrolló contra un péptido del dominio citosólico de la $p185^{HER-2/neu}$.

La Figura 24 es una muestra representativa de los resultados obtenidos con 86 especímenes de mama seleccionados. En la parte inferior de la figura se presentan los datos numéricos obtenidos por ELISA sobre los niveles de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$ en la muestra correspondiente. Como se puede apreciar se obtuvo una alta correlación al determinar los niveles de la $p185^{HER-2/neu}$ por ambos métodos.

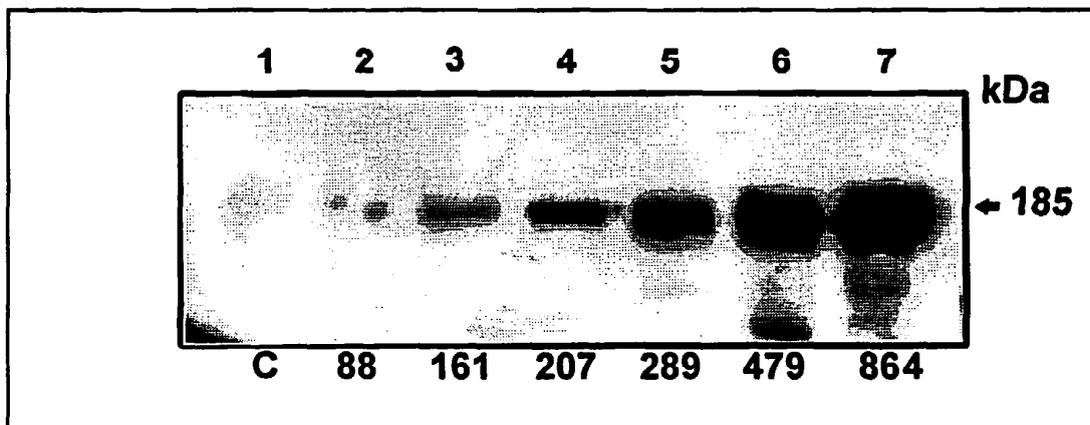


FIGURA 24. Estimación de los niveles de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$ mediante Western blot. La calle 1 (C) es control.

4.1.4. ESTADO DE FOSFORILACION DE LA p185^{HER-2/neu}

Dadas las características funcionales de la p185^{HER-2/neu}, ya apuntadas en la Introducción, es indudable que el hecho de que esta oncoproteína se halle sobreexpresada en un espécimen tumoral, no supone necesariamente que sea funcional. Dicho de otra manera, no podemos establecer una vinculación inmediata y directa entre la sobreexpresión de la p185^{HER-2/neu} y el aumento de su actividad tirosina quinasa. Por otra parte, la ausencia de ligandos conocidos (hasta muy recientemente) y comercializados y de sustratos proteicos específicos y fosforilables por la p185^{HER-2/neu} dificulta enormemente el conocimiento de su estado de actividad.

Un procedimiento indirecto, pero válido, para conocer el estado de actividad de esta oncoproteína es el de estimar su estado de fosforilación. Como ya se apuntó en la Introducción, la actividad tirosina quinasa de la p185^{HER-2/neu} se manifiesta cuando la proteína está fosforilada, de manera que midiendo el estado de fosforilación de la proteína se puede tener una estimación fiable del estado de actividad enzimática de la misma.

Dado su evidente interés, decidimos medir el estado de fosforilación de la p185^{HER-2/neu} en 86 especímenes de cáncer de mama seleccionados de los que teníamos conocimiento de los niveles de expresión de esta proteína a través del ELISA y, en parte de ellos, a través del Western blot con Ab-3. Para ello utilizamos microsomas tumorales, el procedimiento del Western blot y el anticuerpo anti-fosfotirosina Y20 comercializado por ICN. Como control positivo (calle 1) empleamos la línea celular A431, ya citada, que sobreexpresa el EGFR fosforilado. La Figura 25 es una muestra representativa de los resultados obtenidos. En el

pie de la figura aparecen los valores cuantitativos de concentración de la $p185^{HER-2/neu}$ obtenidos mediante ELISA en la correspondiente muestra. Como se observa hay una excelente correlación entre los niveles de expresión de la oncoproteína y la intensidad banda de 185 kD indicadora semicuantitativa del estado de fosforilación de la $p185^{HER-2/neu}$.

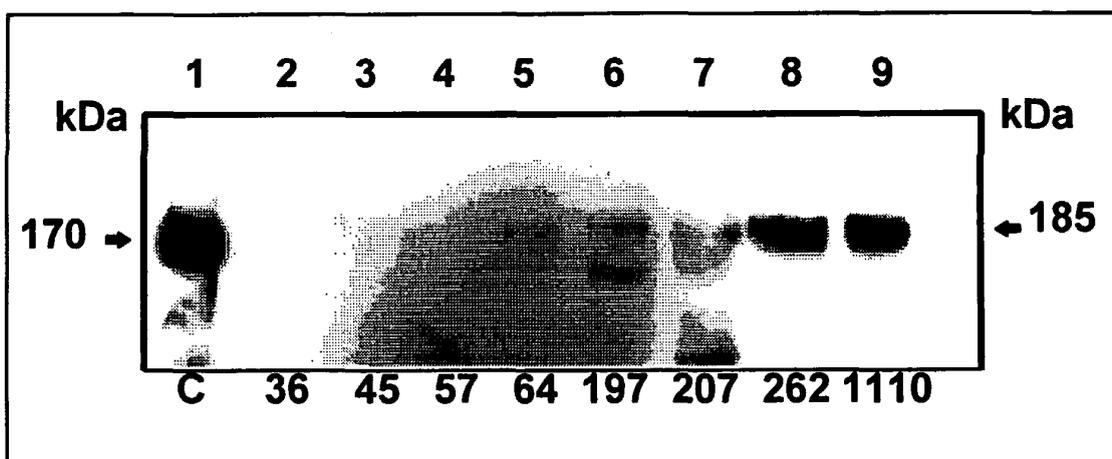


FIGURA 25. Estimación del estado de fosforilación de la $p185^{HER-2/neu}$ mediante Western blot. La calle 1 (C) es control.

La Figura 26 resume los resultados obtenidos al comparar los datos de expresión y fosforilación de la $p185^{HER-2/neu}$ en las 86 muestras estudiadas. Como se aprecia, de las 40 muestras con un nivel bajo de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$, ninguna (0%) dió señal de fosforilación de la proteína, mientras que de las 46 muestras con un nivel medio y alto de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$, 38 (83%) mostraron una intensidad de banda apreciable. Parece pues evidente que, y al menos en el cáncer de mama, la medición del nivel de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$ es un indicador bastante fiable del estado de actividad de la oncoproteína.

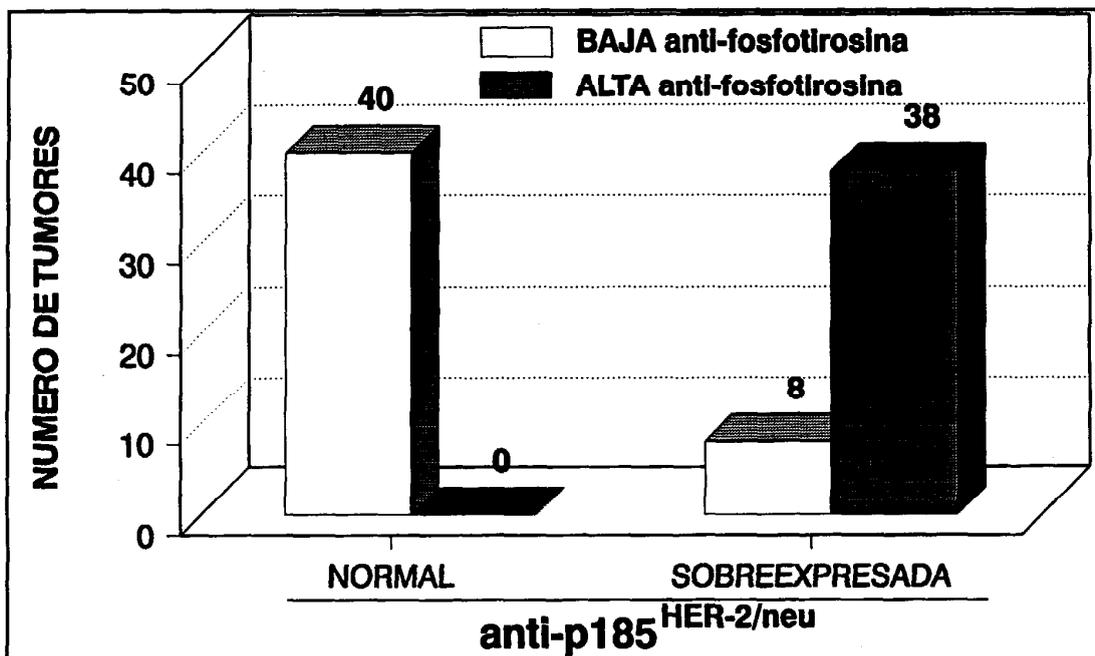


FIGURA 26. Relación entre el nivel de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$ y el estado de fosforilación de la oncoproteína.

Si bien el Ab-3 y el Y20 son anticuerpos bien caracterizados y que reconoce específicamente a la $p185^{HER-2/neu}$, el primero, y las proteínas fosforiladas en tirosina, el segundo, nos pareció importante el confirmar que no mostraban reacción cruzada con otras proteínas. En particular, dadas las similitudes estructurales de la $p185^{HER-2/neu}$ y el EGFR, era preciso confirmar su especificidad. Obviamente, un débil o moderado reconocimiento del EGFR podría alterar los resultados obtenidos con la $p185^{HER-2/neu}$ y más si se tiene en cuenta - tal y como se comentó en la Introducción - que el EGFR se encuentra sobreexpresado en un cierto porcentaje de tumores mamarios. Con ese fin, y utilizando diez tumores seleccionados, hicimos un Western blot utilizando el Y20, con la particularidad de que la muestra que cargamos en los pocillos del gel de la electroforesis eran microsomas que habían sido

immunoprecipitados con el Ab-3. Como control positivo utilizamos microsomas de la línea celular vulvar A431, la cual es conocida que sobreexpresa el EGFR. La Figura 27 es una muestra representativa de los resultados obtenidos, y de ella se deduce claramente que no existía reacción entre el Ab-3 y el EGFR, por lo que los resultados obtenidos con el Ab-3, y por ende - dada la alta correlación mostrada - con el ELISA son fiables.

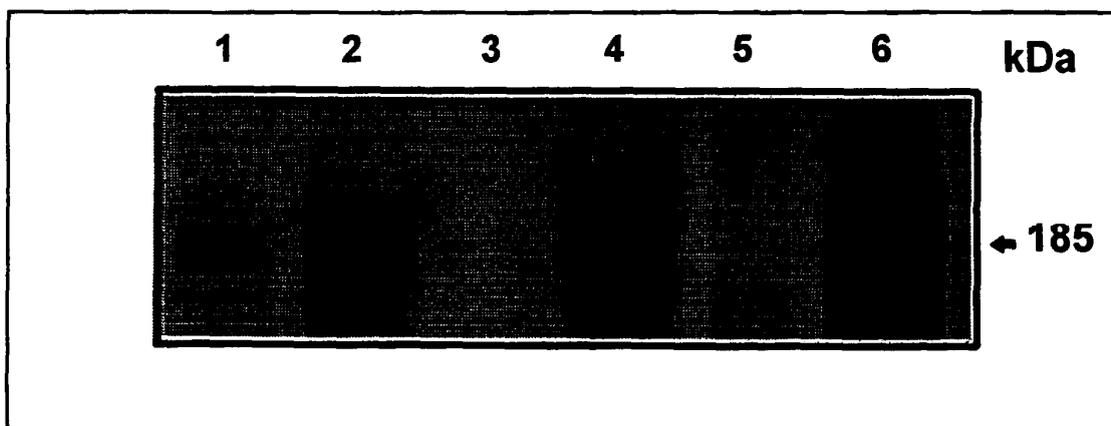


FIGURA 27. Estimación del grado de especificidad de los anticuerpos Ab-3 y Y20 para la detección de la $p185^{HER-2/neu}$. Las calles 1 y 6 son microsomas. Las calles 2 y 4 son el sedimento de microsomas tratados con Ab-3. Las calles 3 y 5 son el sobrenadante de microsomas tratados con Ab-3.

4.1.5. CORRELACION ENTRE LA AMPLIFICACION GENICA DEL HER-2/neu Y LOS NIVELES DE EXPRESION DE LA p185^{HER-2/neu}

Uno de los objetivos principales de este trabajo fué el de comparar los datos obtenidos por PCR diferencial acerca del estatus génico del HER-2/neu en los cánceres de mama estudiados, con los valores cuantitativos obtenidos mediante ELISA sobre la expresión de la p185^{HER-2/neu} en esos tumores. Lo que se pretendía era saber si los resultados de la PCR estaban correlacionados con los del ELISA y, y más importante, se era posible establecer un valor de expresión de la p185^{HER-2/neu} que permitiera dicotomizar los datos cuantitativos de la expresión de la oncoproteína y poder así discernir de manera segura si la p185^{HER-2/neu} estaba sobreexpresada o no.

La Figura 28 resume los resultados obtenidos de la comparación de la PCR diferencial y el ELISA en los 415 cánceres de mama analizados. Como se puede observar, de las 63 muestras que mostraron el gen HER-2/neu amplificado, 56 (89%) tenían un nivel de expresión de la p185^{HER-2/neu} mayor que 250 fmol/mg proteína. De los restantes 352 tumores donde el gen HER-2/neu se encontraba no amplificado, 339 (96%) mostraron niveles de expresión de la p185^{HER-2/neu} menores que 250 fmol/mg de proteína. A partir de esos datos, establecimos que 250 fmol/mg de proteína de p185^{HER-2/neu} es un punto de corte aceptable para la estimación cuantitativa de la sobreexpresión de la oncoproteína.

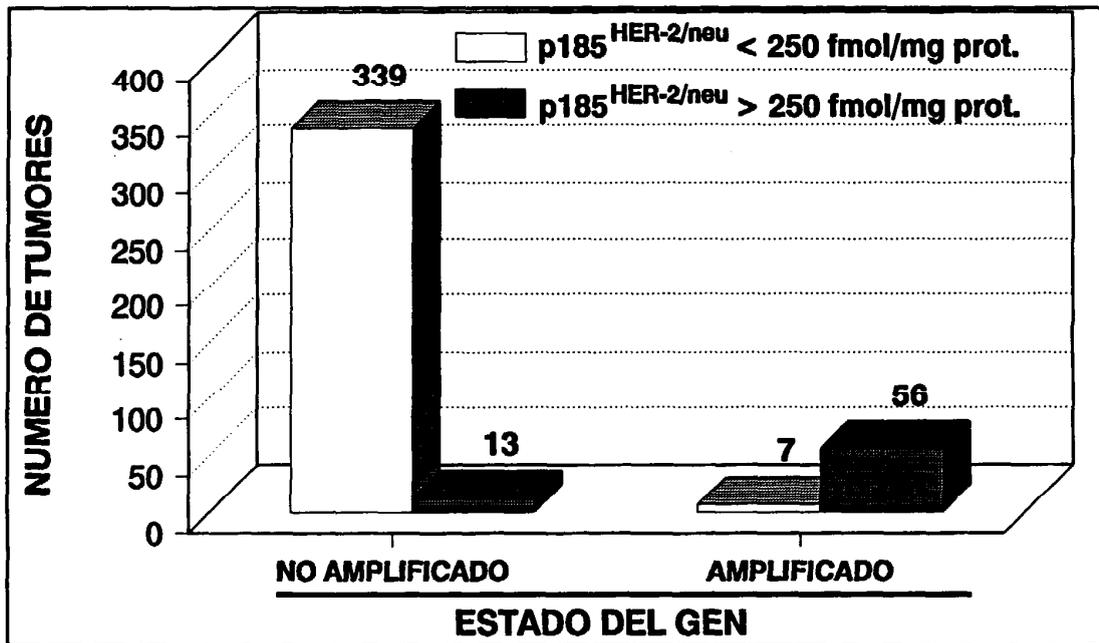


FIGURA 28. Asociación entre el estado del gen *HER-2/neu* y el nivel de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$.

Otro aspecto que resultaba interesante conocer era el de saber si en los tumores con el gen *HER-2/neu* amplificado existía una asociación entre el número de copias génicas del *HER-2/neu* y el nivel de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$. La Figura 29 resume los datos obtenidos. Como se puede observar, no se apreció una asociación lineal positiva entre ambos parámetros.

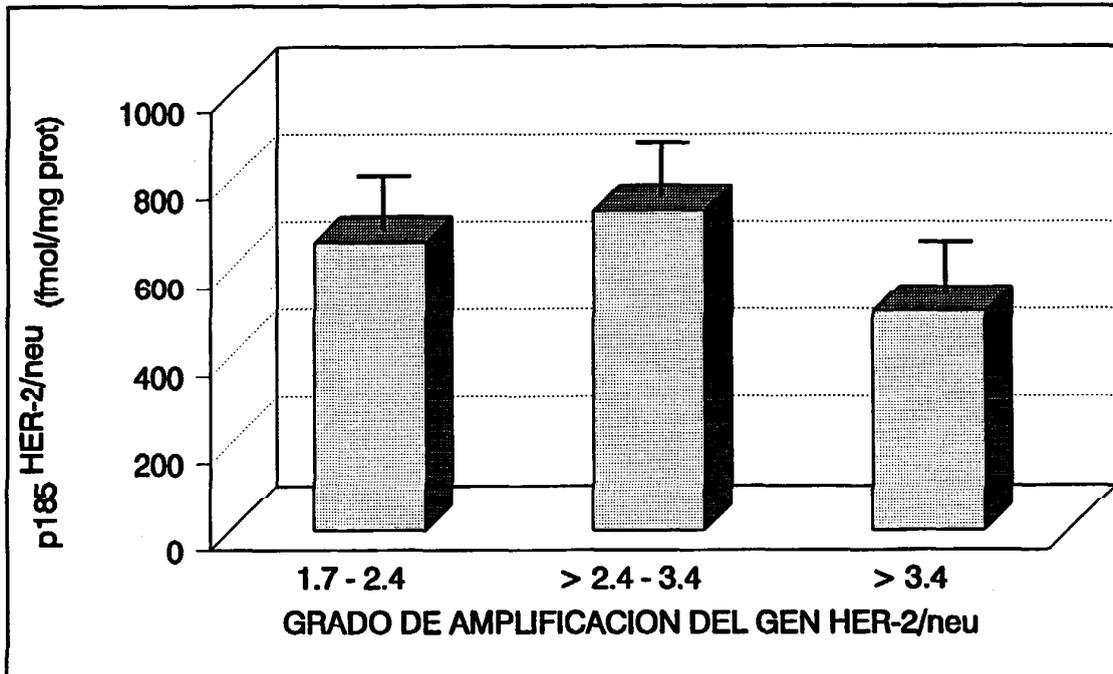


FIGURA 29. Relación entre el grado de amplificación del gen *HER-2/neu* y el nivel de expresión de la $p185^{HER-2/neu}$.

Dada la alta correlación encontrada entre la amplificación del gen *HER-2/neu* y la sobreexpresión y fosforilación de la $p185^{HER-2/neu}$, consideramos conveniente utilizar el término (estado de) activación del *HER-2/neu* para referirnos indistintamente a la situación encontrada para cualquiera de estas tres variables.

4.2. RELACION DE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu CON MARCADORES TUMORALES

Hemos estudiado prospectivamente una serie de 415 pacientes diagnosticadas cáncer de mama invasivo e intervenidas quirúrgicamente en los Hospitales de la red del INSALUD de la provincia de Las Palmas en el período comprendido entre octubre de 1990 y marzo de 1994 y cuyos especímenes tumorales fueron enviados a la Unidad de Tumores Sólidos del Departamento de Endocrinología Celular y Molecular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria para realizarles un estudio de los receptores de estrógenos y progesterona. No se estableció ningún criterio de exclusión de los pacientes, si exceptuamos el sexo, puesto que en el estudio se han excluido a los varones. Podemos considerar pues, que la serie estudiada incluyó casos consecutivos. Esto es cierto por lo que respecta a los especímenes registrados en la Banco de Tumores de nuestra Unidad, si bien, hay que significar que, por diferentes causas, un porcentaje impreciso de especímenes tumorales extirpados no fueron recibidos en la Unidad.

