

***Efecto de la Doxorubicina sobre MKP-1
en el Cáncer de Mama Humano y
Asociación entre la Expresión de MKP-1 y
la Evolución de las Pacientes***

Federico Rojo

Universitat Autònoma de Barcelona

Efecto de la Doxorubicina sobre MKP-1
en el Cáncer de Mama Humano y
Asociación entre la Expresión de MKP-1 y
la Evolución de las Pacientes

Directores: SERGI SERRANO y JOAN ALBANELL

Trabajo de investigación realizado por Federico Rojo
para optar al título de Doctor en Medicina

Departamento de Ciencias Morfológicas

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)

Índice

Índice de capítulos

ÍNDICE	7
ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. <i>Importancia del cáncer de mama en nuestro medio</i>	19
1.2. <i>Alteraciones moleculares en el cáncer de mama: identificación de marcadores pronósticos y predictivos, y de dianas terapéuticas</i>	20
1.2.1. <i>Alteraciones de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa: la familia de receptores HER y cáncer de mama</i>	25
1.2.2. <i>Alteración de las vías de transducción de señal en el cáncer de mama</i>	29
1.2.3. <i>La vía de transducción de señal PI3-K/AKT y cáncer de mama</i>	30
1.2.4. <i>Las vías de transducción de señal de las protein-quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases, MAPK)</i>	34
1.2.4.1. <i>Vía de transducción de ERK1/2</i>	36
1.2.4.2. <i>Vías de transducción activadas en situaciones de estrés celular: JNK y p38</i>	39
1.2.5. <i>Regulación de la actividad de las vías de transducción de señal de las MAPK: fosfatasas específicas duales (dual-specificity MAPK phosphatases, MKP)</i>	42
1.2.6. <i>El papel de las MKP en el cáncer</i>	49
1.2.6.1. <i>Importancia de MKP-1 en el cáncer</i>	50
1.2.6.2. <i>Otras MKP nucleares y cáncer</i>	53
1.2.6.3. <i>Las MKP citoplasmáticas reguladoras de ERK y cáncer</i>	53
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
3. MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1. <i>Reactivos, anticuerpos y células</i>	65

3.2. Análisis cuantitativo de expresión génica mediante ensayos de reacción de la cadena de la polimerasa (Real-time quantitative reverse transcription-PCR)	67
3.3. Análisis de expresión de proteínas mediante ensayo de Western blot	70
3.4. Ensayo in vitro de viabilidad celular	72
3.5. Datos clínicos, selección de material tisular para el estudio clínico-patológico y construcción de matrices de tejidos	73
3.5.1. Selección de casos	73
3.5.2. Variables clínicas e histopatológicas	73
3.5.2.1. Variables clínicas	73
3.5.2.2. Variables histopatológicas	74
3.5.3. Realización de las matrices tisulares o tissue microarrays	75
3.6. Exposición ex vivo de tumores humanos a la doxorubicina	78
3.7. Ensayos de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica e inmunocitoquímica	79
3.7.1. Técnica de inmunohistoquímica	79
3.7.2. Evaluación de los marcadores de inmunohistoquímica	82
3.7.3. Técnica de inmunocitoquímica	83
3.8. Técnica de hibridación in situ de fluorescencia para HER2	83
3.9. Técnica de estudio de apoptosis mediante TUNEL	84
3.10. Análisis estadístico	85
4. RESULTADOS	89
4.1. La doxorubicina modifica la expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las MAPK en líneas celulares de cáncer de mama	91
4.2. Validación de un ensayo de inmunohistoquímica para MKP-1 utilizando muestras de tejido fijadas en formol y embebidas en parafina	104
4.2.1. Ensayos de inmunocitoquímica sobre las células BT-474	104
4.2.3. Ensayos de inmunocitoquímica sobre fibroblastos embrionarios	108
4.2.4. Determinación de las condiciones analíticas del ensayo para MKP-1 sobre muestras fijadas en formol	111
4.3. Estudio del patrón de expresión de MKP-1 en tejido mamario normal y en lesiones patológicas de la mama	128
4.4. La doxorubicina reduce la expresión de MKP-1 en una proporción elevada de tumores humanos de mama	131

4.4.1. Ensayo ex vivo en cáncer de mama para estudio de marcadores	131
4.4.2. Estudio de los efectos moleculares de la doxorubicina sobre MKP-1 y las MAPK en tumores de mama cultivados ex vivo	135
4.4.3. Estudio de los efectos en proliferación celular y apoptosis de la doxorubicina en tumores de mama cultivados ex vivo	140
4.5. La expresión de MKP-1, de las formas fosforiladas de las MAPK y las variables clínico-patológicas en los tumores de mama	143
4.6. Sobre-expresión de MKP-1 y recidiva en cáncer de mama	149
5. DISCUSIÓN	155
6. CONCLUSIONES	169
7. BIBLIOGRAFÍA	175

Abreviaturas

	Inglés	Castellano
AKT	Lymphoma AK Transforming Kinase	Kinasa Transformante de Linfomas AK
Asp	Aspartic	Aspártico
ATM	Ataxia-teleangiectasia	Ataxia-teleangiectasia
BRCA1	Breast Cancer 1	Gen de Cáncer de Mama Familiar 1
BRCA2	Breast Cancer 2	Gen de Cáncer de Mama Familiar 2
BT-474	Breast Cell Line 474	Línea de Cáncer de Mama 474
CAP	College of American Pathology	Colegio Americano de Patólogos
CCND1	Cyclin D1	Ciclina D1
CDK	Cyclin-dependent Kinase	Quinasa Dependiente de Ciclinas
cDNA	Complementary DNA	DNA complementario
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Ácido Desoxiribonucleico
DOX	Doxorubicin	Doxorrubicina
DUSP	Dual-specificity Phosphatases	Fosfatasas con Especificidad Dual
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Epidermal Growth Factor	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ER	Estrogen Receptor	Receptor de Estrógenos
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinases	Quinasa Regulada por Señales Extracelulares
FGF	Fibroblast Growth Factor	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FISH	Fluorescent in situ Hybridization	Hibridación in situ de Fluorescencia
HER2	Human EGF Receptor 2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Tipo 2
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor	Receptor del Factor de Crecimiento Similar a Insulina 1
IRS	Insulin Receptor	Receptor de Insulina
JNK	c-Jun Amino-terminal Kinase	Quinasa con Extremo Amino-terminal c-Jun
kb	Kilobase	Kilobase
kD	Kilodalton	Kilodalton
Ki67	Kiel Proliferating Protein Antibody, clone 67	Anticuerpo Clon 67 Contra la Proteína Proliferante Kiel

LOH	Loss of Heterozygosity	Pérdida de heterozigosidad
MAPK	Mitogen Activated Protein-Kinase	Quinasa Activadas por Mitógenos
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7 Breast Cancer Cell Line, Estrogen-dependent	Línea Celular de Cáncer de Mama, dependiente de estrógenos, del Michigan Cancer Foundation 7
MDA-MB-231	MD Anderson Cancer Center Breast Cancer Cell Line 231, Estrogen-Progesterone-HER2 negative	Línea Celular de Cáncer de Mama, negativa para estrógenos, progesterona y HER2, de MD Anderson 231
MDA-MB-453	MD Anderson Cancer Center Breast Cancer Cell Line 453, Estrogen-Progesterone-HER2 negative	Línea Celular de Cáncer de Mama, negativa para estrógenos, progesterona y HER2, de MD Anderson 453
MDA-MB-468	MD Anderson Cancer Center Breast Cancer Cell Line 468, Estrogen-Progesterone-HER2 negative	Línea Celular de Cáncer de Mama, negativa para estrógenos, progesterona y HER2, de MD Anderson 468
MEKK/MK KK	MAPK Kinase Kinase	MAPK quinasa-quinasa
MKP-1	Mitogen Activated Protein-Kinase Phosphatase 1	Fosfatasa 1 de las Quinasas Activadas por Mitógenos
MKP-2	Mitogen Activated Protein-Kinase Phosphatase 2	Fosfatasa 2 de las Quinasas Activadas por Mitógenos
MKP-3	Mitogen Activated Protein-Kinase Phosphatase 3	Fosfatasa 3 de las Quinasas Activadas por Mitógenos
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	Ácido Ribonucleico Mesanjero
MTS	Methosulfate Tetrazoly Solution	Solución de Meosulfato de Tetrazolio
NP-40	Nonidet P-40	Nonidet P-40
OMS		Organización Mundial de la Salud
p21cip1	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A	Inhibidor Quinasa Dependiente de Ciclina 1A
p27kip1	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B	Inhibidor Quinasa Dependiente de Ciclina 1B
p38MAPK	p38 Mitogen Activated Protein-Kinase	p38 Quinasa Activada por Mitógenos
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacción de la Cadena de la Polimerasa
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PR	Progesterone Receptor	Receptor de Progesterona
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog	Homólogo de Tensina con Actividad Fosfatasa
pTNM	Pathological TNM	TNM Patológico
Rb	Retinoblastoma	Retinoblastoma

RNA	Ribonucleic Acid	Ácido Ribonucleico
RPLP0	Large Ribosomal Protein 0	Proteína Ribosomal Grande 0
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida y Sulfato Dodecil- Sódico
SK-Br-3	Sloan Kattering Breast Cell Line 3, HER2 positive	Línea de Cáncer de Mama del Sloan Kattering 3, HER2 positiva
TGF-α	Transforming Growth Factor alpha	Factor de Crecimiento Transformante alfa
Thr	Threonine	Treonina
TMA	Tissue Microarray	Micromatriz de Tejidos
TNM	Tumor-Node-Metastases	Tumor-Ganglio-Metastasis
TUNEL	TdT-UTP-End Labelling	Marcaje con TdT en Secuencia Final UTP
Tyr	Tyrosine	Tirosina

1. Introducción

1.1. Importancia del cáncer de mama en nuestro medio

El cáncer de mama constituye la neoplasia maligna más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres de los países desarrollados. La tasa de incidencia anual varía en cada país estudiado, siendo la más elevada en Estados Unidos y en el Norte de Europa. En España, la tasa estandarizada se conoce a partir del informe La Situación del Cáncer en España, 1.975-2.006 ¹, publicado por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, y se estima en 93.6 casos por cada 100.000 mujeres durante el año 2.006. Esta incidencia ha aumentado en los últimos años y se espera que en el año 2012 se diagnostiquen unos 27.182 nuevos casos de cáncer de mama en España y mueran por esta enfermedad 6.231 mujeres .



Figura 1.1. Distribución provincial de la mortalidad por cáncer en España, 1989–1998 ²

España presenta una de las tasas de mortalidad más bajas de Europa por esta enfermedad; sin embargo, y de forma similar a otros países de nuestro medio, hasta el año 1992 se había observado una tendencia de aumento de la mortalidad, momento en el que se inicia un descenso progresivo de la misma y un mantenimiento de esta mejora observada en la supervivencia (Figura 1.1).

1.2. Alteraciones moleculares en el cáncer de mama: identificación de marcadores pronósticos y predictivos, y de dianas terapéuticas

En los últimos 25 años, los tremendos avances en el estudio de las alteraciones moleculares presentes o causantes de los procesos neoplásicos, incluyendo el cáncer de mama, están abriendo las perspectivas del abordaje terapéutico de las pacientes con esta enfermedad. Estos conocimientos están siendo utilizados con dos objetivos: la identificación de marcadores pronósticos y predictivos, y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. En primer lugar, se está desarrollando un tremendo esfuerzo en la identificación de marcadores pronósticos de la enfermedad, es decir, aquellos marcadores capaces de averiguar qué pacientes tendrán una evolución clínica desfavorable porque la historia biológica de sus tumores es más agresiva. De forma complementaria, se están identificando también marcadores predictivos de respuesta, mucho más interesantes desde el punto de vista del tratamiento, y que son aquellos marcadores que permiten seleccionar a grupos de pacientes con un mayor potencial de respuesta o de beneficio a una determinada terapia. De esta forma, aumenta la eficacia del tratamiento por una correcta definición de la población diana y, más importante, se evita tratar a aquellas pacientes con escasas posibilidades de respuesta, soslayando así los efectos indeseados en éstas y reduciendo el coste de tratamiento de la enfermedad por utilización de terapias no efectivas.

En segundo lugar, el estudio de los mecanismos moleculares alterados en el cáncer permite la oportunidad de identificar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos selectivos que mejoren sus opciones terapéuticas. Una alteración concreta que sea biológicamente relevante en determinado tipo de tumores puede permitir el diseño de inhibidores, que administrados como monoterapia o, más generalmente, en combinación con los tratamientos sistémicos, mejore la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama. El paradigma de este tipo de tratamientos es el trastuzumab (Herceptin), un anticuerpo quimérico murino humanizado dirigido contra el dominio extracelular

del receptor HER-2, aprobado para su uso en pacientes con sobreexpresión de esta proteína o amplificación del gen que la codifica. Su incorporación a los esquemas de tratamiento ha supuesto la mayor mejora en la expectativa de vida de las pacientes con esta patología, nunca vista con anterioridad.

En la década de 1990, mediante los estudios de hibridación genómica comparada se han identificado multitud de loci potencialmente implicados en el cáncer de mama de los que, en muchas ocasiones, no se conoce con exactitud la función del gen en el que se encuentran estas mutaciones. De una forma breve, ya que no es el objetivo de este trabajo, pueden enumerarse entre éstos, la delección de 3p (FHIT, 34-45% de los casos), delecciones de 10q (PTEN) y de 13q (BRCA2 y Rb, 35-75% de los casos), amplificaciones de 8q (c-myc, 15% de casos) y de 11q (CCND1), delecciones 16q (CDH1, 57-85% de pacientes), de 17p (p53), y 17q (BRCA1) y sus amplificaciones (HER-2/neu)³. Algunas de estas alteraciones son causa del cáncer de mama hereditario o familiar.

También se ha establecido una correlación entre la presencia de determinadas alteraciones génicas y el grado histológico del cáncer. Siguiendo este criterio, podemos encontrar lesiones no neoplásicas y que, sin embargo, tienen pérdida de heterocigosidad (LOH) en algunos loci (3p22, 11p15, 17p13). En las hiperplasias epiteliales existen LOH de 16q, 17p y 17q, que también se encuentran en el caso de las hiperplasias atípicas (LOH de 11q13, 16q, 17p, y 17q). Por otra parte, los carcinomas in situ se asocian con alteraciones de p53, del gen Rb y HER-2/neu, y pérdidas de heterocigosidad (LOH en 11q13 y en 16q). El desarrollo del carcinoma invasivo se asocia con múltiples alteraciones, tales como las del gen c-myc, las ciclinas D1 y E, la de p27^{kip1}, además de la alteración de la actividad telomerasa⁴.

Las amplificaciones del gen regulador de la ciclina D1 (CCND1) se han descrito en aproximadamente el 15-20% de los casos de cáncer de mama. También se ha observado sobreexpresión de la ciclina D1 en el 40% de los casos de cáncer de mama y hasta en un 70% en los carcinomas ductales in situ, que coincide, con frecuencia, con la sobreexpresión de la proteína HER-2⁵. La sobreexpresión de la ciclina D1 se ha correlacionado con la presencia de

receptores de estrógenos, lo que se asocia a buen pronóstico y buena respuesta a tratamiento con terapias anti-hormonales.

La expresión de la proteína p27^{kip1} está regulada negativamente en presencia de estímulos mitógenos. La proteína p27^{kip1} es miembro de la familia de las CIP/KIP, cuya función es la regulación de las ciclinas dependiente de quinasas (CDK). Sus niveles permanecen elevados en células que no se dividen y su sobreexpresión se traduce en la parada del ciclo celular en la fase G1. Sin embargo, se ha constatado que hasta en el 56% de los casos de cáncer de mama la expresión de p27^{kip1} está disminuida, por lo que el normal funcionamiento del ciclo celular está alterado en estos tumores ⁶.

Otra proteína, imprescindible en la normal regulación del ciclo celular y en el control de la estabilidad e integridad del DNA, es la fosfoproteína p53. Ésta molécula se expresa y activa en respuesta a daños en el DNA ante diversas situaciones, con el fin en condiciones fisiológicas de prevenir la acumulación de células con daños en su material genético. Se ha demostrado que p53 media en la respuesta de las células cancerígenas a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia. En células de cáncer de mama las mutaciones del gen que codifica para p53 ocurren con una frecuencia del 30 al 40% de los tumores ⁷. En general, se trata de mutaciones que dan lugar a una proteína defectiva que se acumula en el núcleo de las células y es incapaz de realizar correctamente su función. El 80% de estas mutaciones tienen lugar entre los exones 5 y 8, con mayor frecuencia en los codones 175, 248 y 273. Las mutaciones de p53 en cáncer de mama se asocian con tumores de alto grado histológico, con resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia, y que dan lugar a recaídas tempranas y al desarrollo de metástasis ganglionares. Se estima así que, en pacientes en los que no existe afectación ganglionar, la supervivencia esperada es de un 56% en ausencia de mutación de p53, mientras que ésta se reduce a un 28% si existe esta mutación. Cuando existe afectación ganglionar la supervivencia se estima en un 33% con la mutación de p53 y de 71% en su ausencia ⁸.

En los últimos años, la introducción de tecnologías de estudio de patrones o perfiles de expresión génica ha ampliado en gran medida nuestro conocimiento de las alteraciones moleculares asociadas al desarrollo y progresión del cáncer

de mama. Estos perfiles génicos en el cáncer de mama han permitido, en primer lugar, establecer una clasificación molecular de los tumores, en base a los patrones de expresión, y en segundo lugar, diseñar una serie de pruebas multigénicas con objetivos pronósticos y predictivos de respuesta a determinadas terapias.

Así, en el año 2000 se describió una nueva clasificación taxonómica del cáncer de mama, basada en estos perfiles de expresión génica y que define, al menos, 5 subtipos de tumores en base a su similitud con los distintos componentes del tejido mamario: un subtipo luminal A, un subtipo luminal B, un HER2, un basal-like y por último, un subtipo normal-like^{9, 10}. La importancia de estos subtipos es que cada uno de ellos parece presentar un comportamiento clínico distinto¹¹. De forma general, el subtipo luminal A expresa genes relacionados con los receptores de estrógenos y tiene buen comportamiento; el luminal B tiene un perfil semejante, aunque expresa genes relacionados con HER2 y tiene un comportamiento más agresivo que el anterior; el basal-like se caracteriza por expresar genes similares a las células basales y mioepiteliales de la mama, es característicamente triple negativo (receptores hormonales y HER2 negativos) y presenta un comportamiento más agresivo y con mayor tendencia a desarrollar metástasis; el HER2 sobre-expresa genes relacionados con este receptor y tiene un comportamiento también agresivo. Finalmente, el subtipo normal-like presenta un perfil semejante al de las células estromales de la mama, aunque no está bien caracterizado aún. Se ha descrito también que en el subtipo basal-like, la presencia de células madre tumorales es importante, menor en HER2 y casi inexistente en los luminales. El coste y la complejidad de los estudios de expresión genética para determinar el subtipo fenotípico limitan su uso, pero mediante técnicas de inmunohistoquímica basadas en paneles de anticuerpos se puede aproximar esta clasificación¹². Los tumores luminal A se caracterizan por expresión de citoqueratinas (CK) luminales (8 y 18), de RE y baja proliferación tumoral; los luminal B, por expresión débil de RE y alta proliferación, con CK luminales y co-expresando de forma frecuente HER2; los basal-like, expresan CK de tipo basal (5 y 14) y marcadores basales (caveolina-1, p63, vimentina, α -B-cristalina y, frecuentemente, EGFR); y los HER2, sobre-expresan/amplifican HER2.

