

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN
“h-MAM” EN CÁNCER DE MAMA HUMANO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María José Núñez Villar

Bajo la dirección del doctor

José Schneider Fontán

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2036-6

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.1.1 ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA HUMANO

Factores hormonales

Factores genéticos

Factores ambientales

Antecedentes de enfermedad benigna de mama

1.2 FACTORES PRÓNOSTICOS EN CÁNCER DE MAMA

1.2.1 FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS

1.2.1.1 Edad

1.2.1.2 Tamaño

1.2.1.3 Tipo histológico

1.2.1.4 Ganglios linfáticos

1.2.1.5 Ploidía y actividad proliferativa

1.2.1.6 Grado de diferenciación celular

1.2.2. FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES

2.2.1. Aspectos generales

1.3 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CARCINOMA DE MAMA

1.3.1 GENES SUPRESORES Y PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD p53

retinoblastoma

ciclinas D

ciclina E

1.3.2 ONCOGENES Y AMPLIFICACIÓN GÉNICA

c-erbB2

Bcl-2 y Bax

1.4 EVENTOS TEMPRANOS Y TARDIOS EN EL DESARROLLO TUMORAL

1.5 FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES RELACIONADOS CON LA INVASIÓN Y METÁSTASIS

1.5.1 CRECIMIENTO

1.5.2 VASCULARIZACIÓN DEL TUMOR (ANGIOGÉNESIS)

1.5.3 SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL TUMOR E INTRAVASACIÓN

1.5.4 EXTRAVASACIÓN

1.5.5 MIGRACIÓN E INVASIÓN

1.5.6 CRECIMIENTO

1.5.7 CAMBIOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA METÁSTASIS

CD44

1.6 MAMOGLOBINA HUMANA (*h-MAM*)

2 OBJETIVOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS TUMORALES

3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

3.2.1 Anticuerpos

3.2.2 Interpretación de resultados inmunohistoquímicos

3.3 CITOMETRÍA

3.3.1 Tratamiento de las muestras para análisis por citometría de flujo

3.3.1.1 Tratamiento de las muestras tumorales para análisis del ciclo celular por citometría de flujo

3.3.1.2 Tratamiento de las muestras tumorales para análisis de marcadores reguladores de la tumorigénesis: Bcl-2, Bax y VEGF

3.3.2 Anticuerpos

3.3.3 Interpretación de resultados citométricos

3.4. EXTRACCIÓN DE RNA DE LAS MUESTRAS TUMORALES

3.4.1 Tratamiento de las muestras para la extracción del RNA

3.5 RT-PCR

3.5.1 Interpretación de resultados

3.6 ESPECTROFOTOMETRÍA

3.7 CUANTIFICACIÓN DE *h-MAM*

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4 DISCUSIÓN

5 CONCLUSIONES

6 BIBLIOGRAFÍA

Abreviaturas más comunes usadas en el texto

AFs	proteínas receptoras intracelulares
Apt	activador de plasminógeno tisular
AT	ataxia-teleangiectasia
CAMs	moléculas de adhesión celular
CD44std	CD44 estándar
CDI	carcinoma ductal infiltrante
CDIS	carcinoma ductal “in situ”
cdk	kinasa dependiente de ciclina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CLI	carcinoma lobulillar infiltrante
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleótido trifosfato
EF	factor de elongación
EGF	factor de crecimiento epitelial
EGFr	receptor de factor de crecimiento epitelial
FAD	fibroadenoma
fase S	fase de síntesis del ciclo celular
FISH	“fluorescent in situ hybriditation”
gap	proteína activadora de la GTPasa
GH	grado histológico
GN	grado nuclear
Gp	glicoproteína
GTP	guanosín trifosfato
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
HDA	hiperplasia ductal atípica
HDAC	histoadenilacetilasa
HIER	“heat-induced epitope retrieval”
<i>h-MAM</i>	mamoglobina humana
hsp	proteína de estrés térmico
HSR	“homogeneously staining regions”
ID	índice de DNA
IHQ	inmunohistoquímica
ILE	intervalo libre de enfermedad
Kb	kilobase
LOH	pérdida de heterocigosidad
MFQ	mastopatía fibroquística
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
μ	micra
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetros
nm	nanómetro

jNMP	metaloproteinasas
OMS	organización mundial de la salud
pb	pares de bases
PBS	“phosphate buffered saline” (solución fosfato tamponado)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR-SSCP	“polymerase chain reaction-single strand polymorphism”
p-Rb	retinoblastoma fosforilado
RE	receptor de estrógeno
RNA	ácido ribonucleico
RNA_m	ácido ribonucleico mensajero
RP	receptor de progesterona
rpm	revoluciones por minuto
rPSC₃	esteroide prostático de rata C ₃ de prostateína
RT-PCR	“reverse transcriptase” PCR
rUg	uteroglobina de conejo
SBP-r	receptor de proteína de unión a los esteroides sexuales
seg	segundo
SERM	modulador selectivo de los RE
SG	supervivencia global
TGF-β	factor de crecimiento de transformación β
TK	tirosín kinasa
ug	nanogramos
ul	microlitro
Um	nanómetros
uPA	activador del plasminógeno “urokinasa like”
v	voltios
VEGF	factor de crecimiento endotelial epitelial

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

El cáncer de mama es la neoplasia femenina más frecuente, ya que más del 8-9% de las mujeres desarrollan la enfermedad a lo largo de su vida (Gairard B et al. 1998).

A lo largo de todo el siglo XX, se ha producido un aumento constante en la incidencia de cáncer de mama, tanto en países con mayores incidencias de la enfermedad (Estados Unidos de América, Europa y Australia), como en otros con incidencias menores (Japón y China). Así, por ejemplo, en 1999, en los Estados Unidos de América, se diagnosticaron 176.300 nuevos casos y fallecieron 43.700 mujeres por cáncer de mama (Landis SH, 1999).

España es un país con una incidencia de tipo medio, al igual que los países del sur de Europa. En el periodo de 1990-1994, fallecieron 28.250 mujeres a causa de la enfermedad, aumentando el número de casos desde 1980 (Levi et al. 1999).

Representando el cáncer de mama la causa de mayor mortalidad por cáncer en el sexo femenino, no resulta extraño que numerosos grupos de trabajo hayan centrado su actividad investigadora en el estudio de su biología, no sólo con el objetivo de conocer su génesis y evolución, sino también con el de trasladar a la clínica parámetros diagnósticos y pronósticos.

1.1.1 ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA HUMANO

No se conoce en la actualidad la causa del cáncer de mama. No obstante, existen factores, tanto exógenos como endógenos, que se asocian con un incremento de incidencia de la enfermedad. Esos factores se pueden clasificar en hormonales, genéticos, ambientales y asociados a la existencia de enfermedades benignas previas.

Factores hormonales

El desarrollo de la biología molecular ha establecido la asociación entre factores de riesgo de cáncer de mama y el polimorfismo genético de varias enzimas implicadas en la biosíntesis y el metabolismo estrogénico (Miyoshi et al. 2000). Los estrógenos son mitógenos que incrementan el ritmo proliferativo celular, favoreciendo el paso de células de G0 al ciclo celular, reduciendo la duración de G1 y del ciclo en su conjunto (Schuchard et al. 1993). Debido a este mecanismo de acción, pueden favorecer la acumulación de errores genéticos producidos al azar, y finalmente podrían dar como resultado el desarrollo de la neoplasia (Colditz et al. 1998; Vergote et al. 2000).

Estudios epidemiológicos han mostrado que la exposición prolongada a niveles elevados de estrógenos, ya sean endógenos o exógenos, está asociada a alto riesgo de cáncer de mama. Así, menarquia temprana, menopausia tardía, nuliparidad, obesidad y el uso de hormonas en postmenopáusicas, son factores de riesgo para el desarrollo de la neoplasia (Miyoshi et al. 2000). La menarquia antes de los 14 años multiplica el riesgo de cáncer de mama por un factor de 1.1 a 1.9 comparado con la menarquia después de los 14 años (MacMahon et al. 1982; Saracci et al. 1978).

De forma similar, la menopausia tardía también incrementa el riesgo: mujeres con menopausia antes de los 45 años tienen la mitad de riesgo que las mujeres que la tuvieron después de los 55. (Henderson, 1989) Parece que cuanto más larga es la vida menstrual mayor es la incidencia de cáncer de mama (Verheul et al. 2000).

El riesgo de cáncer de mama para una mujer que tiene su primer hijo vivo después de los 30 años es casi el doble que el de la que lo tiene antes de los 20 años. En las nulíparas el riesgo se multiplica por tres (Trichopoulos et al. 1983; Brinton et al 1983). El efecto protector del embarazo también ha sido estudiado en relación con la gestación múltiple, siendo menor el riesgo en mujeres con gemelos, que en aquellas que tuvieron un solo hijo (Lumbe et al. 1996).

Se han publicado numerosos estudios sobre la posible relación entre la administración de estrógenos exógenos y el riesgo de cáncer de mama, y parece que ésta podría aumentar moderadamente el riesgo de padecer la enfermedad, tanto en mujeres premenopáusicas, como postmenopáusicas. Sin embargo, son mayores los beneficios del tratamiento que el potencial de riesgo (Scheefe et al. 1999; Koukoulis, 2000; Hulka et al. 2001). Además, los estudios publicados sobre la administración de estrógenos y progestágenos exógenos, ya sean anticonceptivos orales o terapia hormonal sustitutiva, son conflictivos y deben ser interpretados cautelosamente debido a los cambios en las dosis de hormonas en el tiempo y a los métodos de administración empleados (Helzlsouer et al. 1995).

En cuanto a la concentración de hormonas circulantes en postmenopáusicas, las concentraciones de estradiol, testosterona libre y prolactina en plasma están fuertemente asociadas con el riesgo de cáncer de mama. No existen diferencias significativas entre postmenopáusicas con y sin cáncer de mama, respecto a las concentraciones de 2-OH estrona y 16-OH estrona. En premenopáusicas, concentraciones elevadas de IGF-I se asocian a un riesgo elevado de cáncer de mama (Miyoshi et al. 2000).

Factores genéticos

La historia familiar es probablemente el factor de riesgo más ampliamente conocido. Sin embargo, la mayoría de las mujeres con una historia familiar de cáncer de mama no tienen la forma de la enfermedad transmitida genéticamente, y por tanto alteraciones genéticas predisponentes al cáncer de mama. Actualmente se considera que tan sólo del 5-10% de los cánceres que se diagnostican son hereditarios.

Existen factores que aumentan el índice de sospecha de que una mujer pueda tener riesgo de cáncer de mama transmitido genéticamente. Dichos factores son: múltiples parientes afectados, tanto maternos como paternos, historia familiar de cáncer de ovario asociado con cáncer de mama, e historia familiar de cáncer de mama bilateral y/o de aparición precoz.

El gen BRCA1 está asociado a una predisposición genética al cáncer, y fue aislado en el cromosoma 17q21. El estudio realizado por Couch et al (1997) en 169 pacientes, puso de manifiesto que el 16% de las pacientes con historia familiar de cáncer de mama mostraron mutaciones en el gen BRCA1, siendo más frecuente en aquellas pacientes con historia familiar de cáncer de mama y de ovario (40%).

Una segunda anomalía genética relacionada con el cáncer de mama es la mutación del gen BRCA2, que ha sido localizado en el cromosoma 13q12-13. Este gen no se asocia con el cáncer de ovario (Helzouer KJ, 1995).

Otros genes implicados en el cáncer heredofamiliar de mama son el p53, AT (ataxia-telangiectasia) y PTEN /MMAC (Fackenthal et al. 2001; Marsh et al. 2001; Hamann et al. 2000; Tonin et al. 2000).

Factores ambientales

El hecho de que exista una incidencia diferente de carcinoma de mama en la geografía, hace pensar que los factores ambientales contribuyan al riesgo de padecer la enfermedad. Así, América del Norte, el Norte de Europa y Oceanía, presentan una elevada incidencia, mientras que América del Sur y Central y Este de Europa presentan una incidencia media, y África y Asia cuentan con los niveles más bajos de incidencia de carcinoma de mama.

Antecedentes de enfermedad benigna de mama

La relación entre enfermedad benigna de mama y el riesgo de cáncer de mama se ha revisado recientemente en detalle. Fitzgibbons et al (1998) han clasificado las lesiones benignas mamarias en cuatro grandes grupos en función del riesgo de desarrollar un carcinoma invasivo, en comparación con las mujeres que no han sido sometidas a una biopsia de mama:

- sin aumento del riesgo:

adenosis (no adenosis esclerosante)

ectasia ductal

fibroadenoma sin rasgos complejos*

fibrosis

mastitis

hiperplasia ligera sin atipia

quistes

metaplasia apocrina simple (sin hiperplasia o adenosis)

metaplasia escamosa

- con riesgo ligeramente aumentado (por 1.5-2):

fibroadenoma con rasgos complejos*

hiperplasia moderada o intensa sin atipia

adenosis esclerosante

papiloma solitario sin hiperplasia atípica asociada

- con riesgo medianamente aumentado (por 4-5):

hiperplasia ductal atípica

hiperplasia lobulillar atípica

- con marcado aumento del riesgo (por 8-10):

carcinoma ductal “in situ”, siempre y cuando sean lesiones pequeñas, de bajo grado y de tipo no comedo

carcinoma lobulillar “in situ”

* Se entiende por rasgos complejos: quistes mayores de 3 mm, adenosis esclerosante, calcificaciones y cambios papilares apocrinos.

1.2 FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA

1.2.1 FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS

Para una paciente en particular, el curso de la enfermedad es impredecible. Unas mueren por enfermedad metastática en un año mientras que otras con tumores aparentemente similares, sobreviven durante décadas. Debido a esta marcada variabilidad, hay un considerable interés en la identificación de características predictivas del comportamiento del tumor que ayuden a establecer una terapéutica más racional y efectiva.

El conocimiento de la extensión de la enfermedad es crucial para una primera aproximación al pronóstico, existiendo factores que nos dan idea del estadio. Entre ellos destacamos los siguientes:

1.2.1.1 Edad

La edad es un importante factor de riesgo. Aunque una de cada ocho mujeres desarrollará cáncer de mama, ésta es una estimación del riesgo acumulativo, ocurriendo un 50% después de los 65 años. El nivel de riesgo para las mujeres en edades jóvenes es bastante bajo, y en ausencia de otros factores de riesgo, la posibilidad de desarrollar cáncer de mama entre los 35 y 55 años es solamente del 2.5%.

Desde el punto de vista de la detección precoz, se ha observado que la mamografía es efectiva en todas las edades, pero es más sensible en mujeres mayores, que son las que presentan cáncer de mama más avanzado. Sin embargo, los peores pronósticos, asociados a recidivas tempranas, tienen lugar en mujeres menores de 35 años, al ser sus tumores más proliferativos (Varlemmens et al. 1998).

1.2.1.2 Tamaño

Numerosos estudios han demostrado la correlación entre el tamaño y la afectación ganglionar axilar, de tal modo que se acepta que ésta es un parámetro independiente del tamaño, pero con efecto aditivo sobre aquél (Orr 1999).

Asimismo, el tamaño es un importante factor para establecer el riesgo de recidivas o metástasis y se ha visto, en pacientes sin ganglios axilares invadidos, que el porcentaje de recidivas a los 5 años es del 11% para los carcinomas menores de 2 cm, del 22 % cuando oscilan entre 2 y 3 cm y del 25% cuando sobrepasan los 5 cm.

Especial interés clínico posee conocer la probabilidad de recidivas en tumores menores de 1cm (12 %) en relación con los casos comprendidos entre 1 y 2 cm (28 %).

1.2.1.3 Tipo histológico

Existe un gran número de clasificaciones del cáncer de mama basadas en criterios morfológicos, microscópicos, citológicos, etc. Sin embargo, las más empleadas son la de la OMS (Organización Mundial de la Salud) (Scarf y Torloni, 1968) y la de Azzopardi (Azzopardi et al. 1979). En ambas existe una división clara y con gran importancia pronóstica entre carcinomas infiltrantes y no infiltrantes.

Los carcinomas no infiltrantes son aquellos que no han roto la membrana basal, denominándose también carcinomas “in situ”. Pueden aparecer en los ductos o en los alveolos. Los primeros son los intraductales y los segundos los intralobulillares. Dentro de los intraductales se pueden distinguir cinco tipos: cribiforme, comedocarcinoma, micropapilar, sólido y carcinoma papilar. Tanto los intraductales como los intralobulillares pueden hacerse infiltrantes, presentando los segundos un alto riesgo (Andersen, 1974). Estos carcinomas no invasores

raramente dan metástasis. Dentro de los carcinomas infiltrantes nos encontramos los ductales infiltrantes (CDI), que suelen ser el 70-80% de todos los carcinomas mamarios, y los lobulillares infiltrantes (CLI), que representan el 5% de todos los carcinomas infiltrantes y que poseen una mayor tendencia que los anteriores a ser multicéntricos, bilaterales y a dar metástasis en huesos y en meninges. Además, existen otros tipos especiales, como son el carcinoma medular, mucinoso, tubular y secretante, que poseen mejor pronóstico que el CDI clásico. El carcinoma papilar presenta un pronóstico similar, y el inflamatorio un pronóstico muy desfavorable (Pérez Manga, 1989; Winchester Det al. 1996).

1.2.1.4 Ganglios linfáticos

La región axilar es la principal área del drenaje linfático de la mama por lo que no resulta extraño que el estudio de los ganglios linfáticos axilares constituya un importante indicador pronóstico en los tumores mamarios, siendo numerosos los trabajos que demuestran su valor en la clínica diaria. De hecho, el estado ganglionar sigue siendo aún hoy, el factor pronóstico más importante en cáncer de mama (Ellis et al. 1998; Maguire et al. 1998).

Así, para tumores de igual tamaño, la supervivencia a los cinco años es un 20% mayor en ausencia que en presencia de afectación ganglionar axilar. También se ha demostrado de gran valor pronóstico el número de ganglios afectados, siendo 4 un dintel con utilidad para distinguir dos subgrupos de pacientes con un diferente riesgo, cifrándose la supervivencia libre de enfermedad en un 20-30 % superior cuando el número de adenopatías invadidas es inferior a 4 (Jatoi I et al. 1999).

1.2.1.5. Ploidía y actividad proliferativa

En los últimos años se han publicado un elevado número de artículos que han reseñado las aplicaciones de la citometría de flujo en investigación y en la práctica clínica. Aquellos ponen de relieve el valor de dicha técnica en la

identificación y cuantificación de parámetros celulares, tales como contenido de DNA y actividad proliferativa.

Se ha descrito una relación inversa entre la aneuploidía y nivel de estrógenos; es decir, los tumores aneuploides son más frecuentemente RE-. Una relación semejante se ha encontrado con los RP. Asimismo la aneuploidía, es un factor pronóstico de menor intervalo libre de enfermedad (ILE) y supervivencia total (Leers et al. 2000).

En cuanto a la fase S, o fracción de proliferación, ha sido también comparada con una gran variedad de características del tumor. Los tumores con fase S elevada son con frecuencia pobremente diferenciados y RE- (Silvestrini et al. 1979). También parece tener valor como parámetro pronóstico negativo de supervivencia global e ILE (Clark et al. 1992).

La ploidía celular y la fase de síntesis del DNA son factores pronósticos y predicen el estadio del desarrollo del cáncer de mama. La aneuploidía se asocia con ganglios axilares invadidos, alto grado histológico y ausencia de RE, mientras que los tumores diploides con bajos valores de fase S, cursan con un buen pronóstico (Dieterich et al. 1995).

Algunos estudios demuestran un 80% de concordancia en el contenido de DNA entre CDIS y el carcinoma invasivo, lo que implica que los mayores cambios en el contenido de DNA suelen producirse durante la progresión de la neoplasia y no necesariamente en la transición de no invasivo a invasivo (Masood et al. 1998).

Los tumores tetraploides presentan mayor fase S y superiores porcentajes de positividad de fase S que los diploides. Asimismo, cursan con mayores concentraciones de receptor de estrógenos y menores de activador del plasminógeno tipo tisular, y de ácido hialurónico de membrana. Estos resultados sugieren que los tumores tetraploides presentan una mayor proliferación, así como ciertos indicadores biológicos sugestivos de una mayor indiferenciación celular,

todo lo cual podría explicar su diferente comportamiento clínico en relación al de los diploides.

1.2.1.6 Grado de diferenciación celular

Otro parámetro anatomopatológico ampliamente utilizado es el grado de diferenciación tumoral. Se obtiene analizando tres aspectos del tejido tumoral: formación de túbulos, hipercromatismo y mitosis, e irregularidades en tamaño, forma y tinción de los núcleos. De esta manera se obtiene una valoración de diferenciación del tumor. Se dan valores de I a los más diferenciados y valores de III a los más indiferenciados y, por tanto, con mayor potencialidad agresiva. Un grado histológico (GH) elevado predice una recidiva más temprana y un intervalo de supervivencia más corto (Clark et al. 2000), así como una tasa de invasión ganglionar significativamente superior en tumores de menos de 2cm (Schneider et al, 1999).

1.2.2 FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES

1.2.2.1 Aspectos generales

En los últimos años se ha intentado correlacionar la patología clásica con los nuevos avances de la biología molecular, para hallar una relación entre eventos moleculares y etapas definidas en la historia natural del cáncer de mama. De este modo, la información molecular puede complementar el desarrollo histopatológico y ayudar a definir no sólo la evolución de la enfermedad sino el curso del tratamiento.

Uno de los factores moleculares más importantes, y primero en ponerse en práctica en el estudio del carcinoma de mama, fueron los **receptores hormonales** (RE y RP), por depender de ellos el pronóstico de la enfermedad, contribuir en la regulación de la proliferación y diferenciación de células epiteliales mamarias, así como en la selección de pacientes candidatas al tratamiento hormonal, a pesar de no ser factores pronósticos independientes muy potentes.

Los receptores esteroideos son fosfoproteínas, factores de transcripción latentes, que se activan tras la interacción con sus ligandos. En ausencia de éstos últimos, el receptor está secuestrado en complejos macromoleculares formados por monómeros del receptor y por proteínas asociadas (hsp 90, hsp 70, p59 y otras).

Los esteroides regulan el ciclo celular actuando sobre puntos definidos de la fase G1, pudiendo ejercer también su efecto sobre los genes que regulan dicha fase del ciclo celular, como son la ciclina D1, Myc, cdk2, cdk4, inhibidores de cdk y Cdc25A, así como sobre moléculas necesarias para entrar en la fase S (Foster et al. 2001; Prall et al. 1998). Cassanelli et al. (1995) han observado que la capacidad de síntesis del receptor de progesterona y su concentración se relacionan con la fase del ciclo celular y el tiempo de duplicación de la población. Otro hecho interesante es que en las dos últimas décadas se ha visto un aumento en las concentraciones de

los RE, lo cual puede reflejar un cambio en la biología del carcinoma mamario y/o en los eventos normales que influyen en la génesis y crecimiento del mismo (Pujol et al. 1994).

Las hormonas esteroideas difunden a través de la membrana plasmática de la célula diana y se unen a proteínas receptoras intracelulares (AFs). La unión del ligando activa los receptores, los cuales regulan directamente la transcripción de determinados genes. Los receptores intracelulares, una vez que se han unido al ligando se unen a secuencias específicas del DNA adyacentes a los genes que están regulados por el ligando correspondiente. La unión del ligando altera la conformación de la proteína receptora, la cual entonces activa la transcripción génica.

Clínicamente, las hormonas esteroideas son factores clave en la génesis de los carcinomas mamarios, por tanto la determinación de sus receptores es obligatoria, pues constituyen indicadores pronósticos y de respuesta al tratamiento endocrino (Osborne 1998, Hilsenbeck et al. 1998). A este respecto, se sabe que esta respuesta se consigue en el 77% de los carcinomas RE+RP+, en el 46% de los RE-RP+, en el 27% de los RE+RP- y en el 11% de los casos RE-RP-. Existen dos grupos bien diferenciados en cuanto a su comportamiento posterior: los carcinomas RE+RP+ y los RE-RP-, siendo conflictivos los RE+RP- y RE-RP+, donde se ha comprobado que 1/3 de los tumores RE+ no responden hormonalmente, 1/10 de los tumores RE- responden a terapia hormonal, 1/5 de los tumores RE+ son RP- y 1/3 de los tumores RE- son RP+, lo cual induce a pensar que existe alguna variable, todavía desconocida, a nivel biológico o funcional, en la cadena de transducción esteroidea.

Bernoux et al. (1998) han estudiado el comportamiento de los tumores RE- en función o no de la positividad para los RP, observando que los tumores RE-RP+ tenían un menor tamaño, eran más frecuentemente GH1, se daban en mujeres más jóvenes y preferentemente premenopáusicas, asociándose a una mayor supervivencia a los cinco años.

Se ha visto que los estrógenos (principalmente el 17β estradiol) en los tumores RE+ tienen un efecto dual, pues estimulan el crecimiento de los mismos (Foster et al. 2001), pero inhiben la invasión y motilidad, posiblemente debido a otras proteínas inducidas y reguladas por los estrógenos, algunas de las cuales se localizan en la matriz extracelular (Prall et al. 1998). Los estrógenos producen un aumento de la actividad mitótica en tejido mamario y endometrial; errores en los mecanismos de división producen malignidad. La activación de los receptores esteroideos implica la interacción de éstos (localizados en el núcleo celular) con los estrógenos y progesterona, que son retenidos a nivel nuclear. Vergote et al. 2000, han estudiado la expresión de las dos isoformas (α formada por 595 aa y β con 485 aa) de los RE, observando que se expresan en distinta proporción según el tejido y pueden ser activados con diferentes afinidades por componentes esteroideos y no esteroideos. Algunos órganos expresan ambos subtipos, y diferentes tipos de células dentro de cada órgano puede expresar ambos RE, indicando que los RE α y RE β tienen diferentes funciones. Los RE β se expresan en mama, próstata, ovario, pulmón, riñón, tracto gastrointestinal y colon mientras que los RE α se expresan en mama, SNC, útero e hígado (Gustafsson et al. 2000). Speirs et al. (1999) han visto que en el tejido mamario normal predomina la expresión de la isoforma β . Por el contrario los carcinomas de mama expresan la isoforma α , sola o en combinación con la β . La expresión de receptores β en tumores que muestran ambas isoformas puede explicar el fallo frente a la terapia antiestrogénica. Ambas isoformas se han clonado en humanos y roedores y poseen dominios funcionales (A-F), cada uno responsable de diferentes funciones, como son: unión hormonal, respuesta hormonal, activación de transcripción (AFs) o iniciación de transcripción génica (Vashisht et al. 2000).

En un estudio realizado por Cullen et al. (2001) en 104 carcinomas de mama y 22 fibroadenomas (FAD) mediante técnica RT-PCR, encontraron una mayor expresión de RNAm de RE β en FAD que en carcinoma. La expresión de RP se asoció con la de RE α en carcinoma, y de forma inversa con la expresión de RE β . Existen dos tipos de receptores de progesterona, A y B, pudiendo el primero ejercer

un efecto represor sobre las funciones del tipo B y el receptor estrogénico α (Osborne, 1998). Los RE y RP se coexpresan aproximadamente en el 10-20% de las células epiteliales de mama normal, siendo fundamentales en el desarrollo y diferenciación funcional de la glándula mamaria (Sutherland, 1998).

Khan et al. 1994, examinaron la relación entre el diagnóstico de cáncer de mama y niveles de expresión de RE en tejido epitelial benigno de mama. Los niveles de expresión de RE fueron mayores en pacientes con cáncer de mama que en el grupo control de pacientes sanas, y estuvieron relacionados con riesgo de padecer la enfermedad en postmenopáusicas.

Los beneficios de la terapia endocrina son proporcionales a la cantidad de RE presente en el tumor. Los RE se han determinado por inmunohistoquímica o midiendo sus niveles en citosol mediante ensayo de unión a ligando. La ventaja de esta última técnica es que podemos determinar las concentraciones y funcionalidad de los RE y es una técnica reproducible (Leake et al. 2000). El estudio inmunohistoquímico ofrece la ventaja de la visualización directa de los receptores en los núcleos de las células neoplásicas, lo que evita falsos positivos en la determinación bioquímica.

En cuanto al uso de hormonoterapia en el tratamiento de carcinoma de mama, el tamoxifeno, modulador selectivo de los RE (SERM), es la droga más utilizada, por reducir el riesgo de recidivas tanto en carcinoma “in situ” como en invasivo. Dhingra (2001), ha observado una disminución de la incidencia de cáncer de mama en pacientes postmenopáusicas con riesgo para desarrollar la enfermedad, que realizaron tratamiento preventivo con tamoxifeno.

Recientemente se ha propuesto otro tipo de agentes como alternativa a la hormonoterapia, como son los isoflavonoides, los cuales se unen con mayor afinidad a los RE β (Kuiper et al. 1997). Los isoflavonoides se encuentran en la soja; sin embargo, en un estudio con pacientes control que consumían soja, no se

observó asociación entre este consumo y un menor riesgo de padecer la enfermedad en mujeres postmenopáusicas. El consumo de soja en animales inhibe el efecto estimulador de proliferación celular en la mama. En relación con estos hechos, Messina, (2000) concluye que no existen suficientes datos acerca de los isoflavonoides y la posible terapia sustitutiva de la hormonoterapia.

Otro agente ligado a la hormonoterapia es la tibolona, progestágeno con parte estrogénica y efecto androgénico que reduce la densidad de la mama en mujeres postmenopáusicas. Gompel et al. (2000) observaron que este agente disminuía la proliferación celular de la mama y aumentaba la diferenciación y apoptosis.

Se ha descrito un receptor específico de membrana, SBP-R (“sex steroid binding protein receptor) receptor de proteína de unión a los esteroides sexuales (Catalano et al. 1997), cuya expresión en los cánceres de mama se asocia con una menor proliferación celular y un mejor comportamiento clínico.

1.3 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CARCINOMA DE MAMA

Existen dos tipos de alteraciones genéticas que ocurren en el cáncer en general y en el cáncer de mama en particular: pérdida de genes supresores con su manifestación cromosómica, que es la pérdida de heterocigosidad (LOH), y activación de oncogenes.

1.3.1 GENES SUPRESORES Y PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD

Los genes supresores son genes que modulan la proliferación u otras actividades de los tejidos y que deben ser inactivados para permitir la progresión del proceso neoplásico (Marshall, 1991; Weinstein, 1991; Vogelstein et al. 1993). El mecanismo más común por el cual se inactiva la función de un gen supresor es la mutación de una de las copias del gen y la pérdida de la otra copia del gen como consecuencia de aberraciones cromosómicas mayores (deleciones, translocaciones y recombinaciones intracromosómicas) (Green, 1988). Este último mecanismo cromosómico se refleja en la pérdida de genes (alelos) maternos o paternos en una región definida del genoma (pérdida de heterocigosidad o LOH).

Se ha descrito la pérdida de LOH en numerosas regiones cromosómicas. Las más comunes son: 1p34-35, 1q23-32, 3p21-25, 6q, 7q31, 9, 11p15, 11q22-23, 13q14, 16q, 17p13, 17q, 18q23-ter y 22q. (Brenner et al. 1995; Borg et al. 1994; Callahan et al. 1992; Clenton-Jansen et al. 1994; Lindblom et al. 1993; Nagai et al. 1995; Tsuda et al. 1994). La identidad de los genes responsables de estas

alteraciones cromosómicas ha sido concretada solamente en alguna de estas regiones.