4.2.1. HER-2/NEU versus EDAD

La edad de las pacientes osciló entre 25 y 97 años, mediana: 59 años, media \pm ESM: $59,4 \pm 0,65$ años. Su distribución por frecuencias se muestra en la Figura 30. Se puede observar que solo el 7% de las pacientes tenían 40 años o menos, y que a partir de 51 años la distribución de edades por décadas presentó porcentajes similares.

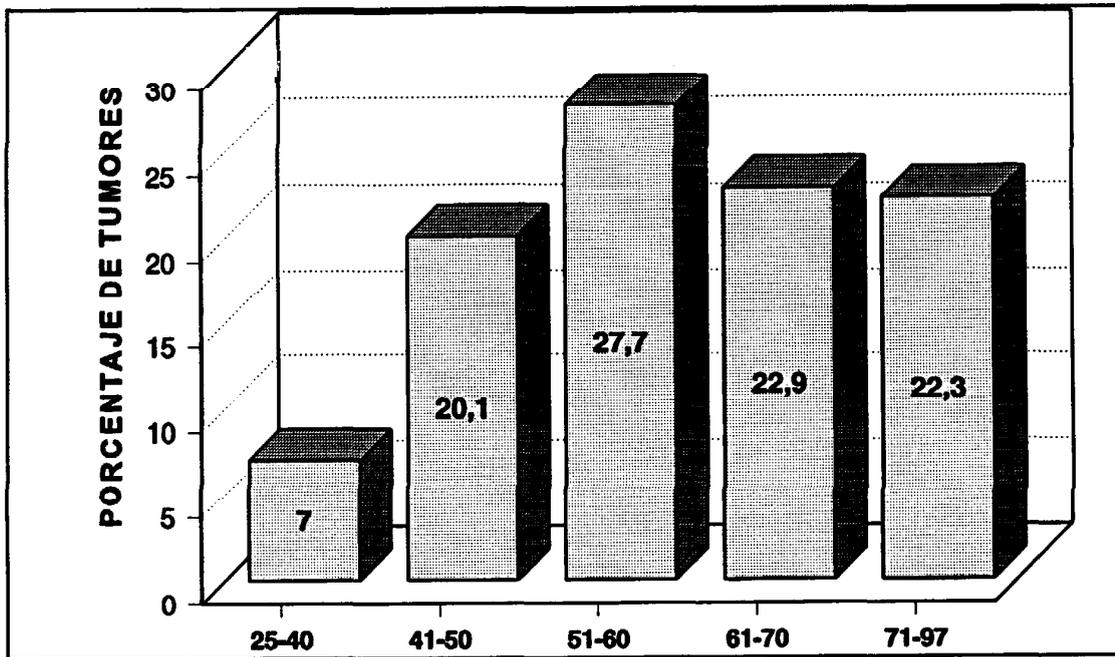


FIGURA 30. Distribución por edades de las 415 pacientes estudiadas.

La Figura 31 muestra la distribución de los especímenes tumorales con el HER-2/neu activado y no activado, agrupados en base a la edad de las pacientes. Mientras que el porcentaje de tumores con el HER-2/neu activado fué similar en las tres décadas comprendidas entre los 41 y los 70 años, dicho porcentaje fué significativamente menor ($P < 0.01$) en las pacientes de más de 70 años, comparado con las de 40 años o menos ($P < 0.01$), 51-60 años ($P < 0.04$) y 61-70 años ($P < 0.05$).

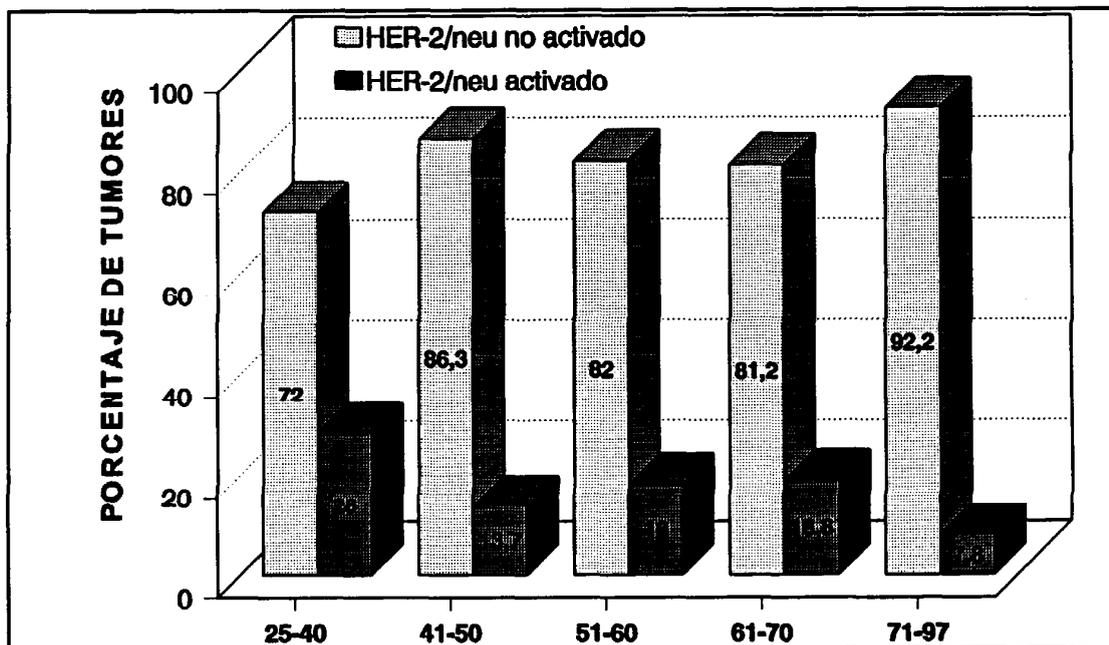


FIGURA 31. Asociación entre el estado de activación del gen HER-2/neu y la edad de las pacientes

4.2.2. HER-2/NEU versus MENOPAUSIA

El 74,6% de las pacientes eran menopáusicas en el momento del diagnóstico (Figura 32). No hubo diferencias significativas en el número de tumores con el HER-2/neu activado al comparar las pacientes pre/peri-menopáusicas con las post-menopáusicas (Figura 33).

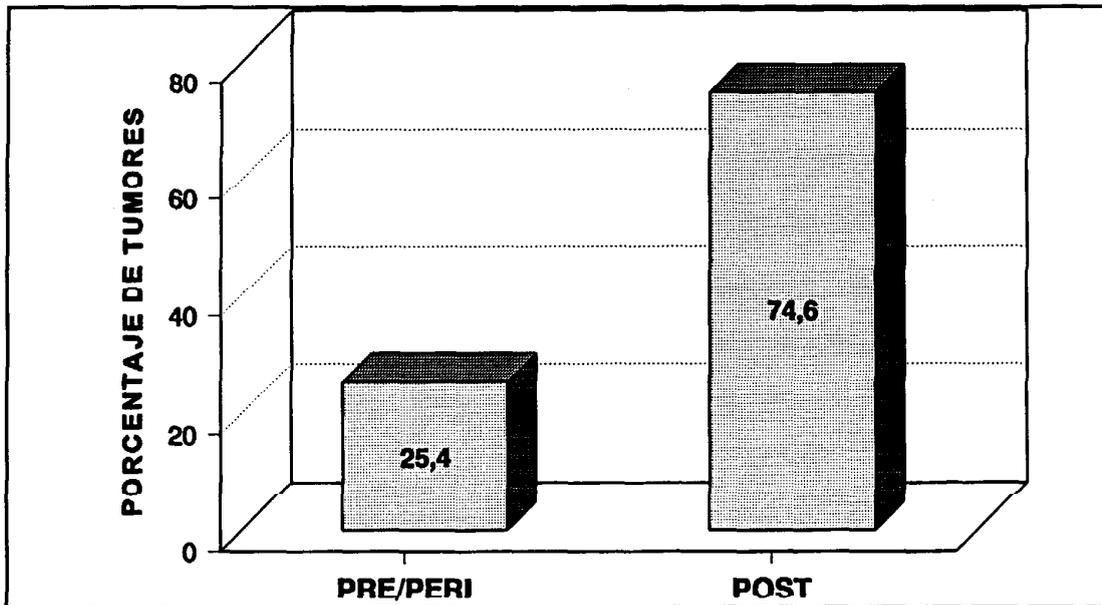


FIGURA 32. Distribución por estado menopáusico de las 415 pacientes estudiadas.

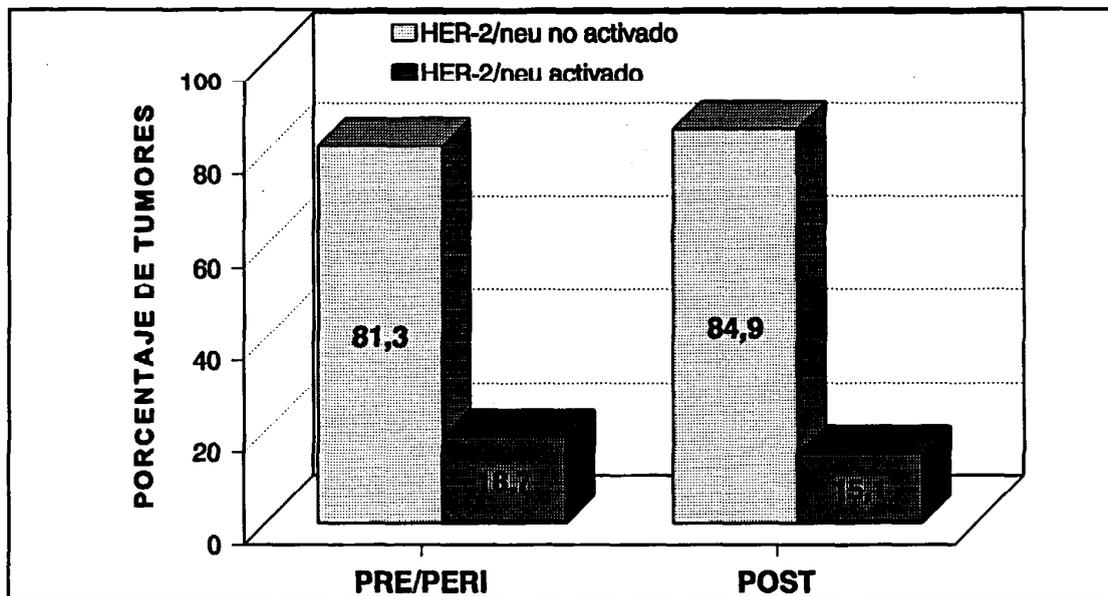


FIGURA 33. Asociación entre el estado de activación del HER-2/neu y el estado menopáusico de las pacientes.

4.2.3. HER-2/NEU versus TAMAÑO DEL TUMOR

La distribución de los especímenes tumorales agrupados de acuerdo con su tamaño se muestra en la Figura 34. Como se observa, el tamaño 2 fué, con diferencia, el más abundante. El número de tumores con HER-2/neu activado fué significativamente mayor en los tumores de tamaño 4 comparado con los de los tamaños 1 ($P < 0.05$) y 2 ($P < 0.03$) (Figura 35).

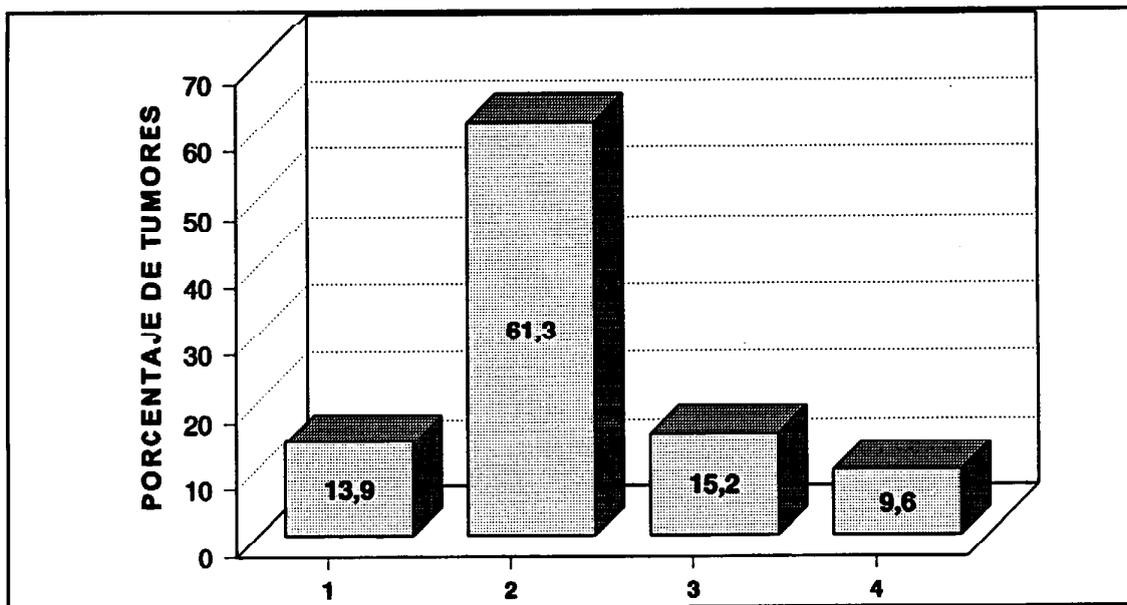


FIGURA 34. Distribución por tamaño tumoral de los 415 especímenes estudiados.

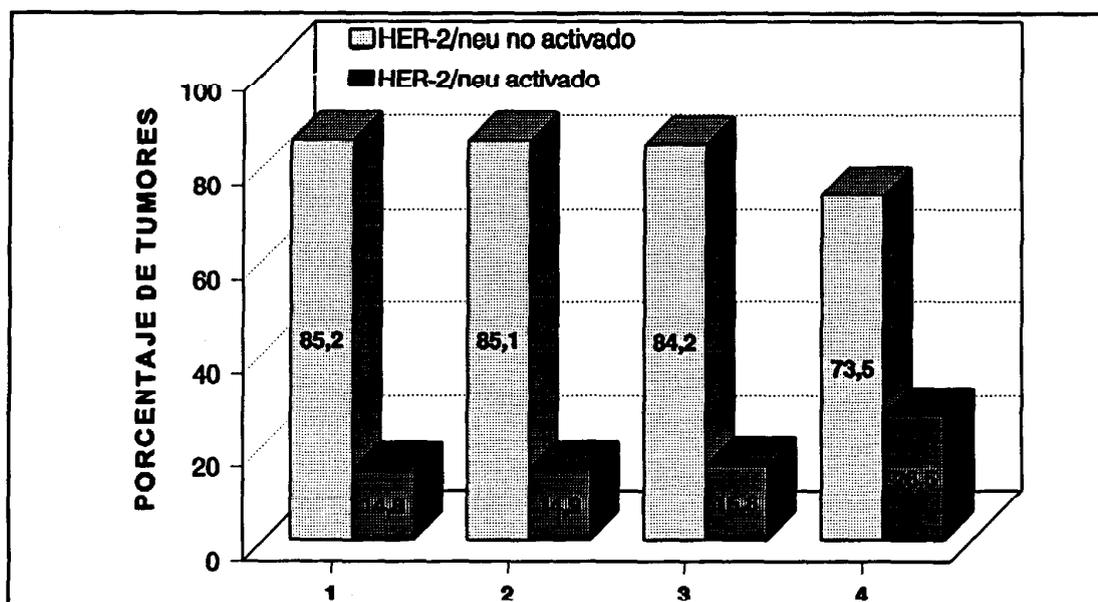


FIGURA 35. Asociación entre el estado de activación del HER-2/neu y el tamaño tumoral.

4.2.4. HER-2/NEU versus AFECTACION GANGLIONAR

El 53,5 % de las pacientes tenían afectados los ganglios axilares (N+), mientras que el 46,5 % eran no los tenían (N-). En 4 casos (1 %) no se tuvo conocimiento del estado de afectación ganglionar (Figura 36). No se observó diferencia significativa en el número de tumores que tenían el HER-2/neu activado al comparar los grupos N- y N+ (Figura 37). Esta ausencia de significación persistió cuando los pacientes con adenopatía axilar se distribuyeron en dos grupos: aquellos que tenían afectados de 1 a 3 ganglios, y los que tenían afectados más de 3 ganglios (no mostrado)

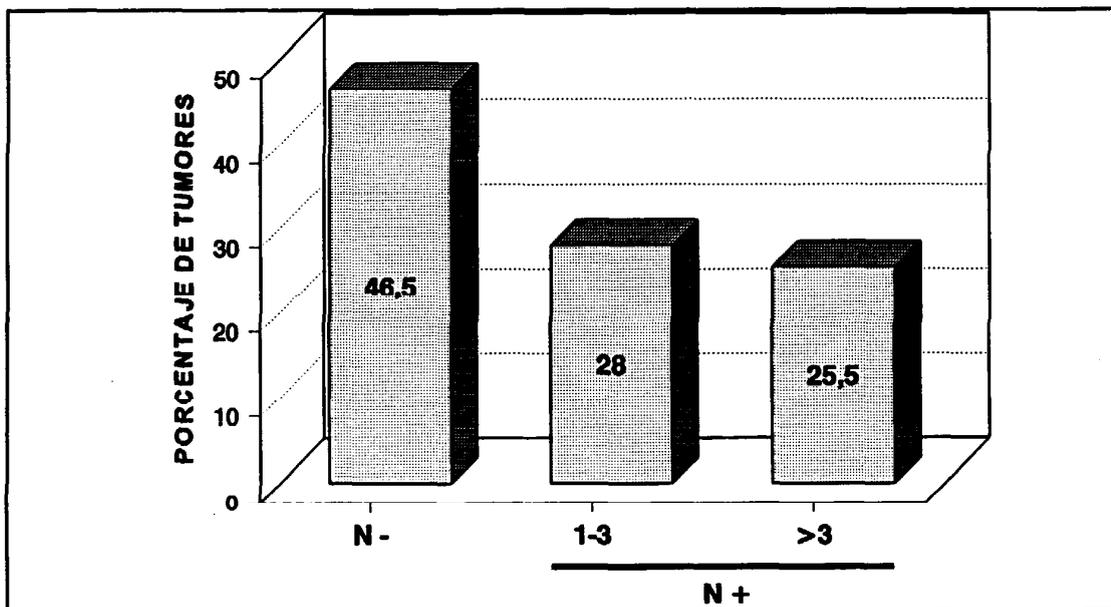


FIGURA 36. Distribución de las 415 pacientes estudiadas en base al estado de afectación ganglionar.

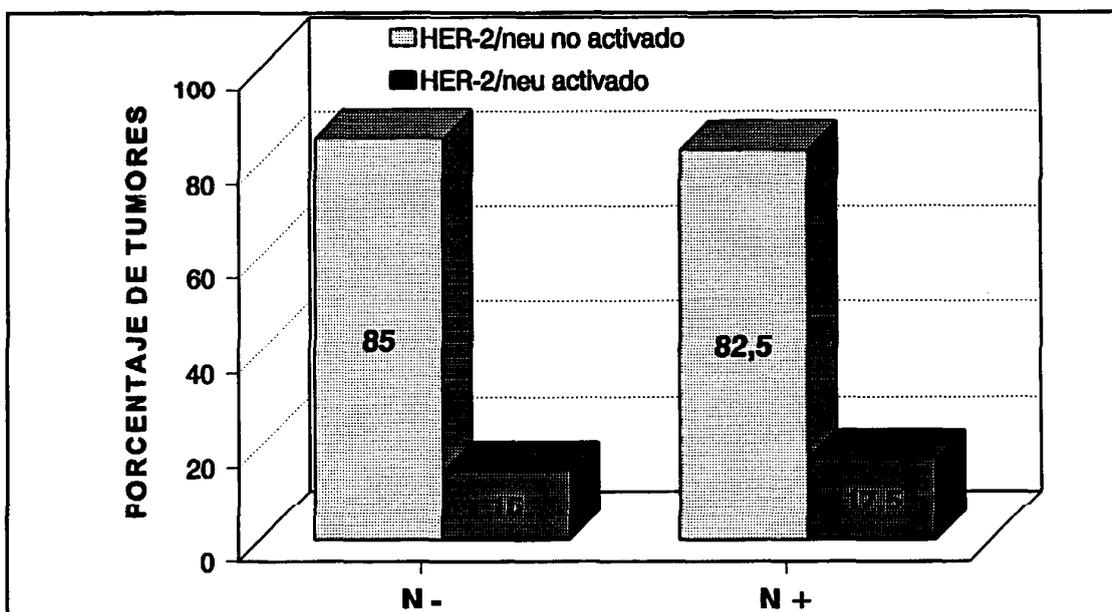


FIGURA 37. Asociación entre el estado del HER-2/neu y la existencia o no de afectación ganglionar.