Por otra parte, las pruebas multigénicas destinadas a discriminar subgrupos de pacientes con un comportamiento clínico peor o que sean candidatas a determinada terapia, se basan tanto en el uso de distintas técnicas moleculares, como la inmunohistoquímica o la hibridación in situ con fluorescencia (FISH), y de otras metodologías relativamente menos conocidas, como PCR reversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), los microarrays de expresión y otros tipos de análisis genómicos complejos. Algunas de estas nuevas plataformas se han comparado en estudios multivariantes con los métodos diagnósticos y pronósticos convencionales en cáncer de mama, demostrando una capacidad superior en la identificación de las pacientes o grupos de pacientes con una historia de la enfermedad más agresiva o candidatas a determinada terapia. Sin embargo, revisiones exhaustivas de estos resultados parecen poner de manifiesto una falta de rigor en el diseño de los estudios, de sesgos en la selección de la población reclutada o de interpretación de resultados interesada, cuestionando el valor real de estos ensayos ¹³.

Plataformas basadas en la inmunohistoquímica son el BD/TRIPATH (TRIPATH Oncology) ProEx, un ensayo inmunohistoquímico con fines pronósticos, basado en la combinación de cinco anticuerpos, que se analiza mediante un sistema de análisis de imagen; o la prueba Mammostrat (Applied Genomics Inc.), que consiste también en un panel de cinco marcadores estudiados por inmunohistoquímico y es capaz de clasificar en bajo, intermedio y alto riesgo de recidiva a pacientes con tumores de mama con expresión de estrógenos y ganglios negativos, tratadas con tamoxifeno en monoterapia ^{14, 15}. La prueba eXagenBC (eXagen Diagnostics, Inc.) se basa en un estudio de FISH de tres genes en tumores de mama con receptores de estrógenos positivos: identificando poblaciones de riesgo bajo o alto de recidiva ¹⁶.

El prototipo de ensayo basado en qRT-PCR es el OncotypeDX, un ensayo multiplexing de 21 genes, que aporta información pronóstica y predictiva de respuesta al tratamiento sistémico ^{17, 18}. Esta prueba, que puede ser realizada sobre muestras archivadas parafinadas de cáncer de mama primario, estudia 16 genes relacionados con proliferación celular, invasividad y actividad de los

receptores de estrógenos y de HER2. Identifica pacientes con alto riesgo que serían candidatas a quimioterapia adyuvante, reduciendo el riesgo de recaída. El ensayo MammaPrint, diseñado por Agendia, es el primer test multigénico totalmente comercializado sobre un microarray para el cáncer de mama. Esta prueba está ideada como un ensayo pronóstico puro para las mujeres de menos de 61 años, con o sin expresión de receptores de estrógenos, y ganglios linfáticos negativos^{19, 20}. El perfil o firma genética de Rotterdam, basado también en un microarray de expresión sobre 76 genes, parece predecir la recurrencia en pacientes con receptores de estrógenos tratadas con tamoxifeno²¹.

Estas pruebas descritas, y otras en proceso de validación, se basan en la definición de un perfil de proteínas, de DNA o de mRNA que identifican grupos de pacientes con un pronóstico determinado o candidatas a una terapia concreta, están ya siendo utilizadas como biomarcadores en cáncer de mama, aunque la validez científica, la verdadera utilidad clínica, y, en última instancia, el balance costo/beneficio de estas pruebas todavía debe de establecerse cuidadosamente. Además, en ninguno de estos marcadores se establece una demostración mecanística de su papel en las células tumorales^{13, 22}.

La necesidad, por tanto, de diseñar pruebas pronósticas y predictivas de respuesta, que permitan individualizar al máximo la terapia para cada paciente, es una realidad en el tratamiento del cáncer de mama y el conocimiento de las alteraciones moleculares que ocurren en el mismo pueden ayudar a su identificación.

1.2.1. Alteraciones de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa: la familia de receptores HER y cáncer de mama

Los receptores de superficie celular o de membrana relacionados directamente con enzimas intracelulares más importantes en cáncer de mama son los receptores proteicos con actividad tirosina quinasa, que fosforilan sus proteínas sustrato en residuos de tirosina y actúan como un mecanismo de señalización

clave en la respuesta a la estimulación de los factores de crecimiento. Esta familia incluye los receptores para la mayor parte de los factores de crecimiento polipeptídicos, como es el caso de la familia HER²³. Esta familia de receptores está formada por cuatro miembros, HER-1 (EGFR), HER-2, HER-3 y HER-4, todos ellos estrechamente relacionados entre sí y capaces de unirse a una amplia variedad de ligandos o péptidos circulantes²⁴. Estos miembros son codificados por cuatro genes homólogos, cuyos productos han sido identificados en multitud de tejidos, donde interaccionan con los factores de crecimiento y cumplen diversas funciones. Todos los receptores de la familia HER poseen un dominio extracelular de unión a ligando, rico en residuos de cisteína, una fracción transmembrana de carácter lipofílico, y un dominio intracelular o citoplasmático con actividad tirosina quinasa. A diferencia de los restantes componentes de la familia HER, HER-3 carece de algunos residuos pertenecientes al dominio catalítico, sugiriendo que posee una débil actividad quinasa.

Todos los receptores de la familia HER se encuentran en forma de monómeros en la membrana plasmática en todas las células de la economía. Su activación requiere la presencia de los ligandos, como antes se ha comentado, y de otros receptores pertenecientes a la misma familia. Tras la unión del ligando al dominio extracelular del correspondiente receptor, se produce una dimerización o asociación de dos de los receptores de esta familia. Los cuatro miembros de la familia de HER pueden asociarse entre sí para formar hasta diez diferentes combinaciones de dímeros, bien homodímeros (dos receptores idénticos) o heterodímeros (dos receptores distintos), siendo la estructura dimérica mucho más estable que la forma monomérica (Figura 1.2). Todos los ligandos de esta familia poseen un dominio de 50 a 55 aminoácidos semejante a la del factor de crecimiento epidérmico (EGF), en la que existen seis residuos de cisteína altamente conservados entre las distintas isoformas^{24, 25}. HER-1 es capaz de unirse a varios ligandos diferentes: el propio EGF, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), la anfiregulina, el factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), la β -celulina y la epiregulina. Tanto HER-3 como HER-4 se unen a multitud de neuregulinas, también denominadas factores de diferenciación de neu, todos ellos péptidos de estructura similar entre sí. HER-

2, sin embargo, es conocido como el receptor huérfano por carecer de ligando conocido. La unión de los ligandos al dominio extracelular de estos receptores activa sus dominios citosólicos con actividad quinasa, resultando en la fosforilación de los propios receptores y de sus proteínas diana intracelulares.

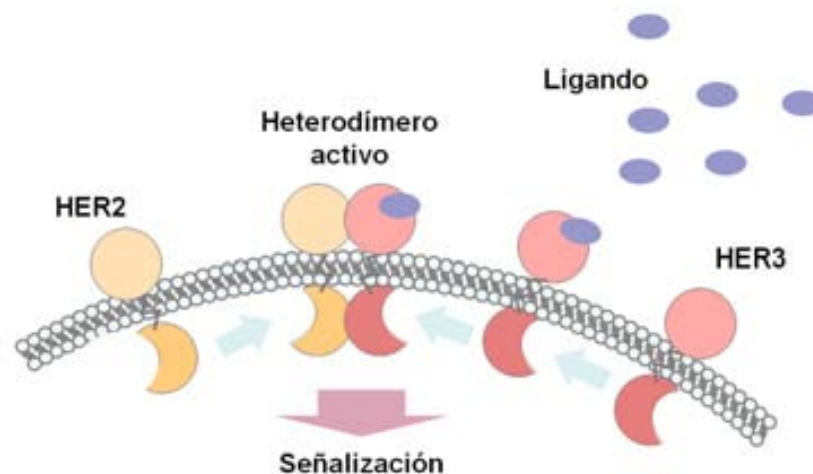


Figura 1.2. Formación de dímeros de receptores HER en la membrana celular. La unión de ligandos a los receptores HER1, HER3 o HER4 induce la formación de dímeros entre ellos o con HER2, provocando su auto-fosforilación y activación, primer paso para el inicio de los mecanismos de señalización celular.

Estudios de estructura molecular han demostrado que los ligandos poseen dos lugares de unión para los receptores HER con diferente afinidad: un punto de unión de alta afinidad, próximo al extremo N-terminal del receptor, y otro de baja afinidad, próximo al extremo C-terminal. De esta forma, se produciría la unión del ligando al lugar de elevada afinidad del receptor HER-1, HER-3, o HER-4, mientras que la unión de baja afinidad permitiría el anclaje al otro receptor componente del homo- o heterodímero, que con frecuencia es HER-2, ya que este receptor presenta una mayor potencia de unión que el resto de receptores y, en realidad, compite con ellos. Existe, por tanto, una jerarquía

que hace que HER-2 sea el co-receptor de elección para la formación de estos dímeros tanto en condiciones fisiológicas como en procesos neoplásicos^{26, 27}. En general, los homodímeros no poseen una eficiencia señalizadora tan potente como los heterodímeros; mientras que la eficiencia para la señalización de los homodímeros HER-1 es escasa y nula para los homodímeros HER-3, los heterodímeros formados por HER-2/HER-3 son los más eficientes y poseen el mayor potencial mitótico, pese a que HER-3 posee una escasa actividad quinasa y que los homodímeros HER-3 sean mitogénicamente inactivos²⁷. Este es el heterodímero dominante en las células epiteliales malignas humanas, incluyendo las neoplasias mamarias. Los heterodímeros en los que participa HER-2 poseen, además, una menor tasa de endocitosis o degradación inducida por la unión al ligando, por lo que la señal iniciada por los mismos es más prolongada en el tiempo y tiene como resultado la activación de mayor número de vías de señalización intracelular²⁸.

En general, la dimerización de los receptores de la familia HER permite la difusión de diferentes tipos de mensajes a la célula²⁹. Para que esto ocurra, debe existir un estricto mecanismo de coordinación y se ha especulado que el miembro HER-2 desempeñaría este papel. Además, la ausencia de ligando conocido para HER-2 ha reforzado esta hipótesis de papel regulador sobre los procesos de señalización mediados por receptores de esta familia.

El gen HER-2 es en realidad un proto-oncogén ubicado en la región cromosómica 17q21, que codifica una glicoproteína transmembrana de 1255 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 185 kDa, denominada p185HER-2. Son sinónimos de la misma proteína, el receptor erbB (eritroblastoma de pollo), neu (neuroblastoma de rata) y HER (genes codificantes para receptores de factores de crecimiento en el humano), siendo esta última nomenclatura la más utilizada en el campo de la oncología. Desde inicio de los años 1980 se ha descrito que en una proporción importante de carcinomas de mama (25-30% de tumores malignos), los niveles de expresión de la proteína HER-2 estaban aumentados, pudiendo ser estos niveles hasta cien veces mayores que los observados en el tejido normal. Este aumento de expresión, denominado como sobre-expresión, se debe en la mayoría de casos, hasta en el 92% de los tumores malignos de la mama, a amplificaciones del gen codificante para HER-

2, mientras que el resto se han relacionado a defectos en los mecanismos de degradación del receptor desde la superficie de la célula, a translocaciones del gen o a aumento de los niveles de RNA mensajero en el tumor. La sobre-expresión de HER-2 se ha identificado en todos los estadios de la enfermedad pero no se ha encontrado en lesiones benignas de la mama, lo que sugiere que su amplificación ocurre como un evento de la transformación maligna de la célula ³⁰.

HER-2 se ha convertido en los últimos 15 años en la principal diana terapéutica en cáncer de mama, junto a los receptores hormonales, y, dado que la expresión de HER-2 en células normales es siempre baja, se observan escasos efectos secundarios o indeseados en las pacientes como consecuencia de los tratamientos aplicados contra este receptor ³¹. Son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de HER-2 y los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa los que han demostrado una mayor eficacia sobre tumores que sobre-expresan o amplifican el gen de este receptor. Este es el caso del trastuzumab (Herceptin), y de lapatinib (Tykerb), que se están empleando en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama en los que se constata esta alteración a partir de tests sobre secciones tisulares basados en determinaciones de inmunohistoquímica, para la sobre-expresión del receptor, o en hibridación in situ para DNA, para la amplificación de su gen ^{32, 33}.

1.2.2. Alteración de las vías de transducción de señal en el cáncer de mama

La mayoría de los ligandos responsables de la señalización intercelular, incluyendo los neurotransmisores, las hormonas peptídicas y los factores de crecimiento, se unen a receptores localizados en la superficie de sus células diana, tal y como se ha descrito anteriormente para los receptores de la familia HER. En general, estos receptores en la superficie celular actúan regulando la actividad de una serie de proteínas intracelulares, que transmiten señales

desde el receptor a una batería de dianas intracelulares adicionales, que incluyen con frecuencia a diversos factores de transcripción. La unión de un ligando a un receptor de la superficie de la célula inicia así una cadena de reacciones intracelulares que alcanza finalmente al núcleo y da lugar a cambios programados de la expresión génica.

En el caso de los receptores HER, la dimerización inducida por el ligando conduce a la transfosforilación de los receptores que componen dicho dímero, puesto que las cadenas polipeptídicas dimerizadas se fosforilan de forma cruzada. Esta transfosforilación tiene diversas repercusiones en la señalización intracelular de estos receptores ²⁸. Por una parte, la fosforilación de los residuos de tirosina presentes en el dominio catalítico incrementa la actividad tirosina quinasa del receptor y, por otro lado, la fosforilación de los residuos de tirosina no pertenecientes a este dominio catalítico crea diversos puntos de acoplamiento específicos para otras moléculas que intervienen en la transducción de señal mediada por receptores activados. Estas últimas moléculas actúan como proteínas adaptadoras, poseen en su estructura dominios SH2 y, como su nombre indica, son encargadas del acoplamiento de los receptores activados a otros componentes necesarios de la vía de transducción de señal hacia el interior de la célula ³⁴. Las principales vías de transducción o señalización celular en el cáncer de mama son la vía del fosfatidil inositol-3 quinasa, PI3-K/AKT, y las vías de las protein-quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases, MAPK), ERK1/2, p38 y JNK.

1.2.3. La vía de transducción de señal PI3-K/AKT y cáncer de mama

La vía PI3-K/AKT es una de las principales responsables en condiciones fisiológicas de la regulación de los procesos de crecimiento celular, proliferación, diferenciación, supervivencia y tráfico intracelular. Se ha observado que en una gran variedad de neoplasias en el ser humano, algunos

de los componentes de ésta se encuentran alterados o disregulados. Este es el caso de neoplasias tales como el glioblastoma, el cáncer de ovario, de mama o de endometrio, el hepatocarcinoma, melanoma, carcinomas del tracto digestivo, de pulmón o de tiroides, el carcinoma renal y distintos procesos linfoproliferativos ³⁵.

La presencia de factores de crecimiento en el medio y la fosforilación de los receptores de membrana con actividad quinasa tras la unión del ligando, induce la activación del fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3-K) (Figura 1.3). El PI3-K es un heterodímero formado por una subunidad reguladora, denominada p85, y una subunidad con actividad catalítica, llamada p110 ³⁶. Con la activación de los diversos receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, quedan expuestos residuos de tirosina pertenecientes a sus dominios intracitoplásmicos. La subunidad p85 del PI3-K se une a estos residuos a través de sus dominios SH2 y ocasiona cambios conformacionales que hacen que PI3-K quede asociada a la cara interna de la membrana celular y que sea activa por fosforilación ³⁷. La subunidad catalítica p110 se encuentra entonces próxima físicamente a los lípidos de membrana, a los que a su vez es capaz de fosforilar. Los anillos de fosfatidil-inositol son así modificados, dando lugar a derivados lipídicos que actúan como segundos mensajeros. Este es el caso del fosfatidilinositol-3,4,5-fosfato (PIP3) que actúa promoviendo la activación de otras moléculas, entre las que se encuentra AKT. AKT se conoce que es crítica en la señalización responsable del control de la supervivencia celular ^{38, 39}. Se han descrito gran número de amplificaciones y mutaciones activantes de la subunidad p110 de PI3-K en gran número de tumores, asociándose a mayor agresividad y peor respuesta a los tratamientos sistémicos ⁶.

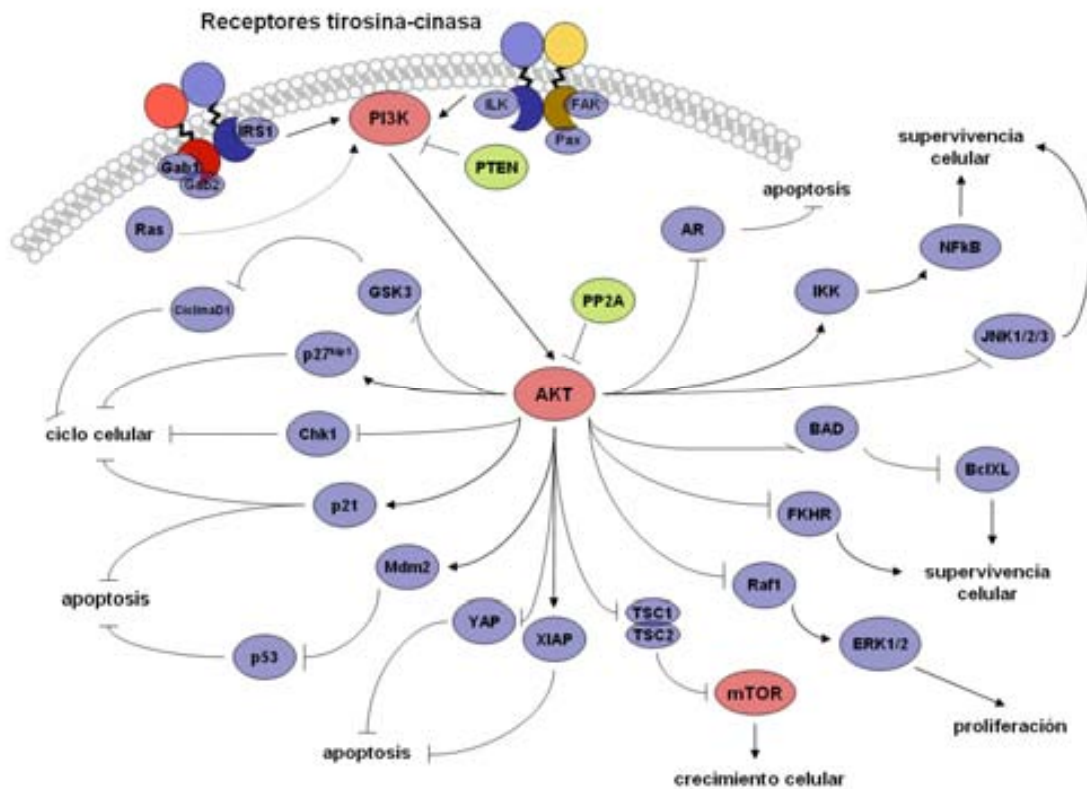


Figura 1.3. Vía de señalización celular de PI3-K/AKT. Las señales procedentes desde la membrana celular por activación de receptores tirosina-cinasa, fosforilan a PI3-K y ésta a AKT. AKT regula multitud de mecanismos celulares, relacionados fundamentalmente con la apoptosis, crecimiento celular e indirectamente con progresión en el ciclo celular. PTEN y PP2A actúan como reguladores de la actividad de la vía. Esta cascada de señalización está alterada en un número importante de tumores de mama, en relación a sobre-expresión de HER2 y HER3 y expresión de IGF1R.