LOH en 17p13 está asociada a la pérdida del gen supresor **p53**, que ha sido hallada en aproximadamente el 46% de los casos (Pezeshki et al. 2001). La proteína p53 es una fosfoproteína que actúa como factor de transcripción del núcleo y que tiene funciones de regulación de crecimiento, apoptosis y control de la fidelidad de la transcripción (Levine et al. 1991). Se le ha denominado el guardián celular por su especial acción; así, cuando la célula está dañada, se estimula la producción de p53, que a su vez producirá:

- Parada de la proliferación, para evitar que la célula defectuosa prolifere y se perpetúe.
- Estimulación de la muerte celular programada (apoptosis).
- Inhibición de la angiogénesis

La inducción de p53 después del daño genético asegura la inhibición de la replicación genómica por medio de p21 y estimula la reparación del DNA por medio del gen dependiente de p53, GADD45. Las células que carecen de p53 funcional, como ocurre en algunas células tumorales, no pueden evitar la replicación del DNA dañado, lo cual lleva a la inestabilidad genómica y a la progresión tumoral.

p53 es el gen somáticamente mutado más común en los cánceres esporádicos, y cuando es mutante en la línea germinal, hace que el locus de susceptibilidad del cáncer hereditario se vuelva responsable del síndrome de Li-Fraumeni (Varley 2001). Se han detectado alteraciones de p53 a nivel proteico entre un 15-50% en CDI (Done et al. 2001) y mutación del gen en el 46% de los casos (Pezeshki et al. 2001). También se han visto metilaciones aberrantes en CpG en la región del promotor de

p53, la cual es independiente del grado de invasión tumoral. Estas hipermetilaciones son una alternativa a la tumorigénesis cuando no existe mutación de p53 (Kang et al. 2001).

El gen p53 está implicado en la progresión del carcinoma de mama, y para demostrarlo, Umekita et al. 1994 estudiaron por inmunohistoquímica su expresión en 83 CDI, 10 CDI con componente intraductal, 13 CDIS, 16 HDA y 27 hiperplasias epiteliales benignas. p53 se expresó en el 29% de los CDI, 50% de los CDI con componente intraductal y 8% de CDIS, siendo la expresión mayor en los subtipos comedo. No se expresó ni en HDA ni en hiperplasias epiteliales benignas. En esta misma línea, Siziopikou et al. (1996) examinaron la expresión de p53 en tejido normal de mama, enfermedades de mama no patológicas y CDIS y vieron ausencia de expresión en tejido normal, hiperplasia normal, HDA y carcinoma lobulillar in situ. La mayoría de los CDIS eran p53 negativos correspondiendo su expresión a lesiones diferenciadas. Resultados similares fueron observados por Alexierv et al. 1997.

Ringberg et al (2001) también encontraron una mayor correlación entre mutación de p53 y carcinomas “in situ” del subtipo comedo, en el estudio que realizaron en 187 pacientes con CDIS, con un seguimiento de 62 meses. Resultados similares obtuvieron Iwase et al. (2001) en 65 CDIS, encontrando expresión de p53 en el 33% de los casos relacionados con los carcinomas comedo. Además se han estudiado 35 carcinomas ductales apocrinos in situ, de perfil hormonal y morfológico distinto a CDIS, con grados histológicos 1-3, y se ha visto una expresión de p53 en el 62% de los casos (Leal et al. 2001).

La alteración de p53 ocurre en los CDIS con mayores grados histológicos y se mantiene en la evolución de los carcinomas, por lo que está implicado en las formas invasivas fomentando la inestabilidad genómica y resistencia a terapia (Done et al. 2001).

Algunos autores no han visto correlación entre mutación de p53 y parámetros clínico-patológicos comunes (tamaño del tumor, expresión de RE, invasión ganglionar o diagnóstico histopatológico), siendo un factor pronóstico independiente que estaría relacionado con la agresividad del tumor (Khaliq et al. 2001; Pezeshki et al. 2001). Sin embargo, Shoa et al. (2001), al estudiar el gen supresor p53 en 126 pacientes con cáncer de mama, detectaron mutaciones en el 36% de los tumores primarios, y de ellos el 65% presentaba mutaciones de p53 en el DNA plasmático. Las mutaciones en p53 se relacionaron significativamente con el estadio clínico, índice mitótico, tamaño y expresión de RE. Tras seguimiento de 29 meses, realizaron análisis uni- y multivariable y vieron que mujeres con tumores primarios que presentaban p53 mutado en el DNA plasmático tuvieron una menor supervivencia, y ésta fue independiente de la afectación ganglionar, por lo que p53 es un factor pronóstico de supervivencia e ILE y puede ser utilizado como marcador temprano de recurrencia y metástasis a distancia (Shao et al 2001; Takashima, 2001; Umekita et al. 1994; Mc Laughlin et al. 2001; Thor et al. 2000). Iwase et al (2001) en su estudio realizado sobre 65 CDIS y 60 CDI, vieron la misma expresión de p53 en CDIS que en CDI, la cual se correlacionaba con positividad para c-erb-B2 (estudiada también por Korkolis et al. 2001; Umekita et al. 1994), RE, y Ki67.

En relación con los receptores hormonales, en un estudio realizado por Ioakim-Liossi et al. (2001), se obtuvieron resultados que contradicen lo expuesto anteriormente, ya que encontraron una asociación negativa entre expresión de p53 y positividad para RE y RP.

Alesiev et a (1997) han visto una correlación positiva entre la expresión de p53 y c-erb-B2 en un estudio inmunohistoquímico sobre 129 carcinomas de mama y 58 lesiones benignas, donde encontraron expresión conjunta de ambos marcadores en el 48% de los casos, concluyendo que ambos marcadores, bien por separado, o conjuntamente, están relacionados con el pronóstico del cáncer de

mama, permitiendo la definición de lesiones intraductales y diferenciación entre hiperplasia ductal atípica (HDA) (donde no se expresaron) y CDIS. Sin embargo, en otro estudio realizado por Ho et al. (2000) en 30 CDIS, encontraron expresión de p53 en el 20% de las muestras y de c-erb-B2 en el 40% de los CDIS, sin alteración en tejido normal, y no encontraron correlación entre ambas alteraciones genéticas. Además no vieron alteraciones entre los distintos subtipos de CDIS (comedo, micropapilar, papilar, cribiforme y sólido) ni correlación entre mutación de p53 y grado nuclear del tumor.

En dicho estudio, clasificaron tumores grado II en dos subgrupos: uno con menor potencial de malignidad, con p53- y positividad para RE y RP, y otro con mayor potencial de malignidad, con p53+ y negatividad para RE y RP, datos que no se relacionan con lo expuesto anteriormente.

En cuanto al valor predictivo de p53 en mujeres tratadas con tamoxifeno, no existe correlación entre expresión de este gen y respuesta a tamoxifeno en pacientes con RE+ en estadios tempranos de cáncer de mama, si bien se ha visto que en mujeres con RE+, c-erb-B2+, y p53+ es útil la terapia con tamoxifeno durante el primer año (Knoop et al. 2001).

Otro gen supresor es el **retinoblastoma (Rb)**, localizado en el cromosoma 13q14, región que se encuentra delecionada en el 30% de los casos de cáncer de mama. El gen Rb codifica una proteína nuclear (pRb), regulada por estradiol (Alban et al. 2001). Rb se encuentra hipofosforilado en fases tempranas del ciclo celular pero cuando se fosforila mediante complejos ciclina-cdk, libera E2F y activa genes críticos para continuar el proceso de proliferación, permitiendo de esta forma la progresión del ciclo celular hacia la fase de síntesis (Weinberg, 1995). No se ha encontrado alteración de pRb en HDA ni en hiperplasias ductales benignas, pero sí en CDIS (8%) (Heffelfinger et al. 2000). Mayores niveles de expresión encontraron Gorgoulis et al. (1998) en 55 carcinomas de mama analizados por

inmunohistoquímica, con una expresión en el 29% de los casos, la cual se relacionaba inversamente con la expresión de p16. La expresión de pRb y p16, junto con alteraciones de microsatélites detectadas en el locus 9p21-22, revelan que existe una correlación entre la expresión normal de pRb e invasión ganglionar, y entre alteraciones de microsatélites (LOH y/o inestabilidad de microsatélites) y tamaño del tumor. Estos autores sugieren que la desregulación de p16-pRB junto con otros genes tumor supresores implicados en la región 9p21-22, podría jugar un papel importante en la invasión y progresión oncogénica.

Ceccarelli et al. (1998) estudiaron por inmunohistoquímica la expresión de pRb en 153 muestras de CDI, fijadas en parafina, y compararon los resultados con otros indicadores pronósticos biopatológicos, con el fin de determinar la agresividad del tumor. Los niveles de pRb se relacionaron con la actividad proliferativa (Ki67), tamaño, GH y GN del tumor y niveles de expresión de receptores esteroideos, y no se relacionaron con la expresión de p53. La expresión paralela de pRb y Ki67 sugiere que la proteína tiene un comportamiento normal en la regulación del ciclo celular. Encontraron, además, ausencia de expresión de pRb en 13 carcinomas con una mayor expresión de marcadores de agresividad (expresión de EGF-R, p53, RE y RP- y niveles elevados de Ki67).

Los mecanismos moleculares básicos que controlan el paso de la célula a través de las distintas etapas del ciclo celular dependen de una serie de holoenzimas, constituidas por una subunidad reguladora llamada ciclina y una subunidad catalítica llamada kinasa dependiente de ciclina (cdk). Su función es fosforilar sustratos clave y de esta manera inactivar los mecanismos que impiden la progresión de la célula hacia la división celular. Las ciclinas D y E son las ciclinas moduladoras de G1, mientras que la principal acción de la ciclina A ocurre en las fases S y G2, siendo la ciclina B clave durante la fase G2 del ciclo celular.

Las **ciclinas D** (D1, D2 y D3) son inducidas en células de cultivo durante la etapa temprana en la fase de G1 como respuesta a los factores de crecimiento, lo

que ha llevado a la hipótesis de que sirven como nexo entre las señales mitogénicas y el control del ciclo celular (Matsushime et al. 1991; Won et al. 1992; Winston et al. 1993). Las ciclina D se une y activa específicamente a las kinasas cdk4 y cdk6, y su actividad catalítica se detecta en una etapa tardía de la fase G1 (Matsushime et al. 1994; Meyerson et al. 1994). A diferencia de otras ciclinas que son expresadas ubicuamente en los distintos tipos celulares, parece haber algún grado de especificidad en la expresión de las ciclinas D, lo que ha llevado a especular que las ciclinas D podrían estar asociadas con distintos programas de diferenciación.

La ciclina D1 juega un papel crítico en el crecimiento y progresión del cáncer de mama. Existen pocos estudios en relación a la expresión de D1 en CDIS; estudios inmunohistoquímicos han revelado que su grado de positividad es variable, debido probablemente a los distintos tipos de anticuerpos utilizados, métodos inmunohistoquímicos y dinteles de positividad definidos (Umekita et al. 2000). Umekita et al (2000) han estudiado la expresión de ciclina D1 en 57 CDIS, 10 HDA, 70 HD benignas, 44 carcinomas con elevado componente intraductal, y 92 CDI, y han visto que está implicada en varias etapas de carcinogénesis y progresión tumoral. Encontraron expresión de D1 en el 72% de CDIS, 50% de carcinomas con elevado componente intraductal y 43% de CDI, y no vieron expresión en HDA e hiperplasia ductal benigna, por lo que esta ciclina puede jugar un papel importante en estadíos tempranos de carcinoma de mama siendo su inmunohistoquímica útil en el proceso de diferenciación de HDA a CDIS incipientes. Steeg et al (1998) también encontraron una sobreexpresión de ciclina D y E en CDIS (que no coincide con los resultados que posteriormente comentaremos en el estudio de la ciclina E).

Sasano et al. (1997) han visto que existen diferentes patrones de expresión de ciclina D1, cdk2 y cdk4 en CDI y CLI. Encontraron inmunorreactividad de ciclina D1 en el núcleo de las células tumorales de 27 de 41 carcinomas, mientras que la inmunorreactividad para cdk4 fue en células tumorales y no tumorales en 39 de 41 carcinomas, y para la cdk2 en el 100% de los casos tanto en células tumorales

como no tumorales. Además, observaron una correlación entre la expresión de ciclina D1 y cdk4 en CDI, pero no en CLI.

Otro estudio realizado por Park et al (2001) sobre 37 muestras de secreción de pezón de 51 pacientes con carcinoma de mama y 8 muestras de 20 pacientes con enfermedades benignas de mama, mostró expresión de ciclina D1. El 26% de los carcinomas de mama fueron positivos para ciclina D1 y la correlación entre expresión de ciclina D1 en muestras histológicas y secreciones de pezón fue del 78%.

En cuanto a la correlación con parámetros clínico-patológicos, Umekita et al (2000) y Sasano H et al (1997), no han detectado correlación entre expresión de ciclina D1 y RE y grado histológico en CDIS, mientras que Park et al (2001) sí han visto una correlación entre la expresión de ciclina D1 y RE y RP, si bien no detectaron correlación con el tamaño tumoral y afectación ganglionar. Además han visto una mayor expresión de ciclina D1 en CDI con menor grado histológico (>80% frente a 61%) y en tumores con fase S <15%. La ciclina D1 se relacionó de forma inversa con la actividad proliferativa del tumor. Sin embargo Sasano H et al (1997) sí detectaron una relación directa en CDI y CLI entre expresión de ciclina D1 y proliferación celular (Ki67), así como con el estado patológico y grado histológico de CDI.

La **ciclina E** se expresa tardíamente en la fase G1, prácticamente en la interfase con la fase S. Esta ciclina se une y activa cdk2 , y se ha postulado que la activación de esta kinasa permite la entrada de la célula en la fase S (Koff et al. 1992) mediante la fosforilación de pRb. Durante la progresión del ciclo celular, el complejo de ciclina D1 fosforila pRb, liberando el EF2 (factor de elongación), que posteriormente puede activar la expresión de la ciclina E (Zhang, 1996). pRb suele colaborar con una histonaadenilcetilasa (HDAC1) para reprimir a la ciclina E, impidiendo el acceso del EF2 al promotor de la ciclina E a través de la estabilización de su estructura nucleosómica (Zhang, 1996). Gracias a la fosforilación de pRb, la ciclina E está implicada en un bucle de autorregulación

positiva donde, tras la unión con cdk2 y la fosforilación de pRb, EF2 continúa liberándose, y la expresión de la ciclina E se mantiene, asegurando la inactivación de pRb y la progresión del ciclo celular hacia la fase de síntesis (Zhang, 1996). Existe una independencia en la regulación de ciclina E respecto a pRb (Nieslsen et al. 1998). La ciclina E es rápidamente degradada inmediatamente después de la entrada de la célula en la fase S. En este momento la ciclina A se une a cdk2 y mantiene la actividad de esta kinasa.

No se ha establecido el papel pronóstico de la expresión de ciclina E en carcinoma de mama y en recidivas. En este sentido, Kim et al. (2001), no han encontrado asociación entre sobreexpresión de ciclina E en carcinoma primario, y riesgo de recidiva locoregional, siendo independiente la sobreexpresión del riesgo de metástasis a distancia.

Para saber cómo contribuye la expresión de la ciclina E a la tumorigénesis, se sobreexpresó en fibroblastos de embriones de rata y en células epiteliales de mama y se vio que la sobreexpresión se relacionaba con inestabilidad cromosómica, además de producir un daño en la progresión a la fase S del ciclo celular, por lo que una regulación aberrante en la progresión del ciclo celular podría ser la causa de la inestabilidad cromosómica (Spruck et al. 1999). Nielsen et al. (1997) estudiaron por Western blot 114 tumores primarios de mama y encontraron una sobreexpresión de ciclina E en un 25% de los casos, además de una menor expresión de ciclina D1. Análisis inmunohistoquímicos demuestran inactividad para pRb en el 40% de los casos, un aumento en la expresión de p16 y una mayor actividad proliferativa. Otro estudio fue realizado por Scott KA et al. (1997) sobre tejido benigno de la mama (47 casos), CDIS (22 casos) y CDI (107 casos), donde no encontraron expresión en tejido benigno y el porcentaje de expresión de ciclina E en ambos tipos de carcinomas fue el mismo (5%). La expresión de ciclina E y p53 coincidió con una menor diferenciación de los tumores, así como con una mayor agresividad y proliferación de las células tumorales.

En cuanto a la relación con receptores hormonales, existe una sobreexpresión de ciclina E asociada con ausencia de expresión de los receptores (Donellan et al. 2001; Nielsen et al. 1996; Sasano et al. 1997), lo que sugiere que el papel de la ciclina E en la regulación del crecimiento del tumor podría ser hormonoindependiente (Nielsen et al. 1996; Nielsen et al. 1997).

Sus niveles pueden ser controlados por mecanismos postraduccionales, por lo que la expresión de esta proteína puede alterarse por vías distintas a la mutación de su gen (Porter PL et al. 1997)

Existen dos familias de inhibidores de la actividad catalítica ciclina dependiente (cdks). La primera incluye a inhibidores específicos de las cdks, cuyos miembros representativos, con p21 y p27.

p21

El producto del gen p21 puede inhibir una variedad de cdks en G1-S y en G2-M dando lugar a una detención del ciclo celular en el marco de una diferenciación o en respuesta al daño de DNA (Barbareschi et al. 1996). La actividad de p21 está sujeta a un mecanismo de fosforilación-defosforilación que precisa guanosín trifosfato (GTP), y está mediado por otras proteínas, como la proteína activadora de GTPasa (gap). Cuando la p21 está en fase activa es capaz de desencadenar nuevas reacciones bioquímicas que activarán una cascada secuencial de proteínquinasas (RAF-MAPKK-MEK-ERK) y transmitirá esta señal hasta el núcleo. Una característica de p21 es que parece estar regulada, por lo menos en algunas circunstancias, por el gen supresor tumoral p53, y mediaría así la inhibición de la proliferación celular que ocurre después del daño al DNA causado por las radiaciones ionizantes y otros agentes mutagénicos.

Oh et al (2001) realizaron un estudio en 49 CDIS, y encontraron expresión de p21 en el 67% de los tumores diferenciados, que estuvo relacionada con parámetros de buen pronóstico, como grado histológico bajo, ganglios negativos, positividad para RE y negatividad para p53. Otro estudio similar fue el realizado por Thor et al (2000) sobre 798 pacientes con cáncer de mama, con un seguimiento de 16.3 años, en el que encontraron expresión de p21 en el 74% de los CDIS, 40% de las lesiones hiperplásicas y 3% de los tejidos tumorales adyacentes de mama. Pacientes con afectación ganglionar que no expresaron p21, presentaron mejor pronóstico. La expresión de p21 no estuvo asociada con la supervivencia en pacientes con ganglios negativos.

p27

p27 es otro inhibidor universal de esta familia implicado en la detención de proliferación, al intervenir en G1-S, hecho que ocurre como resultado de la señal antimitótica del factor de crecimiento TGF- β (factor de crecimiento de transformación β) y por inhibición del complejo D/cdk4 y E/cdk2. Sus niveles pueden ser controlados por mecanismos postransduccionales, por lo que la expresión de esta proteína puede alterarse por vías distintas a la mutación de su gen (Porter et al. 1997).

Se han visto alteraciones en la expresión de p27 en cáncer de mama, y éstas parecen relacionarse con la agresividad del tumor (Chiarle et al. 2001; Chapuis et al. 2000). Lau R et al (2001) analizaron 147 pacientes con carcinomas invasivos, y vieron que la falta de expresión de p27 se relacionaba con estadíos más avanzados del tumor, es decir, tumores con un mayor grado histológico, mayor fase S y negatividad para receptores hormonales. Además, el análisis multivariable correlacionaba la no expresión de p27 y el aumento de la expresión de Ki67 con un menor ILE, por lo que ambos marcadores combinados son útiles para predecir recidivas en pacientes de alto riesgo. Chappuis PO et al. (2000), analizaron en 202

pacientes con carcinoma invasivo, la evolución de p27 por inmunohistoquímica, con un seguimiento de 6.4 años, y observaron una expresión baja de p27 en el 63% de los casos, asociada con mutación en los genes BRCA1/2, y un peor pronóstico. Sin embargo, Volpi A et al (2000) concluyeron en el estudio que realizaron sobre 286 pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar, con tratamiento locorregional, y 5 años de seguimiento, que p27 no está relacionada con la supervivencia.

En otros trabajos, una expresión baja de p27 y ciclina D1 estuvo relacionada con un peor pronóstico (Nohara et al. 2001), y la expresión de p27 se reveló como un importante factor predictivo durante los 5 primeros años de padecer la enfermedad y dejó de serlo a partir de los 7 años de la enfermedad (Leivonen et al. 2001).

La segunda familia de inhibidores de cdks incluye p16 (Serrano et al. 1993), p15 (Hannon et al. 1994), p18 (Guan et al. 1994; Hirai et al. 1995) y p19 (Chan et al. 1995). Todos estos inhibidores se caracterizan por tener motivos de ankyrina y por inhibir específicamente la actividad catalítica de la ciclina D1 con estas moléculas.

p16

La expresión de p16 puede ser negativamente regulada por Rb (Li et al. 1994). Es posible que en células normales p16 sea desreprimido después de la fosforilación del Rb y funcione como un mecanismo de retroalimentación para inactivar cdk4/cdk6 hacia el final de G1 (Weinberg et al. 1995).

Se han propuesto como mecanismos de expresión anormal del gen, deleciones y cambios en posición de metilaciones, ya que se han visto

hipometilaciones de p16INK4a en carcinoma de mama primario y metastático asociada con expresión de RNAm de p16INK4a, mientras que en tejido normal, existe una hipermetilación de p16INK4a, asociada a una falta de expresión de p16INK4a, lo que sugiere que la metilación y falta de expresión de este gen no está asociada al desarrollo de carcinoma de mama, y el gen funcional se expresa en dicha enfermedad.

Este gen supresor está inactivado en líneas celulares cancerosas y tumores primarios, y se ha estudiado la pérdida de LOH de p16 en más de la mitad de los tumores primarios que no se relacionaban con mutación en p16INK4a. Brenner et al (1996) han visto una disminución de la expresión en el 48% de los tumores, debidas a deleciones homocigóticas de p16 y metilación del exón que codifica para p16. Emig et al. (1998) han estudiado mediante inmunohistoquímica (IHQ) la expresión de p16 en 368 carcinomas invasivos, 52 no invasivos, y 3 líneas celulares. Encontraron acumulación citoplasmática de p16 en el 9% de los carcinomas invasivos y en el 4% de los no invasivos, y no detectaron alteraciones genéticas, por técnica PCR-SSCP (“Polimerase Chain Reaction-Single Strand Polimorphism) y secuenciación de DNA, en líneas celulares que expresaron p16 citoplasmático. Guo et al. (1998) vieron mayor expresión de p16, en el estudio realizado sobre 120 carcinomas primarios, analizados por hibridación “in situ”, y donde la positividad para p16 fue del 71%. En cuanto a la relación con otros parámetros clínicos y biológicos, la expresión de p16 se relacionó con un mayor GH, menor diferenciación, pérdida en la expresión de RE y RP y sobreexpresión de p53, y no se relacionó con edad, tamaño, c-erb-B2, Rb ni p-Rb (Emig R et al. 1998; Guo S et al. 1998; Milde-Langoschk et al. 2001). La expresión aberrante de p16 estuvo relacionada con una mayor actividad proliferativa reflejada en mayor fase S y mayor niveles de Ki67 (Emig et al. 1998; Milde-Langoschk et al. 2001; Wong et al. 2001).

1.3.2 ONCOGÉNES Y AMPLIFICACIÓN GÉNICA

La amplificación génica es un mecanismo de desregulación genética común en las neoplasias. Este mecanismo ocurre cuando un fragmento cromosómico se duplica numerosas veces, dando lugar a múltiples copias de uno o más genes. En algunos casos, los fragmentos amplificados pueden estar representados docenas de veces hasta el punto de hacerse visibles microscópicamente en forma de segmentos cromosómicos que se tiñen diferencialmente del resto del cromosoma, llamados “HSR” (homogeneously staining regions), o bien como fragmentos de DNA extracromosómicos, llamados “double minute chromosomes”. En la mayoría de los casos, el gen que se amplifica es un posible oncogén que se sobreexpresa como resultado de la amplificación.

En el cáncer de mama hay varias regiones cromosómicas que se amplifican frecuentemente. Una de ellas se amplifica en aproximadamente el 30% de los casos y afecta a **c-myc** en el brazo largo del cromosoma 8 (Escot et al. 1986; Bishop et al. 1970). Este gen es un factor de transcripción con funciones en la regulación de la proliferación y diferenciación tisular (Gandarillas & Liebermann 1998; Iritani & Eisenman, 1999; Johnson et al. 1999; Schmidt, 1999; Schuhmacher et al. 1999) y participa en la replicación, crecimiento, metabolismo, diferenciación y apoptosis (Packham & Cleveland 1995; Hoffman & Lieberman 1998; Dang et al. 1999). Está implicado en la proliferación maligna de células humanas y animales (Amati et al. 1998; Bouchard et al. 1998; Dang et al. 1999). Evan et al (1992) observaron que la expresión aberrante de c-myc podría ser una de las causas de la apoptosis; este hecho fue estudiado anteriormente por Worm et al. (1986).

Deming SL et al (2000) estudiaron la expresión de este proto-oncogén en carcinomas de mama y encontraron amplificación en el 16% de los casos. La sobreexpresión de c-myc estuvo asociada al grado histológico del tumor, metástasis ganglionar, RP y estado menopáusico de la paciente. Janocko et al (2001) relacionaron la amplificación de c-myc con la de c-erb-B2 y ciclina D1 mediante

hibridación “in situ” fluorescente (FISH) en carcinomas de mama primarios no lobulillares. La frecuencia de amplificación de los tres oncogénes aumentaba progresivamente, al mismo tiempo que la aneuploidía del tumor y las múltiples anomalías que tienen lugar en las células tumorales, como es la mutación de p53.

C-myc es un factor pronóstico independiente, cuya sobreexpresión está relacionada con una menor supervivencia global (SG) y menor ILE.

Otra región frecuentemente alterada se encuentra en 17q e incluye al gen **c-erb-B2** (Schneider et al. 1989). Este gen codifica a una glicoproteína transmembrana de 185 kDa, denominada p185 que consta de un dominio extracelular glicosilado de unión al ligando, una región hidrofóbica transmembrana y un dominio citoplasmático, con actividad tirosín quinasa (TK) (Coussens et al. 1985).

Posee una estructura similar al receptor de factor de crecimiento epitelial (EGF-r) (50% de aminoácidos homólogos), aunque no se une a ningún ligando de éste; es un receptor de factores de crecimiento, y se han purificado y clonado una serie de ligandos, entre los que cabe destacar dos glicoproteínas, gp30 y gp75, en células de cáncer de mama humano (Lupu et al. 1995).

La activación del protooncogén c-erb-B2 se puede realizar por distintos mecanismos:

- Mutación puntual que provoca el cambio de un residuo de valina por uno de glutamato en la posición 664, del dominio transmembrana (Bargmann et al. 1986).
- Deleción artificial del dominio N-terminal, siendo de 10 a 20 veces más efectivo en su actividad transformante que el gen completo (Bargmann y Weinberg. 1988).
- Amplificación y/o sobreexpresión del gen salvaje (Slamon et al. 1989).
- Sobreexpresión de su RNAm y de p185 en ausencia de amplificación génica (Kern y cols 1990).
- Formación de heterodímeros entre la p185 y el EGF-R (Lee et al. 1994).

- Interacción entre la integrina $\alpha_6\beta_4$ y p185, observada en la línea de adenocarcinoma de pulmón Calu-3 (Campiglio et al. 1994).

Todos estos mecanismos dan lugar a un incremento en la actividad TK. La unión del ligando al dominio 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.

Se ha sugerido que p185 podría estar implicada en el proceso metastático, ya que ha sido localizada en las protuberancias de la membrana plasmática, necesarias para la motilidad celular (De Potter y Quatacker, 1993), lo cual es un paso esencial en el proceso de la invasión tumoral y metástasis. Asimismo, la implicación de p185 y moléculas de adhesión en la metástasis tumoral, podrían explicar la agresividad de los tumores que sobreexpresan p185 (Campiglio et al. 1994).

La amplificación del protooncogén c-erb-B2 ha sido detectada en un 15-40% de los carcinomas primarios de mama y en un 30% de los ováricos. Además, niveles elevados de la expresión de p185 en estos tumores se han relacionados con una supervivencia reducida, menor ILE, presencia de metástasis en ganglios linfáticos, pobre grado nuclear, hormonoindependencia y capacidad proliferativa (Slamon et al. 1987; Marx et al. 1990; Meden et al. 1992). Asimismo, es un indicador de la resistencia al tamoxifeno en carcinomas de mama RE+ N+ (Borg et al. 1994), y Gion et al. (1994) demuestran que este oncogén, cuando está asociado a la positividad de ras en carcinomas N+, refleja una respuesta menor al CMF.

La cuantificación en suero de la proteína c-erb-B2 es útil para el diagnóstico y monitorización del cáncer de mama, reflejando preferentemente enfermedad avanzada y diseminada, pudiéndose incrementar seis meses antes de que aparezcan clínicamente las metástasis; se correlaciona estrechamente con el grado histológico y nuclear de los tumores (Go et al. 2000) y puede ser de utilidad como marcador de secreción en los tumores hormonoindependientes .

En cuanto a la relación de c-erb-B2 con otros genes relacionados con el proceso tumoral, se ha descrito una falta de correlación con la edad, grado histológico y tamaño del tumor, catepsina D y estado de receptores hormonales (Korkolis et al. 2001). Sí se observó correlación entre la expresión de c-erb-B2 y p53 e invasión ganglionar (Alexiev et al. 1997; Korkolis et al. 2001). El estudio inmunohistoquímico de c-erb-B2 y p53 permite la definición de lesiones intraductales y diferenciación entre HDA y CDIS (Alexiev et al. 1997).

Bcl-2 y Bax, son dos genes que codifican para dos proteínas reguladoras de apoptosis (Bcl-2, proteína antiapoptótica y Bax, proteína proapoptótica). Además de Bcl-2 (con hasta 12 homólogos) y Bax existen al menos 15 caspasas y distintos tipos de proteínas que modulan la respuesta apoptótica actuando sobre proteínas reguladoras de apoptosis como son las proteínas de estrés térmico (BAG-1 y hsp70/hsc70 de "Heat-Shock Proteins) (Krajewski et al. 1999). La expresión de ambas proteínas en tejido normal de mama e HDA, es similar y siempre inferior a la expresada en CDIS y CDI (Shilkaitis et al. 2000). En este sentido, y para ver la correlación entre estas proteínas y parámetros clínico-patológicos, Iochim et al. (2000) estudiaron 95 muestras de carcinomas de mama y 20 hiperplasias epiteliales benignas. Bcl-2 se expresó en el 40% de los carcinomas (con más de un 10% de células positivas) y en el 85% de hiperplasias epiteliales benignas. La proteína Bax se detectó en el 8% de los carcinomas y en el 5% de las hiperplasias epiteliales benignas. Además, estudiaron la expresión en carcinomas de Rb y p53 que fue positiva en el 75% y 45% de los casos respectivamente. No encontraron relación entre expresión de Bcl-2 y edad, tamaño, tipo y grado del tumor, invasión ganglionar, expresión de Rb e índice de proliferación. Sí encontraron correlación entre expresión de Bcl-2 y Bax, RE, RP (por lo que Bcl-2 puede estar sometida a control hormonal) y de forma inversa con p53. Sin embargo, Yang et al. (1999) no encontraron correlación entre la expresión de Bcl-2 y Bax. La expresión de Bcl-2 está relacionada con un fenotipo de cáncer de mama favorable (baja proliferación, expresión de receptores esteroideos y ausencia de expresión de p53 y c-erb-B2) (Schorck et al. 1999, Yank et al. 1999, Daidone et al. 1999; Kymionis et al. 2001). Otro estudio realizado sobre proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x y Mcl-1) y proteínas proapoptóticas (Bax y Bak), es el

de Rochaix et al. (1999) sobre 110 CDI mediante inmunohistoquímica, y donde la expresión de Bcl-2 y Bax fue mayor que en el estudio anteriormente comentado (62% y 60% respectivamente). Hallaron, además, una correlación entre un mayor índice apoptótico y una menor expresión de Bcl-2 y de receptores hormonales, así como una correlación entre expresión de Bax, y mayor grado histológico del tumor. Similares resultados en relación con niveles de positividad fueron obtenidos por Wu et al. (2000) en el estudio que realizaron sobre 91 pacientes con carcinomas de mama, con un seguimiento de 66 meses, donde también encontraron una relación entre elevados niveles de Bcl-2 y bajos de Bax con invasión ganglionar, recidivas postoperatorias y metástasis. Estos autores hicieron un análisis multivariable, en el que analizaron la expresión de Bcl-2, invasión ganglionar y GH y vieron que todos ellos son factores pronósticos independientes de SG e ILE.