Cuando las pacientes se clasificaron según el estado de la afectación ganglionar y luego se agruparon de acuerdo al tamaño del tumor, en las pacientes sin adenopatía ganglionar (N-) el número de tumores con el HER-2/neu activado fué significativamente mayor ($P < 0.05$) en los tumores T3 y T4 comparado con los tumores T1 y T2. Esta circunstancia no se observó, en cambio, en las pacientes con adenopatía axilar (Figura 38).

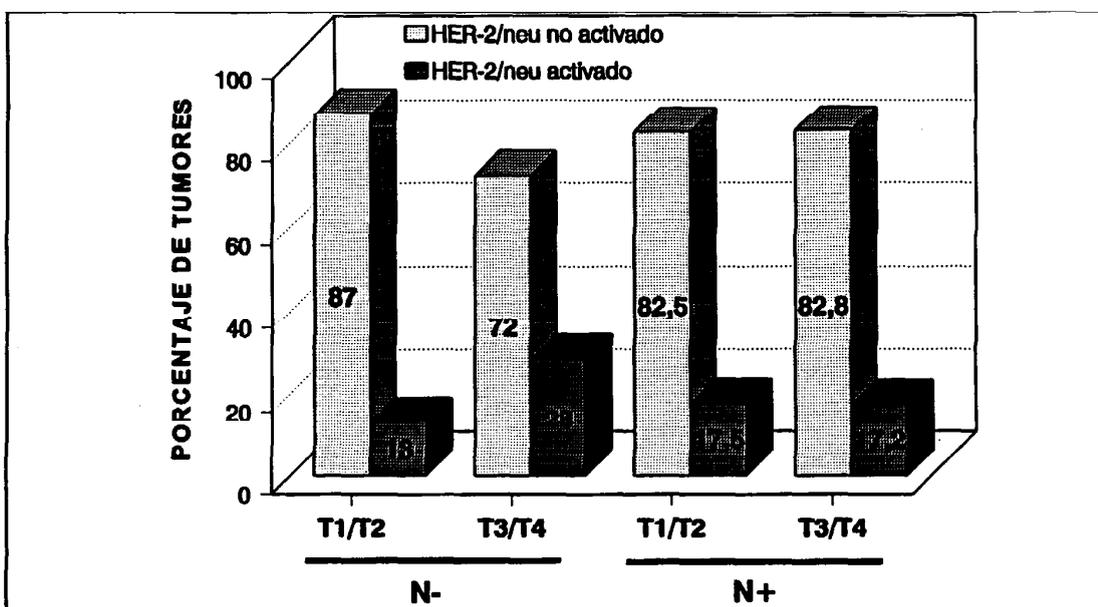


FIGURA 38. Asociación entre el estado del HER-2/neu y el tamaño tumoral agrupados en base a la existencia de afectación ganglionar.

4.2.5. HER-2/NEU versus METASTASIS DE DISTANCIA

El 5,2% de las pacientes presentaban metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (Figura 39). El porcentaje de tumores con el HER-2/neu activado fué similar cuando se compararon los tumores de pacientes que tenían metástasis a distancia con los aquellas que no las presentaban (Figura 40).

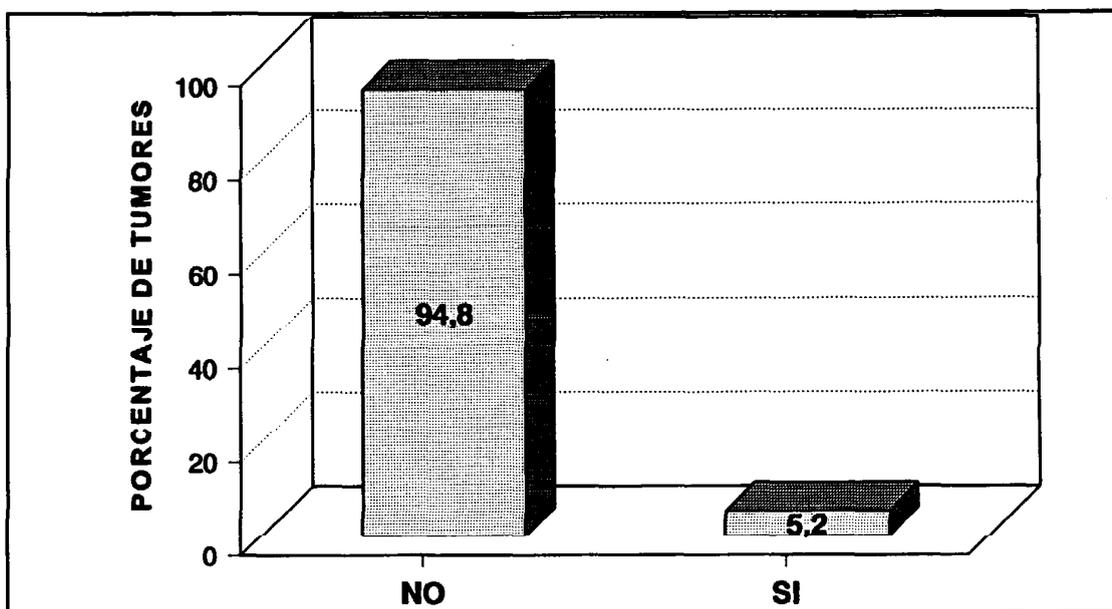


FIGURA 39. Distribución de los 415 especímenes tumorales en base a la existencia de metástasis a distancia.

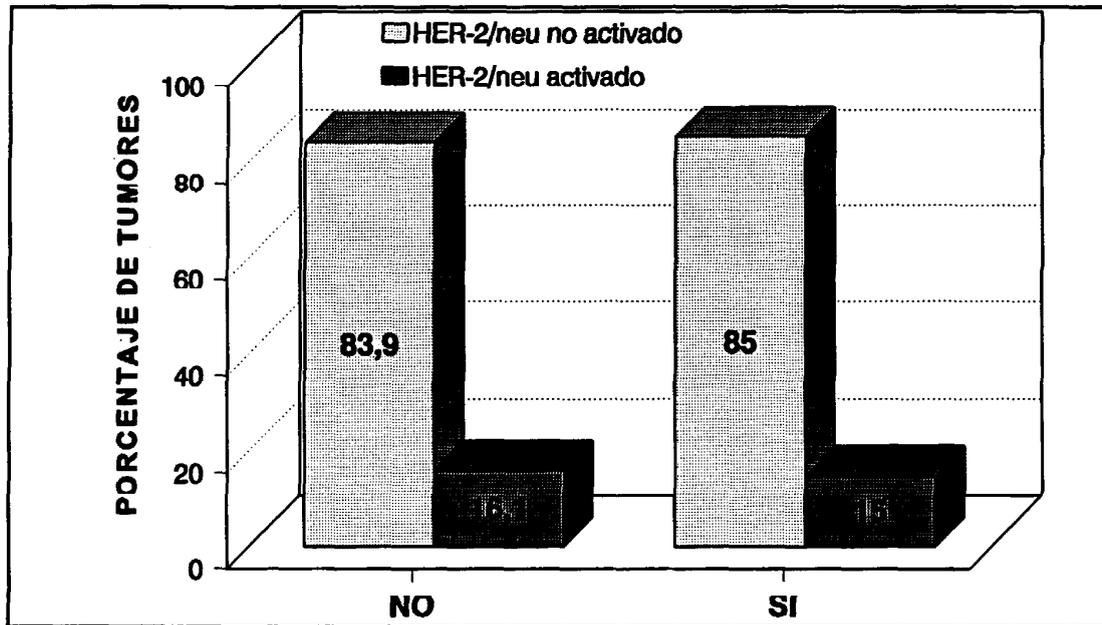


FIGURA 40. Asociación entre el estado del HER-2/neu y la existencia de metástasis a distancia.

4.2.6. HER-2/NEU versus ESTADIAJE CLINICO

La distribución de las pacientes de acuerdo el estadio se muestra en la Figura 41. Como se puede apreciar, la gran mayoría de las pacientes se encontraban en el estadio II (60,2%), siendo minoritarios los estadios I (10,5%) y IV (5,1%). El análisis estadístico comparado del número de tumores con el HER-2/neu activado en los tumores agrupados según el estadio, no mostró diferencias significativas entre ellos (Figura 42).

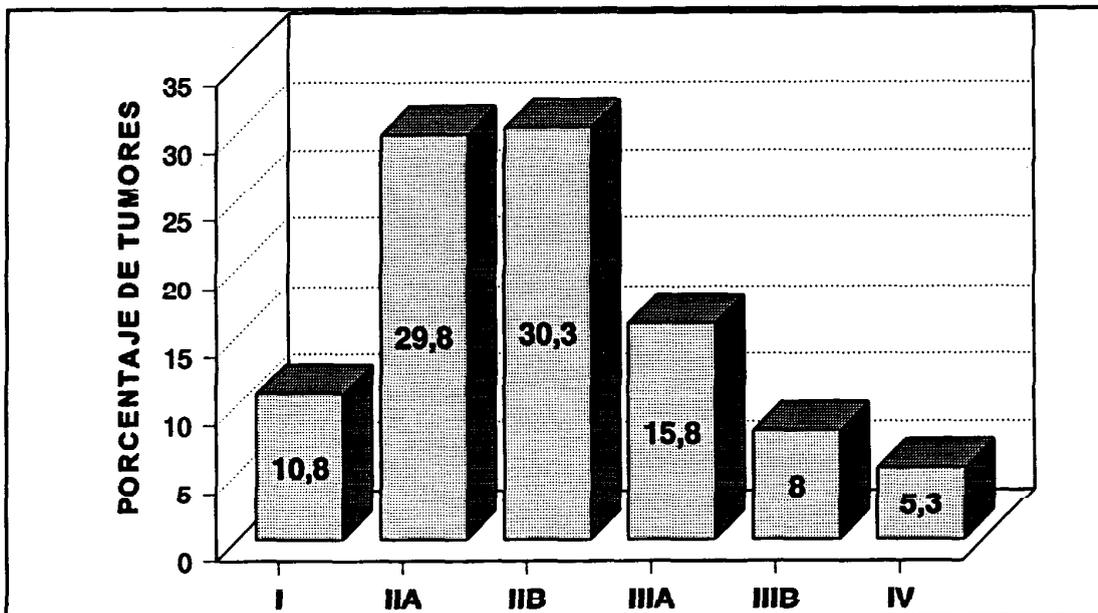


FIGURA 41. Distribución de los 415 tumores estudiados en base a su estadío clínico.

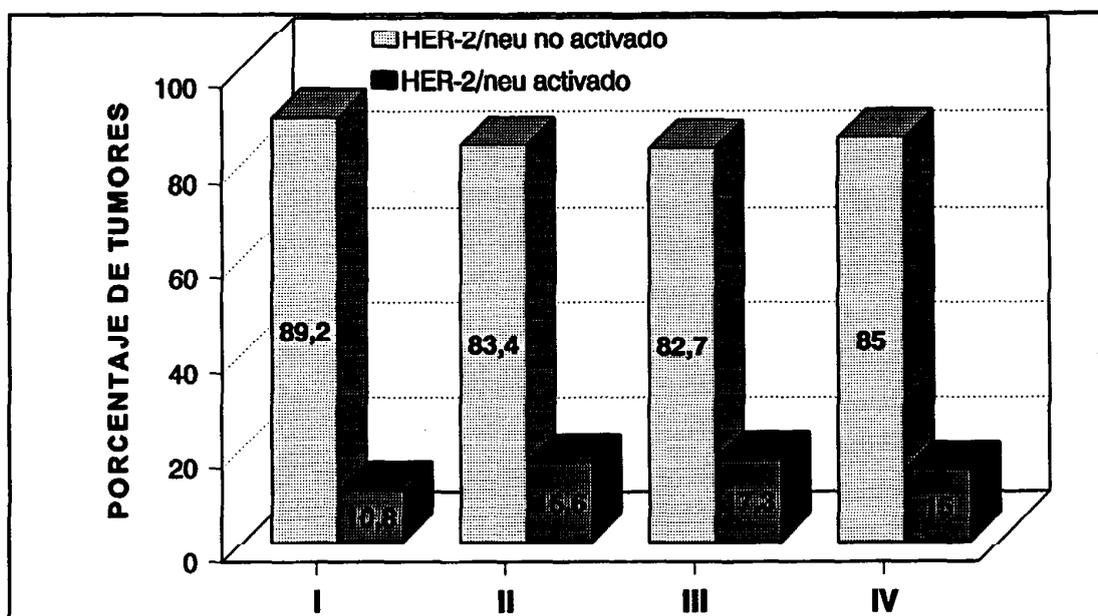


FIGURA 42. Asociación entre el estado del HER-2/neu y el estadío clínico.

4.2.7. HER-2/NEU versus TIPO HISTOLOGICO

La distribución de los tumores según el tipo histológico se muestra en la Figura 43. Como era previsible, el tipo ductal infiltrante fué mayoritario (84,3%), seguido a distancia por el tipo lobulillar (7,2%). El porcentaje de tumores con el HER-2/neu activado no fué significativamente diferente el comparar los tumores agrupados según el tipo histológico (Figura 44).

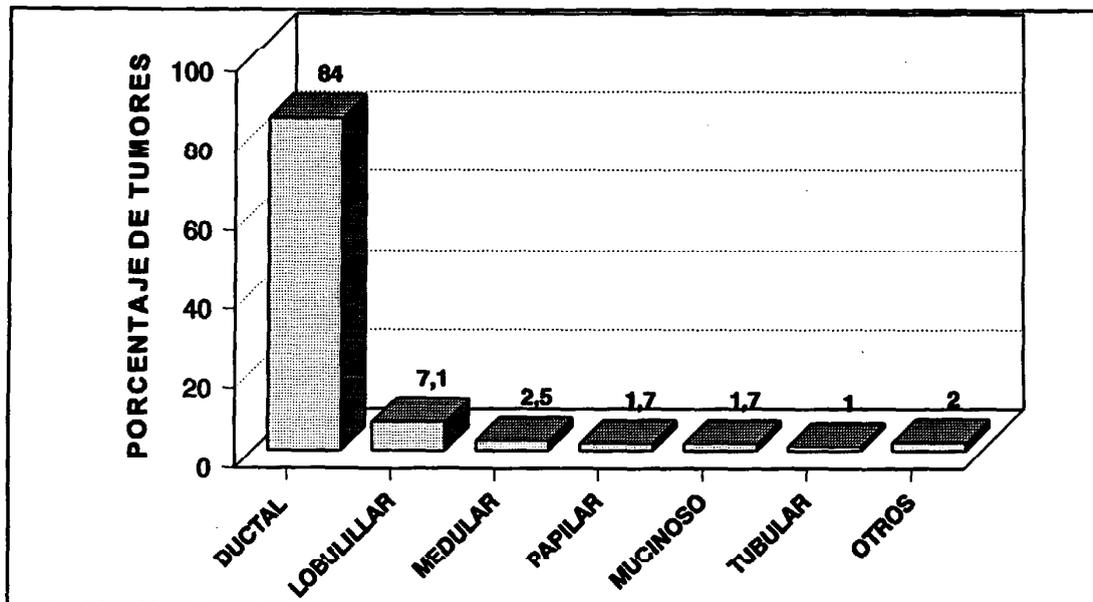


FIGURA 43. Distribución de los 415 especímenes estudiados según el tipo histológico.

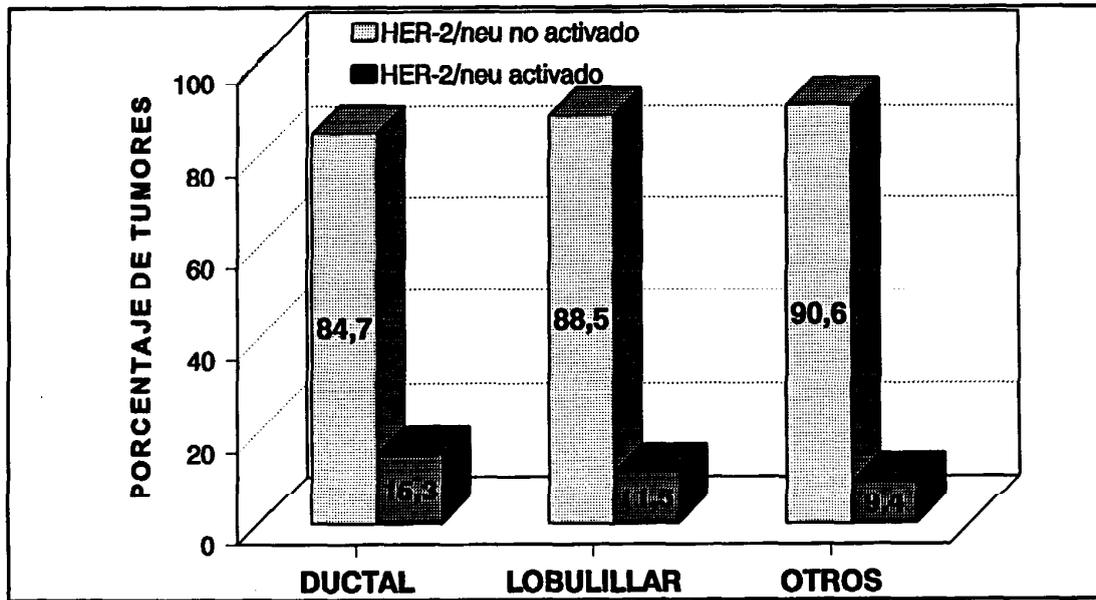


FIGURA 44. Asociación entre el estado del HER-2/neu y el tipo histológico de los tumores estudiados.

4.3. RELACION ENTRE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu Y LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS

En el laboratorio de Fisiología del Departamento de Endocrinología Celular y Molecular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, donde se ha realizado el presente trabajo de investigación, existe una larga tradición en líneas de investigación que precisan la determinación cuantitativa de los receptores tanto de estrógenos como de progesterona, así como los de otras hormonas de naturaleza esteroidea, ya sean naturales o de síntesis, y utilizando muy variados modelos experimentales (132, 133). El procedimiento utilizado fué el ensayo de intercambio con hormona marcada y el empleo del carbono activo (DCC), siguiendo las directrices de ensayo propuestas por las organizaciones internacionales de Oncología, y, entre ellas, la EORTC. Dado que lo consideramos un método suficientemente validado, no nos extenderemos en detalles.

La distribución de los niveles de RE en los 415 especímenes tumorales estudiados se muestra en la Figura 45. Los valores oscilaron entre 0 y 1735 fmol/mg proteína, mediana: 21 fmol/mg proteína, media \pm ESM: $134,4 \pm 6,0$ fmol/mg proteína.