Los niveles celulares de estas proteínas en ausencia de estímulos son reducidos y se encuentran estrechamente regulados mediante distintas fosfatasa, entre las que destaca el homólogo de tensina con actividad fosfatasa (phosphatase and tensin homolog, PTEN), que es responsable de mantener el equilibrio entre PIP3, que es la forma activa, y PIP2, la forma inactiva^{40, 41}. PTEN actúa como supresor tumoral, y las alteraciones de PTEN, por pérdida de función, mutación inactivante o delección, se han implicado en

gran número de procesos tumorales y su alteración somática es causa del síndrome de Cowden, asociado a la aparición de hamartomas múltiples.

AKT, una serina/treonina quinasa cuyo dominio catalítico también posee un segmento PH, es activada por una interacción lípido-proteína con PIP3. Con el término AKT se designa a una familia amplia de moléculas caracterizadas por poseer una elevada homología entre distintas especies, descrita inicialmente en ratones como una alteración genética asociada a linfomas tímicos espontáneos y clasificados como AK, incorporándose posteriormente a su denominación la T por transformantes. En el ser humano se han descrito hasta tres genes, localizados en 14q32, 19q13 y 1q44, y que codifican, respectivamente, a las tres isoformas conocidas, denominadas AKT1, AKT2, y AKT3 (o familia de proteína-quinasas específicas con serina/treonina, serine/threonine-specific protein kinase family, PKB α , PKB β y PKB γ)⁴². Se han encontrado amplificaciones de estos genes y sobreexpresión de la proteína en diversos tipos tumorales^{35, 43-45}, asociándose a mayor agresividad de los tumores, peor pronóstico y resistencia a determinados tratamientos, incluyendo algunas terapias biológicas en cáncer de mama, como trastuzumab⁴⁶.

En el desarrollo del cáncer se ven alterados, de forma imprescindible, una serie de procesos que incluyen el control de la supervivencia celular o de la apoptosis, la proliferación, el crecimiento celular, la angiogénesis y la autonomía de progresión en el ciclo celular. De forma simplificada, en el crecimiento de los procesos malignos existe una pérdida del equilibrio proliferación/apoptosis en las células tumorales, predominando el primero sobre el segundo. La regulación de la apoptosis por la vía de PI3-K/AKT se realiza a través de diversas proteínas dependientes de AKT. En primer lugar, se ha descrito que AKT activa Bad, una proteína de la familia Bcl-2, que permanece inactiva unida a Bcl-X en las células quiescentes. AKT se ha descrito que es capaz de fosforilar Bad, a la que activa, promoviendo una parada en el inicio de la apoptosis^{35, 47}. AKT también controla los niveles de actividad de la caspasa 9, responsable de las últimas fases de la apoptosis; la fosforilación de esta caspasa por AKT se traduce en su inactivación o pérdida de función, impidiendo la formación del apoptosoma y, por tanto, bloqueando el inicio de los mecanismos de apoptosis.

Otras proteínas que interaccionan con AKT pertenecen a la familia de proteínas *forkhead* (FKHR) ⁴⁸. Estas proteínas se encuentran habitualmente en el citoplasma y en presencia de estímulos proapoptóticos, migran al núcleo, donde reconocen en el DNA secuencias de respuesta a insulina (IRS). Estas secuencias de reconocimiento son muy comunes en genes implicados en apoptosis, tales como el gen para la fosfoenol piruvato quinasa, el ligando del receptor Fas, la glucosa-6-fosfatasa, Bax y otros genes cuya expresión da lugar a la liberación de citocromo C ⁴⁹. AKT fosforila las proteínas FKHR, lo que impide su capacidad de migración al núcleo, produciendo el silenciamiento de estos genes pro-apoptóticos.

AKT también interviene en la regulación del ciclo celular, ya que controla la estabilidad de la ciclina D1 e inhibe p27^{KIP1} ⁶. Sin embargo, de forma indirecta, AKT promueve la expresión de genes implicados en la progresión celular a través de NF-κB, un factor de transcripción que no se expresa en células quiescentes ⁵⁰.

1.2.4. Las vías de transducción de señal de las protein-quinzas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases, MAPK)

Las protein-quinzas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) constituyen una familia de quinzas altamente conservadas que son responsables de la transmisión de señales extracelulares hacia efectores que controlan distintos procesos celulares como la proliferación, la integridad y reordenamiento del citoesqueleto de actina, la diferenciación, la apoptosis y la adhesividad celular y capacidad de migración ⁵¹⁻⁵⁵. De forma general, las MAPK se activan mediante fosforilación de residuos tirosina y cisteína a partir de la MAPK quinasa-quinasa (MKKK o MEKK). Las tres clases de MAPK se caracterizan por una secuencia similar y son la p42 y p44 MAPK, también conocida como quinasa regulada por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2), la quinasa con extremo amino-terminal c-Jun (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) y las isoformas de p38 MAPK (α , β , δ y

γ) ⁵⁶. Las MAPK regulan procesos celulares clave en la carcinogénesis, además de que se han descrito alteradas en gran número de neoplasias. Existen numerosas evidencias de que tanto la activación de JNK como de p38 se asocian a fenómenos de apoptosis, mientras que la activación de ERK1/2 se asocia a la supervivencia celular y a la proliferación. Sin embargo, una activación prolongada de ERK podría relacionarse en algunos modelos con una inducción de la apoptosis o con la diferenciación celular, dependiendo del contexto o microambiente del tumor ⁵⁷⁻⁵⁹.

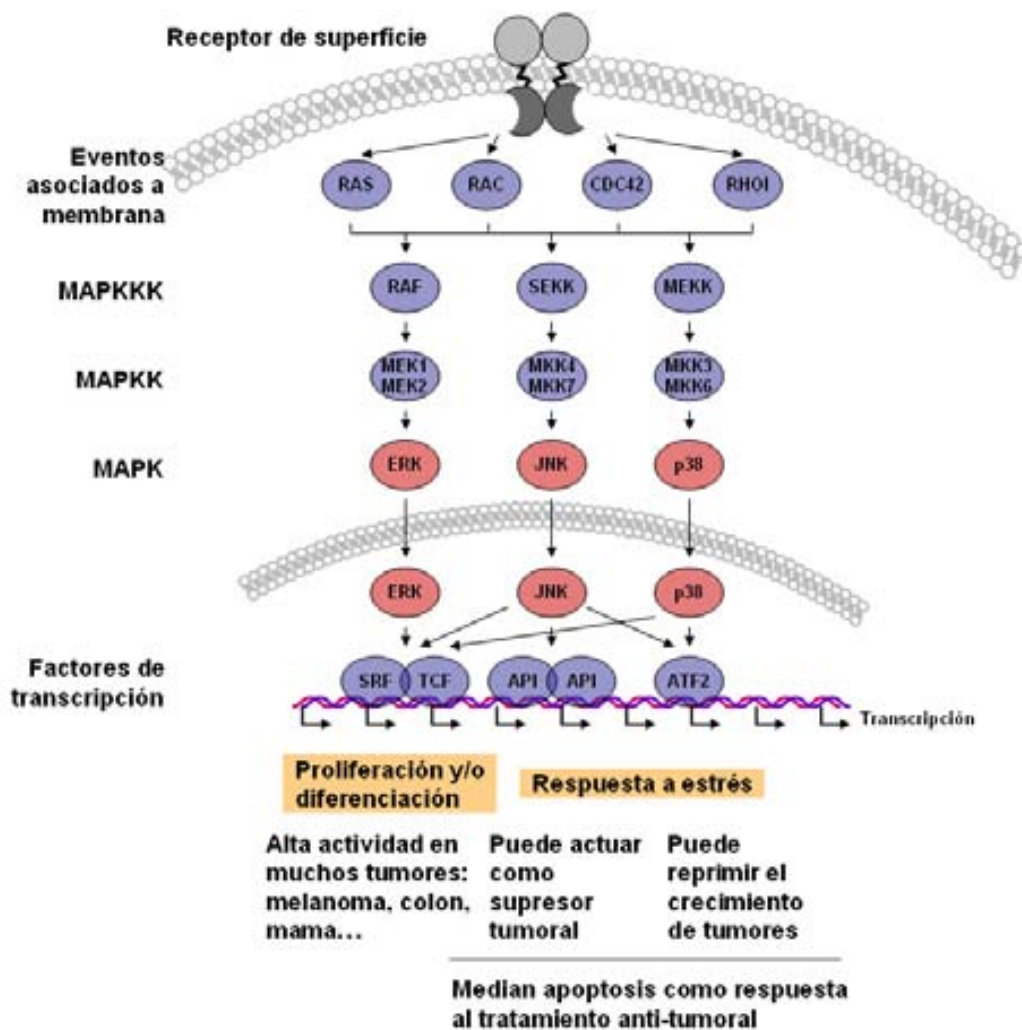


Figura 1.4. Vías de señalización celular de las MAPK. Las señales procedentes desde receptores de la membrana celular activan una serie de mediadores que, finalmente, activan ERK, induciendo proliferación y/o diferenciación, y JNK o p38, relacionándose con el control de la muerte celular por apoptosis en situaciones de estrés celular.

1.2.4.1. Vía de transducción de ERK1/2

En terminos generales, los factores de crecimiento una vez unidos específicamente a receptores de membrana activan una serie de quinasas que terminan fosforilando ERK1/2. Como se ha comentado previamente, estos receptores fosforilan a proteínas con dominios homólogos a Src y SH3, que a su vez interactúan en complejos estables con el adaptador GRB-2. Este adaptador es el que intercambia una guanina con SOS y cataliza la conversión de GDP-Ras a GTP-Ras. Ras fue identificado como un oncogén transformante responsable de los tumores originados por los virus del sarcoma Harvey (h-RAS) y Kirsten (k-RAS) en los años 60, y posteriormente, en 1982, se identificaron diversos genes alterados en tumores humanos, incluyendo un tercer subtipo en neuroblastomas (n-RAS) ⁶⁰. Los tres genes de RAS codifican proteínas similares de 188-9 aminoácidos.

A continuación GTP-Ras interactúa con la primera quinasa de la casacada, Raf, una serina/treonina quinasa, que fosforila a su vez a MEK1/2. Se han descrito hasta tres isoformas de Raf, A-Raf, B-Raf, y Raf-1 (C-Raf). De ellas, Raf-1 es el principal activador de la vía ERK1/2 en el cáncer de mama, mientras que A-Raf parece ser más relevante en los tumores urogenitales y B-Raf en los gliomas. MEK es una proteína con actividad quinasa con actividad dual, ya que fosforila residuos de serina y tirosina, y activa a ERK1/2, que se localiza en condiciones basales en el citoplasma de las células ⁶¹. Esta activación de ERK1/2 solamente se produce cuando, de forma simultánea, se fosforilan los residuos de treonina 202 y tirosina 204. La fosforilación de ERK1/2, además de estimular su actividad, promueve su dimerización y su translocación al núcleo en pocos minutos gracias a sus múltiples puntos de señalización nuclear ⁶².

Es en el núcleo donde, bien de forma directa o indirecta a través de otras quinasas, como RSK1, RSK2 y RSK3, ERK1/2 fosforila y activa los factores de transcripción específicos para genes implicados en la proliferación, la integridad del citoesqueleto de actina, la diferenciación, la apoptosis, la adhesividad celular y migración, entre ellos, genes que codifican proteínas de unión a elementos de respuesta dependientes de AMPc (CREB), la histona H3, las

quinasas de interacción 1 y 2 (Mnk1/2), la proteína de shock 27 (Hsp27), c-Fos, Src o los receptores de estrógenos y progesterona ⁶³. También interviene en la condensación de la cromatina, al fosforilar determinadas moléculas implicadas en este proceso, de manera que se facilita la accesibilidad de determinados factores de transcripción al DNA ⁶⁴.

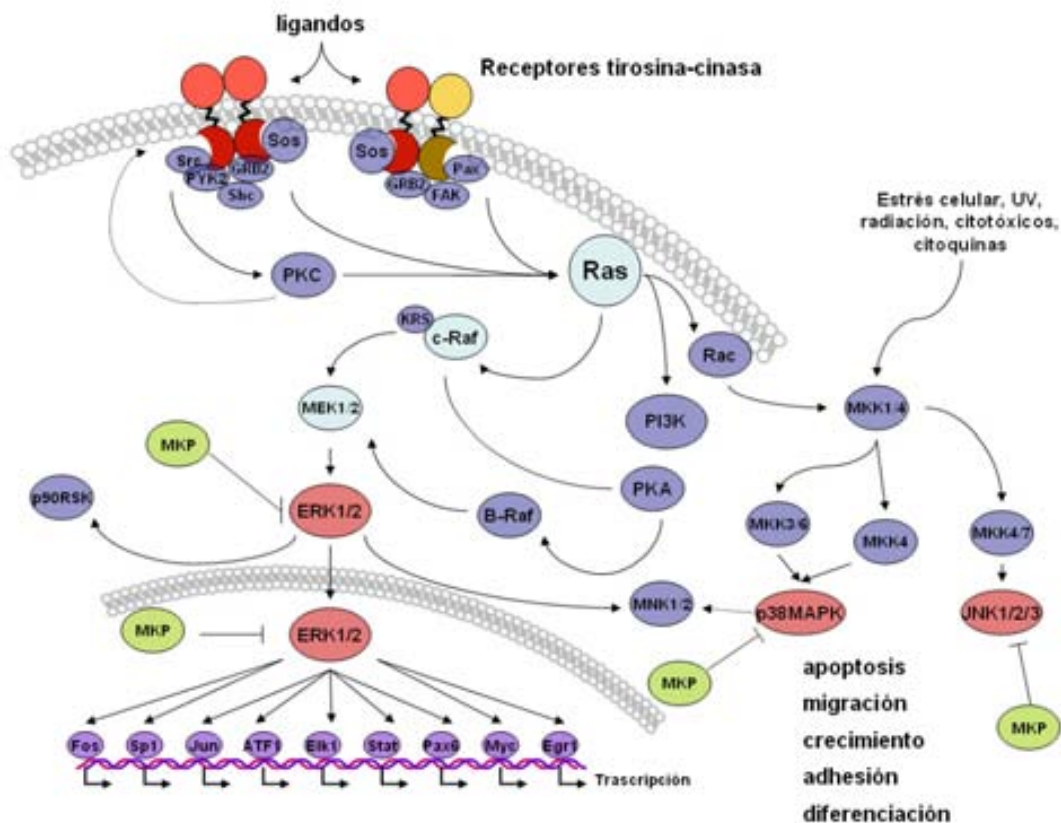


Figura 1.5. Vía de señalización celular de Ras/Raf/ERK. Las señales procedentes desde la membrana celular por activación de receptores tirosina-quinasa, fosforilan a Ras, ésta a Raf y a MEK1/2. La activación de MEK, fosforila ERK, que rápidamente se transloca al núcleo y activa la transcripción de sus genes diana. Estos genes están implicados en los mecanismos de control de la apoptosis, migración celular, crecimiento, adhesión y diferenciación. Situaciones de estrés celular, son capaces de activar de forma directa las vías de apoptosis de JNK y p38, aunque existe un equilibrio entre las tres cascadas de las MAPK. Las fosfatasas de la familia MKP controlan los niveles de activación de estas tres vías de señalización celular.

Los eventos descritos se consideran como imprescindibles en la activación de ERK1/2, lo que unido a que no se han demostrado sobreexpresiones de MEK o de ERK en situaciones neoplásicas, hace hipotetizar que unos niveles finamente regulados de estas proteínas son críticos para garantizar la viabilidad de la célula. Sin embargo, la señalización de ERK1/2 se ha asociado con la capacidad de las células en cultivo para crecer independientemente de los estímulos externos y sus niveles de activación se han descrito alterados hasta en un 30% de los tumores humanos. Estas alteraciones incluyen sobreexpresión o mutaciones activadoras de los receptores de membrana, mutaciones activadoras de Ras GTPasa o mutaciones en B-Raf⁶⁵. Aunque la activación de la vía ERK1/2 desde receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa es el principal mecanismo descrito en cáncer, se han descrito alternativas de activación independientes de estos receptores, como en situaciones celulares de elevada concentración de AMPc, señalización mediada por PKC o sobreexpresión de receptores de plasminógeno o de acetilcolina.

El cáncer de mama puede definirse de una forma simplista entre aquellos tumores biológicamente dependientes de los receptores de estrógenos para su crecimiento y aquellos tumores que son independientes del estradiol. En los tumores independientes de estrógenos, las células reciben estímulos a través de distintos receptores de membrana cuya consecuencia es la activación de ERK1/2. Entre estos receptores, se ha demostrado la importancia en cáncer de mama de los receptores de la familia Erb-B y de los diferentes ligandos de la familia EGF, como se ha descrito previamente, del IGF-1R, del receptor de la insulina, de la prolactina, el UPA o TGF- β . En esta situación, el aumento de la señalización de ERK1/2 se ha asociado en diversos modelos celulares a un incremento en la capacidad de migración y motilidad celular, inhibición del crecimiento y diferenciación, y un aumento de la tasa de proliferación.

Por otra parte, los tumores dependientes de estrógenos utilizan también la vía de ERK1/2 a través de tres mecanismos: 1) ERK puede fosforilar el propio receptor de estrógenos y favorecer su actividad transcripcional; 2) el estradiol estimula a otros factores que activan a su vez a ERK, y 3) el estradiol puede

co-activar otras vías que, indirectamente, aumentan los niveles de actividad de ERK.

1.2.4.2. Vías de transducción activadas en situaciones de estrés celular: JNK y p38

Las quinasas con extremo N-terminal Jun (Jun N-terminal kinases, JNK) pertenecen a la familia de las MAPK y están implicadas en la regulación de los mecanismos de proliferación celular y apoptosis. El efecto final de la activación de las JNK favoreciendo la progresión en el ciclo o induciendo la muerte celular depende del tipo de estímulo recibido y del contexto celular⁶⁶. La familia de las JNK se identificó inicialmente como una serie de proteínas con actividad quinasa capaces de activarse en presencia de exposición a la luz ultravioleta (UV) por fosforilación de sus residuos Ser63 y Ser73^{67, 68}. Aunque los estudios iniciales demostraron que la radiación UV y otros estímulos, como factores de crecimiento, podían activar las JNK^{67, 69, 70}, las principales causas de estimulación son la presencia de citoquinas⁷¹, las situaciones de estrés celular⁷², los agentes citotóxicos y los compuestos genotóxicos, fundamentalmente desencadenando su función pro-apoptótica⁷³⁻⁷⁵.

Las cascadas de señalización celular implicadas en los mecanismos de apoptosis se han clasificado en vías de señalización extrínsecas, iniciadas por los receptores de muerte celular, de los que son los ejemplos más claro el receptor del factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor, TNF- α), TRAIL y ligando de FAS; y en vías de señalización intrínsecas, desencadenadas por alteraciones mitocondriales⁷⁶. En ambos casos, JNK se ha descrito como regulador central de la apoptosis.