En relación con la respuesta terapéutica, una sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-x están implicados en la quimiorresistencia, mientras que niveles elevados de Bax promueven la apoptosis y sensibilizan a las células tumorales para terapia anticancerosa (Krajewski et al. 1999; Wu et al. 2000; Daidone et al. 1999; Kymionis et al. 2001). En este sentido, Gao et al (2000) vieron que cuando el porcentaje de células en G1 era elevado, y por tanto los resultados presentaban niveles de expresión elevados de Bcl-2, la resistencia a inducir apoptosis era mayor que cuando existía una mayor población celular en fase S y menor expresión de Bcl-2. El ciclo celular, por tanto, depende de Bcl-2, que contribuye a la regulación de quimiosensibilidad y apoptosis de células tumorales.

1.4 EVENTOS TEMPRANOS Y TARDÍOS EN EL DESARROLLO TUMORAL

En el desarrollo de cáncer de mama existen una serie de etapas premalignas denominadas HDA y CDIS que eventualmente derivan en carcinoma invasor (Radford et al. 1995; Brenner et al. 1997). La progresión de CDIS a CDI y metástasis son consecuencia de una expansión clonal de las células neoplásicas con alteraciones genéticas (Fujii et al. 1996). Cambios genéticos en CDIS implican ganancias y pérdidas en el material genético, siendo el cromosoma 22 el más implicado en este proceso.

Lakhani et al. (1995) han encontrado pérdida de LOH en el cromosoma 16q (microsatélite D16s413) y 17p (microsatélite D17S796) en HDA. En estadíos tempranos de CDIS existen pérdidas en 16q y 17p (38% y 34% respectivamente) (Fujii et al. 1996), y en estadíos más avanzados de CDIS se produce pérdida en 1p, 1q, 6q, 8q, 9p, 11p, 11q, 16q, 13q, 17q y 17q, (Fujii et al. 1996; Ando et al. 2000; Radford et al. 1995; Anbazhagan et al. 1998; Lakhani et al. 1995; Kuukasjarvi et al. 1997), llegando hasta un 40% en los estadíos más avanzados de los CDIS. Bose et al. (1998) han estudiado la heterocigosidad en el cromosoma 10q23 en el 40% de los CDI. Además, se han observado ganancias en los cromosomas 1q, 8q, 3q, 6p, 17q22-24, 20q13 en carcinomas invasores. En general, el patrón genético observado en CDIS coincide con los tumores infiltrantes, por lo que se asume que son derivados genéticamente de lesiones “in situ” (Fujii et al. 1996).

1.5 FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES RELACIONADOS CON LA INVASIÓN Y METÁSTASIS

El proceso invasivo-metastático incluye las siguientes fases:

- Crecimiento progresivo en la localización primaria.
- Vascularización del tumor (angiogénesis).
- Separación de las células del tumor.
- Entrada de las células tumorales en el torrente vascular (intravasación) ya sea sanguíneo o linfático.
- Circulación en el torrente sanguíneo.
- Detención en los vasos sanguíneos.
- Salida o extravasación.
- Migración e invasión por la célula tumoral del parénquima de un órgano.

1.5.1 CRECIMIENTO

Las células cancerosas, por definición, proliferan desafiando los controles normales, es decir, son neoplásicas y son capaces de invadir y colonizar los tejidos que las rodean. Existe un paso previo antes de lograr la autonomía de crecimiento, que es la inestabilidad del genoma, la cual permite que sea fácil la aparición de lesiones en el DNA, que no se pueda reparar, o que la célula alterada no siga los mecanismos normales de destrucción (apoptosis). La inestabilidad genética y la autonomía de crecimiento, se correlacionan estrechamente con algunos de los genes implicados en los tumores. Así, los oncogenes codifican proteínas que pueden ser cualquier componente de la cadena de transducción de la señal celular, y los genes tumor supresores codifican proteínas que intervienen en condiciones normales en el control del ciclo celular (Kastan et al 1995).

1.5.2 VASCULARIZACIÓN DEL TUMOR (ANGIOGÉNESIS)

El crecimiento de un tumor sólido se halla limitado por el flujo sanguíneo. Para poder crecer, el tumor ha de inducir la formación de una red capilar que invada la masa tumoral. Las células endoteliales invasoras han de responder a una señal producida por el tejido que necesita aporte sanguíneo. La respuesta de las células endoteliales consta de cuatro etapas. En primer lugar, las células deben abrirse paso a través de la lámina basal que rodea a los vasos ya existentes; durante la angiogénesis las células endoteliales segregan proteasas, que les permiten la digestión de distintos materiales a su paso por la lámina basal del capilar. En la siguiente fase, las células endoteliales han de desplazarse hacia el origen de la señal. Seguidamente, tienen que proliferar y por último, tienen que formar conductos. También se han identificado factores de crecimiento que pueden manifestar conjuntamente los cuatro componentes de la respuesta angiogénica, como es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, de Vascular Endothelial Growth Factor), que actúa de forma selectiva en las células endoteliales, estimulando la angiogénesis, y que parece ser el responsable de la elevada irrigación sanguínea que presentan algunos tumores. Otros factores de crecimiento, incluyendo algunos miembros de la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos, también estimulan la angiogénesis. Estos tipos de factores angiogénicos se liberan durante la reparación, inflamación y crecimiento de los tejidos; son fabricados por distintos tipos celulares, incluidos los macrófagos, los mastocitos y los adipocitos. También se ha identificado un cierto número de inhibidores que pueden bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos. Así, la angiogénesis parece que es regulada por complejas combinaciones de señales, más que por un solo tipo de señal.

1.5.3 SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL TUMOR E INTRAVASACIÓN

Las células de un tumor sólido han de ser capaces de disminuir su adhesión a sus vecinas originales mediante la pérdida de expresión de cadherina E, y otras moléculas de adhesión entre células del epitelio, tales como CD44std. Deben atravesar la membrana basal y migrar a través del estroma (invasión) para alcanzar la circulación sanguínea o vasos linfáticos. Para que las células tumorales crucen una lámina basal deben tener receptores de laminina, que permitan a las células adherirse a la lámina y han de segregar colagenasas de tipo IV, que les ayuden a digerir la lámina. El proceso de invasión diferencia carcinomas “in situ” de carcinomas invasivos.

Cuando las células llegan a los vasos sanguíneos, penetran (intravasación) formando nuevas asociaciones con otros tipos de células, en ellos. Deben evitar la destrucción dentro de los vasos y moverse en la dirección del flujo sanguíneo hacia sitios potenciales de crecimiento. El sistema circulatorio es un medio hostil, donde más del 99% de las células cancerígenas son destruidas por una combinación de mecanismos de estrés, destrucción proteolítica y respuesta inmune. La respuesta inmune puede tener lugar además fuera de los vasos, implicando células del sistema inmune y proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de Major Histocompatibility Complex) en las células cancerosas.

La contribución de la respuesta inmune en la invasión metastática es causa de debate, ya que además de los carcinomas virales que expresan proteínas extrañas, las células cancerígenas están formadas por proteínas propias del hospedador incapaces de activar el sistema inmune. Además, en las células cancerígenas tienen lugar cambios en el MHC. Las células T citotóxicas requieren proteínas MHC-I para la presentación antigénica, por lo que la pérdida de proteínas MHC supondrá un aumento en la supervivencia de las células cancerígenas. Ensayos experimentales demuestran que una sobreexpresión de proteínas MHC-I disminuye el potencial metastático, el cual se correlaciona inversamente con la expresión de MHC en líneas

celulares de melanoma. Clínicamente, metástasis en nódulos linfáticos de carcinoma de mama, colon y riñón tienen niveles de expresión de proteínas MHC-I inferiores a las células de las que derivan.

Las células cancerígenas son transportadas en la sangre como células individuales, o bien formando agregados con linfocitos y plaquetas. La formación de estos agregados protege a las células de mecanismos de estrés y respuesta inmune, además de facilitar la unión al endotelio y la posterior extravasación. Las plaquetas interactúan con fibrinógeno en la superficie del endotelio y vía P-selectinas, con proteoglicanos del endotelio. Las células del endotelio tienen determinantes de membrana específicos de órganos, como son las selectinas y moléculas de adhesión intercelular (CAMs, de Cell-Cell Adhesion Molecules). La selectina E endotelial se une a los proteoglicanos de la célula tumoral. Las integrinas $\alpha_4\beta_1$ de células tumorales y linfocitos contribuyen en el freno inicial del movimiento de los agregados y en el ensamblaje al endotelio. Además, existen interacciones fuertes entre las integrinas celulares $\alpha_4\beta_1$ y V-CAM del endotelio, cuya expresión está regulada por citocinas (interleukina-1 y factor de necrosis tumoral). Estas interacciones entre células tumorales y endotelio, sirven de freno de las células tumorales y constituyen la primera etapa en el proceso de extravasación. Un proceso análogo es el que implica a las selectinas E y P endoteliales, las cuales reconocen carbohidratos de proteínas de membrana de células tumorales (E) o plaquetas (P) de los agregados, contribuyendo a parar el movimiento de las células tumorales.

1.5.4 EXTRAVASACIÓN

La salida de las células tumorales de la circulación sanguínea implica tres etapas: unión a las paredes del endotelio, retracción de las células endoteliales que llevan unidas las células cancerígenas y destrucción de la membrana basal y migración al estroma adyacente. La retracción de las células endoteliales lleva

consigo la exposición de glicoproteínas de la membrana basal que se unen a las células tumorales, y que posteriormente éstas últimas digerirán con proteasas y glicosidasas. Las proteínas de la membrana basal son laminina, colagenasa IV y fibronectina, todas ellas ligandos de la familia de receptores de integrinas situadas en la superficie de las células tumorales. Las integrinas $\alpha_1\beta_1$ reconocen colagenasa y laminina, mientras que las $\alpha_6\beta_4$ se unen a laminina. Los receptores de laminina se expresan en niveles elevados en carcinomas de colon, mama y pulmón, todos ellos epiteliales.

En el proceso de extravasación intervienen además los activadores de plasminógeno: el activador del plasminógeno “urokinasa like” (uPA), implicado en la proteólisis tisular, y el activador del plasminógeno tisular (tAP) encargado de la disolución de coágulos. La sobreexpresión de uPA favorece la invasión y metástasis tumoral. Además, en el proceso de metástasis intervienen las metaloproteinasas (NMP), activadas por plasmina, que digieren componentes de la MEC y destruyen barreras físicas.

1.5.5 MIGRACIÓN E INVASIÓN

Tras la extravasación, las células tumorales migran a sitios nuevos para formar colonias, lo que requiere la producción continuada de proteasas que digieran la MEC. Intervienen las integrinas de las membranas de las células tumorales que median señales externas desde la matriz a la actina del citoesqueleto de las células. El movimiento se realiza por contracción y relajación del citoesqueleto. Los péptidos liberados durante la proteólisis de la MEC actúan como agentes quimiotácticos para atraer células cancerígenas. Los péptidos de la matriz se unen a integrinas y bloquean el acceso de las células a la matriz y facilitan el movimiento hacia otros lugares.

Otros péptidos que intervienen son los factores de motilidad, fundamentales en la migración, que pueden ser secretados por células normales y actúan de forma paracrina sobre otras células, o bien son producidos por las propias células tumorales actuando de forma autocrina.

1.5.6 CRECIMIENTO

La proliferación de células cancerígenas en un nuevo lugar de implantación, en un principio se localiza a una distancia de 1mm de los vasos sanguíneos. El crecimiento se desarrolla gracias a la influencia local de los factores de crecimiento, y al O_2 transportado por el sistema circulatorio. Es necesaria, además, la formación de nuevos vasos (angiogénesis) con el consiguiente aporte de nutrientes y O_2 .

1.5.7 CAMBIOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA METÁSTASIS

Los oncogénos y genes supresores están implicados en la metástasis, además de en otras etapas de la biología molecular del carcinoma de mama, tal y como hemos visto. Así, la activación del oncogén *ras*, está asociada a un aumento de la proliferación en las etapas iniciales de carcinoma de colon, además de incrementar el potencial metastático en los carcinomas en general. No está claro el hecho de que el gen *ras* pueda implicar transformación en algunas ocasiones y metástasis en otras. Los procesos de transformación y metástasis tienen lugar de forma separada. Otros oncogénos, como *v-src* y *v-raf*, intervienen en los procesos de proliferación e invasión.

En cuanto a los genes implicados en la angiogénesis, la producción de proteasas y moléculas de adhesión juega un papel fundamental, pero todavía hoy quedan muchas por caracterizar. La fusión de células metastáticas de melanoma de ratón con

células control producen híbridos no metastáticos, lo que indica que las células normales contienen “algo” que inhibe la metástasis. Se han identificado genes inhibidores de la metástasis, como el nm23, cuya pérdida lleva consigo en tumores de hígado un incremento en la metástasis, mientras que en carcinoma de ovario, su expresión está aumentada (Schneider et al. 2000).

CD44 es una glicoproteína transmembrana de la superficie celular, que consta de un dominio amino-terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, implicado en la transducción de la señal e interacción con el citoesqueleto para regular la migración y/o división celular (Lesley 1994, Isacke 1994). Ha sido implicado en una gran variedad de funciones entre las que se encuentran diferenciación epitelial, proliferación celular, migración celular, adhesión célula-célula y célula-MEC, invasión tumoral y metástasis tumoral en células de origen mesenquimal y epitelial (Sanchez Lockhart et al. 2001).

Las moléculas de adhesión CD44 están ligadas a la extensión de la metástasis. Su expresión disminuye en carcinomas de mama y colon, mientras que su variante CD44 std, está aumentada en unos casos, y disminuida en otros. CD44 constituye una familia de proteínas codificadas por un gen de aproximadamente 60kb, localizado en el cromosoma 11p13 y compuesto de, al menos, 20 exones (Sherrington et al. 1992). Merecen destacar dos subgrupos: CD44H y CD44v.

La posible implicación de CD44v en la progresión tumoral se describió en una línea celular tumoral metastásica de adenocarcinoma pancreático de rata (Matzku et al. 1983), que expresaba predominantemente los exones variantes (v4-v7). La formación de metástasis en la línea celular con un crecimiento localizado era iniciada por la formación de transferencia de CD44 v4-v7 (Günthert et al. 1991), y el desarrollo metastático era inhibido por un anticuerpo (1.1 ASML), que reconocía a un epítipo con el exón v6 (Günthert et al. 1991; Matzku et al. 1989).

Ha sido propuesto que CD44v y, en particular el exón v6, puede ser muy importante en la progresión tumoral (Berner et al. 2001), y concretamente en el carcinoma de mama (Morris et al. 2001; Sheen-Chen et al. 1999).

Aunque CD44v no puede ser considerado como un marcador general de metástasis, en algunos tipos de tumores se ha observado una fuerte correlación entre formación de metástasis y expresión de CD44v. Del mismo modo, es importante el hecho de que la metastatización de algunos tumores aparece cuando se pierde la expresión de CD44v. Sin embargo, Berner et al (2001) observaron, por inmunohistoquímica, mayor expresión de las isoformas CD44v3 en citoplasma, y de CD44v6 en membrana en carcinomas alveolares y mucinosos, mientras que la expresión de CD44v5 en membrana, se relacionó con invasión ganglionar. También se ha visto un aumento de los niveles de CD44v6, por enzimoimmunoensayo, en suero de pacientes con carcinoma de mama, que se relacionó con metástasis a distancia y estadio del tumor (Sheen-Chen et al. 1999). Por otro lado, se ha relacionado una negatividad para la isoforma CD44s con tumores con GH3, Ki67 positivo (en más del 10% de las células) y con invasión ganglionar (Schneider et al. 1999).

En cuanto a la relación con parámetros de pronóstico, Morris et al (2001) estudiaron 109 pacientes con carcinoma de mama en estadio II, con un seguimiento de 5 años. Utilizaron técnica inmunohistoquímica y detectaron un 8% de positividad para CD44v6 que no se correlacionaba con edad, tamaño, grado histológico e invasión ganglionar. No encontraron asociación significativa entre CD44v6 e ILE y SG. Observaron similares resultados con la isoforma CD44s. Estos autores concluyen que ni CD4v6 ni CD44std son indicadores pronósticos de estadios tempranos de carcinoma de mama, y el aumento en su expresión podría ser indicador de la pérdida de control sobre el proceso de “splicing” alternativo del RNAm en tejido tumoral. Sin embargo, Sanchez Lockhart et al. (2001) sí consideran útiles la expresión de isoformas de CD44, para el “screening” de detección de carcinoma de ovario y mama, ya que han visto una desregulación en los patrones de expresión de CD44 en tumores malignos de mama y ovario, comparado con patologías benignas y tejidos control.

Tampoco estos autores han encontrado correlación entre expresión de isoformas y edad de la paciente, tamaño, estadio, GH o agresividad del tumor.

Existen, por tanto, discrepancias a la hora de relacionar las distintas isoformas de CD44 con la invasión ganglionar, si bien los últimos estudios relacionan este proceso con la pérdida de expresión de la isoforma CD44std.

1.6 MAMOGLOBINA HUMANA (*h-MAM*)

Recientemente se ha aislado el gen de la mamoglobina en tejido mamario de humanos adultos. Su función concreta en tejido mamario, así como su posible papel en la activación oncogénica del mismo, es de momento desconocida. El gen de la mamoglobina humana (*h-MAM*), localizado en el cromosoma 11q.13 fue identificado en 1996 (Watson et al. 1996), y su secuencia de aminoácidos es homóloga a la de proteínas epiteliales de secreción de la familia de la uteroglobina. A esta familia, pertenecen la propia uteroglobina de conejo (rUg), con la que presenta un 40% de homología en su secuencia de aminoácidos, la proteína hCC10, con un 26% de homología y la rPSC₃ (esteroide prostático de rata unido a la subunidad C₃ de la prostateína), con un 42% de homología (Watson et al. 1996). Aunque la función de *h-MAM* es desconocida, no lo es la de los demás miembros de la familia a la que pertenece, formada, como decíamos, por proteínas secretoras epiteliales. Estas proteínas, bien modulan procesos inflamatorios, o bien la unión a ligandos esteroideos. Las similitudes estructurales entre la *h-MAM* y estas proteínas, sugieren que *h-MAM* podría tener una funcionalidad relacionada con la glándula mamaria.

La rPSC₃ es la principal proteína de secreción en próstata de rata (Lea et al. 1979) cuya síntesis y unión a hormonas está regulada por testosterona; estructuralmente es un tetrámero formado inicialmente por tres subunidades de 8-12KDa (rPSC₁, rPSC₂ y rPSC₃) (Lea et al. 1979) cuyos genes preceden de un ancestro común (Parker et al. 1982). El gen rPSC₃ se duplica, dando lugar al rPSC₃ (I), regulado por andrógenos, que se transcribe y activa en la próstata, y el rPSC₃ (II), que es un gen silente debido probablemente a mutación en el promotor (Hurst y Parker, 1983). El promotor de rPSC₃ se fusiona al antígeno SV40 y es capaz de producir carcinoma de mama y prostático en ratones transgénicos (Maroulakou et al. 1994). Sin embargo, su función biológica es desconocida, y hasta el momento no se ha identificado su homólogo en el genoma humano.

El gen rUg de conejo se caracterizó como proteína de secreción en tejido endometrial de útero y se expresa también, aunque en menores niveles, en pulmón, próstata y mama (Miele et al. 1987). Su transcripción está también regulada por hormonas esteroideas (Sandmoller et al. 1994). Estructuralmente es una proteína homodimérica con dos puentes disulfuro. La rUg une progesterona y otros esteroides y es sustrato de transglutaminasas. Además, inhibe la fosfolipasa A₂ y puede intervenir en la respuesta inmune e inflamatoria celular.

La proteína hCC10 humana y sus homólogas en rata y ratón tienen funciones similares a la rUg de conejo (Miele et al. 1994), aunque su función biológica está por determinar.

Para secuenciar el gen *h-MAM*, se aislaron dos clones superpuestos de una biblioteca genómica utilizando cDNA de *h-MAM*. Uno de estos clones (λ MAM2) se utilizó para subclonar el fragmento Sal I de 4.3 Kb (kilobases). Este fragmento incluye una secuencia de unas 1000 pb en el extremo 5' que no se transcribe, una secuencia de unas 1300 pb del gen de la mama y una secuencia de unas 1200 pb en el extremo 3' que tampoco se transcribe. Se secuenció este fragmento y mostró un 100% de homología con el cDNA de *h-MAM* derivado de la línea tumoral de mama MDA-MB415, así como del cDNA derivado de tejido normal de mama. Las diferencias en la secuencia entre el cDNA y los clones genómicos, permitieron determinar los límites entre exones e intrones del gen *h-MAM*, formado por tres exones (de 119, 188 y 199 pb, respectivamente) y dos intrones (de 603 y 1888 pb, respectivamente). Si se compara el gen *h-MAM* con los rPSC₃ y CC10, se puede observar que existe conservación tanto en la disposición de intrones y exones, como en los sitios de corte, lo que sugiere que todos ellos pertenecen a una familia multigénica derivada de una secuencia ancestral común. La secuenciación de gen *h-MAM* reveló secuencias repetitivas que incluyen repeticiones AUU específicas de humanos en la región no transcrita 5', una secuencia de 500 nucleótidos altamente repetitiva en el intrón b y repeticiones del dinucleótido CA en la región no transcrita 3'.

La secuencia del promotor está formada por unas 1000 pb, con un sitio de inicio de transcripción relativamente uniforme a 27 pb posterior a la secuencia que contiene el elemento TATA. No se han encontrado homologías con la secuencia de promotores de los otros miembros de la familia a la que pertenece (Toonen et al. 1996) y sí se han encontrado con promotores de genes específicos de mama como la proteína acíclica (Mcknight et al. 1992) y la β -caseína (Greenberg et al. 1992). Aunque la síntesis de β -caseína esté asociada a lactogénesis, y su transcripción genética regulada por prolactina, la expresión de *h-MAM*, no está asociada a la lactancia, aunque sí se ha visto que está relacionada con la proliferación y diferenciación de glándula mamaria en embarazo.

Para evaluar la conservación filogenética del gen *h-MAM*, se ha aislado el gen CC10 en humanos, mono, rata y ratón y se ha encontrado un rango de homología entre ellas del 50-90% (Miele et al. 1994). Si embargo el gen rPSC₃ de la rata no se ha identificado en otras especies. Para determinar el grado de conservación interespecie y evaluar su utilidad en tumorigénesis mamaria en modelos animales, se examinó el DNA genómico de múltiples organismos por Southern blot con el subclón genómico p-MAM 4.3. Se observaron dos fragmentos genómicos Xba 1 en humanos y chimpancés y no se detectó hibridación en mono ni en otros mamíferos no primates. Estos resultados indican que *h-MAM* está pobremente conservado o ausente en esas especies; este hecho, junto con que la *h-MAM* sea específico de mama, sugiere que la expresión de este gen pueda estar asociada a la tumorigénesis de mama.

La localización cromosómica del gen se llevó a cabo por técnica “Fluorescent In Situ Hybridation” (FISH), utilizando clones genómicos λ y el subclon de plásmido pMAM 4-3. Se seleccionaron 300 cromosomas en metafase al azar, de los cuales, 243 tenían ambas copias de cromosoma 11 marcado así como señales fluorescentes en el cromosoma 15. Se localizaron señales de hibridación en las regiones 11q12.3-13.1 y 15q23-24. Al igual que en el caso de la rPSC, existen múltiples copias de genes similares a *h-MAM* en el genoma humano.

Los genes *h-MAM* y CC10 tienen localizaciones próximas, por lo que 11q12.3-13.1 podría agrupar secuencias de genes tipo globina. Precisamente el cromosoma 11q13, se encuentra amplificado en carcinoma de mama y contiene oncogénes implicados en la enfermedad, como son int-2 y ciclina D (Fantl et al. 1993), por lo que la localización del gen *h-MAM* en la posición 11q12.3-11.3 podría hacer pensar que niveles elevados de la proteína en carcinoma de mama podrían ser debidas a amplificación génica. Para verificar este dato, se realizó un Southern blot del clon MAM4-3 de *h-MAM* de líneas celulares y tumores donde previamente se había observado sobreexpresión de *h-MAM* respecto a tejido de mama control. No se vio amplificación génica ni reorganización en los tumores ni en las líneas celulares, por lo que la sobreexpresión de *h-MAM* en carcinoma de mama, detectada por algunos grupos, no parece ser debida a la amplificación ni reorganización genética.

Una de las características de los miembros de la familia del gen de la uteroglobina es su regulación transcripcional por hormonas esteroideas (Miele et al. 1994). Sin embargo, la transcripción de *h-MAM* no se encuentra regulada por estradiol, progesterona, dexametasona o andrógenos en líneas celulares de carcinomas de mama MCF7 o T47D con receptores hormonales positivos. Sí se han localizado elementos de respuesta esteroidea en la secuencia “alu” situada a 843 pb del lugar de inicio de la transcripción, que son idénticos a la existente en la región no transcrita 5' del gen BRCA1. Además, se ha visto una secuencia de 2243 Nt similar a la que existe en el gen rPSC₃(I) relacionada con la respuesta androgénica.

Se ha detectado expresión de *h-MAM* en líneas tumorales de células (MDA-MB415 y MDA-MB-361 y con menor intensidad en las líneas BT474, MDA-MB175 y MDA-MB468) y no se ha detectado en líneas celulares inmortalizadas no tumorogénicas, de células mioepiteliales de mama (hMMC) o estroma de mama. La expresión del gen *h-MAM* define un fenotipo único en un grupo de líneas celulares de cáncer de mama, cuya expresión está ausente en los constituyentes celulares de glándula mamaria (Mark et al. 1996). Además se ha testado el RNAm de *h-MAM* en ovario, útero y leucocitos de sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama, mediante “Reverse-Transcriptase- Polimerase Chain Reaction” (RT-PCR), pero no se

ha encontrado expresión en ninguna de las muestras (Zach et al. 1999). Al ser un gen específico de mama, se ha utilizado, de modo experimental, para la detección de células circulantes de cáncer de mama. El límite de detección de células tumorales circulantes fue de 1 célula tumoral de la línea celular MD-MBA361, de cada 10^6 células sanguíneas mononucleares (Grünewald et al. 2000).

Recientemente se ha clonado el gen B de *h-MAM* (MGB2), homólogo de la *h-MAM* (Becker RM et al. 1998), el cual se ha visto sobreexpresado en tejido de carcinoma de mama, aunque su perfil de expresión no es idéntico al de *h-MAM*.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

1. Extracción y cuantificación del RNAm del gen h-MAM en muestras tumorales de cáncer de mama.
2. Cuantificación de la expresión del gen h-MAM en las muestras tumorales.
3. Correlación de la expresión del gen h-MAM con parámetros biológicos de primera generación (variedad histológica, grado histológico grado nuclear e invasión ganglionar), segunda generación (receptores de estrógeno y progesterona) y tercera generación (p53, Ki67 y c-erb-B2), así como con la ploidía del contenido de DNA y marcadores de la angiogénesis (VEGF) y de apoptosis (Bcl-2 y Bax).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS TUMORALES

Las muestras provienen de pacientes operadas en el Centro de Patología de la Mama de Madrid. En el acto operatorio el patólogo diagnostica la malignidad de la masa que posteriormente es confirmada mediante estudio en diferido tras inclusión en parafina. Para el presente trabajo, hemos utilizado exclusivamente los datos del análisis anatomopatológico definitivo, que, además de la variedad histológica, y el carácter invasor o no, incluye la determinación del grado histológico y el grado nuclear.

Hemos estudiado 77 tejidos tumorales mamarios, con un volumen aproximado de cada muestra de 1cm³. Las características de las muestras se expresan en la tabla 1.

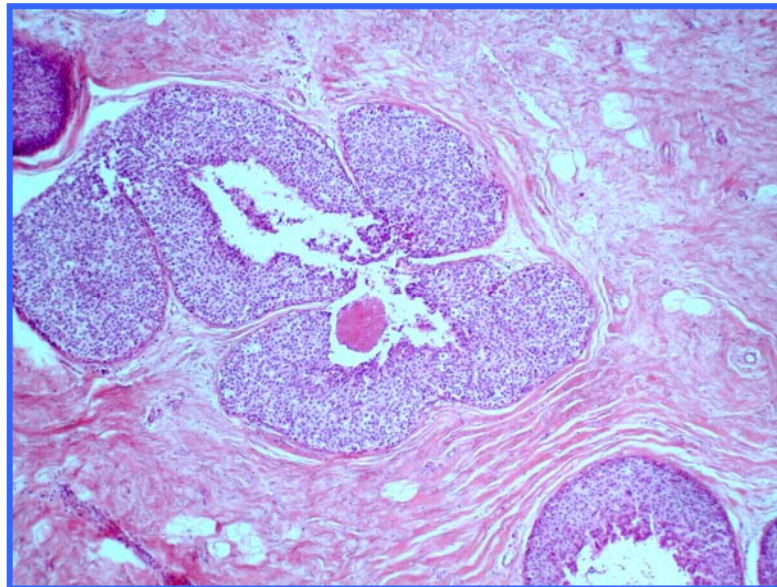
Tabla 1. Características de las muestras de tejido mamario

Total	77
Tipo histológico	
Carcinoma ductal infiltrante (CDI)	56
Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)	11
Carcinoma epidermoide	1
Carcinoma mucinoso	1
Metástasis ganglionar	2
Carcinoma ductal “in situ” (CDIS)	6

De todas las pacientes estudiadas, 10 recibieron tratamiento previo con quimioterapia y sus factores pronósticos serán estudiados en un grupo aparte.

El carcinoma de mama en su fase inicial está representado por el carcinoma “in situ” o intraductal (figura 1).

Figura 1. Carcinoma “in situ” (CDIS). Proliferación epitelial con rasgos citoarquitecturales de carcinoma ductal, confinada en ductos mamarios de cualquier nivel, sin sobrepasar el límite de la membrana basal (ampliación electromicroscópica, x 100).



En las figuras 2 y 3 se representan un carcinoma ductal infiltrante de mama y carcinoma lobulillar infiltrante, respectivamente, que constituyen, por ese orden las variedades más frecuentes de cáncer de mama.

Figura 2. Carcinoma ductal infiltrante (CDI). Carcinoma integrado por nudos y cordones más o menos sólidos.