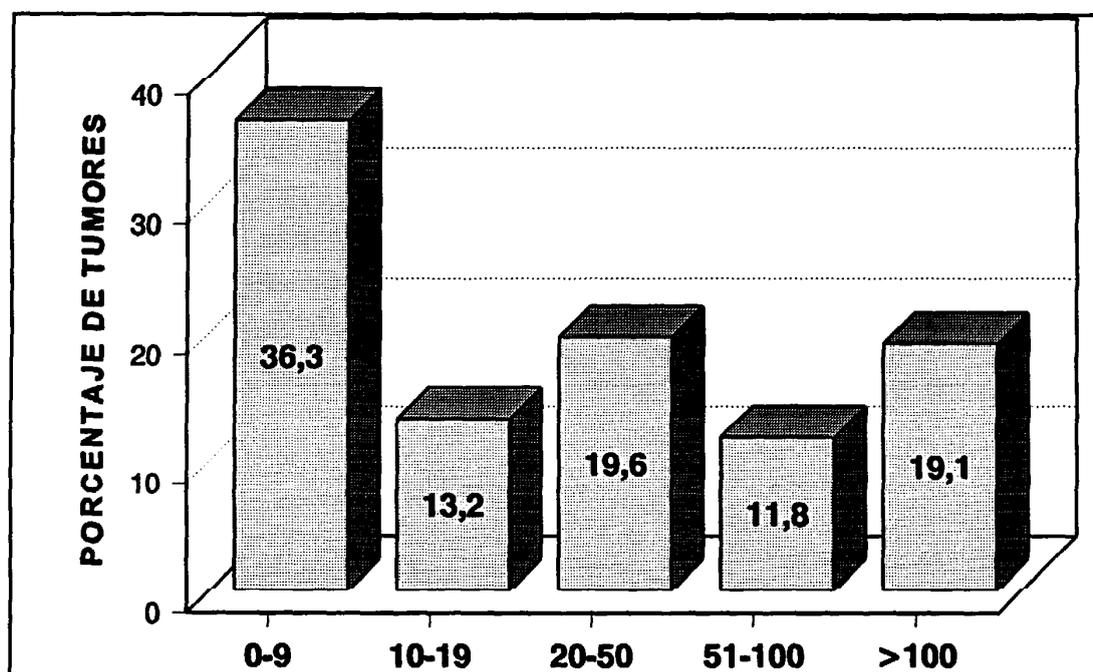


FIGURA 45. Distribución de los valores de receptores de estrógenos en los 415 especímenes estudiados.

Una decisión importante es la de convertir los valores cuantitativos en variables binomiales. En lo que respecta al RE los distintos autores (134, 135) han apostado por niveles arbitrarios que oscilan entre 10 y 20 fmol/mg de proteína, como el valor de RE mínimo a partir del cual considerar que el espécimen tumoral expresa la proteína, y, en consecuencia, etiquetarla como RE positiva (RE+). En nuestra serie, el uso de distintos puntos de corte situados entre 10 y 20 fmol/mg proteína dió los porcentajes de tumores RE+ y RE- que se muestran en la Figura 46. Por analogía con los porcentajes de tumores RE+/RE- referidos en sus respectivas series por la mayoría de los autores, así como por ser el valor más utilizado, elegimos el nivel de 10 fmol/mg de proteína como punto de corte. De acuerdo a ese criterio, el 63,5% de los tumores eran RE+.

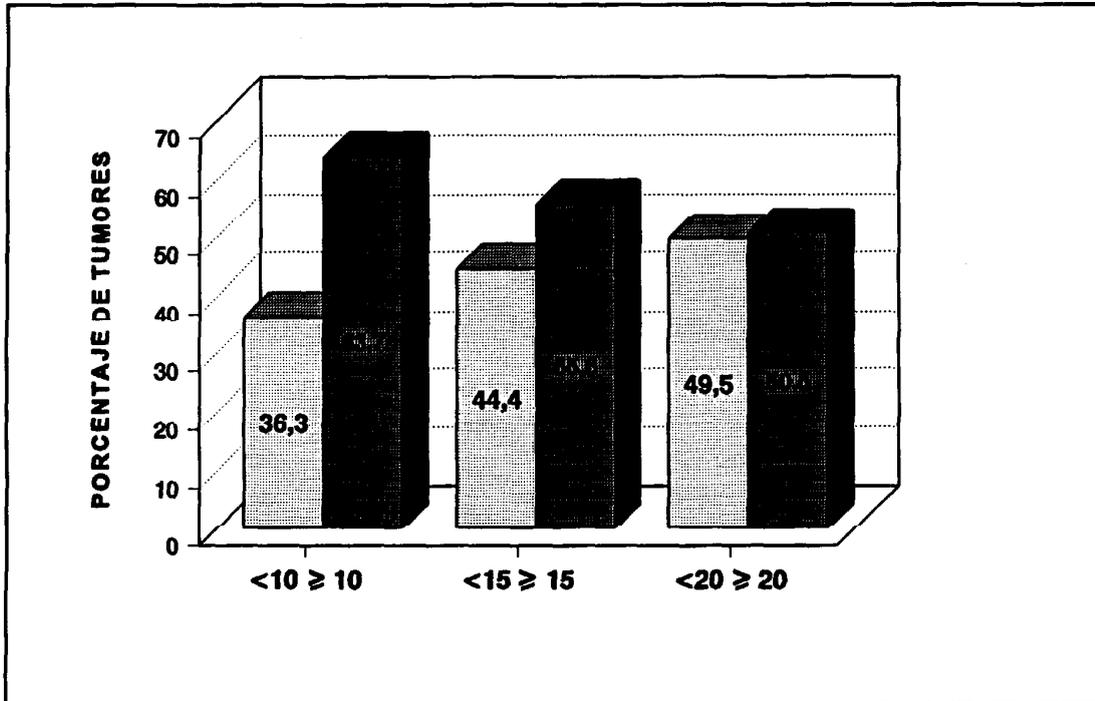


FIGURA 46. Distribución de los RE- y RE+ en la serie de tumores estudiada considerando como punto de corte 10, 15 y 20 fmol/mg proteína.

La distribución de los niveles de RP se muestra en la Figura 47. Los valores oscilaron entre 0 y 2156 fmol/mg proteína, mediana: 31 fmol/mg proteína, media \pm ESM: $288,8 \pm 13$ fmol/mg proteína.

Por lo que se refiere a la dicotomización de los valores de RP, los distintos autores (134, 136) han sugerido niveles arbitrarios que oscilan entre 10 y 30 fmol/mg de proteína, como el valor mínimo de RP, a partir del cual considerar que el espécimen tumoral es RP positivo (RP+). En nuestra serie, el uso de distintos puntos de corte situados entre 10 y 30 fmol/mg proteína dió los porcentajes de tumores RP+ y RP- que se muestran en la Figura

48. Conviene señalar que la inclusión del molibdato sódico - un agente estabilizador de los RP e inhibidor de fosfatasas - en el tampón de homogeneización incrementa por un factor de 1,5 a 2 la concentración de RP que se mediaría en su ausencia. Nosotros elegimos el nivel de 20 fmol/mg de proteína como punto de corte, tanto por similitud con lo referido en la literatura, como por ser un valor empleado frecuentemente. De acuerdo a ese criterio, el 57,5% de los tumores eran RP+.

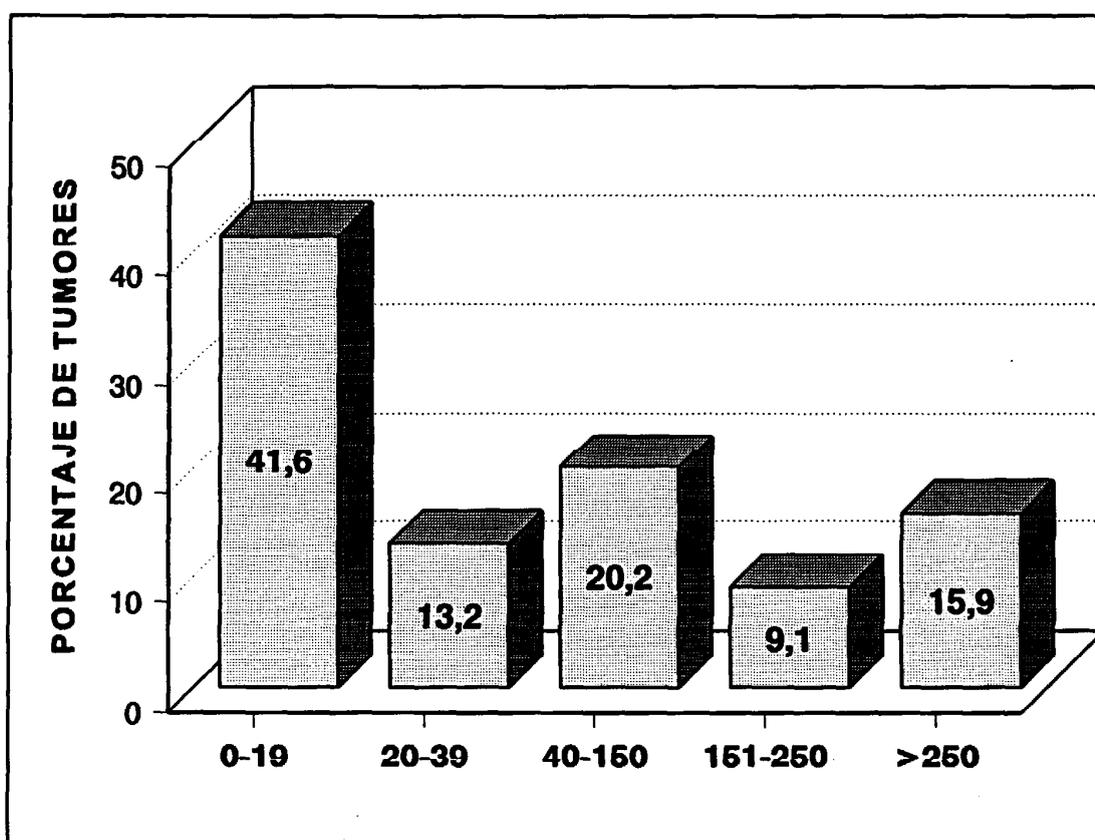


FIGURA 47. Distribución de los valores de receptores de progesterona en los 415 especímenes estudiados.

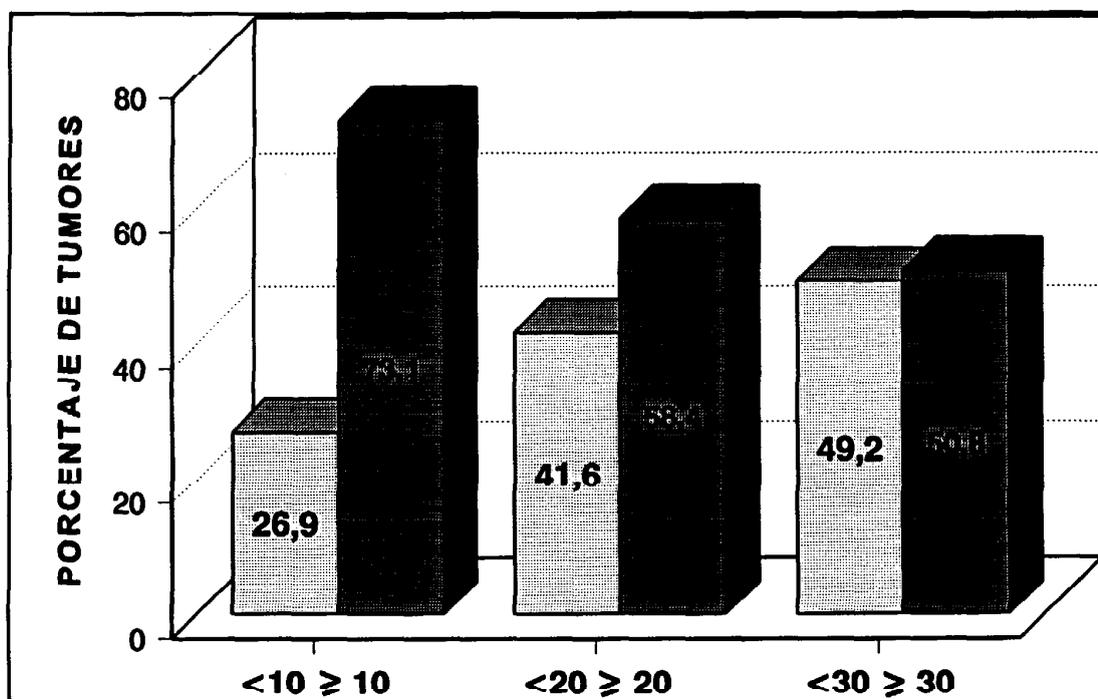


FIGURA 48. Distribución de los RP- y RP+ en la serie de tumores estudiada considerando como puntos de corte 10, 20, y 30 fmol/mg proteína.

La agrupación de los especímenes tumorales en base al estado bien de los RE o bien de los RP, dió una distribución de tumores basada en el estado de activación del HER-2/neu que se muestra en las Figuras 49 y 50, respectivamente. El porcentaje de tumores con el HER-2/neu activado fué significativamente menor ($P < 0.01$) en el grupo RP+ comparado con el grupo RP-. También el grupo RE+ comparado con el RE- mostró un menor porcentaje de tumores con el HER-2/neu activado, si bien las diferencias carecieron de significación estadística.

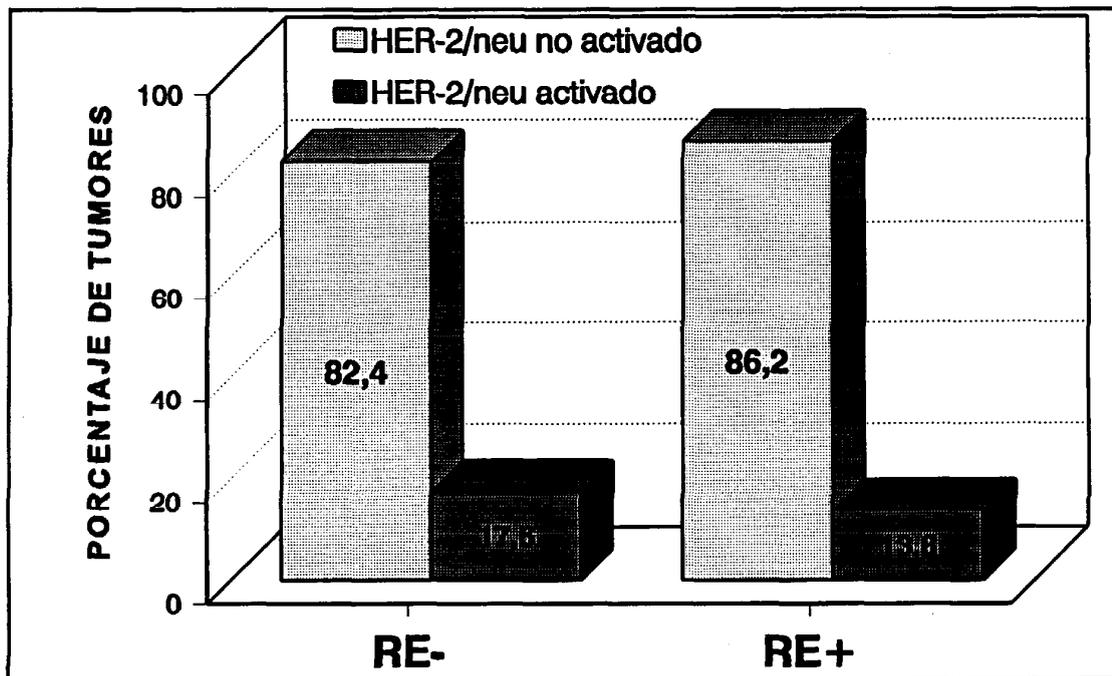


FIGURA 49. Asociación entre la activación del HER-2/neu y la expresión de RE.

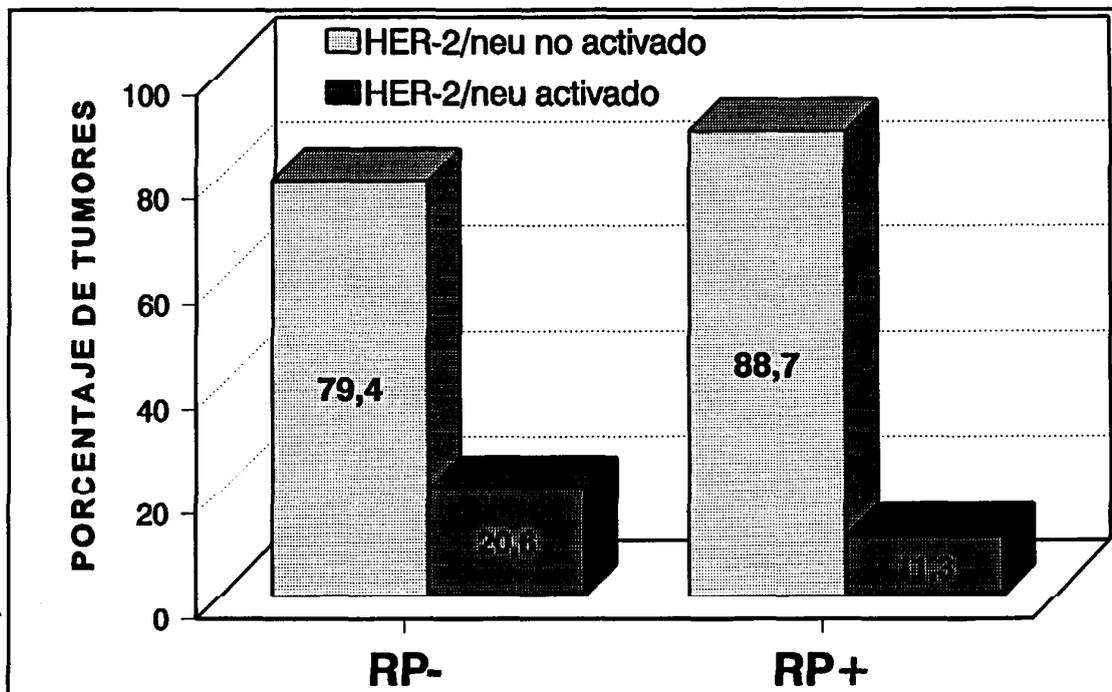


FIGURA 50. Asociación entre la activación del HER-2/neu y la expresión de RP.

Cuando las pacientes se clasificaron según el estado de la afectación ganglionar y luego se agruparon de acuerdo a los RE o RP, en las pacientes sin adenopatía ganglionar (N-) el número de tumores con el HER-2/neu activado fué significativamente mayor en los tumores que expresaban RE (P < 0.02) o RP (P < 0.01) comparado con los tumores que no los expresaban. Esta situación no se apreció en las pacientes con adenopatía axilar (Figuras 51 y 52).

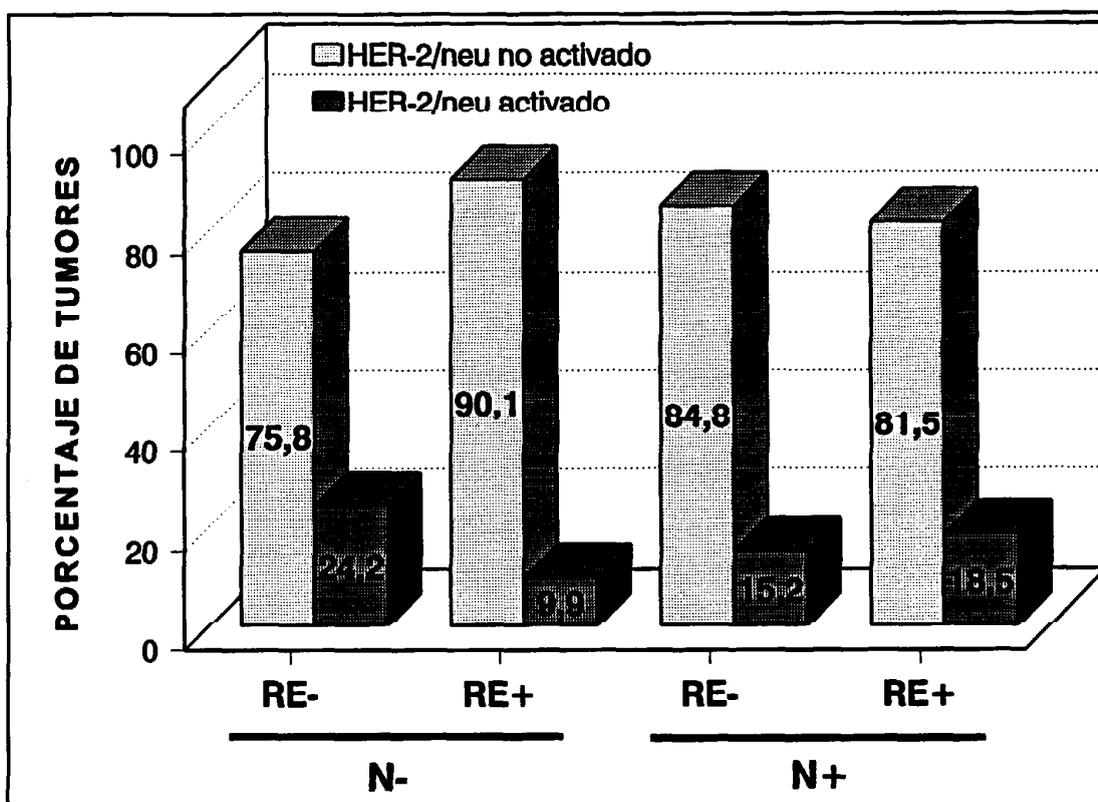


FIGURA 51. Asociación entre el estado de activación del HER-2/neu y los receptores de estrógenos en los subgrupos de pacientes N- y N+.