Las primeras evidencias del papel de JNK como regulador de la apoptosis demostraron que la fragmentación de DNA inducida por radiación en células Jurkatt se asociaba a un incremento de expresión de JNK⁷⁷. Aunque estos primeros estudios no detallaron el mecanismo íntimo de activación de JNK, trabajos posteriores atribuyeron a diversos inductores como TNF- α , el ligando de Fas, o las radiaciones X y UV un papel fundamental como desencadenantes

de la apoptosis mediada por JNK ⁷⁸⁻⁸⁰. La descripción detallada de la señalización de JNK relacionada con la apoptosis se completó en fibroblastos embrionarios de ratón (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF) deficientes en esta JNK ⁸¹. Estas células sin actividad de JNK poseían una mayor resistencia a la muerte celular inducida por la exposición a radiaciones, agentes alquilantes de DNA y otros citotóxicos. El uso de compuestos capaces de inhibir la actividad de JNK se ha utilizado para reducir el daño hepático por necrosis de hepatocitos y células sinusoidales en las fases agudas de la hepatitis ⁸² o de fibras miocárdicas en enfermedad isquémica ⁸³.

Existen evidencias del papel de JNK en la transformación oncogénica *in vitro* mediada por Ras ⁸⁴. Así, las metástasis pulmonares observadas en modelos animales eran de mayor tamaño cuando JNK no era funcional, indicando que JNK podría actuar como supresor tumoral en condiciones *in vivo* ⁸⁵. Aunque el papel pro-apoptótico de JNK aún está siendo investigado, se ha descrito que su activación mantenida desencadena la muerte celular por apoptosis, pero parece que una activación intensa, pero limitada en el tiempo, podría asociarse, por el contrario, a un aumento en la tasa de proliferación celular ^{86, 87}.

La vía de p38 actúa de forma general como un supresor de la señalización de Ras y ERK1/2 ^{88, 89}. Este papel inhibitorio de p38 fue demostrado por primera vez a partir de modelos celulares con sobre-expresión inducida de la misma p38, en los que se observaba una baja expresión de ciclina D1, un gen diana clásico de ERK1/2 ⁹⁰. Posteriormente, se ha corroborado que la activación de p38 induce la proliferación y la movilidad celulares en presencia de una función de Ras conservada ^{91, 92}. El efecto de la activación de p38 en sistemas celulares con mutación inactivante de Ras se describió recientemente, demostrándose que disminuía los niveles de la forma fosforilada de ERK, sugiriendo un sistema de compensación entre ambas MAPK ⁹³. Posteriormente, se ha podido demostrar también que este efecto inhibitorio de p38 ocurre con frecuencia simultáneamente a una activación de JNK ⁹⁴. Finalmente, este efecto inhibitorio de p38 sobre la tumorigénesis *in vivo* fue demostrado mediante la utilización de compuestos bloqueantes selectivos de p38 o el empleo de ratones deficientes en esta MAPK ^{95, 96}.

También en tejidos normales y embrionarios p38 es capaz de inhibir la proliferación celular^{97, 98}. Sin embargo, en macrófagos, la activación de p38 induce la proliferación además de bloquear la apoptosis^{99, 100}. Este efecto dual de p38 puede estar relacionado con la capacidad de esta MAPK de regular la biosíntesis de moléculas implicadas en el inicio de la respuesta inflamatoria y que podrían ser importantes también en las primeras fases de desarrollo de los tumores^{101, 102}. Una de estas moléculas relacionadas con p38 ha sido la activina, miembro de la familia de TGF- β ¹⁰³, que ha demostrado actuar como inductor de crecimiento celular en modelos *in vitro* de cáncer de tiroides o linfoma^{104, 105}. Esta función inhibitoria del crecimiento tumoral de p38 parece depender de la capacidad de inducir la diferenciación celular, como en el rhabdomyosarcoma o en tumores gliales¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Este efecto sobre la diferenciación ocurre también en tejidos normales como en fibras musculares, en precursores eritroides o en queratinocitos¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Por otra parte, p38 también participa de forma muy importante en la regulación de los mecanismos de muerte celular, favoreciendo la apoptosis. Su activación en modelos de cáncer de mama por la exposición a agentes genotóxicos se ha relacionado con un incremento de la apoptosis¹¹². De forma similar, en cáncer de colon, la activación de p38 induce apoptosis cuando co-existe una mutación en k-Ras¹¹³. Algunos estudios adicionales basados en la manipulación farmacológica o genética de p38, tanto en modelos celulares como animales, han confirmado la capacidad de p38 de actuar como inductor de muerte celular. Por ejemplo, la activación de p38 y/o JNK parece un evento imprescindible para el inicio de la apoptosis en presencia de agentes quimioterápicos, tales como la doxorubicina, el etopósido, el cisplatino o las radiaciones UV y γ ¹¹⁴⁻¹¹⁷. Han sido diferentes los mecanismos implicados en esta actividad de p38 como agente apoptótico, incluyéndose la inactivación de p53 o las mutaciones de Ras¹¹⁷⁻¹¹⁹. La actividad de p38 como supresor tumoral también ha implicado p53 como inductor de los mecanismos de apoptosis y, recientemente, también se ha descrito que p38 podría actuar como promotor de la senescencia, evitando de esta forma la transformación inducida por oncogenes¹²⁰. Además, p38 puede activar proteínas de la familia de Bcl-2 o diferentes quinasas de la vía de PI3K^{116, 121, 122}.

Finalmente, p38 también participa en los mecanismos de invasividad y diseminación de las células tumorales. La expresión de la forma activada de p38 se han asociado en modelos celulares de cáncer de mama con su capacidad de migración, de cáncer de pulmón, de melanoma, páncreas y próstata ¹²³⁻¹²⁶.

Por tanto, ambas MAPK inducidas por estrés, p38 y JNK, son determinantes en las respuestas celulares convencionales en cáncer a los tratamientos con radio y quimioterapia, y uno de los factores determinantes más importantes de la respuesta biológica a los tratamientos anti-tumorales es la duración y la magnitud de la activación de estas MAPK ¹²⁷. Este hecho refleja un balance entre la actividad de los activadores y los mecanismos reguladores inhibitorios de las cascadas de señalización celular. Está demostrado en diversos trabajos que uno de los puntos críticos en este balance ocurre a nivel del equilibrio entre la actividad de las MAPK y de los mecanismos de regulación de las fosfatasas específicas de las MAPK. La fosforilación de las MAPK a nivel de los residuos de treonina y tirosina necesarios para su activación está regulada por una serie de fosfatasas de serina/treonina, fosfatasas de tirosina o fosfatasas duales específicas ¹²⁸. La familia de fosfatasas más importante en los mamíferos, en todo caso, y que regula específicamente la actividad de las MAPK, es esta última.

1.2.5. Regulación de la actividad de las vías de transducción de señal de las MAPK: fosfatasas específicas duales (dual-specificity MAPK phosphatases, MKP)

Las diferentes MAPK pueden ser inactivadas o defosforiladas por gran número de fosfatasas específicas para los residuos de treonina y de tirosina, necesarios para su activación. Las fosfatasas de MAPK (mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP), también conocidas como fosfatasas con especificidad dual (dual-specificity phosphatases, DUSP), son las encargadas de defosforilar o inactivar a las distintas MAPK. La familia de las MKP se compone de 10 enzimas activas conocidas hasta el momento, presentando una

localización subcelular distinta, bien citoplasmática o bien nuclear, una diferente cinética de expresión y una variable afinidad molecular por cada una de las MAPK, pudiendo reconocer una única quinasa o varias de ellas ¹²⁹⁻¹³².

Tabla 1.1. Nomenclatura, propiedades y funciones fisiológicas de las MKP descritas en la literatura

Gen	Alias	Localización cromosómica	Localización subcelular	Especificidad por el sustrato	Funciones fisiológicas
DUSP1/MKP-1	CL100, erp, 3CH134, hVH1	5q34	Nuclear	JNK, p38, ERK	Regulador negativo de la función inmune y shock endotóxico. Homeostasis metabólica y resistencia celular al estrés
DUSP4/MKP-2	Typ1, Sty8, hVH2	8p12-p11	Nuclear	JNK, p38, ERK	Desconocidas
DUSP2	PAC-1	2q11	Nuclear	ERK, p38	Regulador positivo de la respuesta inflamatoria
DUSP5	hVH3, B23	10q25	Nuclear	ERK	Desconocidas
DUSP6/MKP-3	Pyst1, rVH6	12q22-q23	Citoplasmática	ERK	Regulador negativo de la señalización mediada por ERK2 y FGFR
DUSP7/MKP-X	Pyst2, B59	3p21	Citoplasmática	ERK	Desconocidas
DUSP9/MKP-4	Pyst3	Xq28	Citoplasmática	ERK>p38	Desarrollo de los tejidos placentarios
DUSP8	M3/6, hVH5, HB5	11p15.5	Citoplasmática/nuclear	JNK, p38	Desconocidas
DUSP10/MKP-5		1q41	Citoplasmática/nuclear	JNK, p38	Inmunidad innata y adquirida
DUSP16/MKP-7		12p12	Citoplasmática/nuclear	JNK, p38	Desconocidas

Todas las MKP comparten una estructura que incluye un dominio catalítico C-terminal, con una secuencia similar al VH1-DUSP vírico, y un extremo N-terminal no activo. Esta última región contiene dos grupos de residuos aminoacídicos básicos, altamente conservados, que participan en el reconocimiento de las MAPK a través de lo que se denomina secuencia de interacción con quinasa (kinase interaction motif, KIM) y que determina la localización subcelular de cada una de las MKP ^{59, 133}. Sobre la base de esta similitud en la secuencia de todas las MKP, su estructura génica, la especificidad por los sustratos y su localización, las MKP pueden subdividirse en 3 grupos distintos (Figura 1.6, Tabla 1.1).

El primero de estos grupos comprende a las fosfatasa DUSP1/MKP-1, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP-2 y DUSP5/hVH-3, todas ellas codificadas por

genes rápidamente inducibles en situaciones de estímulos de estrés celular y mitogénicos ¹³³. Toda esta familia, a excepción de DUSP5 que parece actuar de forma selectiva sobre ERK1/2, presenta una afinidad similar por todas las MAPK, inactivando ERK, JNK y p38. El segundo grupo de MKP incluye a DUSP6/MKP-3, DUSP7/MKPX y DUSP9/MKP-4. Las tres son proteínas citoplasmáticas que exhiben una alta afinidad por ERK1/2. De ellas, la que presenta mayor afinidad por ERK es MKP-3, que no presenta ninguna actividad sobre JNK o p38 ¹³⁴. El tercer grupo de fosfatasa comprende las proteínas DUSP8/hVH-5, DUSP10/MKP-5 y DUSP16/MKP-7. Estas proteínas se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo, y de forma selectiva defosforilan a las MAPK activadas en situaciones de estrés, p38 y JNK, mientras que no presentan actividad importante sobre ERK1/2 ^{59, 135}.

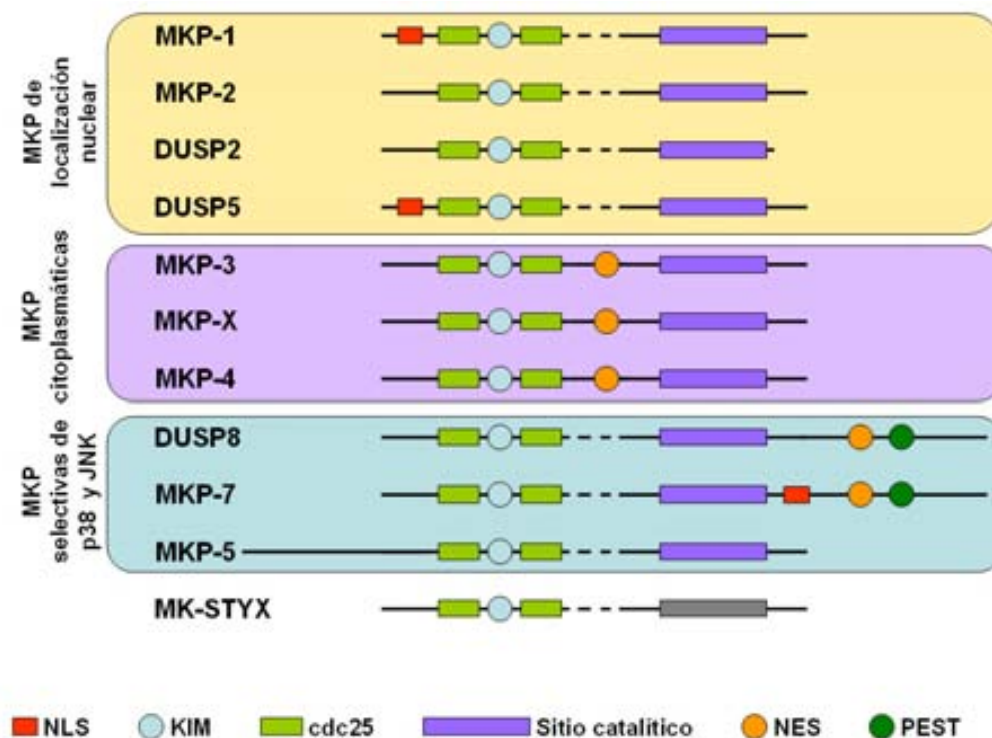


Figura 1.6. Estructura y dominios de las diez proteínas de la familia MKP caracterizadas. El extremo C terminal contiene la actividad catalítica, mientras que en el N terminal se encuentran los dominios de homología a cdc25. Otros dominios son el sitio de interacción con las quinasas (conserved kinase-interaction motif, KIM), el punto de unión a las señales de localización nuclear (nuclear localization signals, NLS), el punto de unión a las señales de exportación nuclear (nuclear export signals, NES) y las secuencias PEST. El análisis filogenético pone de manifiesto los tres grupos de MKP: de localización nuclear, citoplasmáticas con predilección por ERK1/2, y las de afinidad por p38 y JNK.

Las MKP se activan inmediatamente tras su expresión, pero esta actividad puede ser regulada por, al menos, tres mecanismos, que incluyen la inducción de la transcripción, cambios en la estabilidad de la proteína mediante fosforilación y por activación catalítica ¹³⁶ (Figura 1.7).

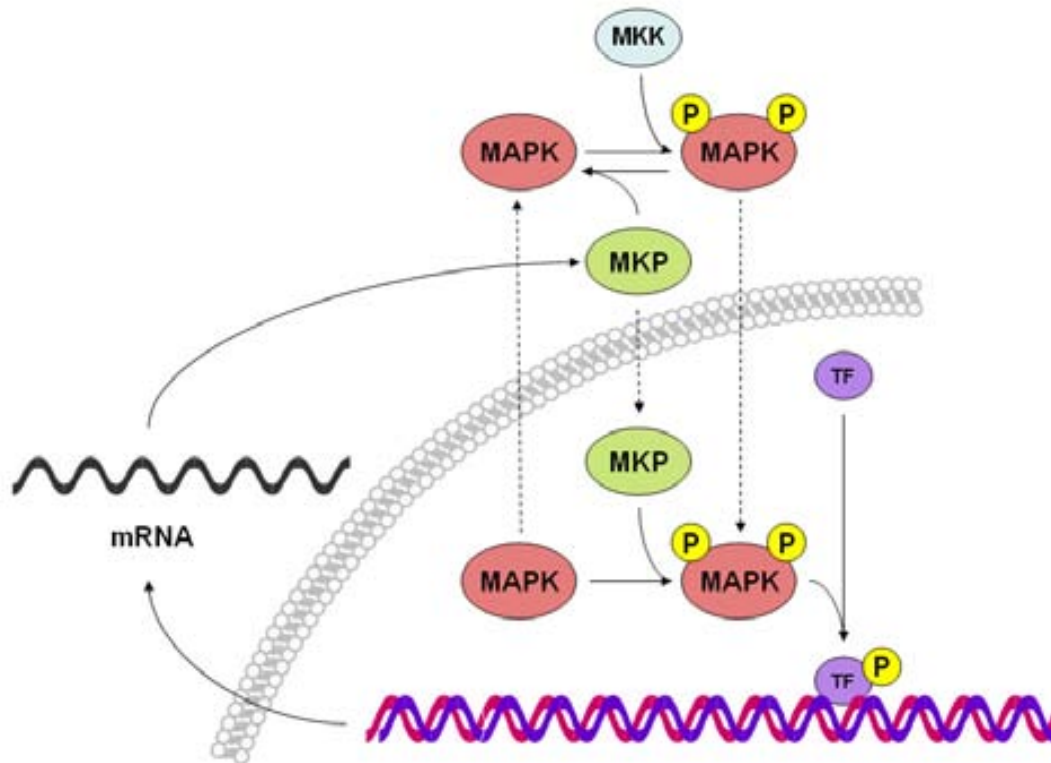


Figura 1.7. Señalización por las MAPK y regulación por las MKP en el interior de la células. Cualquier estímulo, como estrés celular, radiación, citotóxicos o factores de crecimiento activan las MKK. Estas MKK se fosforilan en sus residuos tirosina y treonina, lo que induce la dimerización de las MAPK y su propia fosforilación y activación. Las MAPK activadas pueden interactuar con otras proteínas efectoras citoplasmáticas o traslocarse al núcleo, donde fosforilan factores de transcripción (TF), provocando la lectura de genes y síntesis de RNA mensajero, que codifica proteínas, entre ellas las MKP. Estas MKP actúan como un mecanismo de regulación o feedback negativo, que inactivan las MAPK por defosforilación, tanto en el núcleo como en el citoplasma, dependiendo del tipo sintetizado.

A partir de modelos celulares y animales, se ha comenzado el estudio de las funciones de cada una de las MKP ¹³⁷. MKP-1 participa en los mecanismos inmunes, regulando la biosíntesis de citoquinas o la reacción anti-inflamatoria mediada por glucocorticoides. Así, en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) obtenidos de animales deficientes en esta MKP-1, se ha podido demostrar que el aumento de la actividad de JNK y p38 incrementan la apoptosis provocada por la anisomicina, el peróxido de hidrógeno o la inducida por factores como TNF- α , IL6 o IL10 ¹³⁸⁻¹⁴⁰. La pérdida de MKP-1 no sólo aumenta la actividad de p38, sino que provoca que esta actividad se prolongue en el tiempo, efecto que parece crucial en procesos inflamatorios reumáticos y autoinmunes ¹³⁸⁻¹⁴⁰. MKP-1 es necesaria para la inhibición de la señalización pro-inflamatoria; de esta forma, glucocorticoides como la dexametasona aumentan la expresión de MKP-1 ¹⁴¹, y se asocian a una reducción de genes pro-inflamatorios, como TNF- α , COX-2, IL-1a and IL-1b ^{142, 143}.

MKP-1 se expresa en condiciones normales en tejidos del adulto, como músculo, cerebro, hígado o tejido adiposo, y parece ser importante en el adecuado desarrollo fetal de los órganos ^{130, 144, 145}. MKP-1 se ha descrito como un factor clave en el control de la homeostasis metabólica, y en ratones con pérdida de MKP-1 se ha observado una resistencia a la obesidad producida por dietas ricas en grasas y una intolerancia a la glucosa ¹⁴⁶.

MKP-1 se induce por múltiples estímulos que también activan las MAPK, que incluyen la presencia de factores de crecimiento en el microambiente y las situaciones de estrés celular ¹³⁶. De esta forma, las MAPK pueden aumentar la actividad de MKP-1 mediante dos mecanismos distintos: en primer lugar, la unión de la MKP a su MAPK específica provoca un aumento de la actividad catalítica de la misma ¹³², y en segundo lugar, la fosforilación de ERK inhibe la degradación de MKP-1 vía proteasoma, impidiendo su ubiquitinización ¹⁴⁷. En definitiva, MKP-1 actúa como un mecanismo de control o retroalimentación (feedback) que atenúa la actividad de la señalización celular mediada por las MAPK ^{128, 136, 148, 149}.