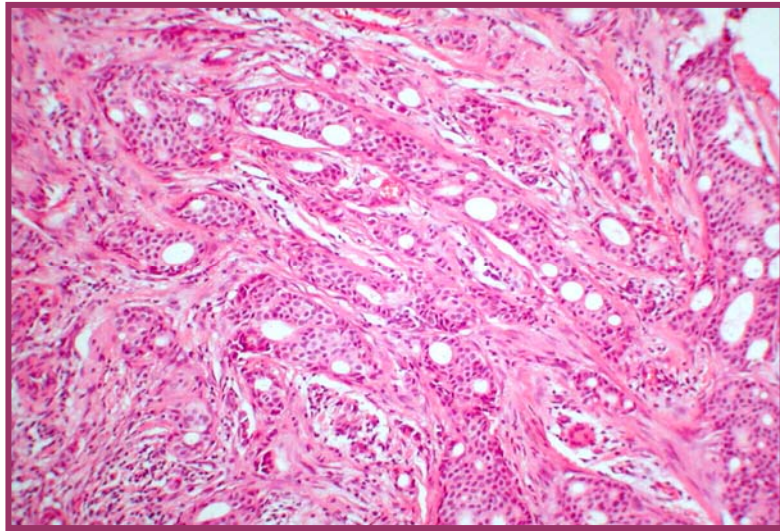
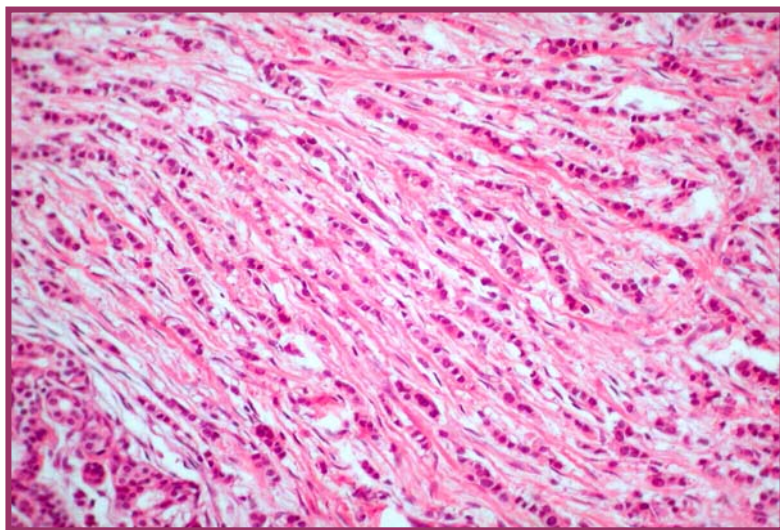


Figura 3. Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI). Tumor de células pequeñas que crece en cordones sólidos.



3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

El análisis de muestras tumorales mediante inmunohistoquímica es una técnica ampliamente utilizada en el entorno clínico debido a que permite detectar proteínas directamente sobre la célula, conocer el origen de las células tumorales así como el pronóstico de las mismas.

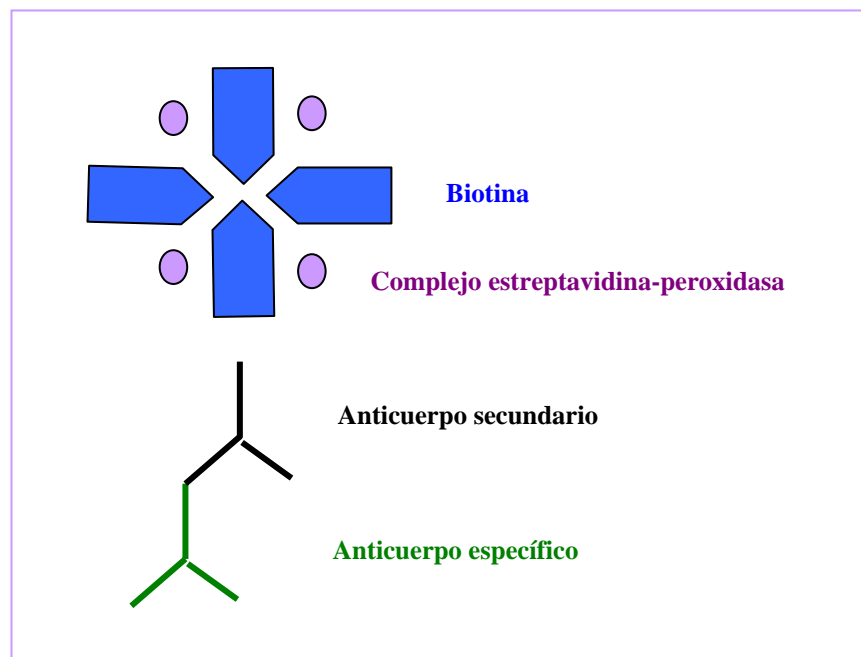
La inmunohistoquímica es una técnica que se basa en reproducir una reacción antígeno-anticuerpo en el laboratorio. El anticuerpo se une al antígeno en zonas específicas (llamadas epítomos) mediante uniones no covalentes.

Las muestras que van a ser utilizadas para análisis inmunohistoquímico se conservan en formol tamponado (para la fijación de los tejidos), se deshidratan, y posteriormente son incluidas en parafina. Una de las exigencias de la inmunohistoquímica es la adecuada conservación del antígeno en el tejido, para lo cual, éste debe ser fijado rápidamente después de ser extraído del organismo para detener la lisis celular. Cuanto mayor tiempo estén las muestras en formol, mayor es el número de enlaces que se forman entre los aminoácidos de una proteína, deteniendo así los procesos de lisis asociados a la muerte celular. Estos enlaces forman una malla que además de detener la lisis, también ocultan los epítomos con lo que no puede producirse la reacción antígeno-anticuerpo. Esta malla debe romperse para mostrar los epítomos. El proceso de rotura de la malla se realiza calentando los tejidos en una olla a presión superando los 100 °C, o bien, en una estufa a 150 °C. Al ser incluidas las muestras en parafina, no necesitan condiciones especiales de almacenamiento y pueden ser analizadas durante años.

Los análisis se realizaron sobre cortes de parafina correspondientes a los mismos carcinomas de mama de los cuales se habían obtenido muestras de tejido fresco (ver apartado 3.1)

La técnica empleada para la detección por inmunohistoquímica de todos los antígenos estudiados fue la de estreptavidina-biotina-peroxidasa, con pretratamiento de las muestras en “buffer” citrato en olla a presión (técnica “HIER”, “Heat-Induced Epitope Retrieval”). El anticuerpo primario o específico no está marcado y el secundario está biotinado. El tercer reactivo a emplear es el complejo estreptavidina-peroxidasa (figura 4). La estreptavidina es una glucoproteína de alta afinidad por la biotina, con la que se obtiene una amplificación de la señal del complejo antígeno-anticuerpo.

Figura 4. Esquema de la técnica inmunohistoquímica “HIER”.



El método para lograr evidenciar la peroxidasa, consiste en hacer reaccionar a ésta con un sustrato específico (peróxido de hidrógeno) en presencia del revelador o cromógeno (diaminobencidina) dando al final el producto coloreado. Debido a que en el tejido existe peroxidasa endógena que da una reacción de color, que puede

interferir en el análisis, antes de añadir el complejo estreptavidina-peroxidasa, es necesario proceder a la inhibición de dicha peroxidasa endógena, mediante inmersión en metanol/H₂O₂ al 3%.

La secuencia de pasos, a partir de los bloques en parafina, es la siguiente:

- Obtención de cortes de 4µm en microtomo y adhesión a portas pretratados para soportar tratamiento térmico; mantener en estufa a 37° durante 24h.
- Desparafinación en xilol (3 x 5 min).
- Rehidratación en alcoholes de concentración decreciente (desde 100% hasta 70%) y posterior paso a baño de “buffer” durante 10 min.
- Inmersión en metanol/H₂O₂ al 3% durante 10 min, para eliminar la actividad peroxidasa endógena.
- Calentamiento en baño de “buffer” citrato 0.01M, pH 6.0, en olla a presión, durante 2 min a la máxima potencia, con el fin de desenmascarar el antígeno.
- Dejar enfriar los cortes.

A partir de este paso, todos los posteriores se llevan a cabo en cámara húmeda a temperatura ambiente.

- Lavado en “buffer” (3 x 3 min).
- Preincubación durante 10 min con suero normal de la misma especie que la utilizada para obtener el 2° anticuerpo puente biotinado, con el fin de evitar uniones inespecíficas.
- Incubación durante 1h con el anticuerpo primario (anticuerpos y concentraciones utilizadas se detallan más adelante).
- Lavados en “buffer” (3 x 3 min).
- Incubación con el 2° anticuerpo puente biotinado durante 10 min.
- Lavados en “buffer” (3 x 3 min).
- Incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa durante 10 min.
- Lavados en “buffer” (3 x 3 min).

- Incubación con el cromógeno (diaminobenzidina) 5 min.
- Lavado en agua corriente (2 x 3 min).
- Contraintinción con hematoxilina de Harris 30 seg.
- Lavado en agua corriente.
- Deshidratación, siguiendo los pasos inversos a la rehidratación (ver paso 3).
- Montaje con medio sintético.

3.2.1 Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica

Receptores de estrógenos (RE)

Anticuerpo monoclonal NCL-ER-6F11 (Novocastra, Newcastle, Reino Unido), 1:40.

Receptores de progesterona (RP)

Anticuerpo monoclonal PR-2C5 (Zymed, U.S.A.), prediluido en el momento de ser utilizado.

Ki67

Anticuerpo monoclonal MIB1 (Zymed, U.S.A.), prediluido en el momento de ser utilizado.

c-erb-B2

Anticuerpo monoclonal NCL-CB11 (Novocastra, Newcastle, Reino Unido), 1:40.

p53

Anticuerpo monoclonal NCL-D07-p53 (Novocastra, Newcastle, Reino Unido), 1:50.

3.2.2 Interpretación de resultados del análisis de las muestras por inmunohistoquímica

- La reacción inmunohistoquímica se consideró positiva para RE, RP, y p53, cuando más del 10% de las células tumorales mostraron tinción específica nuclear.
- La reacción inmunohistoquímica se consideró positiva para c-erb-B2, cuando más del 10% de las células tumorales mostraron tinción específica de membrana.
- La positividad de Ki67 se evaluó como porcentaje de células tumorales positivas (tinción nuclear).

3.3 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es, básicamente, un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz inducidas por la iluminación apropiada de células o partículas microscópicas, a medida que desfilan de una en una arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección. En algunos sistemas, además, las células o partículas pueden ser separadas físicamente, de acuerdo a las propiedades citométricas exhibidas.

La citometría de flujo aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a estructuras celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares, o modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas, a través de un amplio rango de propiedades biológicas.

Cualquier citómetro de flujo mide exclusivamente propiedades ópticas, es decir, luz emitida por fluorocromos o dispersada por las partículas en flujo. La conexión entre las propiedades biológicas de interés y los parámetros ópticos detectables, se establece con el uso de marcadores fluorescentes adecuados.

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda, y emiten luz de una longitud de onda mayor que la absorbida. Se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión, por lo que su utilización está condicionada por el tipo de láser y la longitud de onda a la que se exciten. El espectro de excitación y de emisión varía con los diferentes fluorocromos. Nuestro láser posee una longitud de onda de 488 nm, y el fluorocromo utilizado (ioduro de propidio), es capaz de ser excitado a esta longitud de onda. En citometría de flujo los anticuerpos

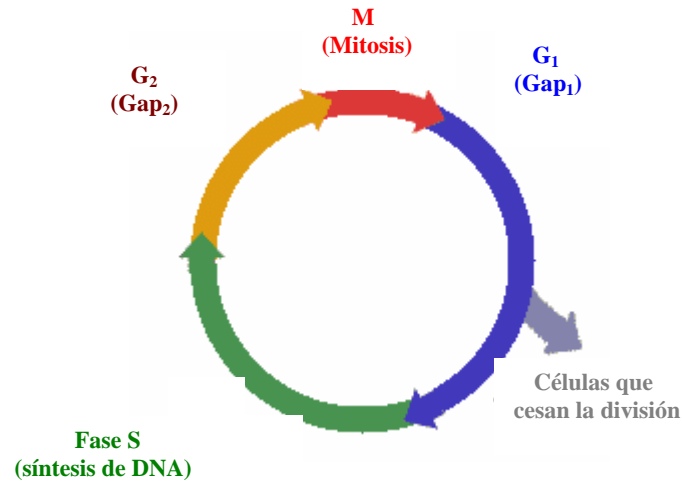
monoclonales están conjugados con fluorocromos siendo la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro directamente proporcional al número de moléculas unidas al antígeno.

El análisis por citometría de flujo nos proporciona datos cuantitativos y la posibilidad de cuantificar un gran número de células rápidamente. De todas las medidas que pueden obtener los métodos cuantimétricos, las de mayor aplicación práctica son la investigación de la ploidía y la proliferación celular. Los estudios realizados con esta técnica han sido:

- Estudio del ciclo celular, es decir, establecer en qué fase del ciclo celular está la célula midiendo su contenido de DNA, que se dobla durante la fase S.
- Estudio de marcadores de apoptosis (Bcl-2 y Bax) y de angiogénesis (VEGF).

El **ciclo celular** comprende el conjunto de procesos que una célula debe llevar a cabo para producir un par de células hijas genéticamente idénticas. Para ello, es necesario que el DNA se replique y que los cromosomas replicados se segreguen en dos células distintas. La replicación del DNA nuclear sólo suele ocupar una parte de la interfase llamada fase S (síntesis) del ciclo celular. El intervalo entre la consumación de la mitosis y el comienzo de la síntesis del DNA se llama fase G₁ (“gap”, intervalo), y el intervalo entre el final de la síntesis del DNA y el principio de la mitosis, se denomina fase G₂. Durante G₁ la célula supervisa su entorno y su propio tamaño y, cuando llega el momento, da un paso decisivo que le conducirá a la replicación del DNA y a la consumación del ciclo de división celular. La fase G₂ proporciona una medida de seguridad, que permite a la célula asegurarse de que la replicación del DNA se ha completado, antes de comenzar la mitosis. G₁, S, G₂, y M son las subdivisiones tradicionales de ciclo celular (Figura 5).

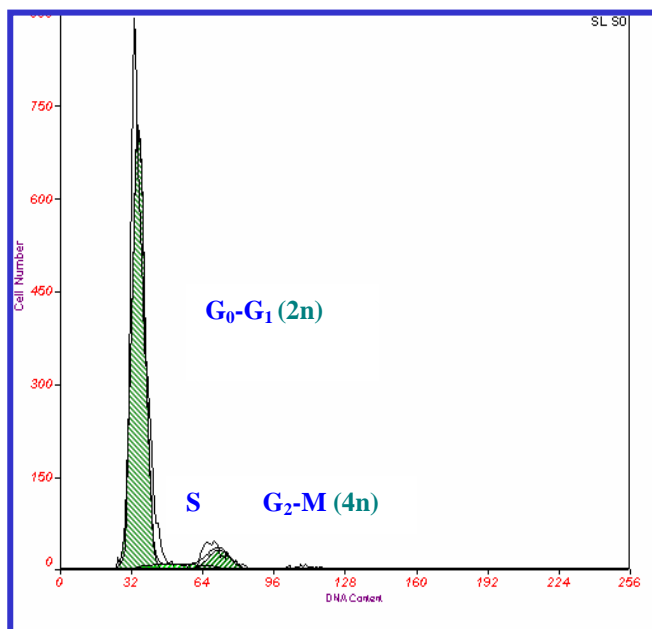
Figura 5. Fases sucesivas del ciclo celular en una célula eucariota típica. En la interfase la célula crece continuamente y durante la fase M se divide. La replicación del DNA se produce en la fase S. G_1 es un intervalo de tiempo entre las fases M y S. G_2 es un intervalo entre las fases S y M.



Las células en G_1 pueden, si no han iniciado la replicación del DNA, detener su progresión en el ciclo celular y entrar en un estado de reposo especial, llamado G_0 (G cero), donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar.

La ploidía en la citometría se recoge en histogramas que se comparan con los de poblaciones celulares control. Normalmente cerca del 90% de las células en un tejido están en fase G_0 y G_1 del ciclo celular, es decir, no se están dividiendo y su carga cromosómica está formada por el número de cromosomas de la especie. Esto se conoce como $2c$. El resto de las células están adquiriendo material de DNA o ya han alcanzado la cantidad doble de DNA ($4c$) (fases S, G_2 y M que se han expuesto anteriormente). Por ello, el histograma representativo de una población celular normal (figura 6), está formado por un pico alto y mayor ($2c$) que corresponde a las fases G_0 y G_1 , una fase de meseta de las células en fase S, y otro pico menor ($4c$) correspondientes a las células en fase G_2 y M.

Figura 6. Fases del ciclo celular. Representación del histograma “Gaussiano” de las fases G_0 - G_1 , S y G_2 -M del ciclo celular que se obtiene en el citómetro de flujo.



3.3.1 Tratamiento de las muestras para análisis por citometría de flujo

3.3.1.1 Tratamiento de las muestras tumorales para análisis del ciclo celular por citometría de flujo

En el análisis del **ciclo celular** y según el protocolo seguido, que se expondrá seguidamente, los núcleos son marcados con fluorocromos que se unen estequiométricamente con los ácidos nucleicos, por lo que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de DNA nuclear. El fluorocromo que hemos utilizado es yoduro de propidio, el cual se excita en el visible a 488 nm. El yoduro de propidio tiene afección tanto por el RNA como por el DNA, por lo que es necesario eliminar las cadenas de RNA para evitar posibles interferencias en la muestra. Esto se consigue incubando la suspensión celular con

RNAasa, incluida en los reactivos de tratamiento de la muestra para el análisis del ciclo celular.

La cantidad de DNA es diferente en cada fase del ciclo celular. Así, en la fase G₂ y en la de mitosis, la célula presentará doble cantidad de material genético que en las fases G₀-G₁, siendo la cantidad de DNA intermedia durante la fase de síntesis. Asimismo, es posible detectar y discriminar poblaciones con contenido de DNA aneuploide.

Las muestras tumorales llegaron al laboratorio suspendidas en solución fosfato tamponado (PBS, “Phosphate Buffered Saline”), tras su obtención en fresco. Los pasos a seguir para el análisis del estado celular son los siguientes:

Se trocea una porción de aproximadamente 1 cm³, con la ayuda de un bisturí y unas pinzas en un vidrio de reloj. A continuación, sobre la suspensión obtenida, se añaden 2 ml de reactivo “DNA-prep Stain” y 100 µl de reactivo “DNA-prep LPR” (Coulter), con el fin de lisar, permeabilizar las células, y teñir el DNA. En la composición de los reactivos añadidos está incluida, como decíamos, RNAasa, detergentes no iónicos, que eliminan las membranas plasmáticas celulares, dejando libres los núcleos, y fijadores que abren poros de membranas nuclear para permitir el acceso del fluorocromo al interior del núcleo.

Se incuba la solución a 37° durante 30 min, en estufa termostatizada, y se filtra con un filtro de tamaño de poro de 50 µm, que permite el paso de los núcleos celulares fijados y teñidos. La muestra así obtenida se analiza en el citómetro de flujo EPICS XL (Coulter), determinándose la ploidía y el porcentaje de células en fase S.

3.3.1.2 Tratamiento de las muestras tumorales para análisis de marcadores reguladores de la tumorigénesis: Bcl-2, Bax y VEGF

Las muestras tumorales llegaron al laboratorio en PBS, tras su obtención en fresco. Los pasos a seguir para determinar la expresión, por parte de las células tumorales, de los marcadores objeto del estudio, consisten en una primera fase de preparación de la muestra, seguida de una fase de fijación y permeabilización, para terminar con la incubación con los anticuerpos correspondientes. A continuación se detalla dicho proceso.

Preparación de la muestra

Se trocea una porción de aproximadamente 1cm^3 con la ayuda de un bisturí y unas pinzas en un vidrio de reloj. A continuación, se añaden 2 ml de pepsina con el fin de disgregar las células del tejido, y se incuba a 37° durante 30 min. Filtramos la muestra con un filtro de tamaño de poro de 50 μm , y centrifugamos a 2000 rpm durante 10 min; desechamos el sobrenadante y sobre el botón celular añadimos PBS y centrifugamos con el fin de lavar dicho botón, eliminando la pepsina residual. Retiramos el sobrenadante y procedemos a la siguiente fase.

Fijación de las células

Sobre el “pellet” obtenido, añadimos 1 ml de paraformaldehído (PFA) al 2% (PH=7.2) con el fin de fijar las células. Transcurridos 20 min (10min a 4° seguidos de 10 min a temperatura ambiente), lavamos con PBS el botón celular obtenido, con el fin de eliminar el PFA residual, y desechamos el sobrenadante.

Permeabilización de las células

El botón celular obtenido lo resuspendemos en 1 ml de metanol absoluto a -20° durante 5 min, con el fin de permeabilizar las células. Lavamos con PBS,

centrifugamos (7000 rpm durante 5 min), para desechar el metanol residual, y eliminamos el sobrenadante.

Incubación con los anticuerpos

El botón celular obtenido lo resuspendemos en PBS e incubamos con el primer anticuerpo a la dilución adecuada, durante 1h a 4°. El anticuerpo primario reconocerá el epítipo citoplásmico, y el secundario va conjugado al fluorocromo, y reconoce el anticuerpo primario.

En este estudio, utilizamos controles negativos, uno para los anticuerpos monoclonales y otro para los anticuerpos policlonales, obtenidos del botón celular tras permeabilizar las células.

Los anticuerpos primarios utilizados en nuestro estudio, son: Bcl-2, Bax y VEGF. En el caso de Bax, el botón se resuspende directamente sobre 100 ul del anticuerpo, mientras que para Bcl-2 la dilución es 1:80 y para VEGF 1:50. Lavamos con PBS, centrifugamos (7000 rpm durante 5 min), y desechamos el sobrenadante. Sobre el botón celular obtenido añadimos el segundo anticuerpo e incubamos a 4° durante 30 min. El segundo anticuerpo es monoclonal en el caso de Bcl-2 y Bax, y policlonal para VEGF, y la dilución utilizada en ambos casos es 1:100. Una vez transcurrida la incubación de la muestra con el segundo anticuerpo, añadimos PBS y yoduro de propidio, con el fin de seleccionar la población de células fijadas.

Finalmente, se analizan las muestras en el citómetro de flujo EPICS XL (Coulter).

3.3.2 Anticuerpos utilizados para citometría de flujo

Bcl2

Anticuerpo monoclonal (Immunotech, Francia), 1:80.

Bax

Anticuerpo monoclonal (Immunotech, Francia).

VEGF

Anticuerpo policlonal (Chemicon), 1:50.

3.3.3 Interpretación de resultados del análisis de las muestras por citometría de flujo

Para la interpretación de los resultados del ciclo celular obtenidos en el citómetro de flujo, utilizamos el programa “MultiCycle for Windows”. El resultado del análisis referido a la ploidía puede presentar diferentes patrones:

- **Patrón diploide:** el histograma se considera diploide si el primer pico, más alto, coincide con una desviación, en general, muy superior al 10% con el de una población control. Cuando la población de células coincide, con el del control se dice que el índice de DNA (ID), (cociente entre el valor del pico principal de la muestra y el del control diploide), es de 1.

- **Patrón aneuploide:** el histograma se considera aneuploide si la población celular presenta un contenido de DNA diferente al del control. Todos los ID distintos de 1 se denominan aneuploides
- **Patrón tetraploide:** el histograma se considera tetraploide cuando el contenido de DNA en la población es doble de la del control. En este caso el ID sería de 2.

3.4. EXTRACCIÓN DE RNA DE LAS MUESTRAS TUMORALES

Para llevar a cabo la extracción de RNA de las muestras tumorales, hemos utilizado los “Kits de Rneasy Midi y Maxi”. El fundamento de la técnica de estos “Kits”, consiste en la propiedad de unión selectiva del RNA a la membrana de silicagel. El conjunto de “buffer” que incorpora, permite aislar moléculas de RNA de más de 200 pb, mediante la absorción a la membrana de silicagel. Las muestras biológicas son lisadas y homogeneizadas en presencia de un tampón desnaturizante de guanidina isotiocianato (GITC) que inactiva de forma instantánea las RNAsas, asegurando el poder aislar RNA intacto.

Además, el proceso de extracción de RNA, lleva incorporado la adición de etanol, para favorecer las condiciones de unión de RNA a su paso a través de la membrana de silicagel. Finalmente, la muestra se pasa por la columna, donde quedará unido el RNA en la membrana, al mismo tiempo que los contaminantes son lavados y eluidos; el RNA es eluído con agua libre de RNAsas.

Con este procedimiento de “Rneasy” (figura 7), se aíslan todas las moléculas de RNA con más de 200 nucleótidos. Además, se produce un enriquecimiento en el RNA mensajero (RNAm), ya que muchos de los RNAs de menos de 200 nucleótidos (como el RNAr 5.8S, RNAr 5S y RNAt) son excluidos selectivamente.

3.4.1 Tratamiento de las muestras para la extracción del RNA

Las muestras tumorales fueron congeladas en N₂ líquido una vez obtenidas de las pacientes. Las piezas son almacenadas en un congelador a -80°C, hasta el momento de su procesamiento, en el que se trituran en N₂ líquido con un mortero de porcelana, hasta obtener un pulverizado. A continuación, se pasa a extraer el RNA de las muestras con el “Kit Rneasy de Qiagen” (cuyo fundamento se ha expuesto en el apartado 3.4), y se almacenan a -80°C, hasta el momento de ser utilizado.

El proceso de extracción del RNA de las muestras tumorales, una vez obtenido el pulverizado, consiste, como decíamos anteriormente, en una primera etapa de lisis y homogeneizado de la muestra, seguido de un proceso de lavado, y por último la elución del RNA. Los pasos a seguir son los siguientes:

Lisis y homogeizado de la muestra

- Añadir al pulverizado 2ml de “buffer” de lisis RLT seguido de 2ml de etanol al 70%.
- Agitar en vortex la suspensión obtenida y echarla rápidamente sobre una columna “midi spin”.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 4 min. El RNA quedará unido a la membrana de la columna.
- Desechar el eluído.

Lavado de la muestra

- Añadir sobre la columna 4ml de “buffer” de lavado RW1.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 4 min. Desechar el eluído.
- Añadir sobre la columna 2.5ml de “buffer” de lavado RPE (2x).
- Centrifugar a 4000 rpm durante 4 min. Desechar el eluído.

Elución de la muestra

- Transferir la columna “midi spin” a un nuevo tubo. Añadir sobre la columna 100 ul de agua libre de RNAasa. Dejar reposar 1min.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 4 min. El eluído obtenido contiene el RNA de la muestra tumoral.

Con el fin de obtener una mayor concentración de RNA, repetimos el proceso de elución utilizando el eluido obtenido en el último paso.

En la figura 7 se representa el proceso de extracción del RNA con el “Kit Rneasy de Qiagen”.

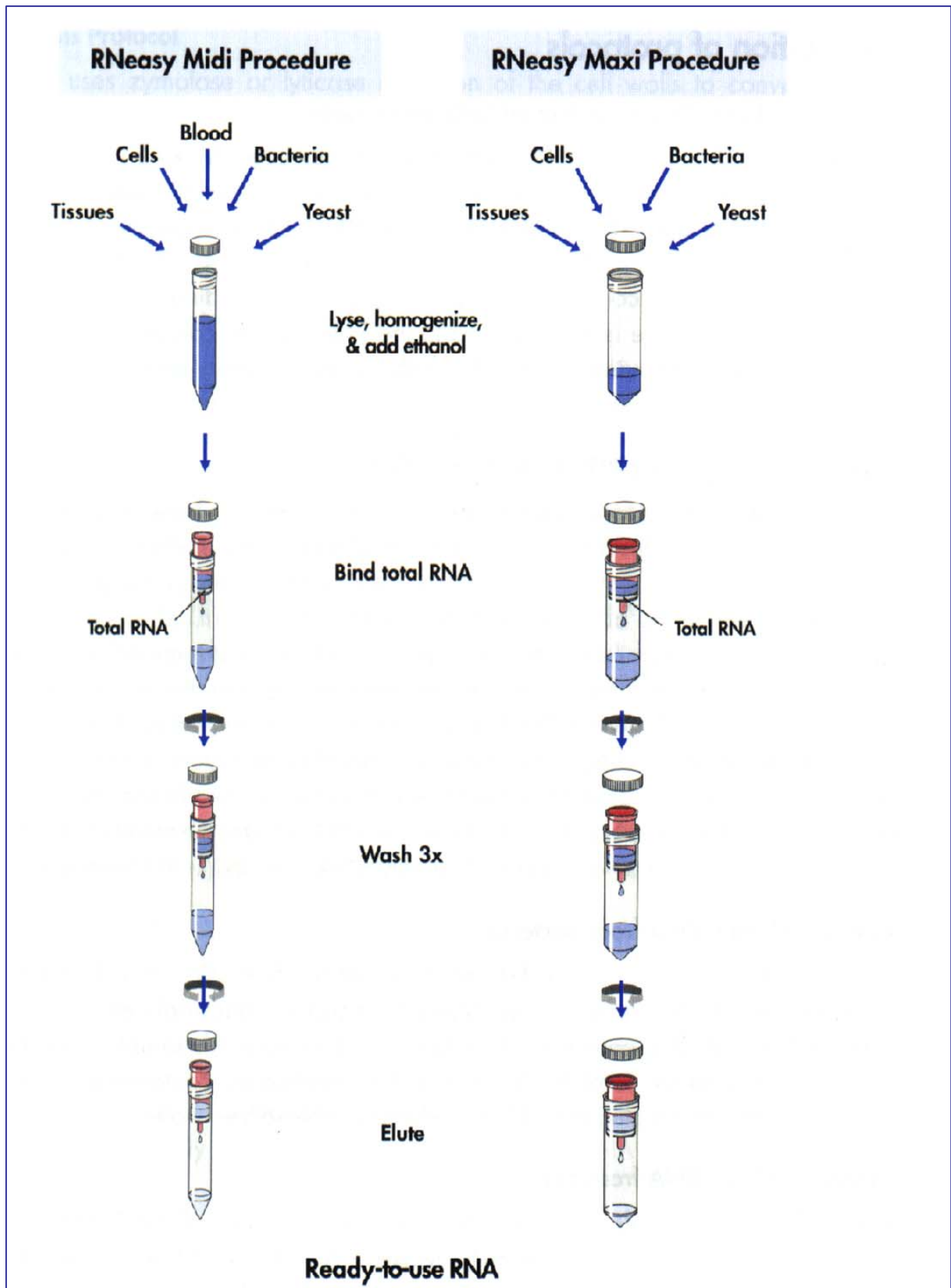


Figura 6. Esquema de extracción del RNA con el “Kit Rneasy Midi y Maxi de Qiagen”

3.5 RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método rápido para amplificación enzimática “in vitro” de un fragmento específico de DNA. La PCR es una metodología, resultante de la aplicación práctica de tres conceptos:

1. Desnaturalización de la doble hebra de DNA para dar hebras sencillas
2. Hibridación específica de la hebra sencilla con un oligonucleótido. También se conoce esta etapa como “annealing”, y tiene lugar una disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica.
3. Replicación de la hebra sencilla por una DNA polimerasa a partir del oligonucleótido cebador. También se conoce esta etapa como elongación del cebador.

En la RT-PCR (“reverse transcriptase PCR”), tiene lugar la retrotranscripción de RNAm en cDNA, a partir del cual se lleva a cabo la PCR. Es el método con mayor capacidad de detección para la medida de la expresión génica “in vitro”.

Para llevar a cabo la RT-PCR en el RNA extraído de las muestras tumorales, hemos utilizado el “kit One Step RT-PCR” de Qiagen. La mezcla inicial, para llevar a cabo tanto la transcripción inversa como la amplificación por PCR del gen *h-MAM*, contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo dichas reacciones en un sólo paso. Entre los componentes que incluye el “kit”, se encuentran las siguientes enzimas:

- **Transcriptasas inversas “Omniscript” y “Sensiscript”** cuya función es la transcripción inversa de forma específica. Ambas enzimas poseen una elevada afinidad por el RNA, permitiendo la transcripción a través de estructuras secundarias, inhibiendo así otras transcriptasas inversas. La transcriptasa inversa “Omniscript” permite la transcripción inversa de cantidades de RNA superiores a 50 ng, mientras que la transcriptasa inversa “Sensiscript” se encuentra optimizada

para cantidades de RNA inferiores a 50 ng. La combinación de ambas enzimas permite la transcripción inversa de cualquier cantidad de RNA entre 1 pg y 2 µg, en condiciones de máxima sensibilidad y eficiencia.

- **DNA polimerasa “HotStarTaq”**, que tiene una elevada especificidad en el proceso de amplificación de la PCR. Durante la etapa de transcripción inversa, esta enzima permanece inactiva, no interfiriendo en dicha reacción. Una vez concluida la transcripción inversa, la mezcla contenida en los “eppendorf” se calienta a 95° durante 15 min, inactivando así las transcriptasas inversas, al mismo tiempo que se activa la DNA polimerasa “HotStarTaq”.