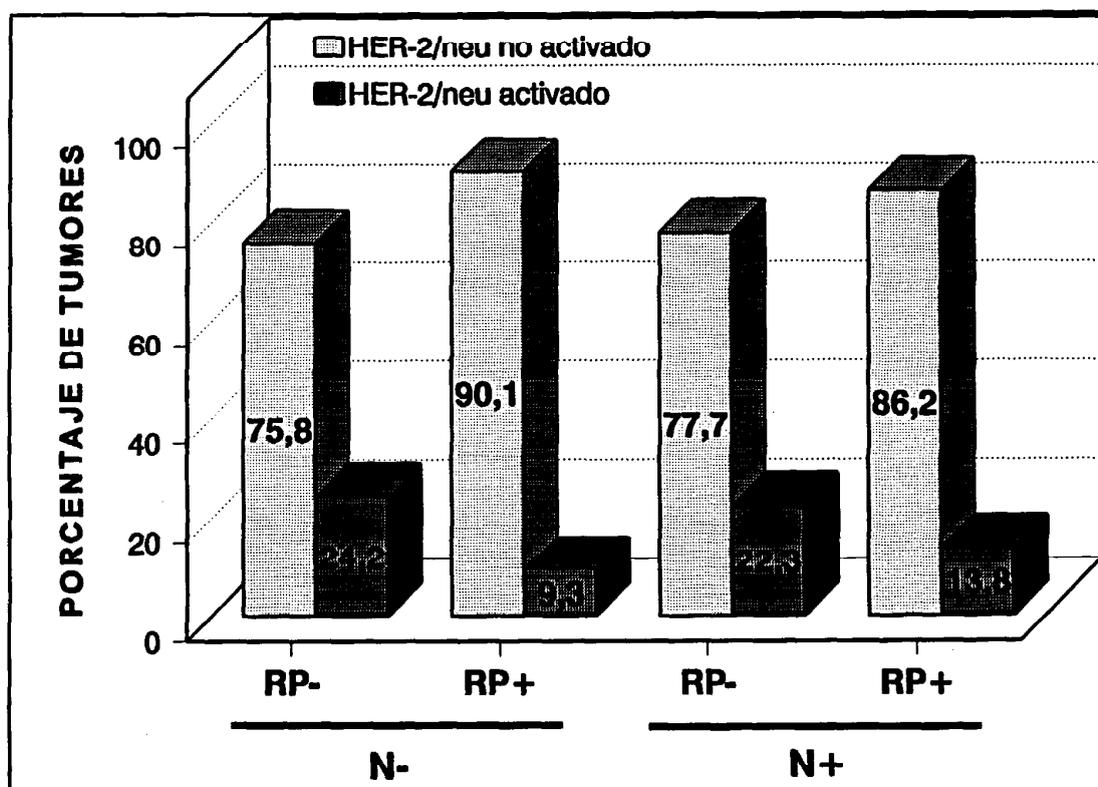


FIGURA 52. Asociación entre el estado de activación del HER-2/neu y los receptores de progesterona en los subgrupos de pacientes N- y N+.

En el estudio de los RE y RP como variable biológica tumoral de posible valor pronóstico y terapéutico, tiene un indudable interés la combinación de los fenotipos RE \pm RP \pm en cada espécimen tumoral. Dado que en el cáncer de mama el RP es inducido por el estradiol actuando a través de su receptor, cabría esperar que la presencia del RE estuviese siempre asociada a la expresión de RP y viceversa. Sin embargo, la existencia - entre otros factores - de formas alteradas del RE (137), pueden originar combinaciones fenotípicas del tipo RE+ RP- y RE- RP+. Parece demostrado (134, 135) que estas variantes fenotípicas tienen un comportamiento intermedio, al menos en cuanto a la respuesta antiestrogénica, en

relación a las combinaciones "normales" (RE- RP- y RE+ RP+). La distribución de estos cuatro posibles fenotipos en nuestra serie se muestra en la Figura 53.

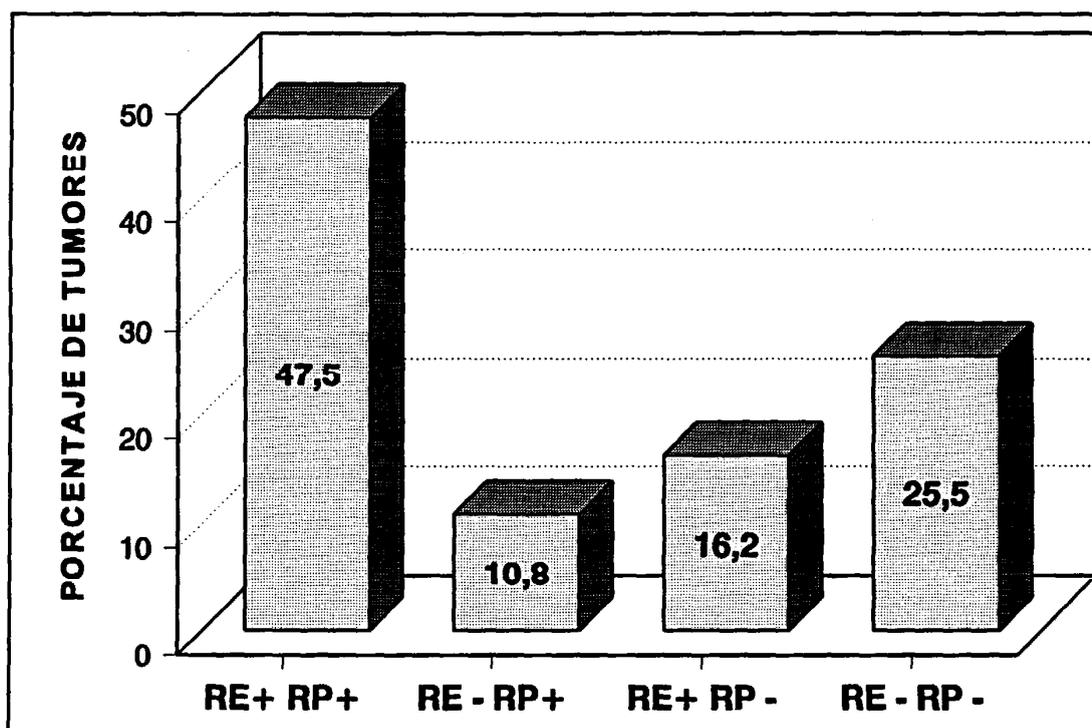


FIGURA 53. Distribución de los cuatro posibles fenotipos resultantes de la combinación de RE y RP.

Cuando los tumores se agruparon en base a las combinaciones fenotípicas RE \pm RP \pm , los tumores con el HER-2/neu activado o no, se distribuyeron como se muestra en la Figura 54. El análisis estadístico mostró que el número de tumores con el HER-2/neu activado fué significativamente menor en los tumores con el fenotipo RE+ RP+ comparado con los del fenotipo RE- RP-.

Cuando las pacientes se clasificaron según el estado de la afectación ganglionar y luego se agruparon de acuerdo a la combinación fenotípica $RE \pm RP \pm$, en las pacientes sin adenopatía ganglionar (N-) el número de tumores con el HER-2/neu activado fué significativamente mayor en los tumores que no expresaban RE y RP que en los tumores que expresaban ambos receptores. Esta situación no se apreció en las pacientes con adenopatía axilar (Figura 55).

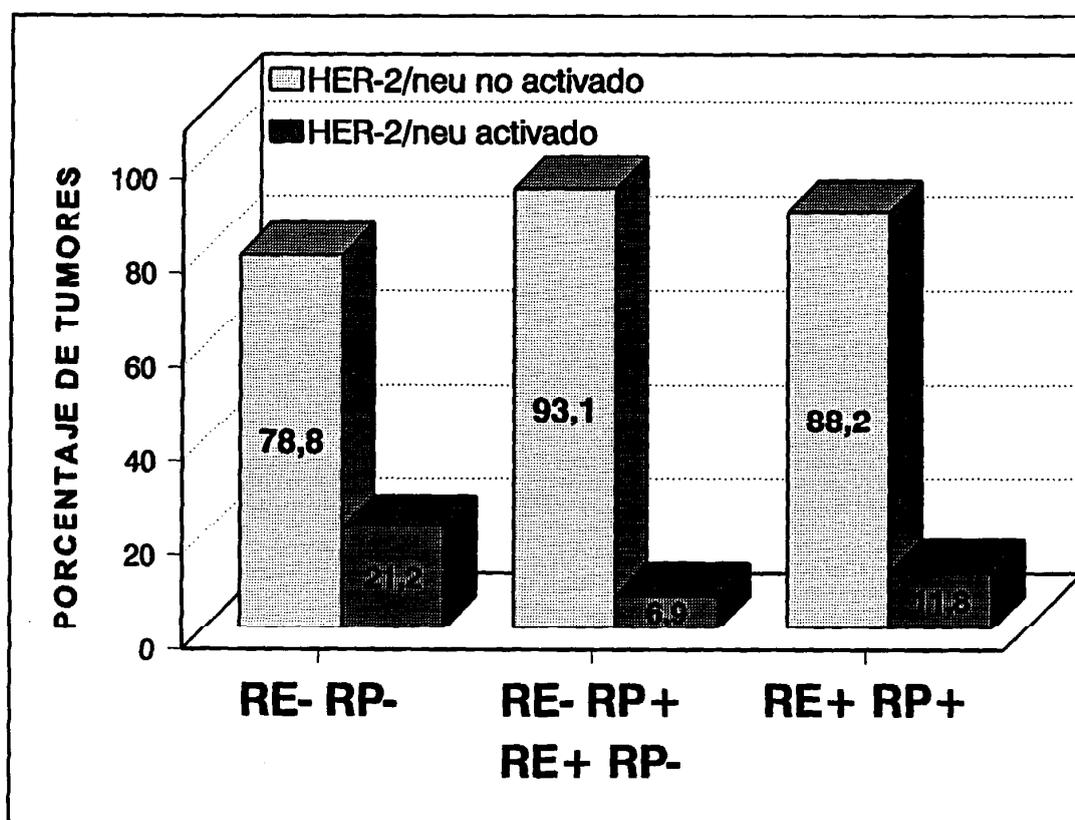


FIGURA 54. Asociación entre el estado de activación del HER-2/neu y las combinaciones fenotípicas $RE \pm RP \pm$ en la serie estudiada.

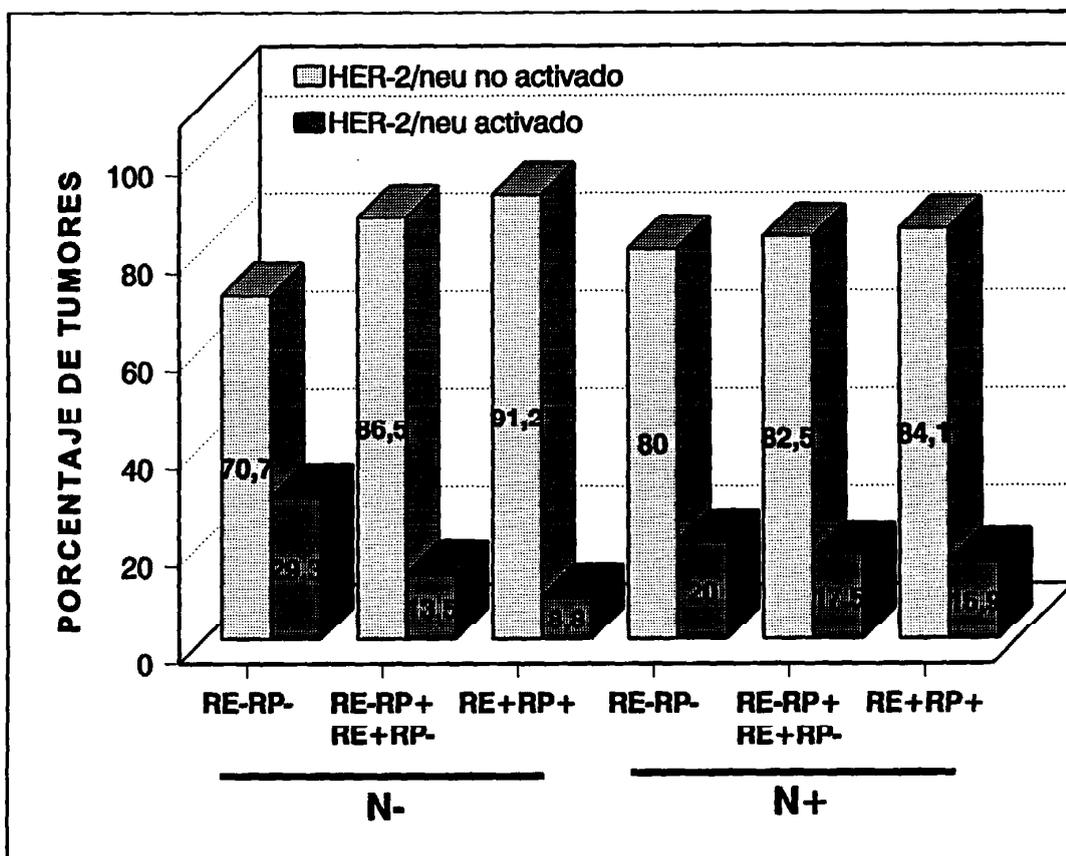


FIGURA 55. Asociación del estado de activación del HER-2/neu y las combinaciones fenotípicas $RE \pm RP \pm$ en los subgrupos de pacientes N- y N+.

4.4 RELACION DE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu CON LA EVOLUCION CLINICA DE LAS PACIENTES

El seguimiento clínico medio de las pacientes ha sido de 2,5 años (rango: de 0,5 a 4 años). Durante este período se han producido 48 (11,5%) recidivas y 43 (10,5%) exitus. Aunque el seguimiento clínico está actualizado, no parece prudente, por razones obvias, incorporarlo a esta memoria, pues podría llevar a conclusiones erróneas por precipitadas.

Nos parece interesante, no obstante, hacer un breve comentario de los resultados obtenidos en las pacientes con adenopatía axilar (N+), donde el porcentaje de exitus alcanzó el 18,9%.

En la Figura 56 se muestra la distribución del fenotipo RE- RP- versus RE+ RP+ en función de la supervivencia y la mortalidad. El fenotipo RE+ RP+ fué significativamente asociado a una mayor supervivencia ($P < 0.02$).

La distribución del número de tumores con el HER-2/neu activado en función de la supervivencia y la mortalidad se muestra en la Figura 57. La activación del HER-2/neu fué significativamente asociada a la una menor supervivencia ($P < 0.03$).

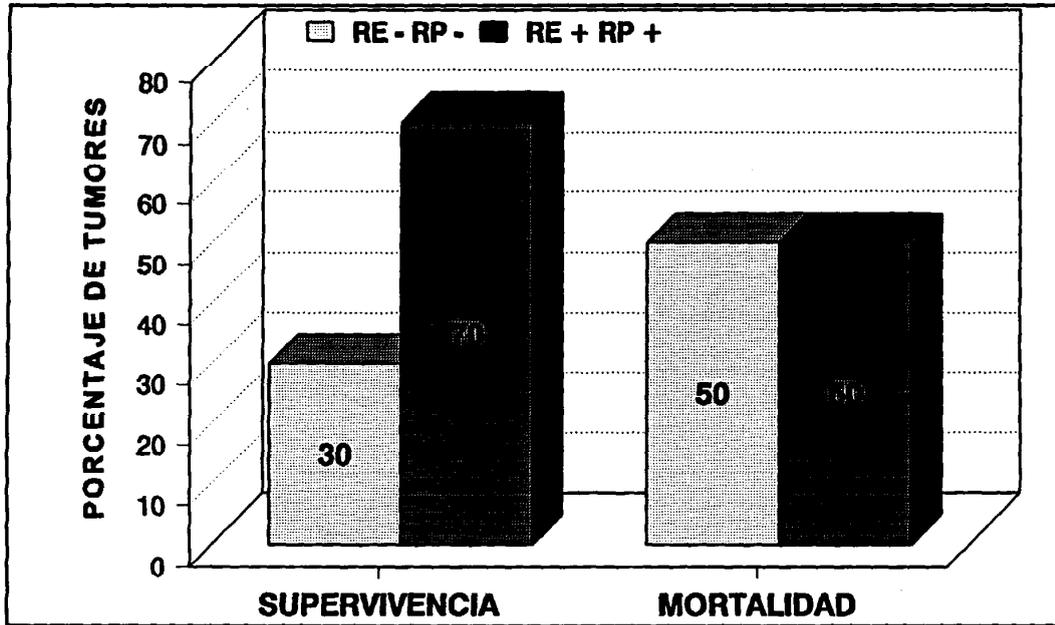


FIGURA 56. Distribución de los fenotipos RE- RP- y RE+ RP+ en función de la supervivencia y mortalidad de las pacientes.

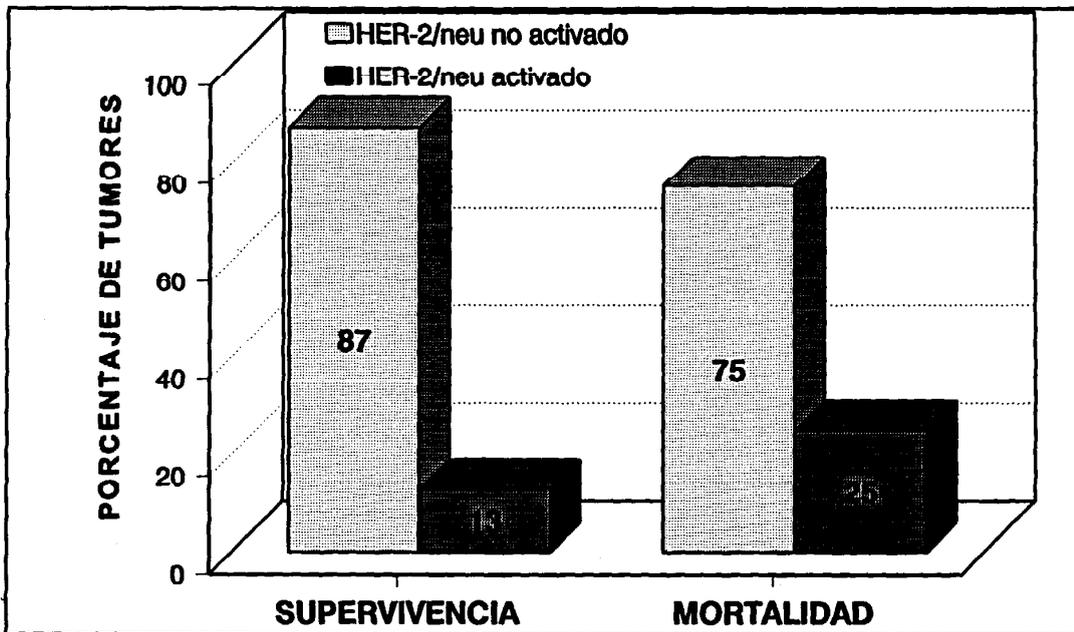


FIGURA 57. Distribución de los especímenes según su estado de activación del HER-2/neu en las pacientes agrupadas en base a su supervivencia y mortalidad.



DISCUSSION

5.1. ESTIMACION DE LA AMPLIFICACION DEL GEN HER-2/neu MEDIANTE PCR DIFERENCIAL

Desde que en 1987 (18) se tuvo la primera evidencia de que la activación del HER-2/neu era una característica biológica tumoral con posible interés pronóstico, distintos grupos de investigación se han interesado en su estudio.

La activación del proto-oncogén HER-2/neu se produce en tumores sólidos humanos casi exclusivamente debido a un fenómeno de amplificación génica, es decir, debido a anomalías en los mecanismos de reparación génica, producto de la inestabilidad genómica que acompaña al proceso de la tumorigénesis y la progresión tumoral.