El gen que codifica MKP-1 contiene cuatro exones y tres intrones, que codifican para un RNA mensajero inducible de, aproximadamente, 2.4 kilobases ^{150, 151}. El

promotor de este gen contiene múltiples sitios de unión AP-2 para el factor 1 de transcripción transactivador y un único sitio de unión AP-1 para la neurofibromina 1, así como una región TATA-box^{151, 152} (Figura 1.8). Otros puntos de unión, como un E-box y tres GC-box, se encuentran entre las posiciones 110 y 30¹⁵³. Finalmente, existe un punto de unión a p53 en el segundo intrón¹⁵⁴. Estos múltiples puntos de unión podrían explicar los numerosos factores que pueden inducir la expresión de MKP-1. Un punto llamativo es el de que aunque el gen de MKP-1 posee una secuencia de consenso E-box, no es capaz de unirse o ser regulado por c-myc, ya que carece de las regiones flanco necesarias para ello¹⁵⁵. Finalmente, el factor de transcripción E2F1 es necesario para asegurar la respuesta de MKP-1 a niveles elevados de peróxido de hidrógeno¹⁵⁶. A pesar de existir un alto grado de conservación, se han descrito polimorfismos de un único nucleótido en el gen de MKP-1, a nivel del primer intrón, por lo que no parece influir en la capacidad de transcripción del gen o en la eficiencia de su traducción¹⁵⁷.

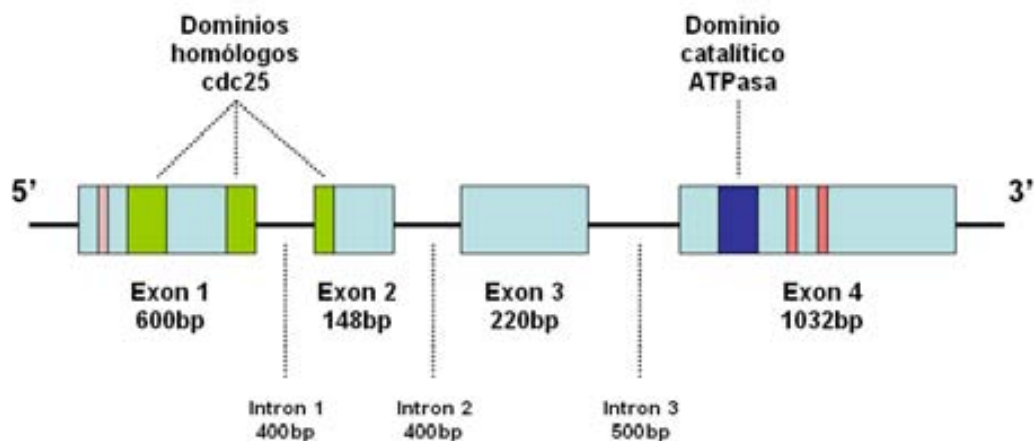


Figura 1.8. Gen codificante de MKP-1. Los exones 1 y 4 son cruciales para la proteína, ya que contienen los dominios imprescindibles para la función de MKP-1. El dominio CH2B es codificado por los exones 1 y 2. No se ha descrito la función del dominio codificado por el exon 3. El promotor del gen puede unirse a gran número de factores de transcripción, entre los que se conocen p53, el factor NF1 (neurofibromina 1), SP1, (factor de transactivación 1) y CRE (elemento de respuesta de AMP cíclico).

MKP-1 es una fosfatasa nuclear de 367 aminoácidos, encargada de defosforilar a las MAPK en este orden de afinidad: p38, JNK y ERK1/2^{135, 158, 159}. Las MAPK se unen específicamente en distintos puntos de la proteína MKP-1; esta especificidad se atribuye a la disposición de determinados residuos de arginina¹⁶⁰. Así, construcciones de MKP-1 con mutaciones en las argininas 53 a 55 son incapaces de unirse a las MAPK. La estructura tridimensional de la proteína no se conoce todavía, pero se supone que p38 y ERK1/2 se unen en el mismo sitio, mientras que JNK probablemente lo hace a distancia de estas dos, permitiendo una acción simultánea de MKP-1 sobre ERK1/2 o p38 y a la vez sobre JNK. De hecho, MKP-1 podría no defosforilar directamente a ERK1/2 según algunos trabajos, sino que competiría directamente con los efectores de ERK1/2 e impediría su activación por fosforilación¹³⁰. En base a este modelo, se sugiere que la unión de MKP-1 a ERK1/2 impediría la interacción de ERK con ELK-1 en el interior del núcleo. La actividad defosforiladora de MKP-1 está restringida al núcleo^{130, 159}. Esta capacidad está controlada por una secuencia LXXLL localizada en el extremo N terminal de la proteína, próxima a los dominios de homología a cdc25 A¹³⁰ (Figura 1.9). Aunque esta secuencia no es una secuencia de localización nuclear clásica, actúa como localizador para MKP-1¹⁶¹. MKP-1 también contiene dominios rodanasa, de función aún no bien caracterizada, y de un residuo cisteína crítico que podría ayudar a la regulación de MKP-1 mediante su secuestro citosólico y, finalmente, de un dominio catalítico¹⁶².



Figura 1.9. Estructura de la proteína MKP-1. El extremo N-terminal es responsable de la localización nuclear de la proteína y de la unión a las MAPK (ERK1/2 y p38; el aminoácido responsable de la unión a JNK no ha sido aún identificado), y el extremo C-terminal contiene el dominio catalítico y el dominio responsable de la estabilización/degradación de la proteína.

MKP-5 se ha relacionado con la inmunidad adaptativa e innata mediante la regulación de la actividad de JNK en las células inflamatorias ¹⁶³. Por el contrario, DUSP2 es un regulador positivo de la respuesta inflamatoria; los ratones deficientes para DUSP2 son resistentes en los modelos experimentales de inducción a la artritis de causa inmune ¹⁶⁴.

De las MKP citoplasmáticas, MKP-3 es la mejor caracterizada. Ésta se ha relacionado con la respuesta mediada por ERK1/2 al factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor, FGF) durante el desarrollo embrionario en el ratón. De forma relacionada a MKP-3, MKP-4 controlaría la actividad de ERK en los tejidos extraembrionarios ^{134, 165, 166}.

Dado este rango tan amplio de funciones de las MKP, resultaría sorprendente que no se hubiesen relacionado en los complejos procesos que se dan en el cáncer y en su desarrollo.

1.2.6. El papel de las MKP en el cáncer

En los últimos años se han demostrado las primeras evidencias de la existencia de alteraciones de las MKP en cáncer, fundamentalmente relacionadas con MKP-1, MKP-2 y MKP-3 (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Evidencias del papel de las MKP en cáncer humano

Gen/MKP	Tumor	Alteración	Correlación con supervivencia
DUSP1/MKP-1	Colon		
	Próstata	Sobre-expresión en estadios iniciales de la lesión	Sin datos
	Vejiga		
	Próstata	Aumento de la expresión de MKP-1 correlaciona con actividad aumentada de JNK y de proteínas de	Sin datos
	Ovario	Sobre-expresión hasta en el 60% de los tumores ováricos malignos	Asociada a menor supervivencia libre de enfermedad
	Mama	Sobre-expresión asociada a actividad de JNK	Sin datos
	Pulmón	Sobre-expresión	Asociada a menor supervivencia libre de enfermedad
DUSP4/MKP-2	Ovario	Expresión en tumores serosos border-line pero no en carcinomas. Asociación con fenotipo benigno	Sin datos
	Mama	Co-expresión con MKP-1	Sin datos
DUSP2	Ovario	Expresión en carcinomas serosos	Asociada a menor supervivencia global
	Leucemia aguda	Expresión asociada a niveles elevados de ERK	Sin datos
DUSP6/MKP-3	Páncreas	Sobre-expresión en tejido displásico y carcinomas in situ, pero disminuida en carcinomas invasivos	Sin datos
DUSP7/MKP-X	Leucemia	Sobre-expresión en leucemia mieloide y linfoblásticas agudas	Sin datos

1.2.6.1. Importancia de MKP-1 en el cáncer

Una de las primeras evidencias de la importancia de MKP-1 como factor mitogénico y regulador de la actividad de las MAPK en tumores demostró que tumores como carcinoma de próstata, colon y vejiga, existía un aumento en las células tumorales de la expresión de MKP-1 a nivel de RNA mensajero (mRNA) y de proteína respecto al tejido normal correspondiente ¹⁶⁷. Esta sobre-expresión de MKP-1 era detectable ya en las fases iniciales de la progresión tumoral, perdiéndose en lesiones de alto grado y en estadios avanzados.

Los mecanismos por los que se altera MKP-1 en los tumores pueden ser diversos y complejos. MKP-1 es una diana del supresor tumoral p53 ¹⁶⁸ y está aumentada su expresión en respuesta a diferentes situaciones de estrés celular, incluyendo el estrés oxidativo y en el daño al DNA ¹⁶⁹. MKP-1 también puede aumentar en situaciones de hipoxia tales como las que ocurren en los diversos tumores sólidos, fundamentalmente cuando alcanzan dimensiones

amplias, participando entonces en la regulación de la actividad de las distintas MAPK en relación al ambiente tumoral ¹⁷⁰.

En cáncer de próstata y en lesiones de neoplasia intraepitelial (PIN) de alto grado se han detectado niveles elevados de expresión de MKP-1, correlacionándose con una baja actividad de JNK y de otras proteínas implicadas en la apoptosis, indicando de MKP-1 podría participar como un factor anti-apoptótico en estos tumores ^{171, 172}. En este mismo sentido, la línea tumoral humana de cáncer de próstata DU145, que sobre-expresa MKP1, es resistente a la apoptosis mediada por el ligando de Fas ¹⁷³.

Los niveles de expresión de MKP-1 en tumores humanos de ovario han demostrado estar aumentados hasta casi en el 60% de los carcinomas, correlacionándose con una menor supervivencia libre de enfermedad ¹⁷⁴. En modelos celulares de cáncer de ovario, se ha correlacionado la sobre-expresión de MKP-1 con resistencia a las terapias basadas en cisplatino ¹⁴⁹.

Muchos de los agentes anti-neoplásicos usados de forma habitual en el tratamiento del cáncer tienen relación con las MKP, como las antraciclinas, los agentes alquilantes, los taxanos, el cisplatino o los inhibidores del proteasoma, que en general inducen apoptosis por activación de la vía de señalización JNK ^{130, 175}. En base a este mecanismo de muerte celular mediado por JNK, se ha descrito que la expresión elevada de MKP-1 en los tumores podría defosforilar JNK y limitar la capacidad citotóxica de los agentes inductores de la apoptosis ^{61, 172-177}. Por el contrario, niveles bajos de expresión de MKP-1 pueden favorecer la apoptosis permitiendo una fosforilación persistente de JNK ¹⁴⁹. En modelos de cáncer de mama, dos trabajos recientes han descrito el papel de MKP-1 como una potencial diana terapéutica. Utilizando modelos celulares de cáncer de mama y agentes anti-tumorales habitualmente usados en la clínica como las antraciclinas, los agentes alquilantes y taxanos como el paclitaxel, se ha demostrado mediante manipulación genética o modulación farmacológica de MKP-1, ésta actúa como un mediador relevante tanto de novo como inducible de la quimiosensibilidad en el cáncer de mama ^{130, 176, 177}.

Los inhibidores del proteasoma, que se han utilizado como tratamiento en fase de ensayo en el cáncer de mama, también parecen inducir la expresión de MKP-1, hecho que provoca un efecto anti-apoptótico ^{59, 167, 175, 178}. La

dexametasona también se ha descrito capaz de inducir los niveles de expresión de MKP-1 en células tumorales, y este hallazgo se ha correlacionado con una limitación del efecto citotóxico del paclitaxel como agente quimioterápico ^{176, 177}. Por el contrario, las antraciclinas como la doxorubicina o la epirubicina, disminuyen los niveles de expresión de MKP-1, tanto en modelos celulares como animales, por represión de la transcripción del promotor del gen de MKP-1 ^{130, 179}. Esta represión de MKP-1 se ha relacionado con la potenciación de la eficacia del efecto citotóxico de agentes alquilantes cuando se combinan con dichas antraciclinas ¹³⁰. La aplidina, un agente experimental ensayado en el cáncer de mama, también reduce la expresión de MKP-1 en el tumor ¹⁷⁶. Finalmente, también se ha demostrado aumento de la expresión de MKP-1 en los tumores de mama humanos y se ha correlacionado con la progresión tumoral, aunque no se ha estudiado su papel como factor pronóstico o predictivo de respuesta a terapias sistémicas ^{180, 181}.

También se han descrito sobre-expresión de MKP-1 en tumores no microcíticos de pulmón ^{182, 183}. El cisplatino es uno de los fármacos incluidos en el tratamiento de esta enfermedad en primera y segunda línea, pero frecuentemente en estadios avanzados de la enfermedad los pacientes muestran resistencia a este compuesto. El grupo de R. Perona, que colabora con nuestro laboratorio, ha descrito el aumento de expresión de MKP-1 en tumores de pulmón, correlacionándolo con la supervivencia libre de enfermedad. En modelos celulares de pulmón con sobre-expresión constitutiva de MKP-1, el mismo grupo ha constatado que el bloqueo de la misma mediante el uso de microRNA de interferencia, sensibilizaba a las mismas hasta diez veces al tratamiento con cisplatino ¹⁸⁴, reduciendo las tasas de crecimiento de los tumores en los modelos animales.

Todos estos datos sugieren que MKP1 podría participar en los mecanismos de quimioresistencia en algunos tumores, y de esta forma, la combinación de la quimioterapia con tratamientos biológicos que interfieran a MPK-1, como los inhibidores del proteasoma, aumentaría la eficacia de la misma ¹⁸⁵. Por tanto, el desarrollo de inhibidores selectivos de MKP-1 podría ser de alto interés para el tratamiento de diversos tumores, en co-administración con diversos quimioterápicos, aumentando así la eficacia del tratamiento anti-neoplásico.

1.2.6.2. Otras MKP nucleares y cáncer

Los conocimientos de otras MKP nucleares en cáncer son mucho menores que los descritos para MKP-1. MKP-2 es la enzima más similar a MKP-1, y se ha encontrado sobre-expresada en tumores border-line serosos de ovario, correlacionándose con una menor tasa de proliferación celular. Este efecto se explica por el bloqueo de la vía de ERK y de los procesos de degradación de la matriz extracelular implicados en la invasividad en estos tumores ¹⁸⁶. La sobre-expresión de MKP-2 se ha descrito también en tumores de páncreas con mutaciones de k-Ras ¹⁸⁷.

Del resto de MKP de esta familia, el conocimiento en el campo de la oncología es reducido. Existen evidencias de que la expresión de DUSP2/PAC-1 es mayor en tumores serosos de ovario y la misma se ha relacionado con un peor pronóstico en términos de supervivencia global. En leucemias agudas, la sobre-expresión de MKP-2 relacionándose con la tasa de proliferación ^{188, 189}.

1.2.6.3. Las MKP citoplasmáticas reguladoras de ERK y cáncer

De las tres MKP citoplasmáticas y responsables de la regulación de ERK, MKP-3, MKP-X y MKP-4, la mejor estudiada y caracterizada es la primera de ellas. La primera evidencia de que MKP3 puede estar relacionada con cáncer procede de varios estudios en tumores pancreáticos en los que se ha encontrado una pérdida frecuente de la región 12q21, que contiene precisamente el gen de MKP-3. Aunque no se han detectado mutaciones de ésta, los niveles de RNA mensajero de este gen están relativamente disminuidos en estos tumores ¹⁹⁰. Se conoce hace tiempo que en cerca del 90% de los tumores pancreáticos, existen mutaciones activadoras de k-Ras, y MKP-3 se ha identificado como uno de los únicos tres genes sobre-expresados en esta situación ¹⁹¹⁻¹⁹³. Este aumento de MKP-3 en condiciones de activación de Ras se interpreta como una respuesta compensatoria para el control de la activación de ERK, alterado en las células tumorales.

La sobre-expresión de MKP-3 inducida en modelos animales, retarda la tasa de crecimiento relativa de los mismos ¹⁹⁴, mientras que la pérdida de su expresión se ha relacionado con aumento de la activación de ERK y con un fenotipo más agresivo en las neoplasias. Un estudio en tumores de páncreas mediante inmunohistoquímica ha demostrado que existe un aumento de la expresión de MKP-3 en lesiones de displasia epitelial y de carcinoma in situ, mientras que su expresión disminuye en los tumores infiltrantes, especialmente en los pobremente diferenciados. Estos hallazgos se han completado en modelos celulares de páncreas, en los que MKP-3 provoca una supresión del crecimiento celular y un aumento de la apoptosis ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

El papel del resto de las MKP citoplasmáticas está peor caracterizado en cáncer, describiéndose tan sólo aumentos de MKP-X en pacientes con leucemia mieloide aguda, estudiado a nivel de médula ósea ¹⁹⁸, y de MKP-4 en algunos tumores cutáneos ¹³¹, asociándose a aumento de actividad de p38 y JNK en los mismos.

2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La fosfatasa específica tipo 1 de las MAPK, MKP-1, regula en condiciones fisiológicas la actividad de JNK, de p38 y de ERK1/2, mediante el control de los niveles de expresión de sus formas fosforiladas, induciendo su defosforilación cuando la célula necesita reducirlos.

Algunos agentes antitumorales, como los inhibidores de la topoisomerasa II alfa –doxorubicina–, actúan induciendo la muerte celular por apoptosis a través de la activación de JNK y p38, aunque de forma no deseada, pueden elevar la actividad de la vía de ERK1/2, relacionada fundamentalmente con la proliferación celular. Unos niveles elevados de la forma fosforilada de ERK1/2 podrían estimular la expresión de MKP-1 como mecanismo regulatorio de la actividad de la vía, aumentando la defosforilación de JNK y p38 y, por tanto, reduciendo la apoptosis.

Por tanto, unos niveles elevados en las células tumorales de expresión de MKP-1, inducidos o constitutivos, podrían actuar como un mecanismo de quimioresistencia en el cáncer por bloqueo de esta muerte celular mediada por JNK y p38.

De esta forma, MKP-1 puede ser un mediador en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama al participar en los mecanismos de supervivencia celular del tumor, lo que la convierte en una atractiva diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.