Todas las enzimas están presentes en la mezcla de reacción, sin embargo, el uso de la DNA polimerasa “HotStarTaq” asegura la separación temporal de los procesos de transcripción inversa y PCR, permitiendo que ambos tengan lugar de forma secuencial.

Otro componente incluido en el “kit” que merece especial atención, es el “buffer” de reacción. La combinación de las enzimas y el “buffer” de reacción aseguran una elevada eficacia de las reacciones de RT-PCR. Dicho “buffer” debe permitir:

- Eficacia del proceso de transcripción. La composición del “buffer” permite que se realice la reacción de transcripción inversa a elevada temperatura, lo que aumenta la eficiencia, ya que se deshacen las estructuras secundarias.
- Eficacia en el proceso de amplificación del cDNA. Para ello el “buffer” contiene una composición equilibrada de KCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que permite el “annealing” de los “primers” en un rango más amplio de temperatura.

Los componentes de la mezcla de reacción, así como los volúmenes y concentraciones finales utilizados se exponen en la tabla 2. El volumen final de cada “eppendorf” es de 50.0 μ l

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción para realizar la RT-PCR en un paso.

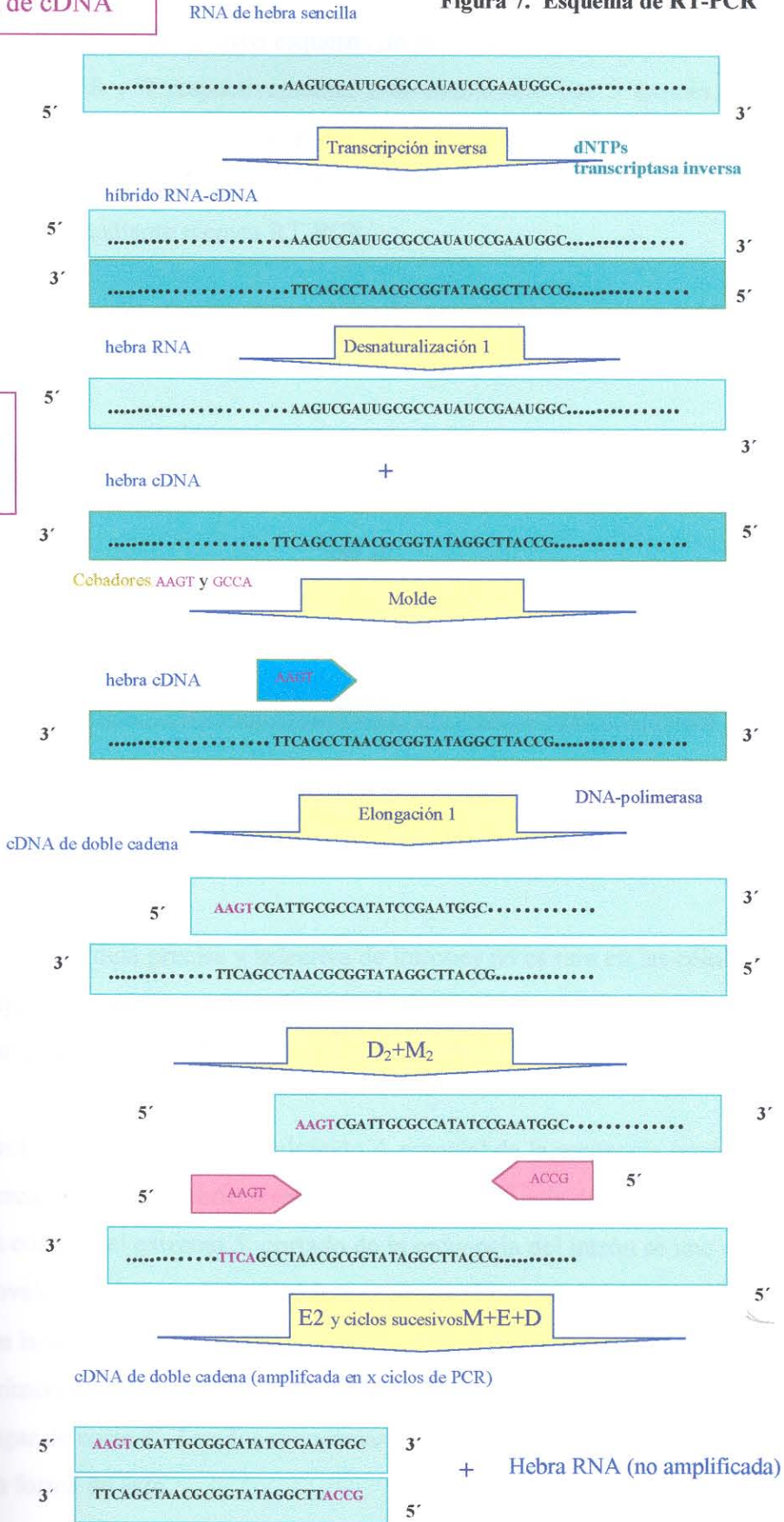
COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua libre de RNAsas	25.0 μ l	
Buffer 5x	10.0 μ l	1x
dNTP mix (10mM de cada uno)	2.0 μ l	400 μ l (de cada uno)
Primer A (6 μ l)	5.0 μ l	0.6 μ l
Primer B (6 μ l)	5.0 μ l	0.6 μ l

El proceso comienza con la síntesis de una hebra de cDNA por la acción de la transcriptasa inversa, permaneciendo el cDNA unido al molde como dúplex RNA:cDNA. En una segunda etapa se desnaturaliza el dúplex y comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal: la hebra de cDNA actúa como molde para una segunda hebra de cDNA y luego las dos hebras se amplifican en sucesivos ciclos.

En la figura 8 se representa un esquema con el conjunto de reacciones que tienen lugar en la RT-PCR.

Síntesis de cDNA

Figura 7. Esquema de RT-PCR

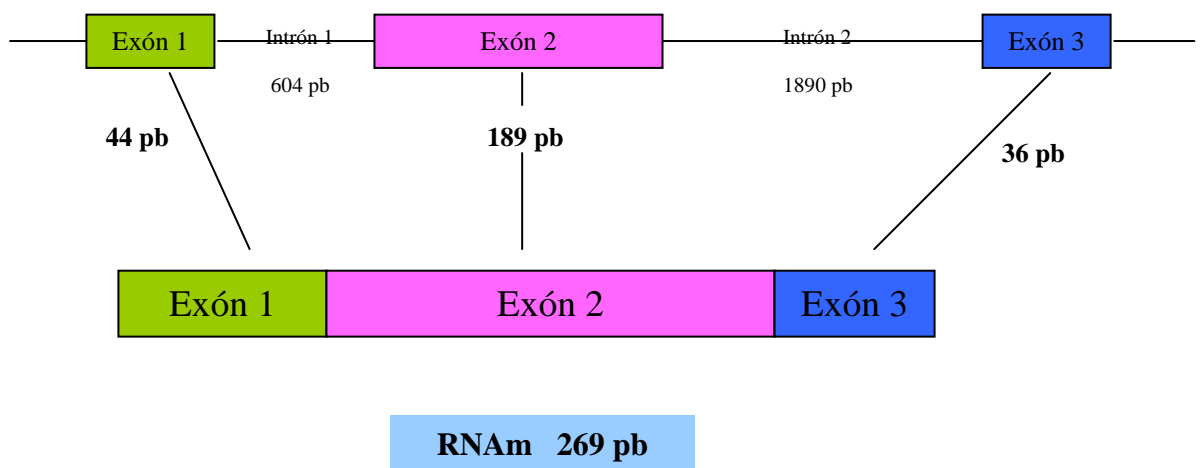


1^{er} ciclo de PCR

2^{do} ciclo de PCR

El gen h-MAM, cuyo esquema de procesamiento y secuencia, se exponen en las figuras 9 y 10 respectivamente, está constituido por 3 exones, separados por intrones de gran tamaño, que evitan la aparición de falsos positivos, debidos a una eventual contaminación por DNA, en la cuantificación del gen en muestras tumorales mediante técnica RT-PCR.

Figura 9. Representación esquemática del procesamiento del gen *h-MAM*.



La pérdida precisa y selectiva de intrones no es rara en las células eucariotas, y requiere la unión exacta de las secuencias de DNA codificantes. La reacción tiene lugar en dos etapas:

- En la primera etapa, un nucleótido A especial de la secuencia intrónica situado cerca del lugar de corte 3' reacciona con la secuencia de corte del lugar 5', la cual es cortada; el extremo 5' cortado de la secuencia del intrón se une covalentemente a este nucleótido A, formando un nucleótido ramificado.
- En la segunda etapa, el extremo 3'-OH del primer exón que estaba expuesto en la primera etapa se añade al inicio del segundo exón, cortando la molécula por el lugar de corte 3'. Las dos secuencias exónicas quedan unidas y el intrón se libera en forma de lazo.

Estas reacciones de maduración produce la molécula de RNAm del gen *h-MAM*, a partir de los transcritos primarios, constituido por 269 pb que se puede copiar en DNA a través de la transcriptasa inversa.

Figura 10. Secuencia del gen h-MAM obtenida del “GenBank”. Las secuencias de nucleótidos que constituyen los exones 1,2 y 3 del gen se representan en rojo. La secuencia de los nucleótidos que forman los intrones del gen, se representan en verde.

```

1  GTCGACTCGATCTCGGCCCACTGCAACCTCCACCTCCTG GGTTC AAGC AATTCTCCTGCC
61  TCAGCCTCCTGAGTAGCTTGGACTACAGGCACGTACCACC ATGCCCA GCTAATT TTGT AT

121  TTTTAGTAGAGAAGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAAGCTG GTCTCAAAC TCCT GACCTCAG
181  GTGATTCACCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCATTGCGACC

241  GGCCATGAAA CAATC TTTACATGAAGCATC CTTATACA AATTCTGCATG CTATCCCATT
301  CGCCTTTTATTTTCTTCAAGTGATGAAAAG GAAGGATGCTCAGAGAGACCAGCAAG GACA

361  TGGCAGGACTGCAAGTTGCATCCAGGGTCCAAA CCCTCATCCCTGAT TCCAA TTC CATC
421  ACCACCCACCACCCAGCACTGCCTGTCCAGCCCATCAGTTACGCTA CTAATTC ACAGCAT

481  CCTTTGAATCAGTGGAAAGAAAACCCTAAAAAGTT ACCAAAGAACTA AACAAAGTTAT CA
541  ATTA ATTTATAATT AACCGAGAT AATCCTTGTAATAAATACTTTCAGCG GAGGGTGG ATG

601  GCCTTAAAT TTCCCC AAAAA GGTA AAACTTTCCAGACATCC CTTTCTGAAAATGAGAT
661  GTCAGTGGATGAGAAAAGCCTGCTCCAAGAGTAGGTGTGAGGTATTGCACCTAGGCCCA

721  CTGCTGGGATAAGCTGGCAC AGATACACGG GACATGATGCTTTCATTCTCACCTTAAAGA
781  AAGAGACAGAGAAGAAAAGGAAGGGGAGCAAGTGGAGAAGGAATACAAGAAAAGAGGAAGA

841  GAAGCAGGAA GATTCTACATACAGGCTGGCTGTGTTTCCC CTGGGGCATGCTCCTGTTTA
901  CTGGTCCCATGCCA GGTTGACTCATTGCCTCGTTCATG GGTGGAAT TAAGATGCCTACCT

961  GGGGAATAAATAGAGCAAGGCTGGGTGCTCACCTCCACAGCGGCTTCTTATGATC CTTGCC
1021 ACCCGCGACTGAACACCGACAGCAGCAGCCTCACCATGAAGTTGCTG ATGGTCCT CATGC

1081 TGGCG GCCCTCTCCAGCACTGCTACGCAGGTGAGTTCTGTGCAGGGAGGGCTGCCTCGG
1141 GGTTAGGGGTTGTCACTTGGGCCTCTATGGAAGAACTCCTGCTCCC CA A TTCTCAG CAGA

1201 GAT CAGCCCCAGT ACAAAGGCTGTAGGTTTAAACAGATCTCACCATGT TGCCCAG GCTGGT
1261 CTTGAACTCCTGAGCTCAGGCAGTCTGTCC ACCTCGGCCTCCAAAG T GCTGGGATTATA G

1321 GTGTGAGCCACCACACTGCC TAGATACTGAAATCTTCTGTGATG CT CTGA ATGGT A ATAG
1381 TGAAGCATCGTATGA TTTTGAACCAAAGAA GAC CAAATAATCT T CACGAT A TACTT CCAA

1441 GTCC GAGTGTTT CAT TTCTCAAGTCTT GTCATTAATGAA GTTTC ATGAG GT TTAGCT TT
1501 TCTGGGCTGG GGAGTGGAGAGAAAGAAGTTGCAGGGCTTACAGGAAATCCCAGAGCCTGA

1561 GGTTC TCTCC CAGATTTGA GAACTC TAG ATTATGCATCAT TATCTTT GAGTCTAT A TTCT
1621 CTTGGGCTGTAAGAAG ATGAGGAATGTAATAGGTCTGCCCAAGC CTNTCATGCCT TCTGT

1681 AGGAAGCTTGTTT CTTGTGC ATCCT TCCAGGCTCTGGCTGCCCC TTATTGGAGA ATGT
1741 GAT TTCCA AGACAATCAATCC ACAAGTGTCT AAGA CTGAATACAAAGAACT TCTTCAAG A

1801 GTTCA TAGACG ACAATGCCAC TACAAA TGCC ATAGATGAATTGAAGGAA TGTTT TCTTAA
1861 CCAA ACGGAT GAACT CTGAGC AATGTTGAGG TGTTTATGGTA ATTT CATTCTT CCTA

1921 TAAGCTTTTTTAAATCCCCTGACCAGGGACAAGT G GG CTCTTCATTTCT CACTG ACAA GC
1981 CAAAGCCACT A GTGAACAAGCC TTTT CT TACATTGGTTA ATTTA GTTGAATGGTTA GTCT

2041 AATGACGTTT GCCATCAAGAAAAACA TCCA GTGTCCCT GTGTTGTCAC TCTACCCAGAGA
2101 ATCCTCAGTG GATGATAAATGAAT AGGGCAAGAGAGG AAAAGGAAAGGTC GGTAGAAGTC

```

2161 TTACCTATCCCCAGAGCTCT CTAATTC ATG CTCACAAACA CA GACACAATC ACACAAA CA
2221 CAGAAACACAC ATACACACAT CCAGACACATGC AAACACACAGAC ACAGTCACAATC ACA

2281 CAAACACACACACATT AGACATACACAAAC ATAGACAGAC AGGCAAAGAC A CAGACACAG
2341 ACACAGACACAATC ACACCAGCACACAATCATCCAG ACAC AAACACAA ACACACAGA CAG

2401 AACC ACACAACCACAGAAA ACAGAGACAC ACACAAA CACTCTC AGACAC ACACA TACAA
2461 ACATATGTTCACTCTCTACAGAA AAAACAA T TTTCCAG AAG ACCCG CACCT ATA GACCAA

2521 TCTGC AGAGA AAA CTTCTCTTC TTCA AAAA A AAGTAAAAG TGT TCTTTCTT AAAAAATGC
2581 CCTAT TTTTC AACAGTT TGG AAAATACCATT TGAGCAAGATT CTATA CATC TCAA AT AAA

2641 AAGAAT TTAA AATGCA CTTC CAGGCAATC ATAATTT GCTAG CATA AATGATG AGAAACCT
2701 TGGACTATCCAAT AGGCAACTGTA GATCAT GGGT ATGAAA CCACCATGGAGGAAGAATTG

2761 CCT CA AACA AA AAC CAAT AGT TTT GTA TTTCTTT TAACTA TACA TGTATAT TGTTGAGG
2821 GTT T TCT TAG CATT ATTCC TA TGTTAA A TTCTT TTAATC GT TCCCTGGTA A AAA A

2881 AAA A AAA AAAA AAAGT TAGA AATA TACCAA ACCCCTC CATT AGGATGAAAGTGAACATC
2941 ACCTC AGGAAACCCTGA CGCTTTCT ACAACAT GGATGAA CCTTGAGGATATTATAGCGAG

3001 TGAAGAGTGAA GCAAAGAGTCACAA AAACACAA ATGCTGCATGAC CCATGCATATGGGAA
3061 TCTGGGGAGCCAGACTCAGAGA CAGTGAAAAAAAAA AAAA CAGTGTTGTGAGGGCTTGG

3121 GTGCAGAGAAGAAGGGGG AGTCATATTTAATG GGTCTG GA GTTTCAGTTGTGCAAACAG
3181 TAATATT CTGGAGTTAG GTTGACACAACCA CACGAATATA CA GAACACTCC GAACTGTCCC

3241 CTTAAAAT GGC AAATTTT ATGAGAT GTACAT TTTA CCAC TAT TAAT AATTT GTTAAAA AC
3301 TAATT ATCAACT GCAGGAAGGGTGATGGAT TTGTTT CTTTT AAAACTT CCTCAG ACAGA

3361 TCATAGTCTGCAGCTCCAATAATTAGTAGAGCACAATGGT GGTGGCAG AG GCGTCGGAC
3421 TGCTGGGAT GCTGGGAAT ATTTCCACAATG GAGGGTTA GACGAGAGCTCAAAGTTTCACT

3481 TTTT TT TT TTTTTT TT TTT TTGCATTTG AG CTAAGATT TTAAC AAT CCTGTGAA AA TAGG
3541 TAAT ATA GTCAC GTATT TGTTG AATA CATTATTTCAAAG AACC AC AAACACACAGAAAAA

3601 ATATTTAAAAAGT CCATGGT GGGGGA AATGAT CCAG AAACAACAGCTCTTCTACTTCCAG
3661 CCCTAACCGTC TGGGATGC T AGATGGTTGTGGGCAAACCGTGGAAAAAGATAAGCTTCTG

3721 TTTTT CA AGAT TTTA TTTT GTTAGAGAGTG CAG AAAATC TAAGTGAT GTCTCTG TTTTTG
3781 C TTT TAGCAAT TAAT ATATG A CAGCA GTC TT TGTGATTT ATTTTAACTTT CTGC AAGAC

3841 CTTTGGCT CA CA GAACTG CAGGGTATGGTGAGAAACCAACTACGGATTGCTGCAAACCAC
3901 ACCTTC TCTT TCTTAT GTCT TTT TACTA CAA ACTACAA GACAATTGT TGAAACCT GCTAT

3961 ACATGT TT ATTTAATAAA TT GATGG CAA AAACCTG AAGTTTCTC TTTG TTCTA CCGTAGA
4021 AAAG AGGCGTTAGA GGGCCTCACA TATTTTACATACAC ACACACAC ACA CACTTACTTAT

4081 TAAAGAACTCATGG TCATGGGT TGAGGACTCT GTGAAGC ATTTGT TTCCTCAGTCTGACC
4141 TCTAAGCCTTGGTACTCTCTCTGAAGAGTG TTTCCCTGTC CCC ATCCCACCACC TCCCCC

4201 GTCGAC

Elegimos *β-globina* como control interno, en la cuantificación del gen *h-MAM*, por ser un gen constitutivo que amplifica con “primers” muy permisivos los cuales permiten realizar el “annealing” en un rango de temperatura amplio. La técnica empleada para la cuantificación de los niveles de expresión de *h-MAM* y *β-globina* fue RT-PCR, con el “kit One Step RT-PCR”. Para ello, tomamos 1 μl del RNA total extraído y se retrotranscribió y amplificó por PCR (RT-PCR), utilizando los “primers” MG1 y MG2, diseñados por Zach et al. (1999) (Figura 11) y sintetizados por “Amersham Pharmacia Biotech”. Estos autores utilizaron además los “nested” primers (MG3 y MG4) de la *h-MAM*, para la detección de células tumorales circulantes en sangre periférica mediante “nested” PCR.

En nuestro estudio hemos utilizado la pareja de “primers” MG1 y MG2 (reconstituídos cada semana para asegurar una concentración constante de los mismos), ya que con ellos fue posible amplificar el cDNA de la *h-MAM* en un único paso de PCR, y el tamaño del fragmento generado no se solapaba con el de nuestro control interno (*β-globina*). Estos “primers” flanquean una región del gen de 269 pb.

Figura 11. Secuencia de “primers” de *h-MAM*. Estos “primers” fueron diseñados para generar un producto de PCR que amplifica toda la región codificante de *h-MAM*.

MG-1: GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT GGC
MG-2: CTC ACC ATA CCC TGC AGT TCT GTG AGC

La reacción se llevó a cabo en tubos “eppendorf” de 0.5 ml. El proceso de retrotranscripción tuvo lugar durante un periodo de 30 min a 54°. Posteriormente se inactivó la retrotranscriptasa y activó la taq-polimerasa protegida, a 95° durante 15 min. El cDNA obtenido se amplificó por PCR, utilizando el siguiente programa:

95°	30 seg	30 ciclos
62°	15 seg	
72°	20 seg	
72°	7 min	1 ciclo

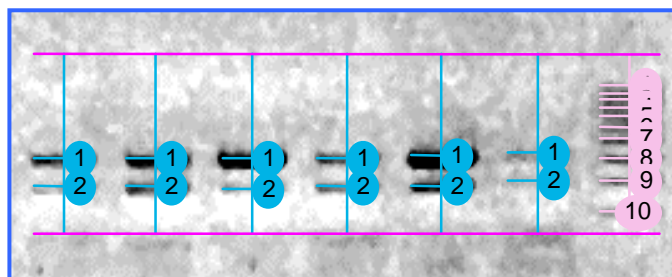
Los productos obtenidos por RT-PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, previamente impregnados con bromuro de etidio. Utilizamos un marcador de DNA (“ladder”), como marcador del tamaño de las bandas. Cargamos el gel con 10 µl de cada muestra, incluyendo el “ladder”. A continuación se procede a la electroforesis del gel en la cubeta de electroforesis (BioRad Power Pak 3000) durante 20 min a 100 v. Las bandas de DNA se visualizaron bajo transiluminación (transiluminador UVP). Fotografiamos el gel con cámara digital (“Kodak digital science DC40”), para proceder al análisis de bandas.

3.5.1 Interpretación de resultados del análisis de las muestras por RT-PCR

El análisis de bandas fue llevado a cabo con el programa “1D Image Analisis Software” (Figuras 12 y 13). Este programa permite la obtención de valores de intensidades netas, que posteriormente se utilizarán para la cuantificación de *h-MAM*.

Al utilizar *β-globina* como control interno, en los casos en los que no obtuvimos banda en *h-MAM*, y sí de *β-globina* asumimos que en esa muestra no existía expresión del gen *h-MAM*.

Figura 12. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, de la electroforesis de los fragmentos retrotranscritos y amplificados por RT-PCR de *h-MAM* (bandas en posiciones 1) y *β-globina* (bandas en posiciones 2). Cada calle corresponde al tumor de una paciente. El marcador del peso molecular (“ladder”), aparece en rosa.

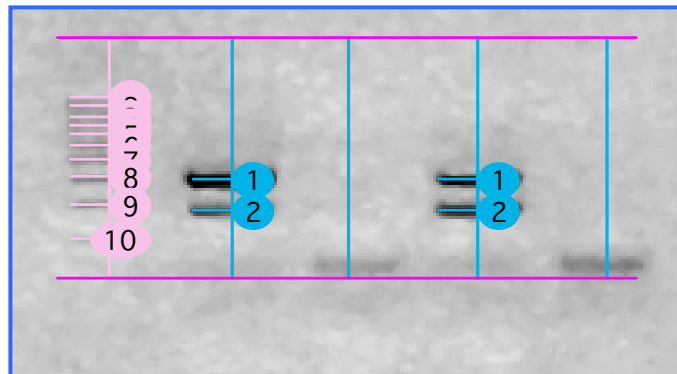


Además, realizamos un control para cada gel mediante PCR con “primers” de *h-MAM* para comprobar que no existía DNA contaminante (Figura 13). La presencia de DNA contaminante podría servir de molde de unión de los “primers” que conllevaría amplificación de dicho DNA.

Otra posible contaminación, sería que el RNA estuviese contaminado con DNA. Este hecho no supone problema en la reacción de RT-PCR, ya que el tamaño del amplificado, a partir de un intrón del DNA, sería siempre superior al cDNA obtenido tras la retrotranscripción.

La ausencia de bandas en la calle control, indicaron que no había DNA contaminante en nuestras muestras.

Figura 13. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, de la electroforesis de los fragmentos retrotranscritos y amplificados por RT-PCR de *h-MAM* (calles 1 y 3) y amplificados por PCR (calles 2 y 4). La ausencia de bandas en las calles 2 y 4 indica ausencia de DNA contaminante en ambas muestras. El marcador del peso molecular “ladder” aparece en rosa.



3.6 ESPECTROFOTOMETRÍA

El fundamento de la espectrofotometría es la medida de las absorbancias a 230, 260, 280 y 320 nm para calcular las concentraciones de RNA de las muestras tumorales. Por espectrofotometría cuantificamos los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nm, ya que una solución de RNA con una densidad óptica de 1.0 tiene una concentración de 40 ng/ml, en una cubeta de longitud de paso de 10 mm.

Se determinó la concentración de RNA, tras amplificación por PCR, a una longitud de onda de 260 nm. Además, el espectrofotómetro utiliza longitudes de onda de 230 y 280 nm, para cálculos de comprobación de pureza (mediante las razones 260/230 y 260/280). La longitud de onda a 320 nm se utiliza para compensación de fondo.

La técnica de espectrofotometría se basa en la cuantificación de los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nm, debido a que una solución de RNA con una densidad óptica de 1.0 tiene una concentración de 40 ng/ml, en una cubeta de longitud de paso de 10 mm.

En las determinaciones por espectrofotometría, es necesario realizar comprobaciones de pureza de los ácidos nucleicos (RNA, en nuestro estudio) ya que en el proceso de extracción de los mismos, también puede arrastrar proteínas, por lo que se requiere de una purificación a fondo para separar estas impurezas proteínicas. La razón 260/280 proporciona un indicador de pureza, sin embargo, no supone una evaluación definitiva. Los preparados puros de RNA tienen razones previstas ≥ 2.0 . Las desviaciones de estos valores son indicativas de la presencia de impurezas en las muestras.

La lectura a 260 nm se determina cerca de la parte superior de un pico ancho en el espectro de absorbancia de ácidos nucleicos, mientras que la lectura a 280 nm se determina en una pendiente pronunciada. Esto significa que, cambios pequeños en la

longitud de onda ocasionan cambios considerables de absorbancia, y pequeñas variaciones en longitud de onda a 280 nm tendrán un mayor efecto en la razón 260/280, que las que ocasionarían variaciones a 260 nm. En consecuencia, cada instrumento producirá resultados reproducibles como resultado de medidas hechas en el mismo instrumento.

La concentración también afectará a las lecturas de la razón 260/280. Si una solución está demasiado diluida, las lecturas se harán en el límite de detección del instrumento, y los resultados pueden variar debido a que hay menos diferencias entre la absorbancia del fondo y la absorbancia del pico a 260 nm respecto a la pendiente a 280 nm. Este es un motivo por el que las absorbancias pueden ser mayores de 0.05 en la determinación de medidas exactas.

Asimismo, una absorbancia elevada a 230 nm puede indicar la presencia de impurezas debidas a sales reguladoras que absorben a esta longitud de onda; la longitud de onda de 230 nm está cerca del máximo de absorbancia de las uniones peptídicas. Al medir muestras de RNA, la razón 260/230 debe ser mayor a 2; una razón inferior a 2 es, por lo general, indicativa de la presencia de contaminantes que absorben en el intervalo 230 a 260 nm.

3.6.1 Análisis de las muestras por espectrofotometría

Una vez extraído el RNA de las muestras tumorales, para análisis por RT-PCR, procedimos a la medida de la concentración de RNA con el espectrofotómetro. La medida para dicha cuantificación se realizó a una longitud de onda de 260 nm, que junto con la medida a una longitud de onda a 280 nm, comprobamos la pureza de las muestras mediante la razón 260/280.

Medimos el RNA de todas las muestras tumorales por técnica espectrofotométrica previa dilución 1:10 de las muestras tumorales en agua libre de RNAasas con la que previamente se extrajo el RNA. Las relaciones de absorbancias [260/280] estuvieron comprendidas entre los valores 1.8-2.1.

3.7 CUANTIFICACIÓN DEL GEL GEN *h-MAM*

Para la cuantificación de la expresión de *h-MAM*, dividimos los valores de intensidades netas (obtenidas con el programa “1D Image Análisis Software”) de cada muestra entre las medidas de concentraciones de RNA de partida de dichas muestras (obtenidas por espectrofotometría). El espectrofotómetro utilizado fue “GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator” de “Amersham Pharmacia Biotech” De este modo, se obtuvieron unas cifras, que expresamos en unidades arbitrarias, y que, comparativamente reflejan el nivel de expresión del gen (en este caso *h-MAM*).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las variables del estudio se correlacionaron con la expresión de *h-MAM*. Para dicha correlación se utilizó el test de Spearman, previa obtención de un dintel de positividad en cada caso, y posterior dicotomización de la variable en positiva y negativa. Dicho dintel, a su vez, fue obtenido mediante la aplicación del test “CRITLEVEL” (Abel et al. 1984), que, como su nombre indica, establece el umbral de significación más nítido para cada correlación particular.

Los resultados se consideraron significativos cuando la posibilidad de que se debieran al azar fue inferior al 5%. Todas las operaciones fueron realizadas utilizando el paquete bioestadístico “Graph Pad PRISM 3.0”.

4 RESULTADOS

Se pudo obtener material suficiente para el análisis inmunohistoquímico, análisis citométrico y análisis por RT-PCR, de los 76 tumores de la serie.

Estudiamos la correlación de factores pronósticos de primera, segunda y tercera generación, con la expresión de h-MAM, mediante el test no paramétrico de Spearman, como previamente se ha expuesto en el capítulo de materiales y métodos. Los valores de expresión de h-MAM oscilaron entre 3.4-920.4 unidades arbitrarias.

4.1 FACTORES PRONÓSTICOS

La evaluación anatomopatológica de la pieza operatoria, así como la realización y evaluación de factores pronósticos de primera generación, las determinaciones inmunohistoquímicas correspondientes a los factores pronósticos de segunda y tercera generación (receptores hormonales y parámetros relacionados con la actividad proliferativa de la célula), marcadores reguladores de la tumorigénesis, el estudio del ciclo celular y el estudio de la *h-MAM* fueron llevados a cabo en el laboratorio del Centro, con las mismas técnicas, los mismos reactivos y condiciones experimentales.

4.1.1 Factores pronósticos de primera generación

Se estudiaron la **variedad histológica, grado histológico (GH), grado nuclear (GN), y la invasión ganglionar** de los tumores como parámetros de rutina para el informe anatomopatológico de la muestra tumoral. En la tabla 1 y 2 se muestran el número de casos con y sin invasión ganglionar de los diferentes

carcinomas, en pacientes que no recibieron quimioterapia previa y en las que sí la recibieron, respectivamente.

Tabla 1. Tipos de carcinomas e invasión ganglionar en pacientes que no recibieron quimioterapia previa.

	N+	N-
CDI	21	28
CDIS	0	5
CLI	3	4
Metástasis	1	0

Tabla 2. Tipos de carcinomas e invasión ganglionar en pacientes que recibieron quimioterapia previa.