Hasta la actualidad, la estimación del número de copias génicas del HER-2/neu se ha llevado a cabo de forma casi exclusiva utilizando el procedimiento del Southern blot, y ocasionalmente mediante el procedimiento del dot/slot-blot.

En el análisis del Southern-blot se utilizan una o varias enzimas de restricción para digerir el ADN y cortarlo en fragmentos idóneos para ser separados mediante electroforesis y transferidos a un soporte sólido, donde la hibridación con las sondas adecuadas permite su identificación y cuantificación. Las sondas son fragmentos radiactivos del gen de interés que se han preparado a partir de plásmidos recombinantes que se han multiplicado en bacterias transformadas. Aunque este procedimiento es utilizado cotidianamente en los laboratorios especializados de biología molecular, posee tres características limitantes que fueron

determinantes en el momento de decidimos a desarrollar un procedimiento alternativo: 1) precisa de un mínimo de decenas de microgramos de ADN para obtener una buena imagen autorradiográfica, 2) requiere del uso del fosforo-32 (un radioisótopo de alto contenido energético) para el marcaje de la sonda, y 3) el tiempo mínimo que debe de transcurrir entre la digestión del ADN y la obtención de la imagen autorradiográfica no suele ser inferior a una semana.

La PCR es una tecnología que se ha introducido con fuerza en el campo de la oncología básica, pues permite, utilizando una pequeña cantidad de ADN, y de una manera rápida y relativamente sencilla, detectar alteraciones génicas que constituyen el sustrato molecular de la activación o desactivación de genes involucrados en la tumorigénesis y la progresión tumoral. Así, la PCR utilizada conjuntamente con sondas de oligonucleótidos marcados o con procedimientos electroforéticos especiales, permite la detección de mutaciones puntuales, pequeñas deleciones e inserciones y translocaciones génicas.

La utilización de la PCR (tradicional) en el estudio de la amplificación génica - alteración molecular que constituye el mecanismo de activación de determinados oncogenes, entre los que se encuentra el HER-2/neu -, es, sin embargo, un procedimiento sumamente ineficaz. Ello es debido a que el proceso de multiplicación génica *in vitro* - fundamento de la PCR - tiene una eficacia variable con cada muestra amplificada, y es imposible el pretender cuantificar el número relativo de copias génicas en las muestras tumorales comparando el número de copias producidos artificialmente en tubos de ensayo distintos. Dicho de otra manera, si partimos de dos especímenes tumorales entre los cuales la relación de copias de un determinado gen es de 100 a 1, podríamos teóricamente esperar encontrar

la misma relación, o aproximada, después de su amplificación in vitro, sin embargo, la realidad indica que los resultados pueden ser muy distintos, dado que pérdidas -quizás no demasiado importantes- en la eficiencia de los primeros ciclos de amplificación en un tubo hacen que el proceso en su globalidad, al ser exponencial, se vea notablemente afectado. Obviamente, si pensamos que deberíamos de intentar distinguir entre especímenes en los cuales la relación del número de copias de un determinado gen es, al menos, de 2 a 1, el objetivo se torna imposible.

La PCR diferencial, como una variante metodológica de la PCR tradicional, pretende cubrir esa laguna, y ser un método útil para la cuantificación de las copias génicas presentes de los especímenes.

Ante la imposibilidad de controlar la eficiencia de cada PCR individual, en la PCR diferencial se amplifican dos genes de un mismo espécimen tumoral en el mismo tubo de ensayo. Uno de los genes es el problema, es decir, aquel del cual queremos conocer el número de copias génicas; el otro es un gen de referencia (o control), y del cual tenemos una gran certeza de que está presente en un número diploide de copias. Dado que la amplificación in vitro de ambos genes se produce en el mismo tubo, tendremos la seguridad de que las condiciones y los abateres por los que discurrirá el proceso cíclico de la PCR les afectarán a ambos por igual. Así, el número relativo de copias producido por PCR diferencial de los genes co-amplificados de cada espécimen reflejará el número relativo de copias de los mismos presentes originalmente en la muestra que fué sometida a la PCR diferencial. Ese número relativo de copias del gen problema al gen de referencia se traducirá en un valor densitométrico equivalente al comparar la intensidad de las bandas electroforéticas del gen

problema y el gen de referencia de una misma calle de la electroforesis.

Admitiendo pues que la PCR diferencial podría ser un procedimiento útil para la estimación del grado de amplificación del oncogén HER-2/neu, su puesta a punto nos supuso el tener en cuenta algunos condicionantes tanto técnicos como biológicos - es decir, propios de la naturaleza de los especímenes que analizábamos -, que podían conducirnos a interpretaciones erróneas de los resultados, y que detallamos a continuación:

- 1) Si bien es cierto que las condiciones generales de la PCR (medio del ensayo, enzima, cambios cíclicos de temperatura, desoxinucleótidos, condiciones microambientales) afectan por igual a los dos genes a amplificar en cada tubo de ensayo, no lo es menos que la eficiencia en la amplificación de cada gen es a su vez dependiente de la eficacia con que es utilizada la pareja de cebadores, la cuál puede ser, y por razones que desconocemos, bastante diferente. Además, la intensidad de la banda electroforética resultante depende de la longitud del fragmento génico amplificado, en el sentido de que, a mayor longitud, mayor incorporación de agente intercalante y mayor intensidad. Aún más, la obtención de una buena imagen para ser densitometrada, depende también de que la electroforesis de los productos de la PCR diferencial separe bandas nítidas y bien definidas.

- 2) Una de las características biológicas de las muestras tumorales es su inestabilidad genómica, ello hace que un cierto porcentaje de tumores sean aneuploides de muy variado tipo, incluyendo hipodiploides, triploides,

tetraploides, etc. Obviamente, el utilizar un solo gen de referencia podría conducir a una infravaloración o sobrevaloración del número de copias del HER-2/neu, si el cromosoma donde se encuentra el gen de referencia está presente en un número anormal de copias. Es por ello que hemos utilizado dos genes de referencia ubicados en distintos cromosomas, y decidido que la relación de intensidades del HER 2/neu con ambos genes control debería de tener un valor mínimo, aún a sabiendas de que perderíamos un cierto número de especímenes con el HER-2/neu amplificado.

- 3) Por muy metódico que sea el patólogo en la preparación de la pieza tumoral, eliminando el tejido sano de la misma, es imposible obviar la presencia del componente estromal, que representa un porcentaje indefinido y variable de la pieza. En consecuencia, la decisión sobre el valor densitométrico de la relación de intensidades que indica la presencia de un número extra de copias del HER-2/neu es un compromiso entre el efecto diluidor de las células diploides, los valores densitométricos obtenidos para los especímenes de tejido mamario sano, y las referencias disponibles sobre los valores densitométricos de relación de intensidades obtenidos utilizando condiciones similares de PCR diferencial en líneas celulares que tienen un número extra conocido de copias génicas del HER-2/neu.

Resolver todos estos condicionantes supuso un notable esfuerzo, y consideramos haberlos solventado ampliamente. Los datos obtenidos del análisis simultáneo mediante PCR diferencial y Southern blot de un buen número de especímenes avala en cierta medida

nuestra opinión.

Hay que significar que la utilización de la PCR diferencial en la estimación del estado génico de oncogenes que se activan por amplificación génica, ofrece diferentes ventajas sobre los métodos tradicionales como el Southern, las cuales ya se han comentado y no parece necesario insistir. No obstante, si conviene resaltar una ventaja que nos parece importante, y es el uso de una cantidad mínima de ADN, diríamos que insignificante, y que puede ser obtenida a partir de piezas tumorales fijadas en formalina buffereada y embebidas en parafina. Esto es sumamente importante, no ya para realizar estudios retrospectivos, sino que incluso para los trabajos prospectivos, dado que tratándose de muestras bien frescas o parafinadas, la cantidad de tejido disponible para realizar estudios de biología molecular tiene una clara tendencia a disminuir, bien por la detección cada día más precoz - afortunadamente - del cáncer de mama, bien por las técnicas de cirugía conservadora que se utilizan en un cierto porcentaje de casos. De hecho, estamos en disposición de asegurar que la cantidad de ADN que se obtiene de la pieza tumoral extraída mediante punción con aguja fina es más que suficiente para realizar varios ensayos de PCR diferencial. Estamos, pues, ante una tecnología con enormes posibilidades de aplicación en el campo del diagnóstico oncológico.

Hasta la fecha, un sólo grupo de investigación (el del Dr. E. Lui, de la Universidad de North Carolina, en Chapel Hill) ha utilizado un procedimiento de PCR diferencial similar al nuestro para estimar la amplificación del oncogen HER-2/neu (128,138,139). Sus trabajos se han centrado en la puesta a punto del método y en su aplicación al estudio del estado del gen en líneas celulares (138) y en una serie de 149 carcinomas de mama, de los que 27 eran carcinomas de mama *in situ* y 122 invasivos en estadio II (139). Nuestro trabajo

se centra en el estudio de una serie amplia de 415 carcinomas de mama invasivos, y podemos considerarlo como uno de los pioneros en este terreno.

El porcentaje de tumores que hemos encontrado con el gen HER-2/neu amplificado (15%) se encuentra en el rango de lo referido en la literatura (entre el 10 y el 30%) utilizando el procedimiento del Southern blot (18,19,96,102).

5.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE LA p185^{HER-2/neu}

Los estudios sobre la expresión de la oncoproteína p185^{HER-2/neu} han sido realizados, hasta la fecha, y por aplastante mayoría, mediante métodos inmunohistoquímicos (96,100,112,113). Excepcionalmente se ha utilizado el Western blot (98).

El procedimiento inmunohistoquímico ofrece dos ventajas particularmente interesantes: 1) la posibilidad de localizar específicamente la expresión de la oncoproteína en las células tumorales y el conocer, de paso, la heterogeneidad de la expresión de la misma en la pieza analizada, 2) la posibilidad de llevar a cabo el estudio en piezas embebidas en parafina, siempre que se disponga del anticuerpo adecuado, necesitando, entonces, muy poca cantidad de tejido para el análisis y pudiendo llevar a cabo estudios retrospectivos. El procedimiento tiene, no obstante, una desventaja evidente, y es la de que la estimación de la expresión de la proteína está sujeta a la opinión subjetiva del observador.

El procedimiento del Western blot es semicuantitativo, precisa de una cantidad

mínima, no despreciable, de tejido, requiere un cierto adiestramiento, y además de un notable trabajo de estandarización para ser utilizado en una serie amplia de tumores.

La determinación cuantitativa de la expresión de la p185^{HER-2/neu} ha sido imposible hasta muy recientemente, debido a que no se conocían el(los) ligando(s) de este receptor - véase el correspondiente apartado de la Introducción -. La ausencia de ligandos conocidos ha impedido el desarrollo de técnicas que utilicen el ligando marcado para, mediante un ensayo de intercambio similar al que se lleva a cabo con el ER, PR o el EGFR, estimar la concentración de esta oncoproteína.

Una alternativa válida al ensayo de intercambio con ligando marcado, es el empleo de un ELISA. Aunque hay diferentes procedimientos que se engloban bajo ese nombre, es incuestionable que el más específico y, en consecuencia, el más fiable, es aquel que utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos determinantes antigénicos de la molécula cuyo nivel de expresión se pretende determinar.

Nuestra clara vocación por la búsqueda de datos cuantitativos nos condujo a utilizar un procedimiento tipo ELISA que utiliza dos anticuerpos monoclonales y que había sido desarrollado por W. Carney y colaboradores en el laboratorio de farmacología clínica del Instituto del Cancer Dana Faber, en Boston, Massachusetts (130,140), y que, justo cuando se inició este trabajo de investigación, se encontraba disponible en el mercado. Es obvio el resaltar que la gran ventaja de un método de estimación cuantitativa es que produce un dato numérico objetivable y no sujeto a cualquier tipo de interpretaciones.

Los datos obtenidos mediante el ELISA utilizando extractos del homogenado tisular fueron contrastados, utilizando un buen número de muestras, con los niveles obtenidos mediante el mismo procedimiento usando extractos microsomales - más específicos -, y validados con datos obtenidos mediante el procedimiento del Western blot empleando microsomas y un anticuerpo distinto a los que se usan en el ELISA. La buena correlación encontrada entre estas tres aproximaciones metodológicas nos proporciona un margen importante de seguridad en nuestros datos.

Aunque se han publicado decenas de trabajos sobre la activación del HER-2/neu en el cáncer de mama, muy pocos se han ocupado de estudiar a la vez el estado génico y el de expresión de la oncoproteína (18,19,96,103), y menos en una serie tan amplia como la que nosotros hemos estudiado. En consecuencia, podemos afirmar que si bien no somos pioneros, somos, indudablemente, de los primeros en hacerlo.

Hay una tendencia muy notoria en la oncología básica/clínica, y es la de tratar la información analítica con la intención de disponerla en una forma simple y útil. En ese sentido, es corriente que los valores numéricos sobre los niveles de expresión de distintas proteínas de previsible interés pronóstico y/o terapéutico, se transformen en variables binomiales, caso de los ER, PR, EGFR, etc. Esta dicotomización de los datos se realiza estableciendo valores arbitrarios de corte, o conociendo la evolución clínica de las/los pacientes y decidiendo sobre cuál es el valor que permite una separación más diáfana entre grupos de mejor y peor evolución o de mejor y peor respuesta.

Que sepamos, y hasta la fecha, no hay ninguna referencia en la literatura en la que

se halla utilizado el procedimiento del ELISA en el estudio de la expresión cuantitativa de la p185^{HER-2/neu} en una serie amplia de cánceres de mama. El grupo de Carney - única referencia disponible - la utilizó en el estudio de líneas celulares y en una serie de 19 carcinomas mamarios (140).

5.3. RELACION ENTRE EL ESTADO DEL GEN HER-2/neu Y LA EXPRESION DE LA p185^{HER-2/neu}

Realizar una dicotomización arbitraria, sin más, de los niveles de expresión de la p185^{HER-2/neu} obtenidos a través del ELISA, nos pareció cuanto menos una temeridad. Para resolver este dilema, existe, sin embargo, una alternativa diferente a las dos apuntadas antes, y que estaba a nuestro alcance.

La estimación simultánea del estado génico y de expresión del HER-2/neu permite, por un lado, correlacionar ambas variables, y por otro, establecer a partir de conocimiento del estado del gen (no amplificado versus amplificado) cuál es el nivel de expresión mínimo de la p185^{HER-2/neu} a partir del cual podemos considerar, con rotunda seguridad, que la oncoproteína está sobreexpresada o no.

La comparación de los datos obtenidos mediante PCR diferencial y ELISA, mostraron que un nivel mínimo de expresión de la oncoproteína de 250 fmol/mg de proteína, es un valor absolutamente fiable para discernir entre expresión normal y sobreexpresión. Utilizando ese valor, los casos de amplificación génica y sobreexpresión, y viceversa, ofrecieron una elevada correlación, que es lo que cabría esperar en la elección de un punto de corte seguro.

Esta misma elevada correlación es la que se encuentra referida en la literatura (18,19,96), en trabajos que utilizan procedimientos de análisis diferentes a los empleados por nosotros. Una vez más consideramos que esta coincidencia, refuerza la validez de nuestros datos.

Si bien los datos del estado génico y de expresión del HER-2/neu mostraron una estrecha correlación, los niveles medios de expresión de la p185^{HER-2/neu} en tumores con el HER-2/neu amplificado y agrupados en base al número creciente de copias extras del oncogén, no mostraron asociación. Podemos especular en el sentido de que si bien a un mayor número de copias génicas del HER-2/neu le debería corresponder un nivel más elevado de expresión de la p185^{HER-2/neu}, otros factores pueden estar actuando y modulando los niveles de la oncoproteína. Desafortunadamente, el desconocimiento sobre los ligandos de la p185 y de los factores que regulan la transcripción del oncogén nos impiden interpretar este fenómeno. Quizás, el reciente descubrimiento de que algunos ligandos de la p185^{HER-2/neu} también se unen a la proteína codificada por el HER-4 (141) pueda, en el futuro aportar alguna luz sobre este tema. Estos resultados obtenidos por nosotros, no coinciden con los referidos por el grupo de D. Slamon (19,96), que, en dos aproximaciones metodológicas diferentes, encontró una correlación entre el número de copias y el nivel de expresión medio de la oncoproteína. Desconocemos el porqué de esta discrepancia.

5.4. ESTIMACION DE LA ACTIVIDAD DE LA p185^{HER-2/neu}

Que la p185^{HER-2/neu} se encuentre sobreexpresada en un espécimen tumoral no quiere decir que su actividad se halle aumentada. De acuerdo con la actividad biológica conocida para esta proteína, después de la unión del (los) factor(es) de crecimiento específicos a su

dominio extracelular (con actividad de receptor), la proteína experimenta un cambio conformacional que posibilita su dimerización. En este estado de dímero, determinados residuos de tirosina del dominio citosólico se autofosforilan, y esta fosforilación se traduce en una activación de la actividad tirosina quinasa presente en ese dominio (49), siendo la respuesta celular enteramente dependiente de la cascada de fosforilaciones que se desencadena.

El desconocimiento, hasta muy recientemente, de sustratos proteicos específicos de la p185^{HER-2/neu}, nos imposibilitó el poder determinar directamente el estado de la actividad tirosina quinasa de la oncoproteína en nuestras muestras. Sin embargo, la aproximación experimental utilizada, esto es, la de estimar el nivel de fosforilación en tirosina de la p185^{HER-2/neu} es una estimación indirecta suficientemente válida para, de acuerdo con lo conocido, tener una valoración bastante precisa del estado de actividad de esta proteína.

Los resultados mostraron que existía una asociación total entre las muestras con un bajo nivel de expresión de la p185^{HER-2/neu} y la ausencia de fosforilación de la oncoproteína, y que un alto porcentaje de las muestras que sobreexpresaban la p185^{HER-2/neu}, la tenían fosforilada. Este hecho nos induce a pensar que la sobreexpresión de la p185^{HER-2/neu} conlleva su activación (en el cáncer de mama), independientemente de los niveles de expresión de sus ligandos. Nuestros resultados coinciden con otros dos trabajos sobre el tema, uno realizado en líneas celulares tumorales mamarias, y el otro en una serie de 56 especímenes de cáncer de mama (134,142).

5.5. RELACION ENTRE LA ACTIVACION DEL HER-2/neu Y LOS FACTORES PRONOSTICOS

El análisis estadístico de la activación del HER-2/neu en nuestra serie de pacientes/especímenes agrupada en base a criterios tales como la edad, menopausia, tamaño del tumor, afectación nodular, metástasis a distancia y estadiaje clínicoquirúrgico, mostró diferencias significativas entre el número de tumores con el HER-2/neu activado y no activado, sólo al comparar las pacientes con edad superior a los 70 años con las que tenían menos de 40 años, y al comparar los tumores T4 con los T1 y T2.

Los factores pronósticos con utilidad clínica hoy en día son la T, el N y el M. Ellos configuran la clasificación TNM y el estadiaje clínicoquirúrgico: estadios I, II, III y IV. La ausencia de asociación entre la activación del HER-2/neu y estos parámetros no debe de sorprendernos. Nuestros resultados coinciden, con algunos matices, con la mayoría de la treintena larga de artículos publicados sobre la amplificación o sobreexpresión del HER-2/neu en el cáncer de mama (100,101,102,104,105,109,111).

Obviamente, si la activación del HER-2/neu tiene alguna utilidad pronóstica y/o terapéutica, la misma debe radicar en la posibilidad de utilizar su estado de activación para establecer, en pacientes previamente clasificados en base al T, N y/o M, subgrupos que previsiblemente tendrán un mejor o peor pronóstico y/o una mejor o peor respuesta a determinado tipo de terapia. A ese respecto, es interesante el hallazgo de que cuando las pacientes son clasificadas en base al estado de afectación axilar, la activación del HER-2/neu está significativamente asociada a los tumores de mayor tamaño en las pacientes sin

adenopatía axilar, lo que sugiere una cierta dependencia entre ambas variables; aspecto sobre el que debemos de profundizar en el futuro.