Objetivos

1. Caracterizar los efectos moleculares a nivel de la fosforilación de las MAPK (ERK, JNK y p38) y los efectos celulares (viabilidad celular) del tratamiento con doxorubicina en líneas celulares de cáncer de mama

2. Validar un modelo ex vivo de cáncer de mama a partir de muestras quirúrgicas de esta patología, con el fin de caracterizar los efectos moleculares y celulares del tratamiento con doxorubicina en muestras humanas

3. Establecer un ensayo de inmunohistoquímica validado, robusto y reproducible destinado al estudio de la expresión de MKP-1 en muestras parafinadas de cáncer de mama
 - 3.1. Estudio del patrón de expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las MAPK (ERK, JNK y p38) en tejido mamario normal y en lesiones patológicas de la mama

 - 3.2. Analizar el papel de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las MAPK como factor pronóstico en una serie retrospectiva de pacientes con cáncer de mama

3. Material y métodos

3.1. Reactivos, anticuerpos y células

Para las diversas técnicas de estudio de proteínas empleadas y descritas en las siguientes secciones, se emplearon los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo policlonal de conejo contra la forma fosforilada de ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204 (Thr202/Tyr204), referencia #9101, de Cell Signalling Technology (Danvers, MA)
- Anticuerpo policlonal de conejo contra la forma total de ERK1/2, referencia #9102, de Cell Signalling Technology (Danvers, MA)
- Anticuerpo monoclonal de conejo contra la forma total de JNK, referencia #9252, de Cell Signalling Technology (Danvers, MA)
- Anticuerpo monoclonal de conejo contra la forma total de p38MAPK, referencia #9212, de Cell Signalling Technology (Danvers, MA)
- Anticuerpo monoclonal de conejo contra la forma fosforilada de p38MAPK en treonina 180 y tirosina 182, referencia #9211, de Cell Signalling Technology (Danvers, MA)
- Anticuerpo policlonal de conejo contra la forma fosforilada de JNK en treonina 183 y tirosina 185 (Thr183/Tyr185), de Promega, referencia #V7931 (Madison, Wi) para los ensayos de Western-blot
- Anticuerpo monoclonal de conejo contra la forma fosforilada de JNK en treonina 183 y tirosina 185 (Thr183/Tyr185) de Cell Signalling Technology (Danvers, MA), referencia #4668) para los estudios de inmunohistoquímica
- Anticuerpo policlonal de conejo contra MKP-1, código C-19 y referencia sc-370 de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA) para los ensayos de Western Blot
- Anticuerpo policlonal de conejo contra MKP-1, código V-15 y referencia sc-1199 de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA) para los estudios de inmunohistoquímica
- Anticuerpo policlonal de conejo contra MKP-1, código M-18 y referencia sc-1102 de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA)

- Anticuerpo monoclonal de conejo contra la forma truncada de caspasa 3 en aspártico 175 (Asp175), clon 5A1E y referencia 9664, de Cell Signalling Technology
- Anticuerpo monoclonal de ratón para los receptores de estrógenos, referencia #N1575 de Dako (Carpinteria, CA)
- Anticuerpo monoclonal de ratón para los receptores de progesterona, referencia #N1636 de Dako (Carpinteria, CA)
- Anticuerpo contra el receptor HER2 mediante el kit PharmaDx Herceptest, referencia #K5207), de Dako (Carpinteria, CA)
- Anticuerpo monoclonal de ratón contra p53, referencia # M7001, de Dako (Carpinteria, CA)
- Anticuerpo monoclonal del ratón, clon MIB-1, referencia # M7240, contra la proteína Ki67, de Dako (Carpinteria, CA)

La amplificación del gen HER2 se estudió en los tumores de mama mediante hibridación in situ de fluorescencia sobre cortes de parafina, utilizando el producto HER2-FISH PharmDx, referencia #K5331, de Dako.

La doxorubicina y el Ro-31-8220 utilizados en los experimentos se obtuvieron de Calbiochem. El inhibidor del proteasoma MG-132 se obtuvo de Millenium Pharmaceuticals (Cambridge, MT). La doxorubicina se empleó disuelta en agua bi-destilada inmediatamente antes de su uso, y el Ro-31-8220, se disolvió en DMSO, obteniendo unas concentraciones de almacenamiento de 10mM.

De la LGC-ATCC (American Type Culture Collection) se obtuvieron las líneas celulares humanas de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SKBR-3, MDA-MB-453 y BT-474. Estas líneas celulares crecen y se mantienen en el medio de cultivo habitual DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 10%, y añadiendo 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin con el objetivo de impedir el crecimiento de bacterias. Todo el material fungible necesario para las técnicas celulares se obtuvo de Gibco. Las células se cultivaron en un incubador húmedo a una temperatura de 37° C y con una concentración del 5% de CO₂. Para su crecimiento, se utilizaron frascos de cultivo de 75 cm² hasta alcanzar unas condiciones del 80% de confluencia

celular. Todos los experimentos descritos en este trabajo se realizaron en un máximo de 5 pases y por triplicado.

3.2. Análisis cuantitativo de expresión génica mediante ensayos de reacción de la cadena de la polimerasa (Real-time quantitative reverse transcription-PCR)

La reacción de la cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (Real-time Polymerase Chain Reaction, PCR) permite monitorizar en cada momento de la progresión de la PCR los niveles de DNA obtenido en la amplificación. Los datos se obtienen después de cada ciclo y al final del proceso. Siguiendo los protocolos habituales para la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron combinaciones de cebadores específicos, añadiendo sondas complementarias con marcaje fluorescente en el extremo 5' (FAM) y en el extremo 3' (TAMRA), para la secuencia del RNA mensajero (mRNA) de MKP-1. Se utilizaron como controles de los niveles de expresión endógena, cebadores y sondas específicas para los mRNA de 18S, β -actina y de la proteína ribosomal grande 0 (large ribosomal protein 0, RPLP0). Todos los reactivos para este ensayo se obtuvieron de Applied Biosystems.

El RNA total de las muestras se aisló y purificó mediante el sistema de columnas de afinidad de Qiagen (RNeasy kit) (Figura 3.1). De forma breve, esta extracción se realiza a temperatura ambiente y sigue los pasos:

- Lisado de las células con solución de trizol durante 15 minutos directamente sobre la placa de cultivo. Recoger el lisado, centrifugar y añadir al pellet 350 μ l de tampón RLT.
- Homogeneizar el lisado con pasos sucesivos por una aguja de 21G
- Añadir 1 volumen de etanol 70% y mezclar bien. No centrifugar
- Pipetear el lisado e introducirlo en una columna de afinidad de RNA con un tubo de 2 ml. Centrifugar durante 15 minutos a 13000rpm
- Añadir 700 μ l de tampón RW1 y centrifugar durante 15 minutos a 13000rpm
- Añadir 500 μ l de tampón RPE a la columna y centrifugar durante 15 minutos a 13000rpm

- Colocar un nuevo tubo de 2 ml, añadir 50 µl de agua bidestilada y sin RNasas (RNasa-free) para la elución final del RNA y centrifugar 1 minuto a 13000rpm. Repetir este mismo paso con el producto de la centrifugación para aumentar el rendimiento de la extracción

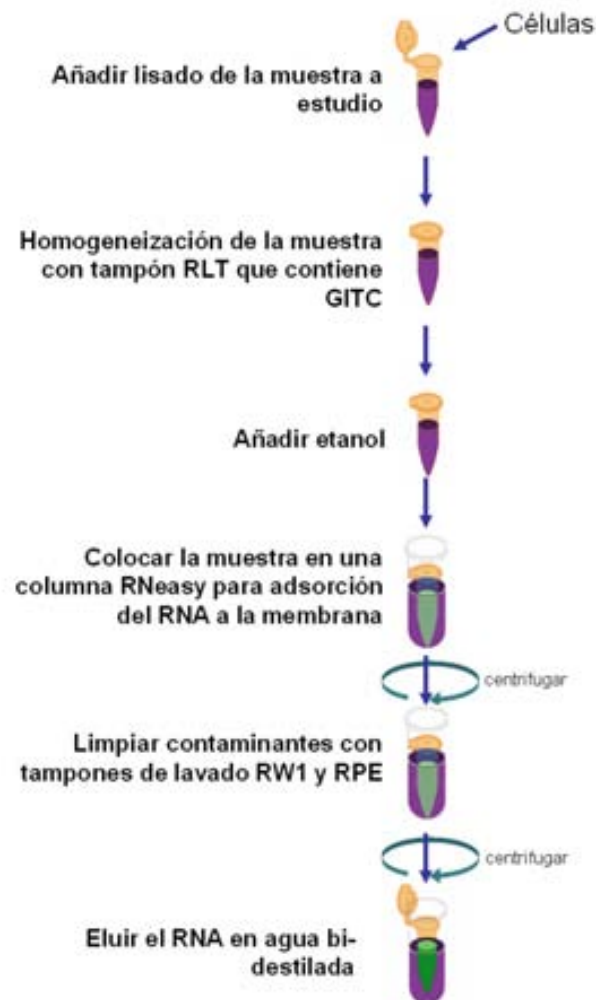


Figura 3.1. Purificación de RNA a partir de muestras celulares mediante el método de columnas de afinidad de Qiagen. La extracción de RNA de los tejidos sigue un proceso similar tras homogeneización del tejido desde 3 cortes de criostato de 10 µm cada una, y utilizando una digestión con proteinasa K a 0.1 mM durante 15 minutos, e incubada a 37°C.

A continuación, se sintetizó DNA complementario (cDNA) a este RNA aislado y purificado, mediante una reacción de PCR reversa y utilizando una retrotranscriptasa (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems), siguiendo el siguiente protocolo:

- Cuantificación del RNA mediante espectrofotometría en el sistema Nanodrop y electroforesis capilar en el sistema Agilent
- Preparación de 1000ng de cDNA a partir de la misma cantidad de RNA y de los componentes de tamponado 10x (2 µl), Random Primers 10x (2 µl), dNTP 25x (0.8 µl), inhibidores de proteasas (1 µl), enzima retrotranscriptasa RT (1 µl) hasta un volumen total de 6.8 µl por tubo de cDNA. Debe de completarse con el volumen necesario de agua RNAsa-free hasta el volumen final de la reacción (20 µl).
- Incubar la mezcla en un termociclador 5 minutos a 95°C, a continuación a 25°C durante 10 minutos, y seguidos de otra incubación de 50°C durante 50 minutos para la síntesis del cDNA. Finalmente la mezcla de reacción se somete a 85°C durante 5 minutos para inactivar la reversotranscriptasa y se mantiene a 4°C hasta su recogida.

Los cDNAs obtenidos de esta reacción reversa se combinaron a una concentración de 5.5 ng/µl con los cebadores y sondas específicas para cada uno de los genes estudiados, junto a la polimerasa TaqMan Gene Expression Master Mix, de Applied Biosystems, que contiene una mezcla de la enzima AmpliTaq Gold DNA Polimerasa ultra pura, Uracil-DNA Glicosilasa y los dTNPs con dUTP. Sus referencias fueron:

- MKP-1, código Hs-00610256-g1
- human β -actin, código Hs99999903_m1
- human 18s, código Hs99999901_s1
- human RPLPO, código Hs99999902_m1

De esta mezcla, se seleccionaron 10 µl, que se sometieron a un ensayo de PCR siguiendo los parámetros de una reacción a tiempo real en un equipo Applied ABI-7500HT, según el siguiente protocolo:

- incubación a 50° C, durante 2 minutos
- incubación a 95° C, durante 10 minutos
- incubación de 50 ciclos a 95° C, durante 15 segundos
- incubación a 60° C, durante 1 minuto

La amplificación de los productos en a reacción de PCR se verificó mediante la obtención de una curva estándar de fluorescencia y la realización posterior de una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 3% de los productos obtenidos de esta PCR. Se utilizaron como controles negativos tanto reacciones que no incluían transcriptasa inversa como reacciones que no partían de molde de cDNA. Los valores de umbral o de *threshold* Ct se establecieron mediante el programa informático SDS v2.2 (Applied Biosystems) sobre la mitad de la curva de crecimiento exponencial para cada uno de los genes de estudio. Los resultados de expresión de las muestras se compararon utilizando el método $\Delta\Delta Ct$, en el que se calcula la diferencia para cada punto entre la expresión del endógeno y el gen diana, hallando las medias para los diferentes experimentos y elevando este valor al valor del umbral seleccionado para los genes. Los resultados obtenidos indican la diferencia de expresión en escala logarítmica sobre un caso o experimento control denominado referencia.

3.3. Análisis de expresión de proteínas mediante ensayo de Western blot

El objetivo del estudio mediante Western blot fue determinar la expresión de las proteínas de interés en las muestras de diferente origen, tanto celulares como tisulares, evaluando de una forma semi-cuantitativa sus niveles y verificando el tamaño molecular de las proteínas analizadas.

En primer lugar, el ensayo de Western blot de las células se realizó a partir de un cultivo de las mismas en placas de 100 mm², sembrando hasta 1,7 x 10⁶ células por pocillo y permitiendo su adhesión durante toda la noche, según las condiciones de cultivo antes descritas¹⁹⁹. Estas células fueron tratadas en las distintas situaciones experimentales que se explican posteriormente. Tras un tiempo determinado de ensayo, las placas fueron lavadas generosamente con

PBS y las células posteriormente lisadas utilizando un tampón Nonidet P-40 (Tris-HCl, a un pH de 7.4 y una concentración de 50mM, NaCl a 150mM, 1% de NP40, EDTA a 5mM, NaF a 5mM, Na_3VO_4 a 2 mM, PMSF a 1 mM, leu-peptina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y aprotinina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), previamente enfriado a una temperatura de 4° C en baño. Tras agitar las muestras obtenidas con esta solución durante 30 minutos a esta temperatura de 4° C, se centrifugaron a 13200 rpm durante 30 minutos. Tras esta centrifugación, el sobrenadante obtenido correspondiente a las proteínas aisladas, se alicotó y almacenó a una temperatura de -20° C hasta el momento del ensayo de Western blot.

Se realizó también el estudio de proteínas mediante este ensayo de Western blot sobre una serie de 10 muestras de tejido humano congeladas y almacenadas a -80° C, procedentes de diversos tumores de mama obtenidos en fresco²⁰⁰. La representatividad tumoral y su naturaleza se confirmaron mediante el estudio microscópico de un corte fino de criostato de 4 μm teñido con hematoxilina-eosina y realizado a partir de la misma muestra montada sobre una pletina embebida con medio OCT. Sólo se aceptaron para el estudio mediante Western blot, aquellas muestras cuyo componente tumoral era del 50% o mayor. Para confirmar la preservación de las proteínas contenidas en el tejido y evitar la aparición de artefactos en los experimentos, se emplearon inhibidores de su degradación. Aproximadamente se empleó 0,1g de tejido tumoral, que fue descongelado y sumergido en una solución con inhibidores de la proteasa (1% de aprotinina, 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilina y 10 g/ml de leupeptina) e inhibidores de la fosfatasa (2 mM de ortovanadato de sodio).

De las proteínas obtenidas, tanto de los lisados celulares como de las muestras tumorales congeladas, se tomaron entre 15 y 30 μg , según en marcador a estudio, y fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membranas de nylon. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios específicos y se reveló con anticuerpos secundarios de cabra marcados con peroxidasa de rábano, del sistema Elite ABC de Vector Laboratories, tras lo que se detectaron con una reacción con sustrato sensible a la peroxidasa y quimioluminiscente (Biozol) mediante el uso del sistema Enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit, de Amersham Pharmacia Biotech, y

utilizando una película fotosensible para su visualización. Los tamaños de las proteínas se estimaron mediante los marcadores comerciales habituales y se utilizó un anticuerpo contra la α -Tubulina de Sigma, referencia T-5238, como control de carga para cada uno de los pocillos.

3.4. Ensayo *in vitro* de viabilidad celular

El ensayo de proliferación y de viabilidad celular se realizó utilizando el método colorimétrico de MTS-CellTiter96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit, de Promega. Este ensayo es una modificación del ensayo clásico de MTT y se basa en el uso de dos soluciones: un compuesto de tetrazolio (MTS) y un reactivo de carga de electrones (phenazine methosulfate, PMS). El MTS es bio-reducido en un producto de formazán, que resulta hidrosoluble, por las células metabólicamente activas, que utilizan sus enzimas dehidrogenasas. La cantidad de formazán medida mediante un espectrofotómetro a una absorbancia de 490nm, es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo celular.

De esta forma, las mismas células se sembraron en placas de 6 pocillos, en una cantidad de 3×10^5 células por pocillo, y añadiendo 2 ml de medio de cultivo en cada uno de los pocillos, se permitió su adherencia a la placa durante toda la noche. A continuación, las células fueron tratadas en las diferentes condiciones descritas posteriormente en la sección de resultados. Las placas se mantuvieron durante 24-72 horas, se añadieron tras este tiempo 20 μ L de MTS/PMS y fueron incubadas 2-4 horas de nuevo. Tras este tiempo, se midió la cantidad de formazán soluble utilizando un espectrofotómetro de microplacas a 490nm (longitud de onda del test) y a 690nm (longitud de onda de referencia). La proporción de células vivas en cada condición de tratamiento se estimó dividiendo la diferencia ($A_{490nm} - A_{690nm}$) en las células tratadas con ($A_{490nm} - A_{690nm}$) en las células control.

3.5. Datos clínicos, selección de material tisular para el estudio clínico-patológico y construcción de matrices de tejidos

3.5.1. Selección de casos

El actual estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital del Mar y realizado según las directrices de la institución respecto al manejo de muestras procedentes de pacientes. Se recopilaron de forma retrospectiva bloques de tejido tumoral, fijados en formol y embebidos en parafina, del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital. Estos bloques procedían de especímenes quirúrgicos de pacientes diagnosticadas histológicamente de cáncer de mama. Además, estas muestras incluían tejido mamario morfológicamente normal, lesiones de hiperplasia usual de mama y lesiones de carcinoma ductal in situ.

3.5.2. Variables clínicas e histopatológicas

3.5.2.1. Variables clínicas

Los datos de seguimiento clínico se obtuvieron de las historias de las pacientes, recogiendo los siguientes parámetros:

- Número de biopsia
- Número de historia clínica
- Edad en el momento del diagnóstico y fecha de nacimiento
- Número de ganglios aislados y número de ganglios afectados
- Tamaño tumoral (diámetro máximo en milímetros)
- Estadio pTNM y de la OMS
- Grado del tumor
- Expresión de receptores de estrógenos
- Expresión de receptores de progesterona
- Amplificación y/o sobre-expresión de HER 2
- Sobre-expresión de p53
- Índice de proliferación Ki67
- Estado hormonal (menopausia)

- Fecha de diagnóstico
- Fecha de la cirugía
- Tipo de cirugía de mama
- Tratamiento de quimioterapia adyuvante
- Esquema de quimioterapia
- Tratamiento hormonal
- Tipo de tratamiento hormonal
- Tratamiento de radioterapia
- Recaída
- Fecha de recaída
- Tipo de recaída
- Localización de la recaída
- Tiempo a la progresión
- Fecha del último control
- Estado en el último control

Se consideró como recidiva de la enfermedad cualquier recurrencia primaria, regional o a distancia del tumor, así como la aparición de un segundo tumor. Todos los datos se introdujeron en una base de datos basada en la hoja de cálculo Excel.

3.5.2.2. Variables histopatológicas

Para el estudio histopatológico, todas las muestras previamente seleccionadas fueron inicialmente fijadas en formol al 10%, y posteriormente incluidas en parafina. De las mismas se realizaron cortes de 3 micras, que se tiñeron con hematoxilina-eosina convencional. Los grados histológicos de los tumores se evaluaron según los criterios de Scarff-Bloom-Richardson, modificados por Elston ²⁰¹. La expresión de los receptores de estrógenos (ER) y de progesterona (PR) se determinó mediante inmunohistoquímica en el momento del diagnóstico, recuperando dicha información posteriormente para el actual estudio. La sobre-expresión de HER2 se evaluó por inmunohistoquímica y su amplificación mediante Hibridación in situ de Fluorescencia (FISH), siguiendo las actuales recomendaciones del College of American Pathology (CAP) ²⁰²,

que establecen sobre-expresión como tinción de membrana completa y de intensidad fuerte en más del 30% del tumor y amplificación como un ratio mayor o igual a 2,2 entre el número de copias del gen de HER2 y el número de centrómeros del cromosoma 17 en un mínimo de 50 células tumorales.