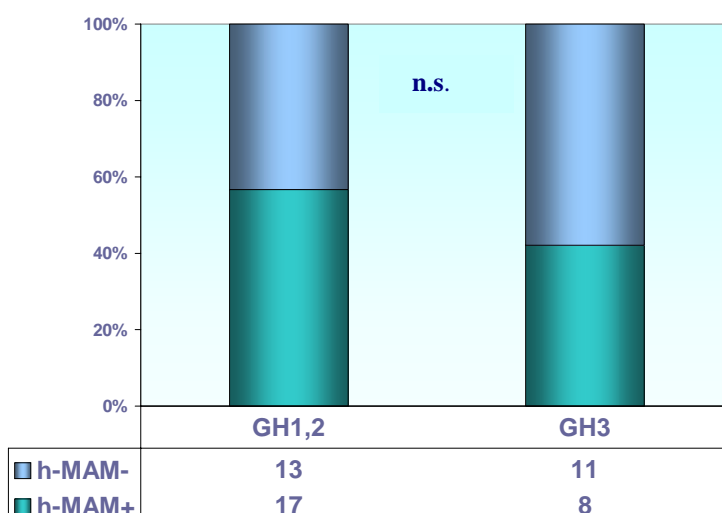
	N+	N-
CDI	4	2
CLI	3	0
C. Epidermoide	0	1
C. Mucinoso	1	0
Metástasis	1	0

4.1.1.1 Grado histológico

De las 77 muestras estudiadas, se pudo determinar el GH en 49 casos, 30 (61%) de los cuales presentaron GH1,2, frente a 19 casos (39%) con GH3.

Al estudiar la correlación entre el GH y h-MAM mediante el test no paramétrico de Spearman, no existió correlación entre ambos parámetros. Obtuvimos un dintel de positividad para h-MAM de 154 unidades, tras aplicar el test “CRITLEVEL”. Valores de *h-MAM* por encima de 154 fueron considerados como valores elevados de *h-MAM*, y valores de *h-MAM* iguales o inferiores a 154 unidades se consideraron valores bajos de *h-MAM*. Obtuvimos 8 casos (16%), del total de casos estudiados, con GH3 y cuyos niveles de *h-MAM* fueron superiores a 154 unidades y 11 casos (22%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 154. Por otro lado, obtuvimos 17 casos (35%) con GH1, 2 y con niveles de *h-MAM* superiores a 154 unidades y 13 casos (27%) con niveles inferiores a 154. En la figura 1 aparecen los porcentajes de expresión del gen h-MAM respecto al GH.

Figura 1. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto al GH.

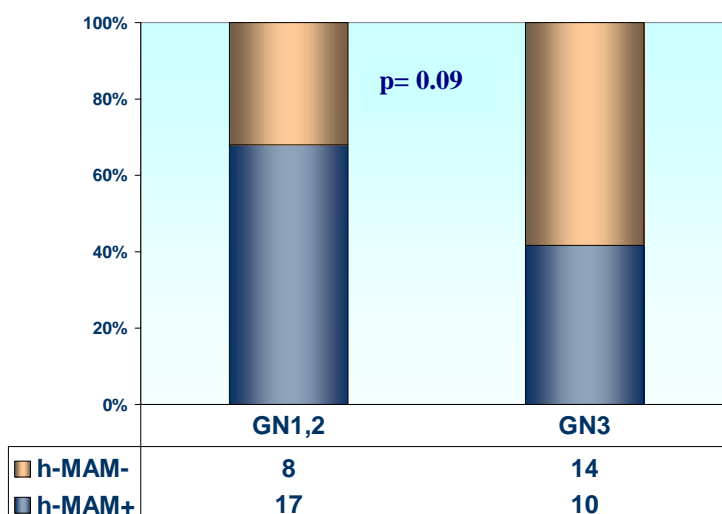


4.1.1.2 Grado nuclear

De las 77 muestras estudiadas, se pudo determinar el GN en 49 casos, 25 (51%) de los cuales presentaron GN1,2, frente a 24 casos (49%) con GN3.

La correlación entre h-MAM y un GN bajo (1,2) fue casi significativa ($p=0.09$). Obtuvimos 10 casos (20%) con GN3 y niveles elevados de h-MAM, es decir, superiores a 154 unidades, dintel de positividad obtenido por el “CRITLEVEL”, y 14 casos (28%) con niveles de h-MAM inferiores a 154 unidades. Por otro lado, 17 casos (35%) tuvieron GN1,2 y niveles de h-MAM superiores a 154 unidades y 8 (16%) casos niveles de h-MAM inferiores a 154. En la figura 2 aparecen los porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto al GN.

Figura 2. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto al GN.

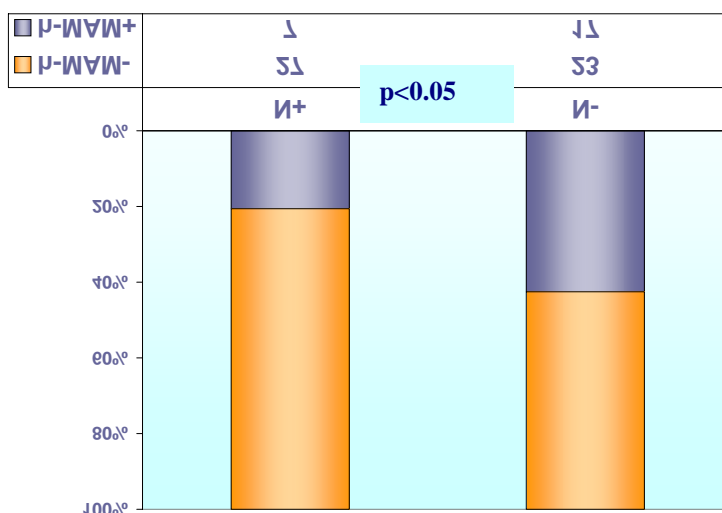


4.1.1.3 Invasión ganglionar

De los 74 casos estudiados, 34 (44%) presentaron invasión ganglionar, 9 de los cuales correspondían a pacientes que recibieron quimioterapia previa, y 40 casos (66%) no presentaron invasión ganglionar, 3 de los cuales correspondían a pacientes que recibieron quimioterapia previa. En el caso de este factor pronóstico clásico de carcinoma de mama encontramos una correlación significativa e inversa ($r=-0.23$ y $p<0.05$) con *h-MAM* (Figura 3), correlación que se mantuvo cuando prescindimos en el estudio, de pacientes tratadas con quimioterapia previa.

Tras aplicar el test “CRITLEVEL”, el dintel de positividad para *h-MAM* en relación con la invasión ganglionar fue de 235 unidades. Obtuvimos 7 casos (9%), del total de casos estudiados, donde existía invasión ganglionar y cuyos niveles de *h-MAM* fueron superiores a 235 unidades, y 27 casos (36%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 235. Por otro lado, obtuvimos 17 casos (23%) sin invasión ganglionar y con niveles de *h-MAM* superiores a 235 unidades y 23 casos (31%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 235. En la figura 3 se expresan los porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a la invasión ganglionar.

Figura 3. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a la invasión ganglionar.



4.1.2 Factores pronósticos de segunda generación

4.1.2.1 Receptores de estrógenos y progesterona

Los receptores de estrógenos y de progesterona, han sido determinados por inmunohistoquímica. En las tablas 3 y 4 aparecen la frecuencia de expresión de los receptores esteroideos, en pacientes que no recibieron quimioterapia previa y en las que sí la recibieron, respectivamente.

Tabla 3. Frecuencia de combinación de receptores esteroideos en pacientes que no recibieron quimioterapia previa.

	Nº de casos	%
RE+RP+	34	53
RE-RP-	14	22
RE+RP-	16	25
RE-RP+	0	0

Tabla 4. Frecuencia de combinación de receptores esteroideos en pacientes que recibieron quimioterapia previa.

	Nº de casos	%
RE+RP+	4	31
RE-RP-	5	38
RE+RP-	4	31
RE-RP+	0	0

La reacción inmunohistoquímica se consideró positiva para RE y RP, cuando más del 10% de las células tumorales mostraron tinción específica nuclear (Figura 4 y 5).

Figura 4. Detección inmunohistoquímica de los RE en células tumorales. Las células tumorales aparecen intensamente teñidas en el núcleo en más del 10% de las mismas.

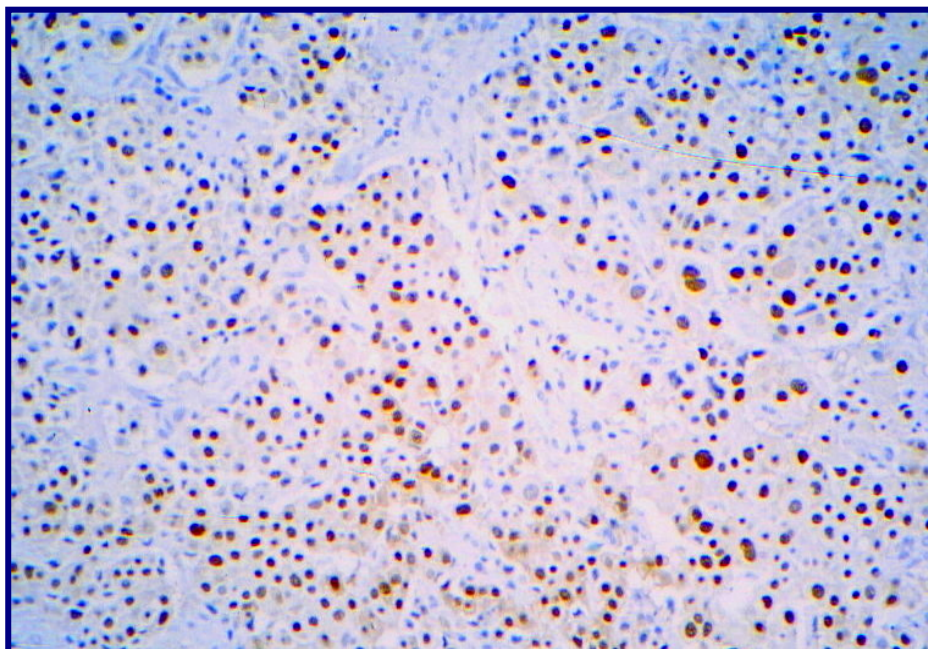
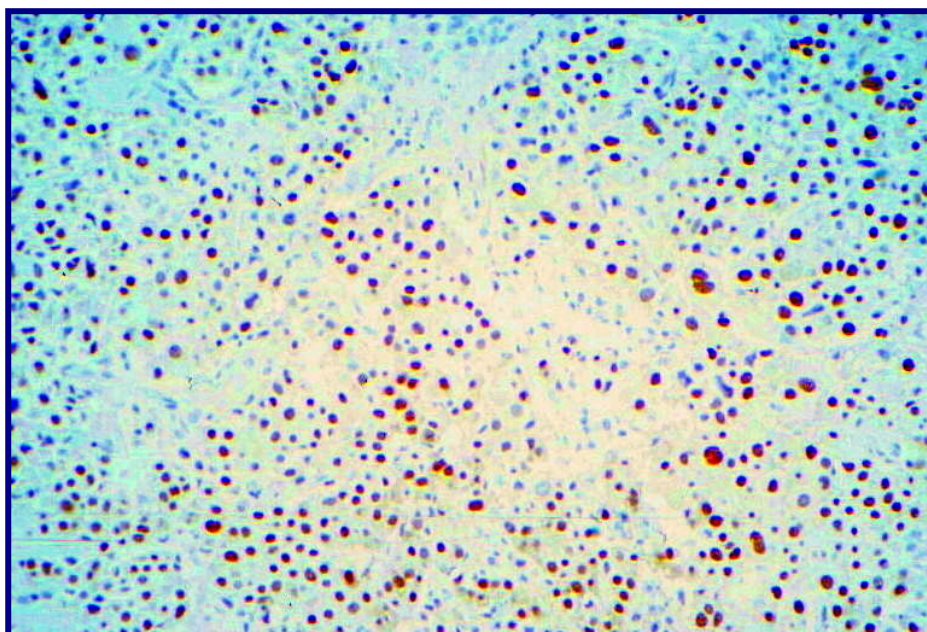


Figura 5. Detección inmunohistoquímica de los RP en células tumorales. Las células tumorales aparecen intensamente teñidas en el núcleo, en más del 10% de las mismas.



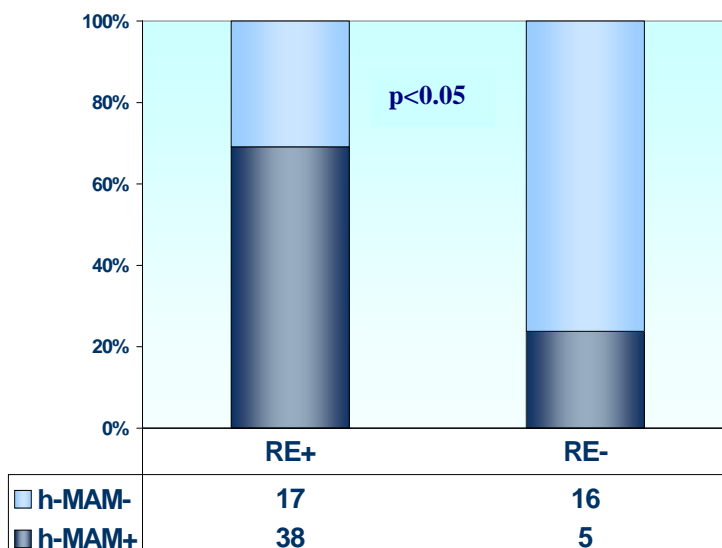
De las 77 muestras estudiadas, 58 (75%) presentaron RE positivos, de las cuales 8 correspondían a pacientes que habían recibido quimioterapia previa, y 19 de las muestras (25%) presentaron RE negativos, 5 de las cuales correspondían a pacientes que habían recibido quimioterapia previa.

Observamos una correlación directa y significativa entre RE y *h-MAM* ($r=0.40$ y $p<0.05$), correlación que se mantuvo cuando prescindimos en el estudio de las pacientes tratadas con quimioterapia.

Obtuvimos 38 casos (50%) con RE+ y cuyos niveles de *h-MAM* fueron superiores a 140 unidades (dintel de positividad obtenido con “CRITLEVEL”), y 17 casos (22%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 140. Valores de *h-MAM* por

encima de 140 fueron considerados como valores elevados de *h-MAM*, y valores de *h-MAM* iguales o inferiores a 140 unidades se consideraron valores bajos de *h-MAM*. Por otro lado, obtuvimos 5 casos (6%) con RE- y con niveles de *h-MAM* superiores a 140 unidades y 16 casos (21%) con niveles inferiores a 140. En la figura 6 aparecen los porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a la expresión de RE+ y RE-.

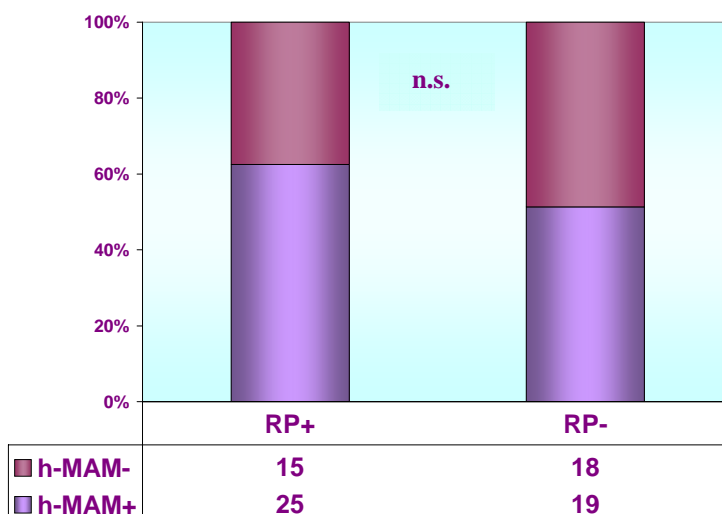
Figura 6. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a la expresión de RE+ y RE-.



En cuanto a los RP, 34 (44%) de las 77 muestras estudiadas, presentaron positividad para los mismos, 4 de los cuales correspondían a pacientes que recibieron quimioterapia previa, y 39 (51%) fueron RP negativos, 9 de los cuales correspondían a pacientes que recibieron quimioterapia previa. En este caso no existió correlación significativa entre RP y *h-MAM*.

Obtuvimos 25 casos (32%) con RP+ y cuyos niveles de *h-MAM* fueron superiores a 140 unidades (dintel de positividad obtenido con el “CRITLEVEL”), y 15 casos (19%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 140. Valores de *h-MAM* por encima de 140 fueron considerados como valores elevados de *h-MAM*, y valores de *h-MAM* iguales o inferiores a 140 unidades se consideraron valores bajos de *h-MAM*. Por otro lado, obtuvimos 19 casos (25%) con RP- y con niveles de *h-MAM* superiores a 140 unidades y 18 casos (23%) con niveles inferiores a 140. En la figura 7 aparecen los porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a la expresión de RP+ y RP-.

Figura 7. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a la expresión de RP+ y RP-.



4.1.3 Factores pronósticos de tercera generación

Estudiamos parámetros moleculares relacionados con la actividad proliferativa de la célula tumoral, como son el oncosupresor disfuncional **p53**, puesto que la inmunohistoquímica detecta el producto del gen mutado, que es más estable que la propia proteína salvaje, un antígeno relacionado directamente con la proliferación, **Ki67**, y finalmente el oncogén **c-erb-B2**. En las tablas 5 y 6, se expresan las frecuencias de expresión de c-erb-B2, p53 y Ki67 en pacientes que no recibieron quimioterapia previa y en las que sí la recibieron, respectivamente.

Tabla 5. Frecuencia de expresión de c-erb-B2, p53 y Ki67 en pacientes que no recibieron quimioterapia previa.

	Nº de casos	%
c-erb-B2+	13	21
c-erb-B2-	50	79
p53+	12	19
p53-	51	81
Ki67>20	28	44
Ki67≤20	36	56

Tabla 6. Frecuencia de expresión de c-erb-B2, p53 y Ki67 en pacientes que recibieron quimioterapia previa.

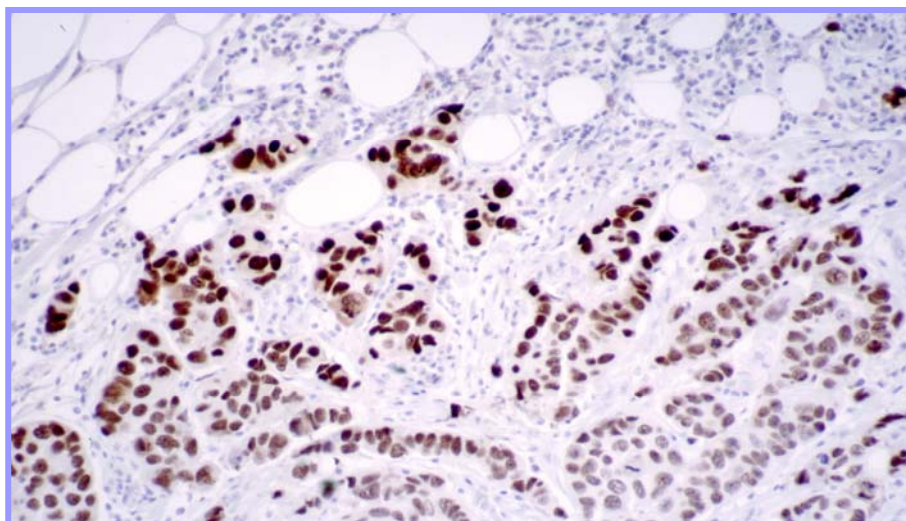
	Nº de casos	%
c-erb-B2+	4	28
c-erb-B2-	10	72
p53+	4	28
p53-	10	72
Ki67>20	4	31
Ki67≤20	9	69

4.1.3.1 p53

La expresión de la proteína p53 fue estudiada por análisis inmunohistoquímico en las 77 muestras tumorales.

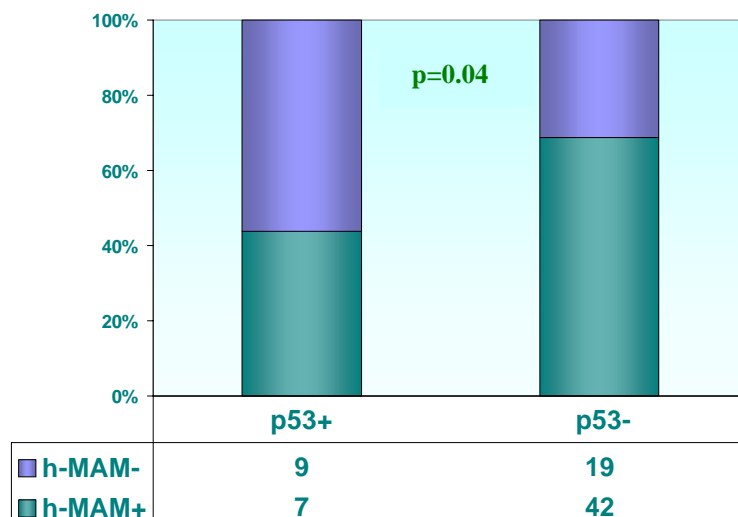
Se consideraron los resultados negativos cuando la expresión de p53 mutada fue inferior al 10% de los núcleos, y los resultados fueron positivos cuando la expresión de p53 mutada fue superior al 10% de los núcleos (Figura 8). p53 se expresó en 16 muestras (21%), 4 de las cuales procedían de pacientes que habían recibido quimioterapia previa, y no se expresó en 61 muestras (79%), 10 de las cuales procedían de pacientes que habían recibido quimioterapia previa. Encontramos una correlación inversa y significativa ($r=-0.22$ y $p<0.05$), entre ambos parámetros moleculares, correlación que no se mantuvo cuando prescindimos en el estudio de las pacientes tratadas con quimioterapia previa.

Figura 8. Detección inmunohistoquímica del oncosupresor p53 en células tumorales. Las células tumorales aparecen intensamente teñidas en el núcleo en más del 10% de las mismas.



Al estudiar la correlación entre p53 y *h-MAM* mediante el test no paramétrico de Spearman, obtuvimos un dintel de positividad para *h-MAM* de 122 unidades, tras aplicar el test “CRITLEVEL”. Valores de *h-MAM* por encima de 122 fueron considerados como valores elevados de *h-MAM*, y valores de *h-MAM* iguales o inferiores a 122 unidades se consideraron valores bajos de *h-MAM*. En 7 de los casos estudiados (9%) encontramos mutación del gen oncosupresor p53 y niveles de *h-MAM* superiores a 122 unidades mientras que 42 casos (54%) presentaron niveles de *h-MAM* mayores a 122, y no presentaron mutación de p53. Además, 9 casos (12%) fueron p53+ con niveles de *h-MAM* iguales o inferiores a 122 unidades y 19 casos (25%) p53- y niveles de *h-MAM* iguales o inferiores a 122. En la figura 9 se representan los porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a p53.

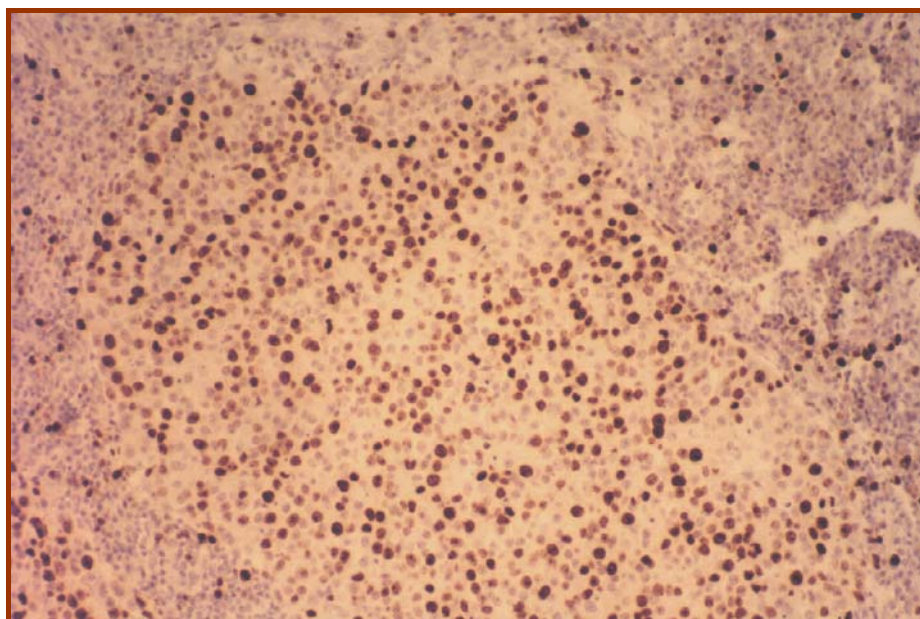
Figura 9. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto al oncosupresor p53.



4.1.3.2 Ki67

Estudiamos la expresión del factor de proliferación celular Ki67 en las 77 muestras tumorales. La positividad de Ki67 se evaluó como porcentaje de células tumorales positivas (tinción nuclear). Obtuvimos expresión de Ki67 mayor al 20% de las células, como muestra la Figura 10, en 32 muestras (42%) del total y Ki67 menor o igual al 20%, en 45 muestras (58%).

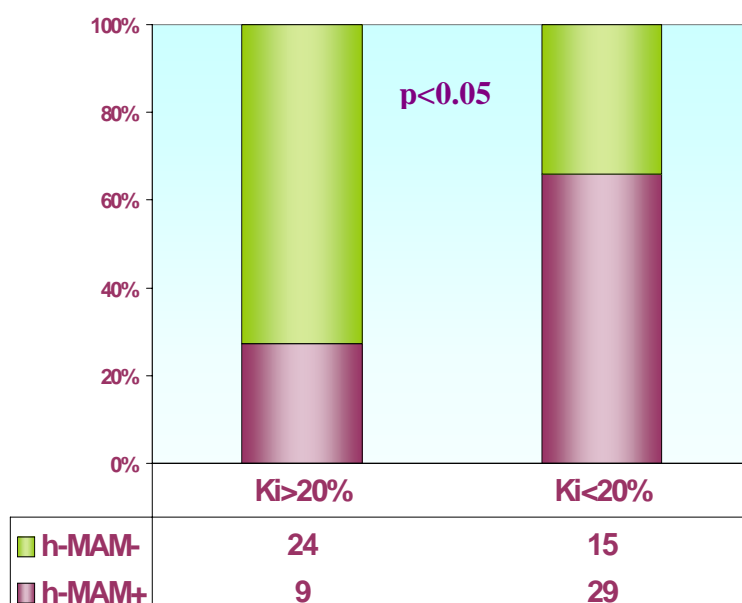
Figura 10. Detección inmunohistoquímica de Ki67 en células tumorales. Las células tumorales aparecen intensamente teñidas en el núcleo en más del 20% de las mismas.



En el caso de este factor pronóstico de carcinoma de mama encontramos, al igual que ocurría con p53 y con la invasión ganglionar, una correlación inversa y significativa entre ambos parámetros moleculares ($r=-0.38$ y $p<0.05$), correlación que se mantuvo cuando prescindimos en dicho estudio de las pacientes tratadas con quimioterapia previa (Figura 11).

Al estudiar la correlación entre Ki67 y *h-MAM*, y tras aplicar el “CRITLEVEL”, el dintel de positividad para *h-MAM* fue de 163 unidades, por lo que valores superiores a 163 fueron considerados valores altos de *h-MAM* y valores iguales o inferiores a 163 fueron considerados bajos. Obtuvimos 9 casos (12%) con $Ki67 > 20\%$ y cuyos niveles de *h-MAM* fueron superiores a 163, y 24 casos (31%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 163. Por otro lado, obtuvimos 29 casos (38%) con $Ki67 \leq 20\%$ y con niveles de *h-MAM* superiores a 163 unidades y 15 casos (19%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 163. En la figura 11 se representan los porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a Ki67.

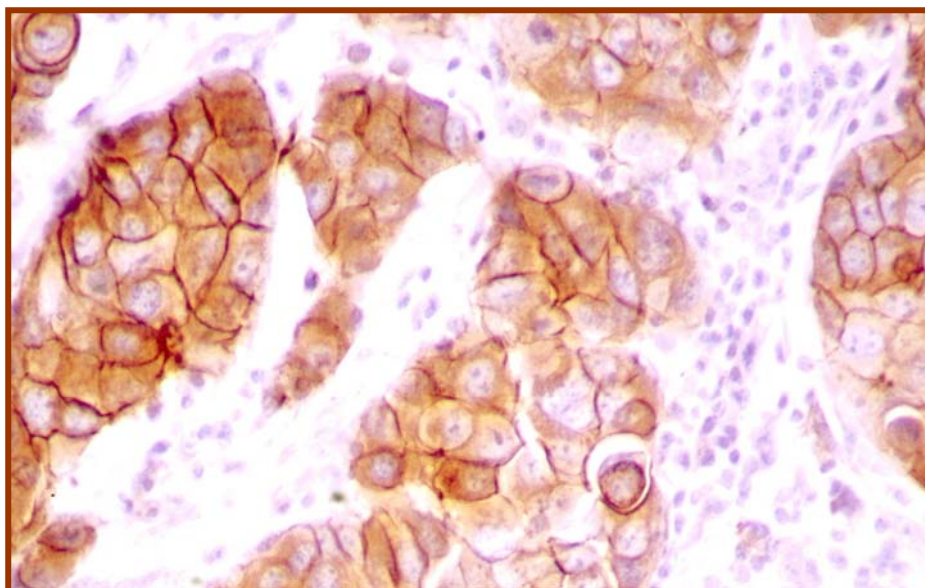
Figura 11. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a Ki67.



4.1.3.3 c-erb-B2

Estudiamos la expresión de c-erbB2 por análisis inmunohistoquímico en todas las muestras tumorales. La reacción se consideró positiva cuando más del 10% de las células mostraron tinción específica de membrana (Figura 12), y negativa cuando menos del 10% de las células mostraron tinción específica de membrana.

Figura 12. Detección de c-erb-B2 en muestras de carcinoma de mama mediante análisis inmunohistoquímico. Las células tumorales aparecen intensamente teñidas en la membrana.

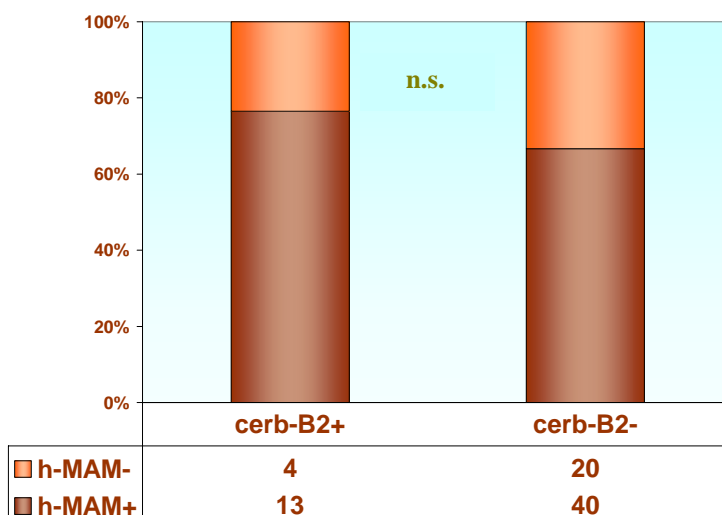


De los 77 casos estudiados, 17 (22%) presentaron reacción inmunohistoquímica positiva para c-erbB2, 4 de los cuales correspondían a pacientes que recibieron quimioterapia previa, y 60 casos (78%) presentaron reacción inmunohistoquímica negativa, 10 de los cuales correspondían a pacientes que recibieron quimioterapia previa. En el caso de este oncogén y, al igual que

ocurría con los RP, no encontramos correlación con *h-MAM*. En la figura 13 se representan los porcentajes de expresión de *c-erbB2* respecto a *h-MAM*.

Al estudiar la correlación entre *c-erb-B2* y *h-MAM* mediante el test no paramétrico de Spearman, obtuvimos un dintel de positividad para *h-MAM* de 122 unidades, tras aplicar el test “CRITLEVEL”. Valores de *h-MAM* por encima de 122 fueron considerados como valores elevados de *h-MAM*, y valores de *h-MAM* iguales o inferiores a 122 unidades se consideraron valores bajos de *h-MAM*. Obtuvimos 13 casos (17%) con *c-erbB2+* y niveles de *h-MAM* superiores a 122 unidades, y 4 casos (5%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 122. Por otro lado, obtuvimos 40 casos (52%) con *c-erbB2* negativo y niveles de *h-MAM* superiores a 122 unidades, y 20 casos (26%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 122 unidades.