5.6 RELACION ENTRE ACTIVACION DEL HER-2/neu Y LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS

El estimación de los niveles de RE y RP se ha introducido como práctica común en los laboratorios de oncología mamaria, en gran medida después de los trabajos del grupo de W. McGuire en el Centro de la Salud de la Universidad de Texas, en San Antonio (143, 144). La presencia de los receptores de estrógenos tiene un interés doble. Por una parte, la positividad de los receptores se ha creído que reviste un interés pronóstico considerable. Por otra parte, indica la dependencia del crecimiento tumoral respecto de las hormonas gonadales, que, sin tener necesariamente la exclusividad, indudablemente favorecen su desarrollo.

En relación al posible interés pronóstico de este tipo de análisis, existe actualmente una abundante controversia, con algunos estudios mostrando una mejor prognosis cuando el RE y/o RP es detectado en el tumor, y con otros no encontrando esta mejora (73,75,76). En este punto hay que incidir en el hecho de que una explicación a buena parte de estas diferencias pueda radicar en diferencias en el tamaño de la muestra, tipo de población estudiada, metodología variada en la medida y en la definición de los niveles de receptores, diferentes períodos de seguimiento clínico de las pacientes, y si se ha administrado o no terapia adyuvante. Parece obvio, en cualquier caso, que la expresión de los RE y RP señala un cierto grado de diferenciación del tumor, lo que clínicamente es indicativo de buen

pronóstico.

Por lo que se refiere a la influencia de las hormonas ováricas sobre el crecimiento tumoral, hay bastante consenso en la literatura en que la positividad en RE y RP está estrechamente (aunque no totalmente) asociada a una mejor respuesta a la terapia endocrina, y, en particular, al tratamiento con antiestrógenos.

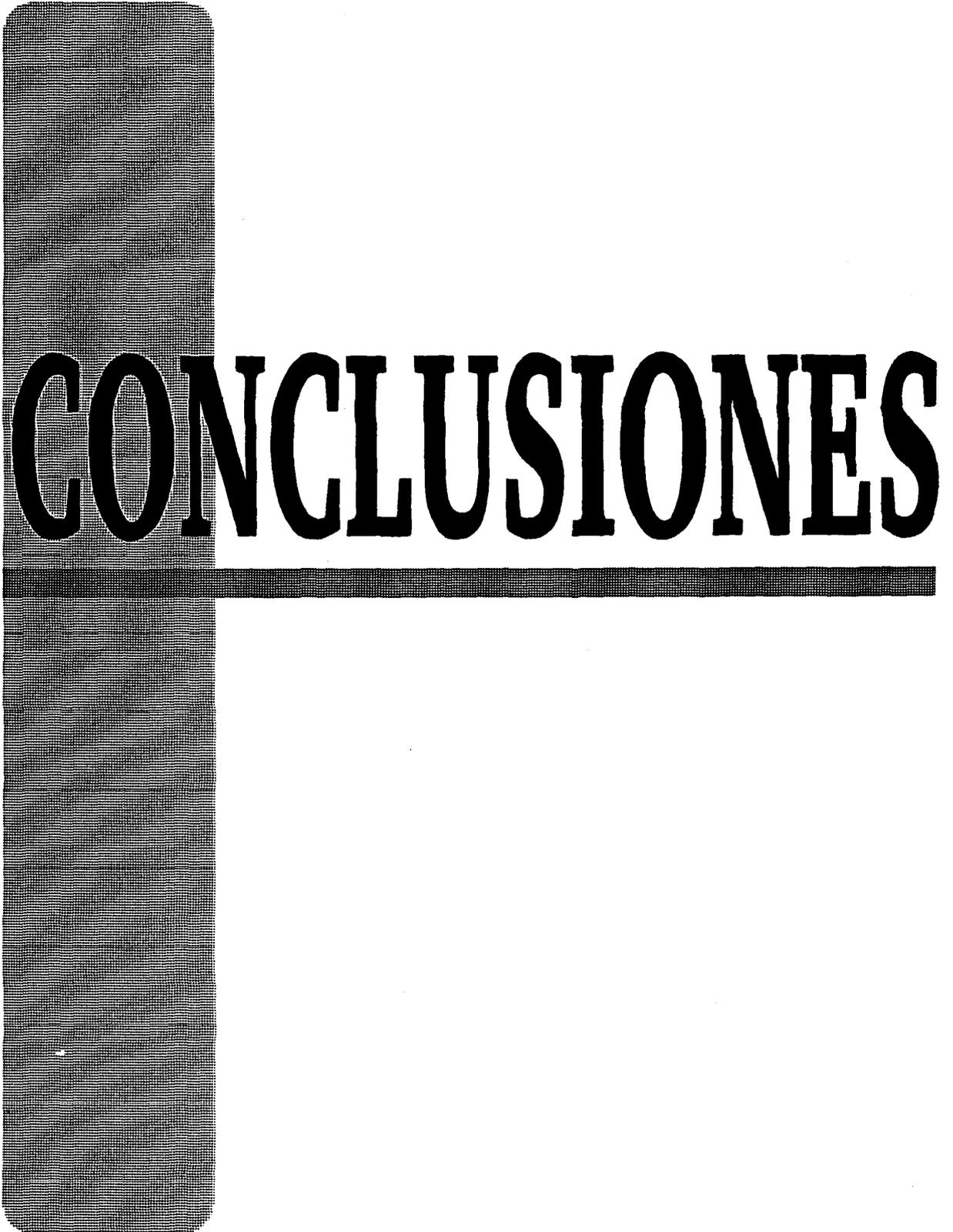
Los resultados sobre la expresión de RE y RP están en el rango de lo descrito en la literatura (75,76). La presencia de distintos fenotipos resultantes de las combinaciones RE \pm RP \pm es sumamente interesante - como ya se ha apuntado varias veces a lo largo de este trabajo - porque permite afinar en la clasificación de las pacientes que responderán a la terapia antiestrogénica. Así, es conocido que el 70% de las pacientes RE+ RP+ tendrán una respuesta objetiva positiva, mientras que ese porcentaje desciende a un 10% en las RE- RP-.

Nuestros datos sobre distribución del HER-2/neu activado en los tumores agrupados bien en base a la expresión de RE o RP, o bien en base a las combinaciones fenotípicas RE \pm RP \pm nos parece de gran interés.

Por una parte, muestran que un cierto porcentaje de tumores de cada uno de esos fenotipos muestra este oncogén activado. Si asumimos - como parece demostrar la abundante literatura al respecto -, que la activación del HER-2/neu es indicativo de una mayor agresividad tumoral, el utilizar el estado de este oncogén en el establecimiento de subgrupos de pacientes dentro de cada uno de los fenotipos estrogénicos, es previsible que nos ayude a: 1) clasificar mejor a las pacientes que previsiblemente tendrán una evolución clínica peor

(caso de la combinación RE- RP- HER-2/neu + (activado), 2) comprender porqué hasta un 30% de los tumores RE+ RP+ no presentan respuesta objetiva a la terapia antiestrogénica.

Por otra parte, nuestros resultados indican que la activación del gen HER-2/neu está inversamente asociada a los tumores que expresan RE y RP. Aún más, que esta asociación negativa está limitada a las pacientes sin afectación axilar. Es esto un fenómeno bastante novedoso que nos sugiere que en este tipo de tumores que todavía no han invadido los ganglios axilares, la presencia de los RE y RP podría ser considerada como un indicador de que la célula tumoral conserva aún intactos ciertos mecanismos de control que garantizan la estabilidad genómica de (al menos) algunos de sus componentes (tal como el mantener un número diploide de copias del gen HER-2/neu).



CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del estudio de 415 especímenes de cáncer de mama invasivo, consideramos que es posible establecer las siguientes conclusiones:

1. La co-amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos de 180 y 98 pb del oncogén HER-2/neu, conjuntamente con fragmentos de 119 del β -interferón o de 150 pb de γ -interferón como genes de referencia permite conocer el número de copias del oncogén presentes en especímenes de cáncer de mama.
2. Este procedimiento cumple los requisitos de bajo consumo de muestra, reproducibilidad, especificidad y sensibilidad por lo que puede ser considerado como un procedimiento rápido, no radiactivo y seguro para conocer el estado del gen HER-2/neu en tejido tumoral.
3. La comparación de los resultados obtenidos en la co-amplificación del HER-2/neu con los de cuantificación de la expresión de su producto génico, la p185^{HER-2/neu}, estudiado mediante ELISA, permite establecer que una relación de 1,7 entre las intensidades de las bandas electroforéticas de los fragmentos del HER-2/neu y los genes de referencia, y un nivel de 250 fmol de p185^{HER-2/neu}/mg proteína, son puntos de corte seguros para afirmar que un espécimen contiene un número anormalmente alto de copias de HER-2/neu, o que hay sobreexpresión de dicho oncogén.

4. El procedimiento de co-amplificación permitió establecer que el 15% de los 415 especímenes de cáncer de mama analizados contenían un número extra de copias del oncogén HER-2/neu. Un porcentaje similar de tumores sobreexpresaba la p185^{HER-2/neu}.
5. En los tumores analizados existió un grado de coincidencia del 89 % entre la presencia de copias supernumerarias del oncogén y la sobreexpresión del producto génico p185^{HER-2/neu}; sin embargo, la abundancia de p185^{HER-2/neu} no presentó correlación cuantitativa con el grado de amplificación del gen, más allá de una clara sobreexpresión.
6. La abundancia de p185^{HER-2/neu} mostró una elevada correlación con el estado de fosforilación de dicha proteína en todos los especímenes estudiados, por lo que es posible establecer que, en el cáncer de mama, la sobreexpresión del oncogén implica también su activación.
7. La activación del oncogén HER-2/neu se correlacionó significativamente con el mayor tamaño del tumor y con la menor edad de la paciente, pero no con la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico, el estadio clínico o la afectación ganglionar axilar.
8. Los tumores que contenían receptores de progesterona presentaron un número significativamente menor de especímenes conteniendo el oncogén HER-2/neu activado que los especímenes negativos para dicho receptor. Los tumores que contenían

receptores de estrógenos también mostraron tendencia a tener menor activación del HER-2/neu.

9. Los tumores conteniendo simultáneamente receptores de estrógenos y receptores de progesterona mostraron un número significativamente menor de especímenes conteniendo el oncogén HER-2/neu activado que los especímenes carentes de ambos tipos de receptores.
10. La clasificación de las pacientes según el estado de afectación de los ganglios axilares mostró que la asociación negativa encontrada entre la activación del oncogén HER-2/neu y la presencia de receptores de estrógenos, de receptores de progesterona, o de ambos, estaba limitada a las pacientes sin afectación ganglionar.
11. Con un seguimiento medio de 2,5 años para las 415 pacientes estudiadas, se ha detectado una correlación significativa de la presencia de receptores de estrógenos y de progesterona en el espécimen con una mayor supervivencia, y de la activación del oncogén HER-2/neu con una menor supervivencia.



AGRADECIMIENTOS

Sirvan estas líneas para expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible que este trabajo viera la luz, así:

Agradezco muy especialmente a D. Juan Carlos Díaz Chico, director de este trabajo, todo lo que me ha enseñado en el terreno profesional y académico, tanto como su trato, amistad, y generosidad conmigo. Sin ninguna duda, el trabajar con él, ha sido una de mis mejores experiencias.

A D. Ricardo Chirino Godoy, codirector de este trabajo, por su confianza en mí, por lo que de él he aprendido y por su humanidad.

A D. Nicolás Díaz Chico aparte de lo que a mí respecta, que es mucho, por mantener un excelente grupo de trabajo unido, que es la base de lo mejor de nosotros.

A mis compañeros de laboratorio Santiago Torres, que sin ninguna necesidad se ha convertido en un experto en fotomontaje, Leandro Fernández, Juan Rivero, Domingo Navarro, Jose Pestano, Antonio López, Luis Dominguez, Noemí Cabrera, Octavio Pérez, Manuel Zumbado, Pilar Díaz y Norberto Santana porque hacen que sea feliz trabajando en su compañía, en la medida que esto es posible, claro está.

A D. Atanasio Pandiella por sus reflexiones sobre este trabajo, que siempre sirvieron de inspiración.

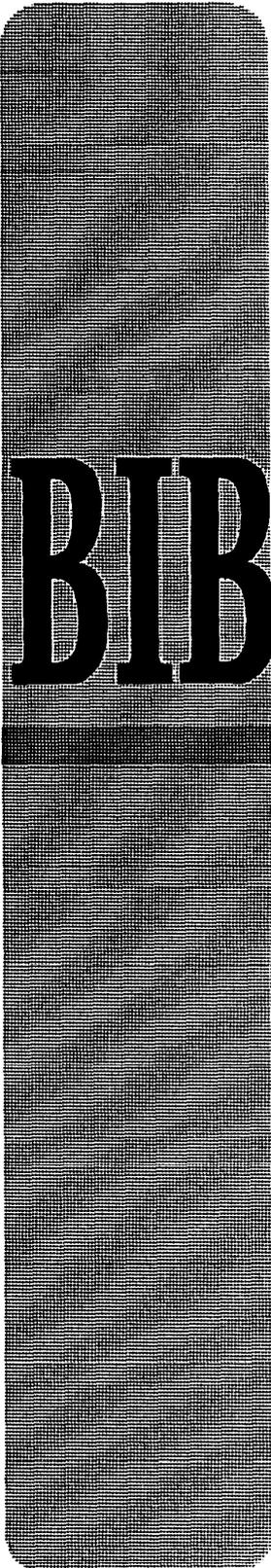
A D. Laureano León Arencibia por facilitarnos todo lo posible nuestro trabajo y estar siempre dispuesto a colaborar.

A D. Victor Vega por su colaboración y asesoramiento.

A Dña. Ana Fortes por la ayuda prestada en la manufactura de esta Memoria.

Y por último quisiera agradecer a mi familia y amigos su apoyo y cariño constante, en especial a mi padre por ser un tipo genial.

En resumen, muchísimas gracias a todos, y deseo que en cualquier circunstancia parecida se encuentren con un grupo de personas tan maravillosas como el que yo he disfrutado estos años.



BIBLIOGRAFIA

1. Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G. and Shoyab, M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1746-1750, 1993.
2. Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.-C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A. and Ullrich, A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230: 1132-1139, 1985.
3. Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. and Toyoshima, K. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319: 230-234, 1986.
4. Schechter, A.L., Hung, M.C., Vaidyanathan, L., Weinberg, R.A., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Ullrich, A. and Coussens, L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229: 976-978, 1985.
5. Bargmann, C.I., Hung, M.C. and Weinberg, R.A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319: 226-230, 1986.
6. Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarkias, H., Kimes, B., Patrick, J. and Steinbach, J.H. Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249: 224-227, 1974.
7. Bargmann, C.I., Hung, M.C. and Weinberg, R.A. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 45: 649-657, 1986.
8. Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R. and Leder, P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54: 105-115, 1988.
9. Suda, Y., Aizawa, S., Furuta, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Saitoh, K., Yamada, Y., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. Induction of a variety of tumors by c-erbB2 and clonal nature of lymphomas even with the mutated gene (Val659—Glu659). *EMBO J.* 9: 181-190, 1990.
10. Yarden, Y. Agonistic antibodies stimulate the kinase encoded by the neu protooncogene in living cells but the oncogenic mutant is constitutively active. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2569-2573, 1990.
11. Brandt-Rauf, P.W., Rackovsky, S. and Pincus, M.R. Correlation of the structure of the transmembrane domain of the neu oncogene-encoded p185 protein with its function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8660-8664, 1990.
12. Sternberg, M.J. and Gullick, W.J. Neu receptor dimerization letter. *Nature* 339: 587, 1989.
13. Weiner, D.B., Liu, J., Cohen, J.A., Williams, W.V. and Greene, M.I. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339: 230-231, 1989.
14. Bargmann, C.I. and Weinberg, R.A. Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5394-5398, 1988.
15. Bargmann, C.I. and Weinberg, R.A. Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *EMBO J.* 7: 2043-2052, 1988.
16. Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R. and Aaronson, S.A. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237: 178-182, 1987.
17. Gullick, W.J. The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int. J. Cancer Suppl. 5D: 55-61*, 1990.
18. 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* 235: 177-182, 1987.
19. Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and Press, M.F. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712, 1989.
20. Kern, J.A., Schwartz, D.A., Nordberg, J.E., Weiner, D.B., Greene, M.I., Torney, L. and Robinson, R.A. p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res.* 50: 5184-5187, 1990.
21. Park, J.B., Rhim, J.S., Park, S.C., Kimm, S.W. and Kraus, M.H. Amplification, overexpression, and rearrangement of the erbB-2 protooncogene in primary human stomach carcinomas. *Cancer Res.* 49: 6605-6609, 1989.
22. Peles, E., Levy, R.B., Or, E., Ullrich, A. and Yarden, Y. Oncogenic forms of the neu/HER2 tyrosine kinase are permanently coupled to phospholipase C gamma. *EMBO J.* 10: 2077-2086, 1991.
23. Goldman, R., Levy, R.B., Peles, E. and Yarden, Y. Heterodimerization of the erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry* 29: 11024-11028, 1990.
24. Connelly, P.A. and Stern, D.F. The epidermal growth factor receptor and the product of the neu protooncogene are members of a receptor tyrosine phosphorylation cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6054-6057, 1990.

25. Spivak-Kroizman, T., Rotin, D., Pinchasi, D., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Lax, I. Heterodimerization of c-erbB2 with different epidermal growth factor receptor mutants elicits stimulatory or inhibitory responses. *J. Biol. Chem.* 267: 8056-8063, 1992.
26. Stancovski, I., Hurwitz, E., Leitner, O., Ullrich, A., Yarden, Y. and Sela, M. Mechanistic aspects of the opposing effects of monoclonal antibodies to the ERBB2 receptor on tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8691-8695, 1991.
27. Lehtinen, H., Lehtola, L., Sistonen, L. and Alitalo, K. A chimeric EGF-R-neu proto-oncogene allows EGF to regulate neu tyrosine kinase and cell transformation. *EMBO J.* 8: 159-166, 1989.
28. Lee, J., Dull, T.J., Lax, I., Schlessinger, J. and Ullrich, A. HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *EMBO J.* 8: 167-173, 1989.
29. Pandiella, A., Lehtinen, H., Magni, M., Alitalo, K. and Meldolesi, J. Activation of an EGFR/neu chimeric receptor: early intracellular signals and cell proliferation responses. *Oncogene* 4: 1299-1305, 1989.
30. Sistonen, L., Holtta, E., Lehtinen, H., Lehtola, L. and Alitalo, K. Activation of the neu tyrosine kinase induces the fos/jun transcription factor complex, the glucose transporter and ornithine decarboxylase. *J. Cell Biol.* 109: 1911-1919, 1989.
31. Stancovski, I., Peles, E., Ben Levy, R., Lamprecht, R., Kelman, Z., Goldman-Michael, R., Hurwitz, E., Bacus, S., Sela, M. and Yarden, Y. Signal transduction by the neu/erbB-2 receptor: a potential target for anti-tumor therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43: 95-103, 1992.
32. Scott, G.K., Dodson, J.M., Montgomery, P.A., Johnson, R.M., Sarup, J.C., Wong, W.L., Ullrich, A., Shepard, H.M. and Benz, C.C. p185HER2 signal transduction in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 266: 14300-14305, 1991.
33. Jallat, B., Schlessinger, J. and Ullrich, A. Tyrosine phosphatase inhibition permits analysis of signal transduction complexes in p185HER2/neu overexpressing human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 267: 4357-4363, 1992.
34. Peles, E., Lamprecht, R., Ben-Levy, R., Tzahar, E. and Yarden, Y. Regulated coupling of the Neu receptor to phosphatidylinositol 3'-kinase and its release by oncogenic activation. *J. Biol. Chem.* 267: 12266-12274, 1992.
35. Yarden, Y. and Weinberg, R.A. Experimental approaches to hypothetical hormones: detection of a candidate ligand of the neu protooncogene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 3179-3183, 1989.
36. Lupu, R., Colomer, R., Zugmaier, G., Shepard, M., Slamon, D. and Lippman, M. Direct interaction of a ligand for the erbB-2 oncogene product with EGF receptor and p185erbB-2. *Science* 249: 1552-1555, 1990.
37. Lupu, R., Colomer, R., Kannan, B. and Lippman, M. Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular response. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 2287-2291, 1992.
38. Holmes, W.E., Sliwkonsky, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W., Yansura, D., Abadi, M., Raab, 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* 256: 1205-1210, 1992.
39. Dobashi, K., Davis, J.G., Mikami, Y., Freeman, J.K., Hamuro, J. and Greene, M.I. Characterization of a neu/c-erbB-2 protein-specific activating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8582-8586, 1991.
40. Tarakhovskiy, A., Zaichuk, T., Prassolov, V. and Butenko, Z.A. A 25 kDa polypeptide is the ligand for p185neu and is secreted by activated macrophages. *Oncogene* 6: 2187-2196, 1991.
41. Huang, S.S. and Huang, J.S. Purification and characterization of the neu/erb B2 ligand-growth factor from bovine kidney. *J. Biol. Chem.* 267: 11508-11512, 1992.
42. Peles, E., Bacus, S.S., Koski, R.A., Lu, H.S., Wen, D., Ogden, S.G., Levy, R.B. and Yarden, Y. Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69: 203-216, 1992.
43. Peles, E., Ben-Levy, R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D. and Yarden, Y. Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/hergulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *EMBO J.* 12: 961-971, 1993.
44. Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S.V., Bacus, S.S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S.M., Ben Levy, R., 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* 69: 559-572, 1992.
45. Marchionni, M. A., Goodearl, A.D.J., Chen, M.S., Birmingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Daney, F., Mizumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K., Wroblewski, D., Lynch, C., Baldassare, M., Hiles, I., Davis, J.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F., Otta, M., McDermney, R.N., Waterfield, M.D., Stroband, P. and Gwynne, D. Glial growth factor are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362: 312-318, 1993.
46. Falls, D.L., Rosen, K.M., Corfas, G., Lane, W.S. and Fischbach, G.D. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the