El estadiaje de las lesiones se realizó siguiendo las normas TNM (Tumor, Nodos –ganglios afectos-, Metástasis) del sistema de clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) para el cáncer de mama en su última versión²⁰³.

3.5.3. Realización de las matrices tisulares o tissue microarrays

Se diseñó una matriz de tejidos (Tissue Microarray, TMA) sobre las muestras de tejido tumoral seleccionadas según se ha descrito por el grupo de Kallioniemi y colaboradores²⁰⁴. Su realización siguió estos pasos:

1. **Selección del material:** En cada una de las preparaciones histológicas, se seleccionaron tres áreas representativas de la lesión con la ayuda del microscopio óptico, con el máximo volumen de células proliferantes e intentando incluir el borde más infiltrante del tumor, evitando las zonas de necrosis y de esclerosis tumoral. Se marcó con un rotulador el punto correspondiente a cada una de las zonas elegidas.

2. **Diseño de la matriz de tejidos:** Es uno de los puntos críticos en la realización de esta técnica. Para nuestro estudio se confeccionó una plantilla o modelo a seguir en la construcción del array, con la ayuda del programa informático Excel de Microsoft, y conociendo el número de casos que se van a utilizar, con la distribución final de los casos y los controles en el bloque receptor. Para poder tener localizado cada caso, se diseña esta matriz con una distribución irregular y diferente en cada uno de los extremos, marcando unas coordenadas según la fila y la columna, siguiendo la plantilla realizada.

3. **Selección del bloque donante:** Una vez que se han seleccionado los cortes más representativos de cada caso, se eligieron los bloques correspondientes en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica. De cada uno de los casos se

escogió el bloque que presentaba la mejor relación grosor-representatividad tumoral. Estas áreas seleccionadas debían estar bien preservadas y presentar una morfología adecuada, siendo representativas de las características del tumor

4. Igualación de los bloques donantes: Para intentar homogeneizar al máximo la técnica, se rehicieron los bloques seleccionados con el mismo tipo de parafina, con el objetivo de intentar igualar el grosor de la parafina en todos ellos. Se esta forma, se garantizó un grosor medio de los bloques donantes utilizados para la construcción del TMA de 2mm, suficiente para obtener un número de secciones histológicas para los marcadores planteados en el estudio, así como para tratar de obtener un rendimiento máximo desde las primeras secciones, garantizando la representatividad del mayor número de puntos desde el inicio.

5. Selección de la zona a perforar en el bloque donante: Una vez que se ha escogido la preparación histológica y el bloque de parafina seleccionados de cada caso, se enfrenta la preparación histológica con el bloque de parafina correspondiente y se marcan las zonas elegidas en el boque donante con un rotulador, tal y como se hizo previamente sobre las preparaciones histológicas.

6. Preparación del bloque receptor: Se preparó un bloque de parafina en blanco destinado a ser utilizado como receptor de las muestras tisulares obtenidas de los bloques donantes. Es importante que no existan alteraciones de la homogeneidad de la parafina, como agujeros o burbujas de aire aparecidas durante la preparación del bloque antes de empezar a insertar los cilindros.

7. Construcción de la matriz de tejidos: Para su construcción se emplea una estación de trabajo de TMA T1000 de Chemicon (Temecula, CA), dotado de un carro portabloques, que contiene los bloques donante y receptor, una lupa binocular que permite confirmar la zona escogida directamente sobre el portaobjetos teñido con hematoxilina-eosina correspondiente, medición digital

micrométrica en los ejes X e Y, y agujas de 1 mm de diámetro con fiadores internos. La aguja más gruesa de cada juego es la que hace la perforación en el bloque donante, y la más pequeña hace el cilindro en el bloque receptor. Se debe de ajustar la profundidad de descenso de las agujas (aproximadamente unos 3 mm). Una vez ajustado el bloque receptor en el portabloques de modo que la superficie del bloque sea paralela a la placa base, se efectúa el agujero correspondiente en el bloque de parafina receptor. A continuación se realiza en la posición primera de la matriz una perforación con la aguja sobre el bloque receptor. Después se desliza el carro portabloques y se coloca el bloque receptor por debajo de la aguja que contiene el cilindro de tejido del bloque donante. Se pincha el bloque sobre el orificio del bloque receptor y se expulsa el cilindro de tejido mediante el fiador de la aguja, exactamente encima del agujero realizado en la parafina, de modo que quede justo a nivel de la parafina, sin hundirlo. Este mecanismo se repite para cada uno de los cilindros hasta la finalización del tissue array.

De cada bloque seleccionado se toman tres cilindros o cores correspondientes a las zonas previamente marcadas, y se colocan en filas y en columnas, siguiendo la plantilla previamente diseñada, separados unos de otros por una distancia aproximada de 1mm. En total, para el estudio se obtuvieron 8 tissue microarrays, cada uno de los cuales contenía tres cilindros de cada caso problema. Tras realizar la técnica, los bloques donantes muestran una mínima pérdida del volumen tumoral. Una vez terminado el bloque receptor, se introduce en una estufa a 37°C durante 15 minutos, aproximadamente, lo que facilita que los cilindros de tejido se adhieran mejor a la parafina en los agujeros del bloque receptor, evitando la pérdida de cores en el momento del corte.

8. Corte de los bloques de las matrices de tejidos: Finalmente, se realizó sobre el bloque donante un corte histológico de 4 μ m, teñido con hematoxilina-eosina para verificar la presencia de las áreas seleccionadas de las lesiones originales. A continuación del primer corte, se realizaron 30 cortes de 3 micras cada uno, de cada uno de los bloques receptores, empleando para ello la técnica tradicional de microtomía: enfriando ligeramente los bloques antes de

cortarlos, con baño de agua caliente para extender completamente los cortes obtenidos y utilizando portaobjetos cargados electrostáticamente. Tras el corte, las secciones se estufaron a 60°C durante 3 horas para garantizar la adhesión completa del tejido al portaobjetos. Tras este paso, los cortes se bañaron generosamente en parafina para garantizar la conservación de los antígenos del tejido durante un periodo de tiempo prolongado.

Se seleccionaron de esta misma serie 30 casos, de los que se obtuvieron secciones completas de tejido para demostrar la correlación de los parámetros estudiados con los datos obtenidos de los cortes de las matrices de tejidos y validar la metodología.

3.6. Exposición *ex vivo* de tumores humanos a la doxorubicina

Además del estudio sobre los tumores de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, recuperadas del archivo de Anatomía Patológica, se recogieron prospectivamente nuevos casos de tumores malignos de mama para estudiar los efectos moleculares de la doxorubicina sobre estos tejidos. Este modelo de experimentación *ex vivo*, se realizó a partir de pequeños fragmentos seleccionados de los nuevos tumores de mama una vez resecados de las pacientes, según la experiencia previa de la Dra. B. Bellosillo y el Dr. Tusquets, miembros de nuestro grupo de investigación. Para seleccionar un tumor, éste debía de presentar un diámetro superior a 15 mm, ser obtenidos de especímenes quirúrgicos de mastectomías o tumorectomías, y su obtención no debía de comprometer el adecuado diagnóstico morfológico de los mismos. Las muestras se obtuvieron en las máximas condiciones de esterilidad e inmediatamente después de la extracción de la pieza quirúrgica.

El procedimiento requirió la selección de dos pequeños fragmentos de tumor, de aproximadamente 8 mm³, cada uno. El primero de los fragmentos, denominado muestra control, se introdujo en medio de cultivo con suero bovino fetal al 10%, y el segundo de los fragmentos, denominado muestra tratada, en el mismo medio suplementado con la doxorubicina a una concentración de 2 µg/ml, considerada equivalente a las concentraciones plasmáticas alcanzadas en pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia ²⁰⁵. Ambos

fragmentos se mantuvieron en condiciones de cultivo en placas de 24 pocillos, a 37° C y en una atmósfera constante de CO₂ durante 24 horas. Tras estas 24 horas, los fragmentos se extrajeron y fijaron en una solución de formol tamponado al 10% durante 16 horas, a temperatura ambiente, para ser posteriormente embebidas en parafina en condiciones de vacío mediante un procesador automático. Estas muestras se utilizaron para los estudios de expresión de proteínas mediante ensayos de inmunohistoquímica (Figura 3.2).

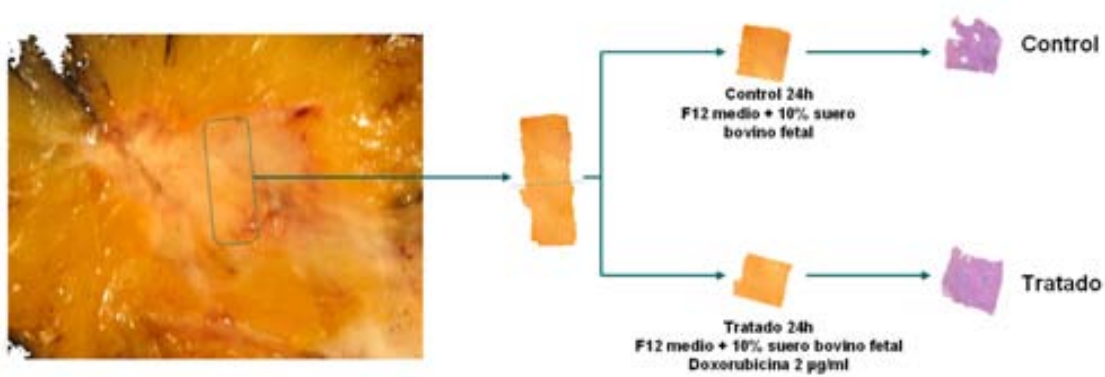


Figura 3.2. Esquema de obtención de las muestras para el modelo ex vivo de exposición de tumores a drogas terapéuticas. El primer fragmento se mantiene 24 horas en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal al 10%, y el segundo de los fragmentos en este medio con doxorubicina a una concentración de 2 µg/ml. Tras 24 horas, ambas muestras se fijan en formol y procesan en parafina.

3.7. Ensayos de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica e inmunocitoquímica

3.7.1. Técnica de inmunohistoquímica

Las inmunotinciones se realizaron sobre secciones de tejido de 3 micras de grosor, montadas sobre cristales portaobjetos con carga electrostática. Tras el

proceso de desparafinización e hidratación en una batería de xilol, alcoholes con graduación decreciente (absoluto, 96° y 70°) y agua bidestilada, se realizó el proceso de desenmascaramiento antigénico, utilizando diferentes soluciones:

- solución basada en EDTA tamponada a pH9 (Dako), para los ensayos de MKP-1, JNK y p-JNK
- solución basada en citrato tamponada a pH8 (Ventana), para los ensayos de ERK1/2, p-ERK1/2, p-p38 y p38.

Este desenmascaramiento se consiguió sumergiendo las secciones en la solución correspondiente y calentando la misma a 110°C durante 3 minutos en un autoclave SA-260FA.

Tras el desenmascaramiento, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena del tejido mediante una incubación de las secciones en una solución al 0,03% de peróxido de hidrógeno durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron lavados enérgicos con una solución salina tamponada a pH 7.6 de Tris, que contiene Tween 20, durante 5 minutos. A continuación se realizó la incubación con los anticuerpos primarios durante 60 minutos, a temperatura ambiente. La unión anticuerpo-antígeno se evidenció con la utilización de polímeros (EnVision, Dako) y multímeros (OmniMap, Ventana), conjugados a inmunoglobulinas específicas al anticuerpo primario empleado, y marcados con peroxidasa. Estas reacciones se revelaron mediante el uso de 3,3'-diaminobencidina como cromógeno, durante 5 minutos, seguido de tinción suave con hematoxilina. Todas estas técnicas se realizaron de forma automática mediante el uso del Dako Link y del Discovery XT de Ventana. De forma esquemática, el protocolo seguido fue el siguiente para la técnica de inmunohistoquímica basada en EnVision:

1. Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena:

Incubar con peróxido de hidrógeno al 3% (Blocking Solution DAKO), 5 minutos a temperatura ambiente.

Lavar con TBS (DAKO) durante 10 minutos

Este paso se puede hacer en cualquier momento antes de añadir la peroxidasa.

2. Añadir anticuerpo primario:

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Lavar con solución de lavado DAKO (TBS).

3. Añadir polímero de dextrano específico marcado

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Lavar con solución de lavado DAKO (TBS) o PBS.

4. Añadir la solución de sustrato-cromógeno DAB

Incubar 5 minutos

Lavar con agua destilada.

5. Contrateñir con hematoxilina DAKO

Incubar 2-5 minutos.

Lavar con agua destilada.

6. Montar las preparaciones, después de deshidratar con etanol y xilol.

El protocolo seguido para la técnica de inmunohistoquímica basada en OmniMap fue el siguiente, bajo incubación en cámara de aceite mineral y de temperatura controlada:

1. Incubación con anticuerpo primario:

Incubar 30 minutos a 37°C.

Lavar con solución de lavado TBS de Ventana.

2. Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena:

Incubar con la solución bloqueante (Inhibitor CM Ventana), 10 minutos a 37°C.

Lavar con TBS (DAKO) durante 10 minutos

3. Añadir multímero específico conjugado con peroxidasa

Incubar 15 minutos a 37°C.

Lavar con solución de lavado TBS de Ventana.

4. Añadir la solución de sustrato-cromógeno DAB-CM de Ventana en presencia de sales de cobre (Cooper CM de Ventana)

Incubar 5 minutos a 37°C.

Lavar con TBS de Ventana.

5. Contrateñir con hematoxilina acuosa de Ventana

Incubar 2 minutos.

Lavar con agua destilada.

6. Montar las preparaciones, después de deshidratar con etanol y xilol.

Como controles negativos, se incubaron secciones de los mismos casos, sustituyendo el anticuerpo primario con un suero no inmunizado de la misma especie. Como control positivo, se utilizó un caso con una expresión ya conocida de cada una de las proteínas estudiadas.

Además de los tejidos humanos, se procesaron de la misma forma tejidos procedentes de ratones silvestres y mutados para MKP-1¹³⁰, procedentes de Bristol-Myers Squibb Co.

3.7.2. Evaluación de los marcadores de inmunohistoquímica

La expresión de los marcadores se evaluó sin acceso a la información clínica hasta la finalización del estudio. La proteína MKP-1 se detectó en las células epiteliales del tejido mamario morfológicamente normal, y su expresión fue semejante en todos los casos estudiados. Sobre esta base, se estableció este nivel de expresión de MKP-1 como corte o umbral para definir aquellos tejidos con sobre-expresión de MKP-1 y los tejidos sin sobre-expresión de la proteína. Así, se consideró sobre-expresión cuando el nivel de tinción observado en el núcleo de las células tumorales era superior al observado en las células epiteliales de la mama morfológicamente normales, y sin sobre-expresión cuando esta tinción era igual o menor.

La expresión de las MAPK, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK, p38 y p-p38, se observó en el núcleo de las células. Las correspondientes formas fosforiladas o activas se evaluaron considerando el porcentaje de células con expresión nuclear, y estableciendo como umbral de positividad el 1% de las células^{200, 206}. Las formas totales, además, se expresaron en el citoplasma de estas mismas células como reflejo de la forma no fosforilada de la proteína.

Para el resto de marcadores, se calculó una escala de expresión semi-cuantitativa, denominada Histo-score (H-score), que considera el porcentaje de células con expresión y la intensidad de la misma. La intensidad se evalúa en 4 categorías: negativa (valor 0), débil (valor 1), intermedia (valor 2) y fuerte (valor 3). El H-score se calcula aplicando un factor de corrección o de peso al porcentaje en cada una de las intensidades de expresión, de acuerdo a la siguiente fórmula:

H-score = (expresión baja %) x 1 + (expresión intermedia %) x 2 + (expresión fuerte %) x 3.

Los resultados de este cálculo oscilan en un rango entre 0 y 300.

3.7.3. Técnica de inmunocitoquímica

Los estudios de inmunocitoquímica destinados a la validación de los anticuerpos contra MKP-1 se realizaron en pequeños portaobjetos circulares de 1 cm de diámetro, tapizados por una monocapa de células BT-474, mantenidas en distintas condiciones de tratamiento. Para obtener estos portaobjetos, se colocaron los mismos en el interior de seis placas convencionales de cultivo de 5 cm de diámetro, y se sembraron las células BT-474 en las condiciones antes mencionadas. Tras conseguir una confluencia celular del 80%, se realizaron los tratamientos. A continuación, los portaobjetos fueron retirados de la placa de cultivo y fijados en una solución de metanol y acetona al 50% a temperatura ambiente durante 15 minutos, para posteriormente realizar las determinaciones de la expresión de MKP-1 mediante una técnica de inmunocitoquímica, utilizando para ello los tres anticuerpos seleccionados frente a MKP-1 (V-15, M-18 y C-19) en las mismas condiciones que en los ensayos de inmunohistoquímica y utilizando el sistema de detección EnVision+ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se empleó la diaminobencidina como cromógeno durante 5 minutos, seguida de una contratinción suave con hematoxilina. Todas estas técnicas se realizaron de forma automática mediante el uso de la plataforma Dako Link.

El resto de células BT-474 de cada una de las placas en las distintas condiciones experimentales se lisaron, aislando las proteínas de las mismas para su análisis mediante un ensayo de Western-blot, que se utilizó como referencia de la expresión de MKP-1.

3.8. Técnica de hibridación in situ de fluorescencia para HER2

El estado del gen que codifica HER2 se determinó mediante el test de hibridación in situ de fluorescencia Pathvysion (Abbot-Vysis Diagnostics). Secciones de 5 µm de tejido se desparafinizaron y rehidrataron, y

posteriormente se calentaron en la Pre-Treatment Solution (solución de pretratamiento) durante 10 minutos. A continuación, se realizó una digestión proteolítica utilizando la Ready-to-use Pepsin (pepsina lista para su uso) a 37°C en un horno de hibridación durante 12 minutos. Tras los pasos de calentamiento y pretratamiento proteolítico, se utilizó una mezcla de las sondas de FISH basadas en una combinación de tecnología de PNA (ácido nucleico peptídico) y de ADN. Esta mezcla de sondas de ADN incluye sondas marcadas con Rodamina, que cubren una región de 218 kb y que incluye el gen HER2 en el cromosoma 17, y una mezcla de sondas de PNA marcadas con fluoresceína cuya diana es la región centromérica del cromosoma 17. La hibridación específica de ambas dianas condujo a la formación de una señal fluorescente roja-naranja bien definida en cada locus del gen HER2, así como de una señal fluorescente verde correspondiente al centrómero de cada cromosoma 17. Tras el lavado astringente, las muestras se montaron con un medio de montaje fluorescente que contiene DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) y se cubrieron con un cubreobjetos. Con un microscopio de fluorescencia se estudiaron al menos 60 células representativas del componente tumoral infiltrante, estableciendo el número de señales rojas del gen HER2 y de señales verdes del centrómero del cromosoma 17. Siguiendo las recomendaciones del CAP-ASCO, aquellos casos con ratios o cocientes entre ambas señales mayores de 2.2 se consideraron como amplificados.