Figura 13. Porcentaje de expresión del gen *h-MAM* respecto a *c-erb-B2*.



4.1.4 Ploidía

La ploidía de las 76 muestras tumorales fue estudiada por análisis citométrico. Se consideraron tumores diploides aquellos que presentaban índice de DNA=1 (Figura 14) y tumores aneuploides aquellos que presentaban índice de DNA distinto a 1 (Figura 15). De los 76 casos estudiados, 36 fueron diploides (48%), 5 de los cuales correspondieron a pacientes que habían recibido quimioterapia previa, y 39 fueron aneuploides (52%), 7 de los cuales correspondieron a pacientes que habían recibido quimioterapia previa.

Figura 14. Ploidía del ciclo celular. En la figura aparece un ciclo celular diploide con 88.0% de células en fase G1, 6.7% de células en fase G2 y 5.3% de células en fase S.

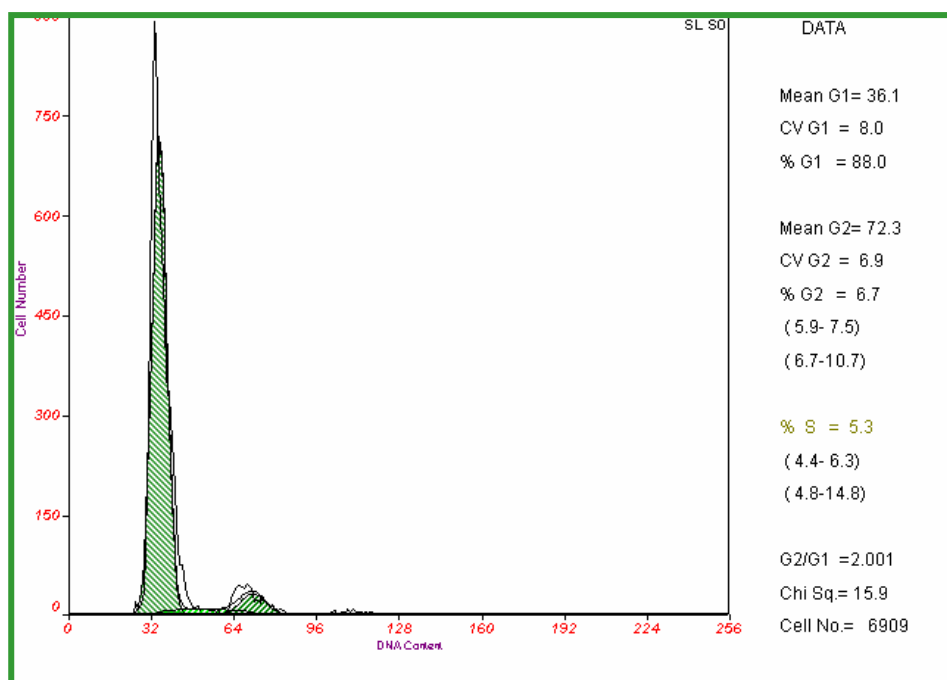
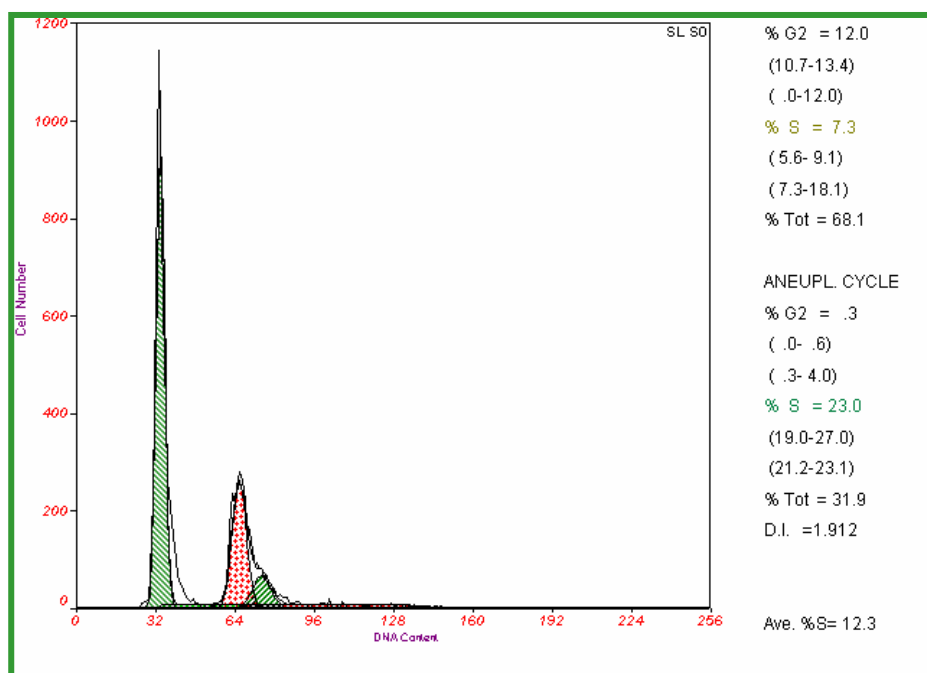


Figura 15. Ploidía del ciclo celular. En la figura se muestra un ciclo celular aneuploide con índice de DNA de 1.9.

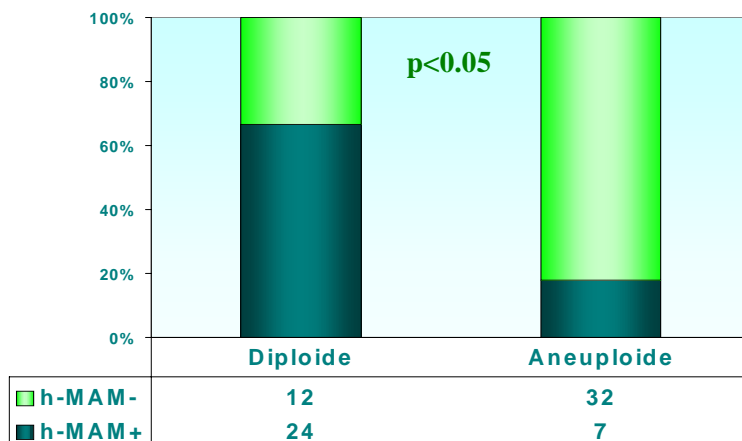


Encontramos 24 casos (31%) con ciclos celulares diploides y cuyos niveles de *h-MAM* fueron superiores a 205 unidades (dintel de positividad obtenido por “CRITLEVEL”), y 12 casos (15%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 205 unidades. Valores de *h-MAM* por encima de 205 fueron considerados como valores elevados de *h-MAM*, y valores de *h-MAM* iguales o inferiores a 205 unidades se consideraron valores bajos de *h-MAM*. Por otro lado, obtuvimos 7 casos (9%) con ciclos celulares aneuploides y con niveles de *h-MAM* superiores a 205 unidades y 32 casos (41%) con niveles de *h-MAM* inferiores a 205.

Encontramos una correlación directa y significativa entre ciclos celulares diploides y *h-MAM* ($r= 0.49$ y $p<0.05$), correlación que se mantuvo cuando prescindimos en el estudio de pacientes que habían recibido quimioterapia previa. Sin embargo, no existió correlación entre *h-MAM* y ciclos celulares aneuploides.

En la figura 16 aparecen los porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a muestras con ciclos celulares diploides y aneuploides.

Figura 16. Porcentajes de expresión del gen *h-MAM* respecto a muestras con ciclos celulares diploides y aneuploides.



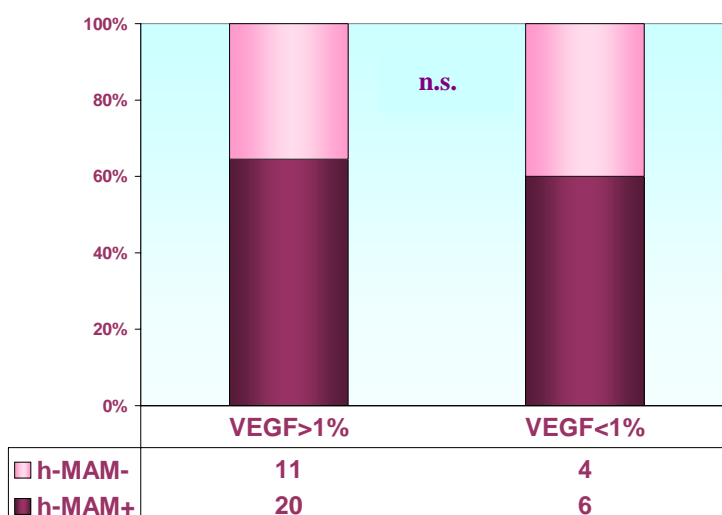
4.1.5 Marcadores reguladores de la tumorigénesis

4.1.5.1 VEGF

Estudiamos el factor de proliferación VEGF en 41 muestras tumorales. Se consideraron los resultados positivos cuando más del 1% de las células fueron positivas para VEGF, y los resultados fueron negativos cuando menos del 1% de las células fueron positivas para VEGF. En 10 casos (25%), menos del 1% de las células fueron positivas para VEGF, mientras que en 31 casos (75%), más del 1% de las células fueron positivas para VEGF.

El análisis estadístico no fue significativo cuando comparamos este marcador de tumorigénesis con las concentraciones de h-MAM. En la figura 17 se representan los porcentajes de expresión de del gen *h-MAM* respecto a VEGF.

Figura 17 . Porcentajes de la expresión del gen *h-MAM* respecto a VEGF.

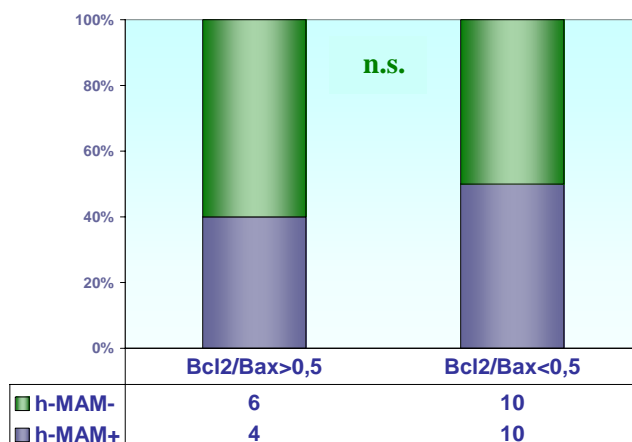


4.1.5.2 Bcl-2/Bax

Por último, estudiamos las proteínas reguladoras de la apoptosis Bcl-2 y Bax en 30 muestras tumorales. Se formaron dos subgrupos según si las relaciones entre Bcl-2/Bax fueron mayores o menores a 1/2. En 10 casos (33%), la relación Bcl-2/Bax fue mayor de 1/2, mientras que en 20 casos (67%), dicha relación fue menor a 1/2.

El análisis estadístico no fue significativo cuando comparamos ambas proteínas con la expresión del gen h-MAM. En la figura 18 se representan los porcentajes de expresión de Bcl-2/Bax respecto a la expresión del gen h-MAM.

Figura 18. Porcentajes de expresión del gen h-MAM respecto a Bcl-2/Bax



A continuación, se reflejan todos los resultados anteriormente expuestos de forma resumida en la tabla 7.

Tabla 7. Tabla resumen. Relación entre la expresión del gen h-MAM y factores pronósticos estudiados

Parámetro biológico	r	p
• GN	-0.29	0.09
• RE	0.40	<0.05
• p53	-0.22	<0.05
• Ki67	-0.38	<0.05
• N	-0.33	<0.05
• Ciclo celular diploide	0.49	<0.05
• GH	n.s.	
• RP	n.s.	
• c-erbB2	n.s.	
• VEGF	n.s.	
• Bcl-2/Bax	n.s.	

4. DISCUSIÓN

Nuestro estudio ha consistido en el análisis de la expresión del gen *h-MAM* en muestras tumorales, por estar su expresión alterada con relación a tejidos normales de mama. Para ello hemos utilizado la técnica RT-PCR, y hemos cuantificado sus niveles de expresión conociendo las concentraciones de RNA de las muestras tumorales. Además, hemos estudiado parámetros de primera, segunda y tercera generación, por técnica inmunohistoquímica y citometría de flujo, los cuales hemos relacionado con la expresión de la *h-MAM*. El gen *h-MAM* se expresa tanto en estadios tempranos de carcinoma (CDIS), como en estadios invasivos (CDI, carcinomas lobulillares infiltrantes y metástasis) y su sobreexpresión podría reflejar alteraciones celulares específicas del epitelio de mama.

Numerosos investigadores han utilizado técnicas modificadas de PCR y Northern blot para el estudio de genes que intervienen en el desarrollo del cáncer de mama, como es *h-MAM*, y son útiles como marcadores pronósticos para el control de las pacientes. Varios grupos han estudiado la expresión del gen *h-MAM* en sangre periférica, por lo que hemos incluido estos estudios en nuestro trabajo. Sin embargo, son escasos los trabajos previos en la bibliografía que estudian la expresión del gen *h-MAM* en tejido tumoral sólido de mama (Watson et al. 1996; Watson et al. 1998; Fleming et al. 2000), si bien sí se ha estudiado la correlación entre la expresión de *h-MAM* y otros marcadores biológicos y moleculares de cada tumor, tal y como hemos hecho nosotros.

4.1 EXPRESIÓN DEL GEN *h-MAM* EN SANGRE PERIFÉRICA

Aproximadamente el 30% de las pacientes que desarrollan cáncer de mama y son intervenidas y sometidas a radiación, hormonoterapia y quimioterapia, finalmente desarrollan metástasis. Por esta razón, es muy importante la detección de células tumorales en tejidos periféricos, como son sangre y médula. Muchos investigadores han encontrado una correlación significativa entre la existencia de células tumorales en sangre periférica en pacientes con carcinoma de mama e ILE y SG (Pantel et al. 1999; Wong et al. 2000; Zach et al. 1999). La detección de células circulantes tumorales podría ser un indicativo temprano de la progresión de la enfermedad. El screening inmunocitoquímico con anticuerpos monoclonales contra marcadores epiteliales, podría ser un método de detección de células tumorales aisladas en sangre y médula ósea (Pantel, 1993). Sin embargo, resulta difícil seleccionar marcadores epiteliales para la detección de micrometástasis en carcinoma de mama, mediante técnica RT-PCR, debido a la baja especificidad de la técnica, ante la existencia de pseudogenes, como ocurre con la citokeratina 19. Además la detección de RNAm de genes específicos de tumor (CEA) o genes específicos de epitelio (citokeratina 19) como marcadores en sangre periférica en pacientes con carcinoma de mama, tienen un valor diagnóstico limitado debido a que aparecen también en células de individuos sanos (Zach et al. 1999).

El paso a sangre periférica de cualquier marcador tumoral está en función directa del volumen tumoral, a partir de la mayor o menor expresión individual del marcador. La presencia de RNAm en sangre periférica referida por los diversos investigadores probablemente refleje una mayor masa tumoral primaria y no una diferencia cualitativa en la expresión del gen, que es lo que hemos estudiado nosotros. Este dato debemos tenerlo en cuenta a la hora de relacionar los resultados obtenidos por estos investigadores en sangre periférica, con nuestros resultados en tejido tumoral de mama.

Como decíamos anteriormente, las células epiteliales de cáncer de mama expresan marcadores epiteliales, como son la citokeratina 19, muc-1, EGF-R, c-erbB2 (estudiadas por Grünewald et al. (2000) por técnica RT-PCT) y *h-MAM* (Grünewald et al. 2000; Fleming et al. 2000; Zach et al. 1999; Watson et al. 1996). Para calcular el límite de detección analítico de *h-MAM* por técnica RT-PCR, Zach et al. (1999), diluyeron células de cultivo de carcinoma de mama SKBR5 en sangre periférica de voluntarios sanos. El límite detectado fue de 1 célula SKBR5 de cada 10^6 - 10^7 células sanguíneas. Los niveles de expresión de *h-MAM* en esta línea celular son menores que en otras, como es el caso de la línea celular MDA-MB415. Como ya hemos dicho, algunos tumores de mama sobreexpresan RNAm de *h-MAM* (Watson et al. 1996) y la expresión de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama, depende no sólo del número de células tumorales sino también de la expresión de RNAm de *h-MAM* por célula. Por tanto, el límite de detección de RNAm de *h-MAM* es interindividual. Todavía queda por saber si todas las células de cáncer de mama expresan *h-MAM*.

Para evaluar el impacto pronóstico de la presencia de la h-MAM en sangre periférica, Zach et al. (1999) estudiaron la expresión de transcritos de RNAm de *h-MAM* en células tumorales de sangre periférica de distintos subgrupos de pacientes con enfermedad de mama, y detectaron expresión en el 28% de las pacientes operadas de carcinoma de mama que no presentaban metástasis, en el 6% de las pacientes con enfermedad en estadios I-III y en el 49% de las pacientes con metástasis. No encontraron expresión de la proteína en pacientes sin carcinoma de mama, lo que implicaría una elevada especificidad de la h-MAM como marcador de células derivadas de glándula mamaria. En esta misma línea, Fleming et al. (2000) también observaron, por técnica RT-PCR presencia de h-MAM en sangre periférica de 9/15 casos (60%) en pacientes con cáncer de mama, y ausencia de la proteína en todas las pacientes sanas. Los 6 casos en los que no se detectó h-MAM, pudieron ser debidos a la ausencia de células tumorales que expresasen *h-MAM*, o bien a la falta de sensibilidad del ensayo.

Zach et al. (1999) también estudiaron la posibilidad de detectar RNAm de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con patologías distintas al carcinoma de mama. Sin embargo, sólo detectaron RNAm de dicha proteína en 2 de las 41 pacientes estudiadas. Las dos muestras de pacientes en las que sí detectaron *h-MAM* por técnica RT-PCR correspondían a pacientes que presentaban linfomas. Una posible translocación en el cromosoma 11q13 en las células tumorales podría ser la causa de la sobreexpresión de *h-MAM* y la consiguiente detección inesperada de RNAm de *h-MAM* en sangre periférica de las dos pacientes con linfoma.

Grünewald et al. (2000) estudiaron la expresión de *h-MAM* en sangre periférica de un grupo control formado por 51 pacientes (31 de los cuales eran pacientes sanas y 20 con enfermedad hematopoyética) y un grupo formado por 145 pacientes con carcinoma de mama (12 de las cuales presentaban CDIS y 133 CDI). Además, incluyeron en el estudio 40 tejidos sanos de mama. No detectaron expresión de *h-MAM* en pacientes sanas, pacientes con enfermedad hematopoyética, ni en pacientes con CDIS, pero sí en 11 (8%) de las pacientes con CDI. *h-MAM* se expresó en los 40 tejidos sanos de mama estudiados. Estos mismos autores estudiaron también en sangre periférica expresión de citokeratina 19 y EGF-R (marcadores epiteliales de células de carcinoma de mama) en un grupo control positivo formado por 10 tejidos de cáncer de mama, donde se expresaron ambos marcadores, un grupo control negativo formado por pacientes sanas donde la CK19 se expresó en el 39% de los casos y EGF-R no se expresó. También incluyeron en el estudio 20 pacientes con enfermedades hematopoyéticas, encontrando expresión de CK19 en el 10% de los casos y de EGF-R en el 25% de los casos, así como pacientes con CDIS y CDI. En las 12 pacientes con CDIS no encontraron expresión de EGF-R pero sí de CK19 (en el 25% de los casos). En las pacientes con CDI (133) encontraron expresión de EGF-R (en el 10% de los casos) y de CK19 (en el 48% de los casos). Estos autores no encontraron relación entre la expresión de *h-MAM*, CK19 y EGF-R en sangre periférica.

En contraposición al estudio realizado en sangre periférica por Grünewald et al. (2000), pero de acuerdo con el estudio realizado por Watson et al. (1999),

también en sangre periférica, en nuestro estudio sí hemos encontrado expresión de *h-MAM* en tejidos tumorales con CDIS. Tal como hemos enunciado anteriormente, el paso a sangre periférica de cualquier marcador tumoral está en función directa del volumen tumoral, a partir de la expresión del marcador tumoral. En nuestro trabajo hemos estudiado la expresión cualitativa del gen *h-MAM* en tejidos tumorales entre los que se han incluido tejidos con CDIS.

Queda por demostrar si la detección de expresión de *h-MAM* en células tumorales de sangre periférica es un factor pronóstico, especialmente en pacientes con estadios iniciales de la enfermedad.

Otros factores que podrían ser importantes para definir la utilidad clínica de *h-MAM* para una detección temprana, pronóstico y monitorización de cáncer de mama en suero, serían embarazo, ciclo menstrual y estado menopáusico de la paciente (Fleming et al. 2000).

Para determinar la importancia pronóstica de *h-MAM* “in vivo” y su desregulación en tumores de mama primarios, Watson et al. (1996) estudiaron la expresión de dicha proteína en 35 tumores primarios de mama de diferentes tipos histológicos (carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mucinoso, CDIS y CDI) por técnica Northern blot, así como en tejido normal de mama. Detectaron sobreexpresión de *h-MAM* en 8 de los 35 tumores (23%), así como en tejido normal de mama, aunque la expresión en estos últimos fue menor que en tejido tumoral. Estos autores concluyen que la sobreexpresión de *h-MAM* no está restringida a una especie de tumor y que existe una elevada frecuencia de expresión de dicha proteína entre tumores primarios de mama y su progresión de expresión en estadios avanzados del tumor. Está por estudiar la expresión de *h-MAM* en enfermedades benignas; una menor expresión de *h-MAM* en enfermedades benignas con relación a carcinoma de mama, podría definir una relación entre progresión de la patología de la mama y expresión de la proteína. Watson et al. (1996) estudiaron la posibilidad de que *h-MAM* se expresase en otros tejidos, como útero y pulmón (lugar de expresión de la uteroglobina, homóloga a la *h-MAM*), ovario o placenta,

pero no detectaron expresión de la proteína en ninguno de los tejidos. Realizaron otro estudio sobre las mismas muestras, para ver la expresión de *h-MAM*, pero esta vez utilizando técnica RT-PCR, y también encontraron expresión de la proteína en todas las muestras tumorales de tejido adulto. Además, con esta técnica detectaron expresión de *h-MAM* en tejido normal. Al igual que cuando utilizaron la técnica Northern blot, no detectaron expresión en pulmón, útero o próstata, sitios de expresión de rPSC₃ y uteroglobina. Tampoco encontraron expresión en tejidos con respuesta hormonal (ovario, testículos y placenta) ni en órganos epiteliales (colon y vejiga).

En esta misma línea, Watson et al. (1998) realizaron el análisis de *h-MAM* utilizando técnicas de Northern blot y RT-PCR en 15 tejidos de mama normal, 35 carcinomas de mama primarios y 21 tumores de mama con metástasis, y encontraron expresión en glándula mamaria en todos los tejidos de mama normales (controles), en el 23% de carcinomas de mama primarios y en el 62% de los tumores de mama con metástasis, lo que sugiere que el nivel de expresión de *h-MAM* es relevante en la biología del cáncer de mama.

Fleming et al. (2000), estudiaron la expresión de *h-MAM* en tejidos no tumorales adultos y fetales utilizando dot-blot de poli-A de RNAm de tejidos no malignos que híbrida con cDNA de *h-MAM*. Observaron, al igual que Watson et al. (1996), que *h-MAM* se expresaba en tejido de mama y no se expresaba en glándula apocrina (glándulas salivares), tejidos con respuesta hormonal (útero y próstata), leucocitos de sangre periférica, ganglios linfáticos, o médula espinal.

Fleming et al. (2000), también estudiaron por inmunohistoquímica la expresión de *h-MAM* en carcinomas de mama, y encontraron expresión en el 80% de los carcinomas ductales. La expresión de *h-MAM* tuvo lugar tanto en carcinomas bien diferenciados (78%), moderadamente diferenciados (67%), como pobremente diferenciados (63%). Estos hallazgos concuerdan con nuestros resultados, obtenidos por RT-PCR, ya que hemos observado que altos valores de expresión del gen *h-MAM*, se correlacionan con todos aquellos factores que definen un alto grado

de diferenciación del tumor. Además, encontraron expresión de la proteína en los tres CDIS que estudiaron. El patrón de expresión inmunohistoquímico de *h-MAM* fue difuso y citoplásmico. Por otra parte observaron expresión de *h-MAM* en algunas células epiteliales intraductales e intralobulillares. Al igual que se ha visto con otras proteínas secretoras, este aumento de expresión de *h-MAM* tiene lugar en tejidos metaplásicos apocrinos. En este sentido, en tejido benigno de mama con epitelio apocrino metaplásico, observaron inmunorreactividad para la *h-MAM* tanto en epitelio, como en líquido quístico apocrino.

Todos los autores concluyen que debido a la frecuencia con que se expresa *h-MAM* en tumores poco diferenciados así como en tumores diferenciados, y la relativa baja expresión en tejido normal de la mama así como la ausencia de expresión en otros tejidos distintos a la mama, hacen de *h-MAM* un atractivo candidato como marcador tumoral. El hecho de que no encontraran expresión de *h-MAM* en todas las muestras tumorales de mama estudiadas, podría ser debido a insuficiente cantidad de RNA en las muestras, mala calidad del mismo, o bien a la falta de sensibilidad del ensayo, que supone ausencia de expresión de la proteína.

4.2. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *h-MAM* CON OTROS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Con relación a la **invasión ganglionar**, hemos encontrado una correlación inversa estadísticamente significativa ($r=-0.23$ y $p=0.04$) con la expresión del gen *h-MAM*.

No existen estudios que relacionen invasión ganglionar con expresión de RNAm de *h-MAM* en tejido tumoral de mama. Sin embargo, Fleming et al. (2000) estudiaron expresión del RNAm de *h-MAM* en ganglios linfáticos, y Grünewald et al. (2000), estudiaron la expresión de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama primario, y lo relacionaron con invasión ganglionar. *h-MAM* se expresa en un gran número de tumores primarios de mama y la ausencia de expresión en ganglios linfáticos no invadidos estudiada por Fleming et al. (2000), sugiere que podría ser un marcador específico en la detección de células tumorales en ganglios linfáticos en carcinoma de mama con metástasis. Para verificar esta idea, estos investigadores estudiaron la expresión de RNAm de *h-MAM* por técnica de Northern blot en ganglios linfáticos en tumores de mama y tumores no mamarios con metástasis. También estudiaron la expresión de RNAm de citokeratina 19, marcador de células epiteliales, como control de expresión de RNAm de *h-MAM* en células epiteliales tumorales en ganglios linfáticos. El estudio estuvo formado por 21 muestras de ganglios linfáticos procedentes de pacientes con carcinomas de mama con metástasis. Detectaron RNAm de *h-MAM* en 9 casos (43%); en 6 casos no detectaron expresión de RNAm de *h-MAM* ni de citokeratina 19, lo que sugiere que las muestras de ganglios linfáticos no presentaban suficientes células tumorales como para ser detectadas por la técnica utilizada. Excluyendo estos 6 casos, el 60% de las muestras expresaban RNAm de *h-MAM*, y en 1 de los casos no se detectó expresión de RNAm de citokeratina 19, por lo que *h-MAM* podría ser un marcador más sensible en la detección de células tumorales. Además RNAm de la *h-MAM* sólo se detectó en 1 caso de metástasis no mamaria,

mientras que la citokeratina 19, se detectó en varios casos. En todos los casos sin invasión ganglionar, no se detectó RNAm de *h-MAM* ni de citokeratina 19.

Por otro lado, Grünewald et al. (2000), estudiaron la expresión de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama primario y encontraron relación significativa entre la expresión de *h-MAM* y factores pronósticos establecidos, como es la invasión ganglionar. Observaron expresión de RNAm de *h-MAM* en sangre periférica en el 25% de los pacientes que presentaban más de 4 ganglios invadidos en el momento de diagnóstico. Además el RNAm de *h-MAM* se expresó en dos pacientes sin invasión ganglionar. Estos autores relacionaron la expresión de RNAm de *h-MAM* en sangre periférica con invasión ganglionar. Sin embargo, la relevancia pronóstica en pacientes sin invasión ganglionar está sin determinar.

Estos resultados aparentemente contradicen los nuestros, puesto que en nuestro estudio, hemos encontrado una correlación significativa entre expresión de RNAm de *h-MAM* y ausencia de invasión ganglionar. Sin embargo, la presencia de RNAm de *h-MAM* en sangre periférica referida por Grünewald et al. (2000), como decíamos anteriormente, probablemente sólo refleje una mayor masa tumoral primaria y no una diferencia cualitativa en la expresión del gen, que es precisamente lo que hemos estudiado nosotros. Es sabido que el tamaño tumoral se correlaciona significativamente con la invasión ganglionar de la axila, y es probable que tumores de mayor tamaño produzcan mayor cantidad de *h-MAM* circulante.

Con relación a los **RE**, hemos encontrado una correlación directa estadísticamente significativa ($r=0.40$ y $p<0.05$) con la expresión de *h-MAM*.

No existen estudios que relacionen expresión de RNAm de *h-MAM* con RE en tejido tumoral, pero sí en sangre periférica como es el trabajo realizado por Zach et al. (1999) en el cual relacionaron la expresión de transcritos de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama con el estado de RE. De un 15-23%

de las pacientes con cáncer de mama tienen amplificada la región q13 del cromosoma 11, que implica a *h-MAM*, y además estos tumores coinciden en ser RE+. Esta asociación es la razón de la elevada incidencia de expresión de RNAm de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con RE+, si bien no se ha estudiado la asociación de expresión de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con tumores RE-, por lo que habría que estudiar en estos tumores las amplificaciones del cromosoma 11q13. La amplificación de esta región en el cromosoma 11, también tiene lugar en otros tumores como en el carcinoma de esófago, pulmón o hepatocelular.

Nuestros resultados están de acuerdo con el estudio realizado por Zach et al. (1999), ya que la expresión de RNAm de *h-MAM* en muestras tumorales se ha relacionado con RE+.

La mutación del gen oncosupresor **p53** también se correlacionó, de forma inversa ($r=-0.23$, $p=0.04$), con la expresión de *h-MAM*. Hasta el momento, no existe en la bibliografía ningún trabajo donde se haya relacionado la mutación del gen oncosupresor p53 con *h-MAM*. Según nuestros resultados, la expresión de *h-MAM* se ha relacionado con factores de buen pronóstico y uno de ellos es precisamente ausencia de mutación de p53.

La proliferación de las células tumorales fue medida a través de **Ki67** mediante anticuerpos monoclonales por técnica inmunohistoquímica. Hemos podido hallar una correlación significativa e inversa ($r=-0.38$ y $p<0.05$) entre proliferación elevada, medida con Ki67, y niveles de expresión del gen *h-MAM*.

Estudiamos la relación entre *h-MAM* y la **ploidía del ciclo celular**. *h-MAM* se relacionó con ciclos celulares diploides ($r=0.49$ y $p<0.05$). Tampoco en este caso hemos encontrado en la bibliografía estudios que relacionen la expresión de RNAm de *h-MAM* con la ploidía del ciclo celular.

Existen, finalmente, trabajos en la bibliografía que relacionan la expresión de *h-MAM* en sangre periférica de pacientes con carcinoma de mama con otros parámetros clínicos-patológicos, como niveles elevados en suero de **CA15.3** (Grünewald et al. 2000) y de **CEA** (Zach et al. 1999). Grünewald et al. (2000), también relacionaron la expresión de *h-MAM* en sangre periférica de estas pacientes con **metástasis** a distancia, ya que el 25% de las pacientes con metástasis expresaban *h-MAM* frente al 5% de las pacientes con carcinoma de mama sin metástasis que expresaban la proteína. En este sentido, Zach et al. (1999) estudiaron la incidencia de transcritos de *h-MAM* en sangre periférica de distintos subgrupos de pacientes con carcinoma de mama. *h-MAM* se expresó en el 28% de las pacientes que no presentaban metástasis, en el 6% de las pacientes con enfermedad en estadios I-III y en el 49% de las pacientes con metástasis. Relacionaron la positividad de expresión del gen *h-MAM* con metástasis a distancia.