- neu ligand family. *Cell* 72: 801-815, 1993.
47. Bacus, S.S., Stancovski, I., Huberman, E., Chin, D., Hurwitz, E., Mills, G.B., Ullrich, A., Sela, M. and Yarden, Y. Tumor-inhibitory monoclonal antibodies to the HER-2/Neu receptor induce differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 52: 2580-2589, 1992.
 48. Orr-Urtreger, A., Trakhtenbrot, L., Ben-Levy, R., Wen, D., Rechavi, G., Lonai, P. and Yarden, Y. Neural expression and chromosomal mapping of Neu differentiation factor to 8p12-p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1867-1871, 1993.
 49. Peles, E. and Yarden, Y. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factor. *BioEssays* 15: 815-824, 1993.
 50. Elledge R.M. and McGuire W.L. Prognostic Factors in axillary node-negative breast cancer. En R.B. Dickson y M.E. Lippman (editores): *Genes, Oncogenes and Hormones: Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer*. Kluwer Academic Publisher, Boston, 1991.
 51. Morales, M. Estudio epidemiológico y aspectos clínicos de presentación del cáncer de mama en la provincia de Santa Cruz de Tenerife. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. 1988.
 52. De Waard F., Baanders-Van Haewijjn E.A. and Huizinga J. The bimodal age distribution of patients with mammary carcinoma. *Cancer* 17: 141-151. 1964.
 53. Anderson D.E. Some characteristics of familial breast cancer. *Cancer* 28: 1500-1504. 1971.
 54. Winder E.L., Bross J.J. and Hirayama T. A study of the epidemiology of cancer of the breast. *Cancer* 13: 559-601. 1960.
 55. Mac Mahon B., Cole Ph. and Brown, J. Etiology of human breast cancer. A review. *J.Natl. Cancer Inst* 50: 21-42, 1973.
 56. Valaoras V.G., Mac Mahon, B., Trichopoulos, D. and Polychronopoulou, A. Lactation and reproductive histories of breast cancer patients in Greater Athens. *Int. J. Cancer* 4: 350-363. 1969.
 57. Dupont W.D. and Page D.L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative disease. *N. Engl. J. Med.* 312: 146-151. 1985.
 58. Vutuc C. and Kunze M: Zur hypothese der Beziehung zwischen mamakarzinom und ernahrung. *Wiend Med. Worthenschr* 128: 428-430. 1978.
 59. Nemoto T., Tominaga T., Chamberlain A., Iwasa, Z., Koyama, H., Hama, M., Bros, I. and Dao T. Differences in breast cancer between Japan and the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 193-197. 1977.
 60. Feinleib M. Breast cancer and artificial menopause. A cohort study. *J. Natl. Cancer Inst.* 41: 315-329. 1968.
 61. Kelsey, J.L.: A review of the epidemiology of human breast cancer. *Epidemiol. Rev.* 1: 74-109, 1979.
 62. Oral contraceptive use and the risk of breast cancer. The cancer and steroid hormone study of the centers for disease control and the national institute of child health and human development. *N. Engl. J. Med.* 315: 405-411. 1986.
 64. Carter, C.L., Allen, C. and Henson, D.E: Relationship of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63: 181-187, 1989.
 65. Rosen, P.P., Groshen, S., Saigo, P.E., Kinne, D.V. and Hellman, S. Pathological prognostic factors in Stage I (T1N0M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with with median followup of 18 years. *J. Clin. Oncol.* 7: 1239-1251. 1989.
 66. Fisher, B., Bauer, M., Margolese, K., Margolese, R., Poisson, R., Pilch, Y., Redmon, C., Fisher, E., Wolmark, N., Deutsch, M. and Montague, E. Five year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with and without radiation in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 312:665-672. 1985.
 67. Fisher, B., Redmon, C., Fisher, E.R., Bauer, M., Wolmark, N., Wickerham, D.L., Deutsch, M., Montague, E., Margolese R. and Foster, R. Ten years results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with and without radiation. *N. Engl. J. Med.* 312:675-682. 1985.
 68. Fisher, B., Redmond, C., Fisher, E.R., and Caplan, R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 6: 1076 1087, 1988.
 69. Delides, G.S., Garas, G., Georgouli, G., Jiortziotis R.B., Lecca, J., Liva, T. and Elemenoglou, J. Intralaboratory variations in the grading of breast carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 106: 126-128, 1982.
 70. Dressler, L.G., Seamer, L.C., Owens, M.A., Clark, G.M. and McGuire, W.L. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 61: 420-427, 1988.
 71. Clark, G.M., Dressler, L.G., Owens, M.A., Pounds, G., Oldaker, T. and McGuire, W.L. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl. J. Med.* 320: 627-633, 1989.
 72. Moran, R.E., Black, M.M., Alpert, L. and Straus, M.J. Correlation of cell-cycle kinetics, hormone receptors, histopathology and nodal status in human

- breast cancer. *Cancer* 54: 1586-1590, 1984.
73. Knight, W.A., Livingston R.B., Gregory, E.J., and McGuire, W.L. Estrogen receptor as an independent prognosis factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res.* 37: 4669-4671, 1977.
 74. Fawell, S.E., Lees, J.A., White, R. and Parker, M.G. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60: 953-962, 1990.
 75. Horwitz, K.B. and McGuire, W.L. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 253: 2223-2228, 1978.
 76. Osborne, C.K., Yochmowitz, M.G., Knight, W.A. and McGuire, W.L. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 46: 2884-2888, 1980.
 77. Rayter, Z. Steroid receptor in breast cancer. *Br. J. Surg.* 78: 528-35, 1991.
 78. Osborne, C.K., Hamilton, B., Titus, G. and Livingston R.B. Epidermal Growth Factor stimulation on human breast cancer cell in culture. *Cancer Res.* 40: 2361-2366, 1981.
 79. Lewis, S., Locker, A., Todd, J.H., Bell, J.A., Nicholson, R., Elston, C.W., Blamey, R.W. and Ellis I.O. Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 43: 385-389, 1990.
 80. Battaglia, F., Scambia, G., Rossi, S., Panici, P.B., Bellamone, K., Polizzi, G., Querzoli, P., Negrini, R., Iacobelli, S. and Crucitti, F. Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid receptors and axillary node involvement. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24: 1685-1690, 1988.
 81. Grimaux, M., Romain, S., Remvikos, Y., Martin, P.M. and Magdelenat, H. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 14: 77-90, 1989.
 82. Rochefort, H., Augereau, P. and Briozzo, P. Structure, function regulation and clinical significance of the 52 kd pro-cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Biochimie* 70: 943-949, 1988.
 83. Tandon, A.K., Clark, G.M., Chamness, G.C., Chirgwin, J.M. and McGuire, W.L. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl. J. Med.* 322: 297-302, 1990.
 84. Thorpe, S.M., Rochefort, H., Garcia, M., Freiss, G., Christensen, I.J., Khalaf, S., Paolucci, F., Pau, B., Rasmussen, B.B. and Rose, C. Association between high concentrations of M52000 cathepsin D and poor prognosis in primary breast cancer. *Cancer Res.* 49: 6008-6014, 1989.
 85. Rio, M.C. and Chambon, P. The pS2 gene, mRNA, and protein: A potential marker for human breast cancer. *Cancer Cells* 2: 269-274, 1990.
 86. Rio, M.C., Bellocq, J.P., Gairard, B., Raamussen, U.B., Krust, A., Koehl, C., Calderoli, H., Schiff, V., Renaud, R. and Chambon, P. Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancer in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptor and the oncogene ERBB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9243-9247, 1987.
 87. Knudson, A.G. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820-824, 1971.
 88. Casey, G.L., Hsueh, M., Lopez, M.E., Vogelstein, B. and Stanbridge E.J. Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of the wild-type p53 gene. *Oncogene* 6: 1791-1797, 1991.
 89. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. p53 mutations in human cancer. *Science* 5: 49-53, 1991.
 90. Thor, A.D., Moore, D.H., Edgerton, S.M., Kawasaky, E.S., Reihnsaus, E., Lynch, H.T., Marcus J.N., Schwartz, L., Chen, L.C., Mayall, B.H. and Smith, H.S. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in the breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 84: 845-855, 1992.
 91. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stern, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49: 729, 1987.
 92. Cole, M.D. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Ann. Rev. Genet.* 20: 361, 1986.
 93. Barbacid, M. Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 779-827, 1987.
 94. Bos, J.L. Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* 49: 4682, 1989.
 95. Rilke, F., Colnaghi, M.I., Cascinelli, N., Andreola, S., Baldini, M.T., Bufalino, R., Della Porta, G., Menard, S., Pierotti, M.A. and Testori, A. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int. J. Cancer* 49: 44-49, 1991.
 96. Press, M.F., Pike, M.C., Chazin, V.R., Hung, G., Udove, J.A., Markowicz, M., Danyluk, J., Godolphin, W., Sliwkowski, M., Akita, R., Paterson, M.C. and Slamon, D.J. Her-2/neu Expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res.* 53: 4060-4070, 1993.
 97. Varley, J.M., Swallow, J.E., Brammar, W.J., Whittaker, J.L. and Walker, R.A. Alterations to

- either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene* 1: 423-430, 1987.
98. Tandon, A.K., Clark, G.M., Chamness, G.C., Ullrich, A. and McGuire, W.L. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 7: 1120-1128, 1989.
99. Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Hirota, T., Tsugane, S., Yamamoto, H., Miyajima, N., Toyoshima, K., Yamamoto, T., Yokota, J., Yoshida, T., Sakamoto, H., Terada, M. and Sugimura, T. Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: *hst-1/int-2* and *c-erbB-2/ear-1*. *Cancer Res.* 49: 3104-3108, 1989.
100. Walker, R.A., Gullick, W.J. and Varley, J.M. An evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short-term prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 60: 426-429, 1989.
101. Wright, C., Angus, B., Nicholson, S., Sainsbury, J.R., Cairns, J., Gullick, W.J., Kelly, P., Harris, A.L. and Home, C.H. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* 49: 2087-2090, 1989.
102. Borg, A., Tandon, A.K., Sigurdsson, H., Clark, G.M., Ferno, M., Fuqua, S.A., Killander, D. and McGuire, W.L. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 50: 4332-4337, 1990.
103. Borresen, A.L., Ottestad, L., Gaustad, A., Andersen, T.I., Heikkila, R., Jahnsen, T., Tveit, K.M. and Nesland, J.M. Amplification and protein over-expression of the *neu/HER-2/c-erbB-2* protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis. *Br. J. Cancer* 62: 585-590, 1990.
104. Gullick, W.J., Love, S.B., Wright, C., Barnes, D.M., Gusterson, B., Harris, A.L. and Altman, D.G. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br. J. Cancer* 63: 434-438, 1991.
105. Lovekin, C., Ellis, I.O., Locker, A., Robertson, J.F., Bell, J., Nicholson, R., Gullick, W.J., Elston, C.W. and Blamey, R.W. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer published erratum appears in *Br. J. Cancer* 64: 202, 1991. *Br. J. Cancer* 63: 439-443, 1991.
106. Winstanley, J., Cooke, T., Murray, G.D., Platt-Higgins, A., George, W.D., Holt, S., Myskov, M., Spedding, A., Barraclough, B.R. and Rudland, P.S. The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* 63: 447-450, 1991.
107. Kallioniemi, O.P., Holli, K., Visakorpi, T., Koivula, T., Helin, H.H. and Isola, J.J. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int. J. Cancer* 49: 650-655, 1991.
108. Ro, J.S., el-Naggar, A., Ro, J.Y., Blick, M., Frye, D., Fraschini, G., Fritsche, H. and Hortobagyi, G. c-erbB-2 amplification in node-negative human breast cancer. *Cancer Res.* 49: 6941-6944, 1989.
109. Paterson, M.C., Dietrich, K.D., Danyluk, J., Paterson, A.H., Lees, A.W., Jamil, N., Hanson, J., Jenkins, H., Krause, B.E., McBlain, W.A., Slamon, D.J. and Fourney, R.M. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 51: 556-567, 1991.
110. Ali, I.U., Campbell, G., Lidereau, R. and Callahan, R. Lack of evidence for the prognostic significance of c-erbB-2 amplification in human breast carcinoma. *Oncogene Res.* 3: 139-146, 1988.
111. Clark, G.M. and McGuire, W.L. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* 51: 944-948, 1991.
112. Barnes, D.M., Lammie, G.A., Millis, R.R., Gullick, W.L., Allen, D.S. and Altman, D.G.. An immunohistochemical evaluation of c-erbB2 expression in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 58: 448-452, 1988.
113. Guerin, M., Barrois, M., Terrier, M.J., Spielmann, M. and Riou, G. Overexpression of either c-myc or c-erbB-2/neu proto-oncogenes in human breast carcinomas: correlation with poor prognosis. *Oncogene Res.* 3: 21-31, 1988.
114. Guerin, M., Gabillot, M., Mathieu, M.C., Travagli, J.P., Spielmann, M., Andrieu, N. and Riou, G. Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int. J. Cancer* 43: 201-208, 1989.
115. Tavassoli, M., Quirke, P., Farzaneh, F., Lock, N.J., Mayne, L.V. and Kirkham, N. c-erbB-2/c-erbA co-amplification indicative of lymph node metastasis, and c-myc amplification of high tumour grade, in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 60: 505-510, 1989.
116. Uehara, T., Kaneko, Y., Kanda, N., Yamamoto, T., Higashi, Y., Nomoto, C., Izumo, T., Takayama, S. and Sakurai, M. C-erbB-2 and c-erbA-1 (ear-1) gene amplification and c-erbB-2 protein expression in Japanese breast cancers: their relationship to the histology and other disease parameters. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 620-624, 1990.
117. Garcia, I., Dietrich, P.Y., Aspro, M., Vauthier, G., Vadas, L. and Engel, E. Genetic alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. *Cancer Res.* 49: 6675-6679, 1989.

118. Heintz, N.H., Leslie, K.O., Rogers, L.A. and Howard, P.L. Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114: 160-163, 1990.
119. DePotter, C. R.Beghin, C., Marack A. P., Vandekerckhove, D. and Roels, H.J. The neu oncogene protein as a predictive factor for hematogenous metastases in breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 45: 55-58, 1990.
120. Allred, D.C., Clark, G.M., Molina, R., Tandon, A.K., Schnitt, S.J., Gilchrist, K.W., Osborne, C.K., Tormey, D.C. and McGuire, W.L. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ invasive breast cancer. *Hum. Pathol.* 23: 974-979, 1992.
121. Muss, H.B., Thor, D., Berry, D.A., Kute, T., Liu, E.T., Koerner, F., Cirincione, C.T., Budman, D.R., Wood W.C., Barcos, M. and Henderson C. C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 330: 1260-1266, 1994.
122. Matsuda, S., Kadowaki, Y., Ichino, M., Akiyama, T., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. 17- β -Estradiol mimics ligand activity of the c-erbB2 protooncogene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10803-10808, 1993.
123. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
124. Thorne, H.V. Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* 29: 234-239, 1966.
125. Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. v-erbB-related proto-oncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6497-6501, 1985.
126. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. and Chambon, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-a. *Nature* 320:134-139, 1986.
127. Ohno, S. and Taniguchi, T. Inducer-responsive expression of the cloned human interferon β gene introduced into cultured mouse cells. *Nucleic Acids Res.* 10: 967-977, 1982.
128. Neubauer, A., Neubauer, B., He, M., Effert, P., Iglehart, D., Frye, R.A., Liu, E. Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 7: 1019-1025, 1992.
129. Gray, P.W. and Goeddel, D.V. Structure of human immune interferon gene. *Nature* 298: 859-863, 1982.
130. McKenzie, S.J., Marks, P.J., Lam, T., Morgan, J., Panicali, D.L., Trimpe, K.L. and Carney, W.P. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the human neu oncogen product, p185. *Oncogene* 4: 543-548, 1989.
131. Van de Vijver, M.J., Peterse, J.L., Mooi, W.J., Wisman, P., Lomans, J., Dalesio, O. and Nusse, R. Neu-protein overexpression in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 319: 1239-1245, 1988.
132. Navarro, D., Cabrera, J.J., León, L., Chirino, R., Fernández, L., López, A., Rivero, J.F., Fernández, P., Falcón, O., Jiménez, P., Pestano, J., Díaz-Chico, J.C. and Díaz-Chico, B.N. Endometrial stromal sarcoma expression of estrogen receptors, progesterone receptors and estrogen-induced arp27 (24K) suggests hormone responsiveness. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41: 589-596, 1992.
133. Chirino, R., López-Guerra, A., Fernández, L., Boada, L.D., Valerón, P.F., Díaz-Chico, J.C. and Díaz-Chico, B.N. The role of growth hormone regulation of low affinity glucocorticoid-binding sites from male rat liver microsomes. *Endocrinology* 134:409-415, 1994.
134. Wildenhain, Y., Pawson, T., Blackstein, M.E. and Andrulewicz, I.L. p185 is phosphorylated on tyrosine in human primary breast tumors which overexpress neu/erbB-2. *Oncogene* 5: 879-883, 1990.
135. Thorpe, S.M., Rose, C., Rasmussen, H.T., Mouridsen, H.T., Bayer, T. and Keiding, N. Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node-negative primary breast cancer. *Cancer Res.* 47: 6126-6133, 1987.
136. Clark, G.M., McGuire, W.L., Hubay, C.A., Pearson, O.H. and Marshall J.S. Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 309: 1343-1347, 1983.
137. Navarro, D. Caracterización de las formas nativas del receptor de estrógenos en mioma uterino humano. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 1994.
138. Frye, R.A., Benz, C.C. and Liu, E. Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 4: 1153-1157, 1989.
139. Liu, E., Thor, A., He, M., Barcos, M., Ljung, B.-M. and Benz, C. The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene* 7: 1027-1032, 1992.
140. Carney, W.P., Hamer, P.J., Petit, D., Retos, C., Greene, R., Zabrecky, J.R., McKenzie, S., Hayes, D., Kufe, D., DeLellis, R., Naber, S. and Wolfe, H. Detection and quantitation of the human neu oncoprotein. *J. Tumor Marker Oncol.* 6: 53-72, 1991.
141. Plowman, G.D., Green, J.M., Culouscou, J.-M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M. and Buckley, S.

- Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180^{erbB-4}. *Nature* 366: 473-475, 1993.
142. King, C.R., Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Segatto, O., Kraus, M.H. and Aaronson, S.A. Oncogenic potential of the erbB-2 gene: frequent overexpression in human mammary adenocarcinomas and induction of transformation in vitro. Ed: M.E. Lippman (editor). Growth regulation of cancer. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.
143. McGuire, W.L. Estrogen receptor versus nuclear grade as prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 6: 1071-1072, 1988.
144. McGuire, W.L. and Clark, G.M. Prognosis in breast cancer. *Recent Res. Cancer Res.* 115: 170-174, 1989.