Watson et al. (1998) no encontraron relación entre la expresión de *h-MAM* en tejido normal de mama y sobreexpresión en tejido tumoral de mama y parámetros clínico-patológicos como histología del tumor estadio del tumor y estado hormonal, por lo que la sobreexpresión de la *h-MAM*, podría estar restringida a una transformación específica de tumores primarios de mama.

En conclusión, y según nuestros estudios, niveles elevados de *h-MAM* se relacionaron con ausencia de invasión ganglionar, RE positivos, ausencia de mutación del oncogén supresor p53, una baja proliferación celular y ciclos celulares diploides, todos ellos factores de buen pronóstico en el carcinoma de mama, al reflejar, en conjunto, un alto grado de diferenciación de los tumores, así como una baja tasa de proliferación de los mismos. Por todo lo expuesto podríamos decir que niveles elevados de *h-MAM* en las muestras tumorales de mama podrían ser un factor pronóstico favorable en dicha patología.

6. CONCLUSIONES

Del trabajo desarrollado se extraen las siguientes conclusiones:

1. Hemos detectado expresión del gen *h-MAM* en todas las muestras tumorales analizadas.
2. No se han visto diferencias en la expresión del gen *h-MAM*, en los diferentes tipos histológicos de carcinoma de mama.
3. No se han visto diferencias en la expresión del gen *h-MAM* en pacientes tratadas con quimioterapia respecto a las no tratadas.
4. Existe una correlación significativa e inversa entre la expresión del gen *h-MAM* e invasión ganglionar.
5. Existe una correlación significativa y directa entre la expresión del gen *h-MAM* y receptores de estrógeno.
6. Existe una correlación significativa e inversa entre la expresión del gen *h-MAM* y p53 mutado.
7. Existe una correlación significativa e inversa entre la expresión del gen *h-MAM* y Ki67.
8. Existe una correlación significativa y directa entre la expresión del gen *h-MAM* y ciclos celulares diploides.

9. Existe una correlación casi significativa entre la expresión del gen *h-MAM* y grado nuclear bajo de los tumores.
10. No existió correlación entre la expresión del gen *h-MAM* y c-erbB2, receptores de progesterona, Bcl-2/Bax y grado histológico de los tumores.
11. Todos los datos anteriormente expuestos parecen indicar que el *h-MAM* es un marcador de diferenciación tumoral, y por tanto de valor pronóstico en cáncer de mama.

7 BIBLIOGRAFÍA

Abel U, Berger J, Wiebelt H. CRITLEVEL: an exploraty procedure for the evaluation of quantitative prognostic factors. *Methods Inf Med*, Jul; 23 (3): 154-6, 1984.

Aihara T, Fujiwara Y, Ooka M, Sakita I, Tamaki Y, Monden M. Mammaglobin B, as a novel marker for detection of breast cancer micrometastasis in axillary limph nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Breast cancer Research and Treatment* 58: 137-140, 1999.

Aihara T, Fujiwara Y, Ooka M, Sakita I, Tamaki Y, Monden M. Mammaglobin B, as a novel marker for detection of breast cancer micrometastasis in axillary limph nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Breast cancer Research and Treatment* 58: 137-140, 1999.

Alban P, Hurd C, Dinda S, Khattree N, Moudgil VK. Differential regulation of retinoblastoma protein by hormonal and antihormonal agents in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* May; 77 (2-3): 135-141, 2001.

Alexiev BA, Bassarova AV, popovska SL, Popov AA, Christov CZ. Expression of c-erbB-2 oncogene and p53 tumor suppressor gene in benign and malignant breast tissue: correlation with proliferative activity and prognostic index. *Gen Diagn Pathol* Jun; 142 (5-6): 271-279, 1997.

Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E. Allelic loss of chromosomal arm 8p in breast cancer progression. *Am J Pathol* 152 (3): 815-819, 1998.

Ando Y, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Karamatsu S, Mitsuyama S, Fujii Y, Kobayashi S. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett* 11; 156 (2): 207-214, 2000.

Baker ME. Amino acid sequence homology between rat prostatic steroid binding protein and rabbit uteroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 325-330, 1983.

Bargmann CI, Weinberg RA. Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 5394-5398, 1988.

Becker RM, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Watson MA, Fleming TP: Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobin gene family. *Genomics* 54: 70-78, 1998.

Berner HS, Nesland JM. Expression of CD44 isoforms in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *resast Cancer Res Treat Jan*; 65 (1): 23-9, 2001.

Borg A, Baldetorp B, Ferni M, et al. ErbB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid receptor positive breast cancer. *Cancer Letters* 81: 137-144, 1994.

Bose S, Wang SI, Terry MB, Hibshoon H, Parsons R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene* 9;17(1):123-127, 1998.

Brenner AJ, Paladugu A, Wang H, Olopade OI, Dreyling MD, Aldaz CM. Preferential loss of expression of p16 (INK4a) rather than p19 (ARF) in breast cancer. *Clin Cancer Res Dec*; 2 (12): 1993-8, 1996.

Caldes T, Perez-Segura P, Tosar A, de la Hoya M, Diaz-Rubio E. Microsatellite Carcinog Mutagen 20 (5): 283-291, 2001.

Campiglio M, Tagliabue E, Srinivas U, et al. Colocalization of the p185 HER2 oncoprotein and integrin alpha 6 beta 4 in Calu-3 lung carcinoma cells. J Cell Biochem, 55: 409-418, 1994.

Catalano MG, Comba A, Fazzari A, Benedusi-Pagliano E, Sberveglieri M, Revelli A, Massobrio M, Frairia R, Fortunati N. Sex steroid binding protein receptor (SBP-R) is related to a reduced proliferation rate in human breast cancer.

Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Taffurelli M, Gamberini M, Pileri SA, Marrano D. Retinoblastoma (RB1) gene product expression in breast carcinoma. Correlation with Ki-67 growth fraction and biopathological profile. J Clin Pathol Nov; 51 (11): 818-24, 1998.

Chan FKM, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16. Mol Cell Biol, 15:2682-2688, 1995.

Charlie R, Pagano M, Inghirami G. The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. Breast Cancer Res; 3 (2): 91-94, 2001.

Clark GM. Oncology of breast cancer in older women. J Gerontol 1992 Nov; 47: 19-23.

Couch FJ, Deshano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. N Engl J Med 1997; 336: 1409-1415.

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230: 1132-1139, 1985.

Cullen R, Maguire TM, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Duffy MJ. Studies on estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in breast cancer. *Eur J Cancer Jun*; 37 (9): 1118-1122, 2001.

Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silivstrini R. Clinical Studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer Mar*; 6 (1): 61-68, 1999.

De Potter CR, Quatacker J. The p185 HER2 protein is localized on cell organelles involved in cell motility. *Clin Exp Metastasis*, 11: 453-461, 1993.

Deming SI, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer Dec*; 83 (12): 1688-95.

Dhingra K. Selective estrogen receptor modulation: the search for an ideal hormonal therapy for breast cancer. *Cancer Invest*, 19 (6): 649-659, 2001.

Dieterich B, Albe X, Vissilakos P, Wieser S, Friedrich R, Krauer F. The prognostic value of DNA ploidy and S-phase estimate in primary breast cancer: a prospective study. *Int J Cancer* 1995 Sep 27; 63(1): 49-54.

Done SJ, Arneson CR, Ozelik H, Redston M, Andrulis IL. p53 protein accumulation in non-invasive lesions surrounding p53 mutation positive invasive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* Jan; 65 (2): 111-118, 2001.

Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M, Andrulis IL. p53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* May 2; 93 (9): 700-704, 2001.

Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J* May 13 (8): 773-780, 1999.

Donnellan R, Kleinschmidt I, Chetty R. Cyclin E immunoeexpression in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implications. *Hum Pathol* Jan; 32 (1): 89-94, 2001.

Emig R, Magener A, Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, Sinn HP. Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation. *Br J Cancer* Dec; 78 (12): 1661-8, 1998.

Fackenthal JD, Marsh DJ, Richardson AL, Cummings SA, Eng C, Robinson BG, Olopade OI. Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations. *J Med Genet* Mar; 38 (3): 159-164.

Fantl V, Smith R, Brookes S, Dickson C, Peters G. Chromosome 11q13 abnormalities in human breast cancer. *Cancer Surveys*, 18: 77-94, 1993.

Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasema J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* Sep; 12 (7): 320-327, 2001.

Fujii H, Marsh C, Cairns P, Sidransky D, Gabrielson E. Genetic divergence in the clonal evolution of the breast cancer. *Cancer Res* 1;56(7): 1493-1497, 1996.

Fujii H, Szu,el R, Marsh C, Zhou W, Gabrielson E. Genetic progression, histological grade, and allelic loss in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Res* 15; 56 (22): 5260-5265, 1996.

Gairard B, Mathelin C, Schaffer P, Brettes JP. Breast cancer: epidemiology, risk factors, screening. *Rev Prat* Jan 1; 48 (1): 21-7, 1998.

Gairard B, Mathelin C, Schaffer P, Brettes JP. Breast cancer: epidemiology, risk factors, screening. *Rev Prat* Jan 1; 48 (1): 21-7, 1998.

Gion M, Dittadi R, Mione R, Pagan V, Busetto A. Preliminary evaluation of CYFRA 21.1 in lung cancer cytosol. *Int J Biol Markers* 9: 258-259, 1994.

Gorgoulis VG, Koutroumbi EN, Kotsinas A, Zacharatos P; Markopoulus C, Giannikos L, Kyriakou V, Voulgaris Z, Gogas I, Kittas C. Alteration of p16-pRb pathway and chromosome locus 9p21-22 in sporadic invasive breast carcinomas. *Mol Med* 1998 Dec; 4 (12): 807-822.

Greenberg NM, Wolfe J, Rosen JM. Casein gene expression: from transfection to transgenics. *Cancer Treatment Res*, 61: 379-397, 1992.

Grünewald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Müller-Holzner, Gunsilius E, Dünser M, Marth C, Gastl G. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cyokeratin-19. *Laboratory investigation*, 80, 7: 1071-77, 2000.

Grünewald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Müller-Holzner, Gunsilius E, Dünser M, Marth C, Gastl G. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cyokeratin-19. *Laboratory investigation*, 80, 7: 1071-77, 2000.

Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth supression by p18, a p16 and p14 related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*, 8: 2939-2952, 1994.

Guo S, Liao S, Ding H. In situ hybrid detection of p16 mRNA in primary breast carcinoma: its clinicopathologic significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi Jun*; 78 (6): 464-6, 1998.

Hamann U. Hereditary breast cancer: high risk genes, genetic testing and clinical implications. *Clin Lab*; 46 (9-10): 447-461, 2000.

Heffelfinger SC, Yassin R, Miller MA, Lower EE. Cyclin D, retinoblastoma, p53, and Her2/neu protein expression in preinvasive breast pathologies: correlation with vascularity. *Pathobiology* May; 68 (3): 129-136, 2000.

Helzlsouer BE , Couzi R . Hormones and breast cancer. *Cancer* 36: 2059-63, 1995.

Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol* 7 (6): 489-94, 1995.

Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol* 7 (6): 489-94, 1995.

Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel Ink 4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, 15: 2672-2681, 1995.

Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: Hormones and other risk factors. *Maturitas* Feb 28; 38 (1): 103-113, 2001.

Hurst HC, Parker MG. Rat Prostatic steroid binding protein: DNA sequence and transcript maps of the two C3 genes. *EMBO J*, 2: 769-774, 1983.

Ioakim-Liossi A, Karakitsos P, Markopoulos C, Aroni K, Athanassiadou P, Delivelioti K, Athanassiades P, Vaiopoulos G. p53 protein expression and oestrogen and progesterone receptor status in invasive ductal breast carcinomas. *Cytopathology Jun*; 12 (3): 197-202, 2001.

Iochim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, c-erbB-2, EGFR and proliferation indices.....

Iwase H, Ando Y, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura Ta, Karamatsu S, Ito Y, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Fujii Y, Mitsuyama S, Kobayashi S. Immunohistochemical analysis on biological markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer* 8 (2): 98-104, 2001.

Janocko LE, Brown KA, Smith CA, Gu LP, Pollice AA, Singh SG, Julian T, Wolmark N, Sweeney L, Silverman JF, Shackney SE. Distinctive patterns of Her-2/neu, c-myc, and cyclina D1 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in primary human breast cancers. *Cytometry Jun* 15; 46 (3): 136-49, 2001.

Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ, Kang HS. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest Apr*; 81 (4): 573-579, 2001.

Khaliq T, Afghan S, Nagi A, Haider MH, Islam A. p53 mutations in carcinoma breast a clinicopathological study. *J Pak Med Assoc Jun*; 51 (6): 210-213, 2001.

Kim HK, Park IA, Heo DS, Noh DY, Choe KJ, Bang YJ, Kim NK. Cyclin E overexpression as an independent risk factor of visceral relapse in breast cancer. *Eur J Surg Oncol Aug*; 27 (5): 464-471, 2001.

Knoop AS, Bentzan AM, Nielsen NM, Rasmussen BB, Rose C. Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol* Jul 15; 19 (14): 3376, 3384, 2001.

Korkolis D, Ardavanis A, Yotis J, Kyroudi A, Gorgoulis V, Kittas C. HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathological parameters, p53 oncoprotein and cathepsin-D. *Anticancer Res* May; 21(-C): 2207-2212, 2001.

Koukoulis GN. Hormone replacement therapy and breast cancer risk. *Ann Y Acad Sci*, 900: 422-8, 2000.

Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, Frenkel V, Robertson S, Ionov Y, Yamamoto H, Perucho M, Takayama S, Reed JC. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* Mar; 6 (1): 29-40, 1999.

Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Kallioniemi OP, Isola J. Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 150(4):1465-1471, 1997.

Lakhani SR, Collins N, Stratton MR, Sloane JP. Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss of heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. *J Clin Pathol* 48(7): 611-615, 1995.

Lambe M, Hsieh CC, Tsaih SW, Ekblom A, Adami HO, Trichopoulos D. Maternal risk of breast cancer following multiple births: a nationwide study in Sweden. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 533-538.

Lau R, Grimson R, Sansome C, Tornos C, Moll UM. Low levels of cell cycle inhibitor p27kip1 combined with high levels of ki-67 predict shortened disease-free survival in T1 and T2 invasive breast carcinomas.

Lea O A, Petrusz P, and French FS. Prostatein. A major secretory protein of the rat ventral prostate. *J. Biol.Chem*, 254: 6196-6202, 1979.

Lea OA, Petrusz P, French FS. Prostatein. A major secretory protein of the rat ventral prostate *J Biol Chem*,254: 6196-6202.

Leal C, Henrique R, Monteiro P, Lopes C, Bento MJ, De Sousa CP, Lopes P, Olson S, Silva MD, Page DL. Apocrine ductal carcinoma in situ of the breast: histologic classification and expression of biologic markers. *Hum Pathol* May; 32 (5): 487-493, 2001.

Lee EY, Cibull ML, Strodel WE, Haley JV. Expression of HER-2/neu oncoprotein and epidermal growth factor receptor and prognosis in gastric carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 118: 235-239, 1994.

Leivonen M, Nordling S, Lundin J, von Boguslawski K, Hanglung C. p27 expression correlates with short-term, but not with long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* May; 67 (1): 15-22, 2001.

Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. Cancer mortality in Europe, 1990-1994, and an overview of trends from 1955 to 1994. *European Journal of Cancer*, 35; 10: 1477-1516, 1999.

Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Troup S, Hiller-Hitchcock, Murphy L, Watson P. Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis. *Journal of pathology*, 189: 28-33, 1999.

Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Troup S, Hiller-Hitchcock, Murphy L, Watson P. Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis. *Journal of pathology*, 189: 28-33, 1999.

Li M, Hu J, Heermeier K, Hennighausen L & Furth PA. Expression of a viral oncoprotein during mammary gland development alters cell fate and function: Induction of p53-independent apoptosis is followed by impaired milk protein production in surviving cells. *Cell Growth Differ* 7: 3-11, 1996.

Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinases inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product, pRB. *Cancer Res*, 54: 6078-6082, 1994.

Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer Sep*; 7 (3): 143-64, 2000.

Loden M, Nielsen NH, Ross G, Emdin SO, Landberg G. Cyclin E dependent Kinase activity in human breast cancer in relation to cyclin E, p27 and p21 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene Apr* 22; 18 (16): 2557-2566, 1999.

Lupu R, Cardillo M, Harris L, Hijazi M, Rosenberg K. Interaction between erbB receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance. *Sem Cancer Biol* 6, 135-145, 1995.

Mark A, Watson and Timothy P. Fleming. Mammoglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Research February* (15); 56: 860-865.

Maroulakou IG, Anver M, Garrett L, and Green JE. Prostate and mammary adenocarcinoma in transgenic mice carrying a rat C3 (1) simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11236-11240, 1994.

Marsh A, Spurdle AB, Turner BC, Fereday S, Thorne H, pupo GM, Mann GJ, Hopper JL, Sambrook KF, Chenevix-Trench G. The intronic G13964C variant in p53 is not a high-risk mutation in familial breast cancer in Australia. *Breast Cancer Res* 3 (5): 346-349, 2001.

Masood S, MD, FCAP, MIAC. Molecular distinction between atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ. *The Breast Journal*, 4 (5), 336-343, 1998.

McKnight RA, Burdon T, Pursel VG, Shamay A, Wall RJ, Hennighausen L. *Cancer Treatment Res*, 61: 399-412.

McLaughlin R, O'Hanlon D, McHale T, Connolly CE, Given HF. Prognostic implications of p53 and bcl-2 expression in 108 women with stage two breast cancer. *Ir J Sci Jan*; 170 (1): 11-13, 2001.

Meden H, Marx D, Hammadi H, et al. Immunohistochemical detected oncoprotein p185/NEU in ovarian cancer: a new prognostic factor? In Klapdor R (ed): *Tumor associated antigens, oncogenes, receptors, cytokines in tumor diagnosis and therapy at the beginning of the nineties*. Zuckschwerdt, München Bern Berlin, 431-432, 1992.

Miele L, Cordella-Miele E, and Mukherjee AB. Uteroglobin: structure, molecular biology, and new perspectives on its function as a phospholipase A₂ inhibitor. *Endocr. Rev.*, 8: 474-490, 1987.

Miele L, Cordella-Miele E, Mantile E, Peri A, and Mukherjee AB. Uteroglobin and uteroglobin like proteins: the uteroglobin family of proteins. *J. Endocrinol. Invest.*, 17: 679-692, 1994.

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Loning T. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res Treat* May; 67 (1). 61-70, 2001.

Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, Egawa C, Noguchi S. European Journal of Cancer 36: 2375-2379, 2000.

Mommers EC, Leonhart AM, Falix F, Michalides R, Meijer CJ, Baak JP, Diest PJ. Similarity in expression of cell cycle proteins between in situ and invasive ductal breast lesions of same differentiation grade. J Pathol Jul; 194 (3): 327-333, 2001.

Morris SF, O'Hanlon DM, McLaughlin R, McHale T, Connolly GE, Given HF. The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in stage two breast carcinoma: an immunohistochemical study. Eur J Surg Oncol Sep; 27 (6): 527-31, 2001.

Nielsen NH, Arnerlov C, Cajander S, Landberg G. Cyclin E expression and proliferation in breast cancer. Anal Cell Pathol; 17 (3): 177-188, 1998.

Nielsen NH, Arnerlov C, Emdin SO, Landberg G. Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. Br J Cancer Sep; 74 (6): 874-880, 1996.

Nielsen NH, Emdin SO, Cajander J, Landberg G. Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein. Oncogene Jan 23; 14 (3): 295-304, 1997.

Nielsen NH, Ross G, Emdin SO, Landberg G. Methylation of the p16 (Ink4a) tumor suppressor gene 5'-CpG island in breast cancer. Cancer Lett Feb 10; 163 (1): 59-69, 2001.

Nohara T, Ryo T, Iwamoto S, Gon G, Tanigawa N. Expression of cell-cycle regulator p27 is correlated to the prognosis and ER expression in breast carcinoma patients.

Otto Zach, Hedwig Kasparu, Otto Krieger, Wolfgang Hehenwarter, Michael Girschikofsky, and Dieter Lutz. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *Journal of Clinical Oncology*, Jun ;17 (7): 2015-2019, 1999.

Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91:1113-1124, 1999.

Park K, Han S, Kim HY, Ko I. Cytologic evaluation of cyclin D1 expression in primary breast carcinoma. *Cancer* Jun 25; 93 (3): 211-215, 2001.

Parker M, Needham M, White R. Prostatic steroid binding protein: gene duplication and steroid binding. *Nature*, 298: 92-94, 1982.

Parker MG, White R, Hurst H, Needham M, and Tilly R. Prostatic steroid-binding protein. Isolation and characterization of C3 genes. *J. Biol. Chem.*, 258: 12-15, 1983.

Peri A, Cordella-Miele E, Miele L, and Mukherjee AB. Tissue-specific expression of the gene coding for human Clara cell 10 K-D protein, a phospholipase A₂-inhibitory protein. *J. Clin. Invest.*, 92: 2099-2109, 1993.

Pezeshki AM, Farjadian S, Talei A, Vasei M, Gharesi-Fard B, Doroudchi M, Ghaderi A. p53 gene alteration and protein expression in Iranian women with infiltrative ductal breast carcinoma. *Cancer Lett* Aug 10; 169 (1): 69-75, 2001.

Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM. Expression of cell-cycle regulators p27kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* Feb; 3 (2): 222-225, 1997.

Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* Apr; 65 (1-6): 169-174, 1998.

Radford DM, Fair KL, Phillips NJ, Ritter JH, Steinbrueck T, Holt MS, Donis-Keller H. Allelotyping of ductal carcinoma in situ of the breast: deletion of loci on 8p, 13q, 16q, 17p and 17q. *Cancer Res* 55 (15) 3399-3405, 1995.

Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol* Feb; 73 (2): 145-150, 2001.

Ringberg A, Anagnostaki L, Anderson H, Idvall I, Ferno M. Cell biological factors in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast-relationship to ipsilateral local recurrence and histopathological characteristics. *Eur J Cancer* Aug; 37 (12): 1514-1522, 2001.

Rochaix P, Krajewski S, Reed JC, Bonnet F, Voigt JJ, Brousset P. In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression on breast carcinomas in relation to apoptosis. *J Pathol* Mar; 187 (4): 410-415, 1999.

Sanchez Lockhart M, Hajos SE, Basilio FM, Mongini C, Alvarez E. Splice variant expression of CD44 in patients with breast and ovarian cancer. *Oncol Rep* Jan-Feb; 8 (1): 145-51, 2001.

Sandmoller A, Halter R, Gomez-La-Hoz E, Grone HJ, Sske G, Paul D, and Beato M. The uteroglobin promoter targets expression of the SV40 T antigen to a variety of secretory epithelial cells in transgenic mice. *Oncogene*, 9: 2805-2815, 1994.

Sandmoller A, Halter R, Gomez-La-Hoz E, Grone HJ, Suske G, Paul D, Beato M. *Oncogene*, 9: 2805-2815.

Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Taniyama Y, Nagura H, Matsunaga G, Takehana K, Kimura M, Silverberg SG. Immunolocalization of cyclins D and E and cyclin dependent kinasa (cdK) 2 and 4 in human breast carcinoma. *Anticancer Res Sep*; 17 (5A): 3685-3690, 1997.

Sasco AJ. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease?. *APMIS Suppl*, (103): S80-91, 2001.

Scheele F, Burger CW, Kenemans P. Postmenopausal hormone replacement in the woman with a reproductive risk factor for breast cancer. *Maturitas Dec* 15; 33 (3): 191-6, 1999.

Schneider J, Pollan M, Jimenez E, Marenbach K, Martinez N, Volm M, Marx D, Meden H. nm23-H1 expression defines a high-risk subpopulation of patients with early-stage epithelial ovarian carcinoma. *Br. J Cancer May*; 82 (10):1662-70.

Schneider J, Pollan M, Ruibal A, Jimenez E, Lucas AR, Nunez MI, Sanchez J, Tejerina A. Histologic grade and CD44 are independent predictors of axillary lymph node invasion in early (t1) breast cancer. *Tumour Biol Nov-Dec*; 20 (6): 319-30, 1999.

Schneider PM, Hung H-C, Chiocca SM, et al. Differential expression of the c-erbB2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 49: 4968-71, 1989.

Schoenfeld A, Luqmani Y, Sinnott HD, Shousha S, Coombes RC. Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastasis in lymph nodes in breast cancer patients. *Br J Cancer*; 76 (8): 1112-1113.

Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* Apr; 4 (2): 153-164, 1999.

Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* Dec; 14 (6): 659-69, 1993.

Scott KA, Walker RA. Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br J cancer* 76 (10): 1288-1292, 1997.

Serrano M, Gómez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi, D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16. *Science*, 267: 249-252, 1993.

Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Nguyen M. p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* Aug; 7 (8): 2222-2227, 2001.

Sheen-Chen SM, Chen WJ, Eng HL, Sheen CC, Chou FF, Cheng YF. Evaluation of prognostic value of serum soluble CD44 in patients with breast cancer. *Cancer Invest* 17 (8): 581-5, 1999.

Shen KL, Yang LS, Hsieh HF, Chen CJ, Yu JC, Tsai NM, Harn HJ. Microsatellite alterations on human chromosome 11 in situ and invasive breast cancer: a microdissection microsatellite analysis and correlation with p53, ER (estrogen receptor), and PR (progesterone receptor) protein immunoreactivity. *J Surg Oncol* Jun; 74 (2): 100-107, 2000.

Shilkaitis A, Graves J, Mehta RR, Hu L, You M, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Christov K. Bcl-2 and Bax are differentially expressed in hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis. *Cell Grow Differ* Aug; 11 (8): 437-445, 2000.

Siziopikou KP, Prioleau JE, Harris JR, Schnitt SJ. bcl-2 expression in the spectrum of preinvasive breast lesions. *Cancer* Feb 1; 77 (3): 199-506, 1996.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SC, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER 2/neu oncogene. *Science*, 235: 177-182, 1987.

Slamon DJ, Godolphin WJ, Holt LA, et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244: 707-712, 1989.

Spruck CH, Won KA, Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* Sep 16; 401 (6750): 297-300, 1999.

Stampfer MR, and Bartley JC. Metabolism of benzoapyrene by human mammary epithelial cells: toxicity and DNA adduct formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 2394-2398, 1983.

Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1-3): 17-28, 1998.

Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997; 336: 1409-1415.

Sutherland RL, Prall OW, Watts CK, Musgrove EA. Estrogen and progesterin regulation of cell cycle progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* Jan; 3 (1): 63-72, 1998.

Tait L, Soule HD, and Russo J. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line. MCF-10. *Cancer Res.*, 50: 6087-6094. 1990.

Takashima T, Onoda N, Ishikawa T, Ogawa Y, Kato Y, Fujimoto Y, Sowa M. Proliferating cell nuclear antigen labeling index and p53 expression predict outcome for breast cancer patients with four or more lymph node metastases. *Int J Mol Med* Aug; 8 (2): 159-163, 2001.

Tonin PN. Genes implicated in hereditary breast cancer syndromes. *Semin Surg Oncol* Jun; 18 (4): 281-286, 2000.

Toonen RFG, Gowan S, Bingle CD. The lung enriched transcription factor TTF-1 and the ubiquitously expressed proteins Sp1 and Sp3 interact with elements located in the minimal promoter of the rat Clara cell secretory protein gene. *Biochem. J.*, 316: 467-473 (1996).

Umekita Y, Takasaki T, Yoshida H. Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, non-invasive and invasive mammary carcinoma: an immunohistochemical study. *Virchows Arch* 424 (5): 491-494, 1994.

Umekita Y, Yoshida H. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma in situ, atypical ductal hyperplasia and usual ductal hyperplasia: an immunohistochemical study. *Pathol Int* Jul; 50 (7): 527-530, 2000.

Van Zee KJ, Calvano JE, Bisogna M. Hypomethylation and increased gene expression of p16INK4a in primary and metastatic breast carcinoma as compared to normal breast tissue. *Oncogene* 1998 May 28; 16 (21): 2723-7.

Vanlemmens L, Hebbard M, Peyrat JP, Bonneterre J. Age as a prognostic factor in a breast cancer. *Anticancer Res* 1998 May-Jun; 18 (3B): 1891-96.

Vashist A, Studd JWW. Molecular mechanisms of oestrogen-the gynaecologists's viewpoint. *Eur J Cancer*, (36)(Suppl 4.) S14-S15, 2000.

Vergote I, Bonneterre J, Thurlimann B, Robertson J, Krzakowski M, Mauriac L, Koralewski L, Webster A, Steinberg M, von Euler M. Randomised study of anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women. *Eur J cancer* Sep; 36 Suppl 4: S84-5, 2000 .

Verheul HA, Coelingh-Bennink HJ, Kenemans P, Atsma WJ, Burger CW, Eden JA, Hammar M, Marsden J, Purdie DW. Effects of estrogens and hormone replacement therapy on breast cancer risk and on efficacy of breast cancer therapies. *Menopause* Jul 31; 36 (1): 1-17, 2000.

Volpi A, De paola F, Nanni O, Granato AM, Bajorko P, Becciolini A, Scarpi E, Riccobon A, Balzi M, Amadori D. Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study. *Breast Cancer Res Treat* Oct; 63(3): 181-92, 2000.

Wang JC, Radford DM, Holt MS, Helms C, Goate A, Brandt W, Parik M, Phillips NJ, Deschryver K, Schuh ME, Fair KL, Ritter JH, Marshall P, Donis-Keller H. Sequence-ready contig for the 1.4-cM ductal carcinoma in situ loss of heterozygosity region on chromosome 8p22-p23. *Genomics* 15;60(1):1-11, 1999.

Watson M, Darrow C, Zimonjic D, Popescu N, Fleming T. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to Chromosome 11q13. *Oncogene* 16: 817-824, 1998.

Watson MA, and Fleming, TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res*, 54: 4598-4602, 1994.

Watson MA, Dintzis S, Darrow C, Voss L, Dipersio J, Jensen R, Fleming T. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Research* ,59: 3028-3031, 1999.

Watson MA, Dintzis S, Darrow C, Voss L, Dipersio J, Jensen R, Fleming T. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Research* ,59: 3028-3031, 1999.

Watson MA, Dorrow C, Zimonjic D, Popescu N, Fleming T. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene* 16: 817-27, 1998.

Watson MA, Dorrow C, Zimonjic D, Popescu N, Fleming T. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene* 16: 817-27, 1998.

Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56: 860-65, 1996.

Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56: 860-65, 1996.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 31: 323-330, 1995.

Wong IVY, Yeo W, Chan A, Johnson P. Quantitative correlation of cytokeratin 19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications. *International Journal of Oncology* 18: 633-638, 2001.

Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast.

Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD. DNA methylation in the promoter region of the p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) gene in human breast tumours. *Br J Cancer* Jan; 79 (2): 251-6, 1999.

Yang Q, Sakurai T, Jing X, Utsunomiya H, Shan L, Nakamura Y, Nakamura M, Oura S, Suzuma T, Yoshimura G, Umemura T, Kokawa Y, Kakudo K. Expression of Bcl-2, but not bax, correlates with estrogen receptor status and tumor proliferation in invasive breast carcinoma. *Pathol Int Sep*; 49 (9): 775-80, 1999.

Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin Mrna. Journal of Clinical Oncology, Vol 17, 7: 2015-19, 1999.

Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin Mrna. Journal of Clinical Oncology, Vol 17, 7: 2015-19, 1999.

Zhang X. Progresses in radiology in China. Chung Hua I Hsueh Tsa Chih.; 76: 938-9. 1996.