3.9. Técnica de estudio de apoptosis mediante TUNEL

La apoptosis se estudio mediante el ensayo de TUNEL (TdT-UTP-End Labelling) sobre secciones de tejidos idénticas a las utilizadas en inmunohistoquímica. Como sonda para detectar las células que han iniciado la apoptosis, se empleó la 16-dUTP-Tdt marcada con fluoresceína (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) tras digestión con proteinasa K del tejido durante 15 minutos, manteniéndola en incubación durante una hora. El tejido se montó con DAPI con objeto de marcar los núcleos en fluorescencia azul. Las secciones se estudiaron mediante un microscopio de fluorescencia con filtro para FITC y con filtro UV para detectar el DAPI y localizar las regiones de

interés. Se calculó un índice apoptótico como el porcentaje de células con fluorescencia verde en 10 campos de gran aumento (x400 de magnificación).

3.10. Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó utilizando el paquete informático SPSS versión inglesa 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL), considerando todos los cálculos hasta el nivel de significancia de 0.05. Las correlaciones entre la expresión de MKP-1 y las variables clínico-patológicas se realizaron aplicando el test χ^2 (Fisher exact test) y el test U de Mann Whitney. También se utilizó el test T de muestras pareadas para comparar la expresión de los diferentes marcadores, expresada como Histo-score, entre las muestras control y las muestras tratadas con doxorubicina del ensayo ex vivo. Los resultados de este test se expresaron de forma visual, agrupando los diferentes patrones de expresión mediante un análisis no supervisado de tipo jerárquico, utilizando las medias como método de agrupación. Mediante esta agrupación, se establecieron relaciones entre los diferentes casos y los patrones de expresión de los marcadores^{207, 208}. El estudio de supervivencia se realizó aplicando el test de rangos en escala logarítmica de Kaplan-Meier. El análisis multivariado se calculó incluyendo todas las variables cuantitativas y cualitativas mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

4. Resultados

4.1. La doxorubicina modifica la expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las MAPK en líneas celulares de cáncer de mama

Varios trabajos científicos en los últimos años han demostrado que el tratamiento con doxorubicina disminuye de una forma significativa los niveles de expresión de MKP-1 en líneas celulares humanas de cáncer de mama. La importancia de este hecho es que la reducción de MKP-1 por diferentes métodos parece aumentar, al menos en estos modelos, la sensibilidad de las líneas de cáncer al tratamiento con fármacos anti-tumorales que inducen la expresión de MKP-1, como algunos agentes quimioterápicos¹⁷⁸.

De esta forma, el primer grupo de experimentos realizados estaba dirigido a confirmar estos efectos de la doxorubicina sobre la expresión de MKP-1, utilizando como modelos las líneas celulares de cáncer de mama disponibles en el laboratorio y, posteriormente, caracterizar las modificaciones secundarias producidas en las formas fosforiladas o activas de las diferentes MAPK que participan en la señalización celular.

El primer experimento estaba destinado a medir el efecto citotóxico de la doxorubicina mediante la utilización de un ensayo de viabilidad celular tipo MTS, medido a un tiempo de 48 horas, en un panel de líneas de cáncer de mama que incluía las células MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SKBR-3, BT-474 y MCF-7 (Figura 4.1). La doxorubicina se empleó a las dosis de 0,5nM, 5nM, 0,05µM, 0,5µM, 5µM, 10µM, 25µM, 50µM y 100µM. Los resultados obtenidos confirmaron el efecto citotóxico de la doxorubicina a 48 horas sobre este panel de líneas, tal y como habían sido publicados por diferentes grupos en años recientes. La IC₅₀ para las células estudiadas se pudo calcular entre 5µM, en MDA-MB-453, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y SKBR-3, las más sensibles, y 20µM, en MCF-7 y BT-474, las más resistentes.

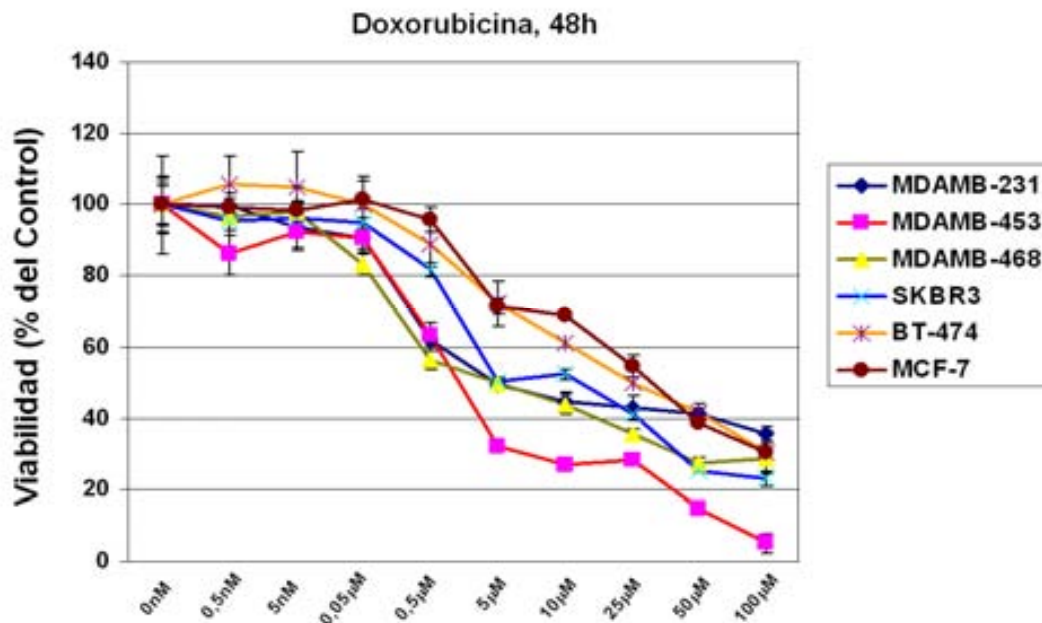


Figura 4.1. Ensayo de viabilidad celular tipo MTS sobre un panel de líneas de cáncer de mama. Se trataron con dosis de doxorubicina (0,5nM, 5nM, 0,05µM, 0,5µM, 5µM, 10µM, 25µM, 50µM y 100µM). La viabilidad celular está ajustada a los niveles de viabilidad observados en el control a las 48 horas del inicio del experimento.

A continuación, se estudiaron los efectos producidos a nivel de RNAm y de proteína en estas mismas líneas celulares tratadas con las concentraciones de doxorubicina alrededor de la IC50 (5 y 20µM) sobre la expresión de MKP-1, explorados a 4 y a 8 horas de tratamiento. Para ello se diseñó un experimento basado en un ensayo simultáneo o *multiplex* de PCR a tiempo real, utilizando el RNA mensajero obtenido de una de las células del panel, BT-474, en las diferentes condiciones del ensayo. En esta PCR a tiempo real se utilizó la expresión del gen de RPLPO como endógeno o referencia para medir las modificaciones en MKP-1 a partir de los niveles observados en la situación basal o control. De forma concordante a lo detectado en el ensayo de viabilidad celular, este experimento demostró una importante reducción de los transcritos del gen de MKP-1, siguiendo un patrón dosis y tiempo dependiente, en las células BT-474 tratadas con doxorubicina respecto a estas mismas células en condiciones de control. Característicamente, los niveles de

RNA mensajero del gen referencia RPLPO no se modificaron de forma significativa en las distintas condiciones del experimento (Figura 4.2). Así, en la concentración de 5 μ M indujo una reducción de MKP-1 del 46% a las 4 horas y del 83% a las 8 horas. El tratamiento a 20 μ M redujo la expresión de los transcritos de MKP-1 hasta en un 97% a las 4 horas y en más del 99% a las 8 horas.

Este ensayo se realizó de forma independiente y por triplicado a partir de tres experimentos completos, confirmando los mismos resultados. Para validar los hallazgos obtenidos, en nuevos experimentos de PCR a tiempo real se determinaron los niveles de MKP-1 en las mismas condiciones de ensayo aunque utilizado otros dos genes referencia, la β -actina y el de la proteína 18S, obteniéndose resultados similares a los descritos con RPLPO. Finalmente, se determinaron también los niveles de expresión de MKP-1 en las mismas condiciones de tratamiento en las líneas MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-453, SKBR-3 y MCF-7, mostrando en mismo patrón de inhibición de su expresión tiempo y dosis dependiente, con un rango de cambio en el tratamiento a 5 μ M entre 33 y 58% a las 4 horas y del 61 y 90% a las 8 horas y en el tratamiento a 20 μ M entre 91 y 99% a las 4 horas y en todas las condiciones del más del 99% a las 8 horas.

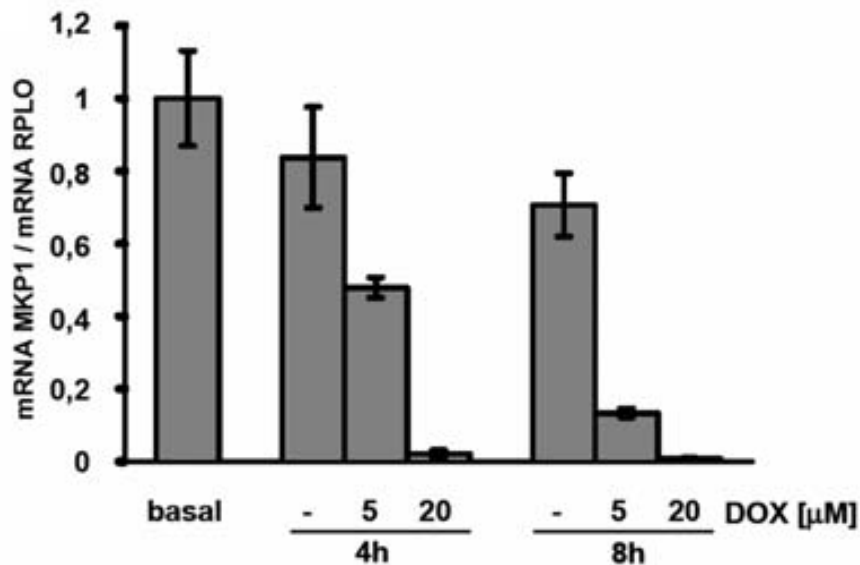


Figura 4.2. Expresión de MKP-1 mediante PCR a tiempo real desde cDNA construido sobre transcritos de mRNA en la línea BT-474. Se analizaron los niveles de expresión en condiciones basales y tras tratamiento con doxorubicina a 4 y 8 horas y a concentraciones de 5 y 20 μM . Los valores están ajustados a la expresión de RPLPO como gen endógeno y al valor basal como referencia. Se observa una inhibición profunda de MKP-1 de forma dosis y tiempo dependiente, alcanzando un bloqueo casi completo en la dosis más alta y al tiempo más largo explorado

Los siguientes experimentos abordaron el estudio de la expresión de MKP-1 a nivel de proteína y cómo ésta se modificaba con el tratamiento con doxorubicina. Mediante un ensayo de Western-blot a partir de lisados de las mismas células BT-474 en las condiciones de tratamiento con doxorubicina a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 50 μM , durante 4 horas, se demostró un efecto similar dosis dependiente de reducción de los niveles de proteína de MKP-1. Como se observa en la Figura IV.3, se alcanzó una reducción significativa a dosis iguales o superiores de 5 μM de doxorubicina.

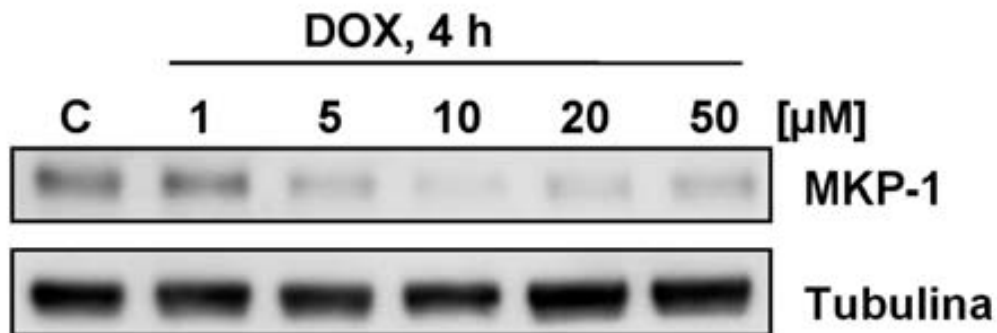


Figura 4.3. Expresión de MKP-1 mediante Western blot sobre células BT-474, en condiciones basales y de tratamiento con doxorubicina a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 50 μM , durante 4 horas

En los experimentos de Western-blot ensayando diferentes tiempos de tratamiento con doxorubicina (experimento *time-course*), se demostró que la reducción observada de los niveles de proteína de MKP-1 era evidente ya a las 4 horas de tratamiento con doxorubicina a la concentración de 5 μM y máxima a las 8 horas, confirmando los hallazgos obtenidos del análisis de transcritos (Figura 4.4). Esta inhibición de MKP-1 se mantenía hasta las 24 horas, último tiempo explorado en nuestros experimentos. Resultados similares a estos en la expresión de MKP-1 se pudieron detectar utilizando concentraciones de doxorubicina de 20 y 50 μM .

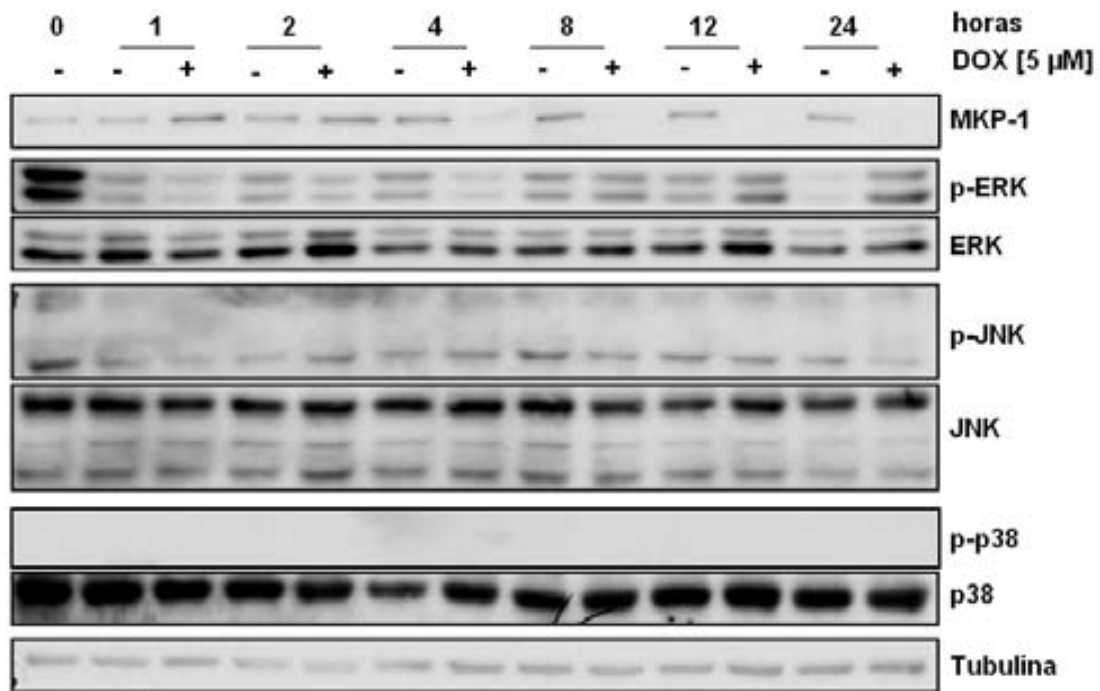


Figura 4.4. Experimento time-course de los efectos de la doxorubicina en el tiempo sobre la expresión de MKP-1. La expresión de MKP-1 se estudió mediante Western blot sobre células BT-474, en condiciones basales y de tratamiento con doxorubicina a concentración de 5 µM, durante 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Se observan los efectos de la doxorubicina sobre las formas totales y fosforiladas de ERK, JNK y p38

De forma complementaria al estudio de la expresión de MKP-1 y los cambios inducidos por la doxorubicina, el siguiente grupo de experimentos se encaminó a estudiar las modificaciones de los diferentes miembros de las vías de señalización de las MAPK. De forma interesante, el descenso de MKP-1 observado en las células BT-474 precede en el tiempo a un incremento de la expresión de las formas fosforiladas de los diferentes miembros de la familia de las MAPK. De esta forma, la expresión de la forma fosforilada de ERK1/2 aumenta de una forma dosis y tiempo dependiente: a concentraciones de 5 µM de doxorubicina, la expresión de p-ERK1/2 se incrementa a las 12 horas de tratamiento (Figura 4.4), mientras que a concentraciones superiores de doxorubicina, este incremento es detectado ya a las 8 horas (Figura 4.4). El

aumento de la expresión de la forma fosforilada de JNK por doxorubicina se observa a concentraciones de 20 μ M o superiores (Figuras 4.5 y 4.6). Por último, la forma fosforilada de p38 no fue detectada en ninguna de la condiciones ensayadas utilizando la línea BT-474. Como control de este experimento, se utilizaron células Jurkat ²⁰⁹ estimuladas con PHA, que demostraron una expresión inequívoca e inducible de las formas fosforiladas de JNK y de p38.

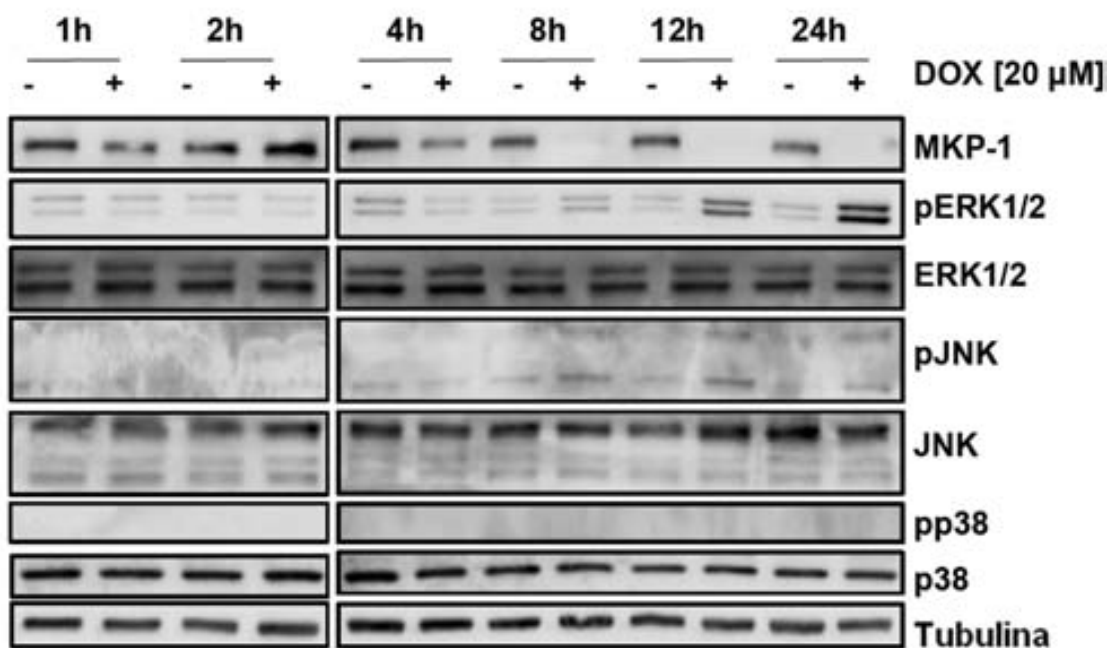


Figura 4.5. Expresión de MKP-1 mediante Western blot sobre células BT-474, en condiciones basales y de tratamiento con doxorubicina a concentración de 20 μ M, durante 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Se observan los efectos de la doxorubicina sobre las formas totales y fosforiladas de ERK, JNK y p38

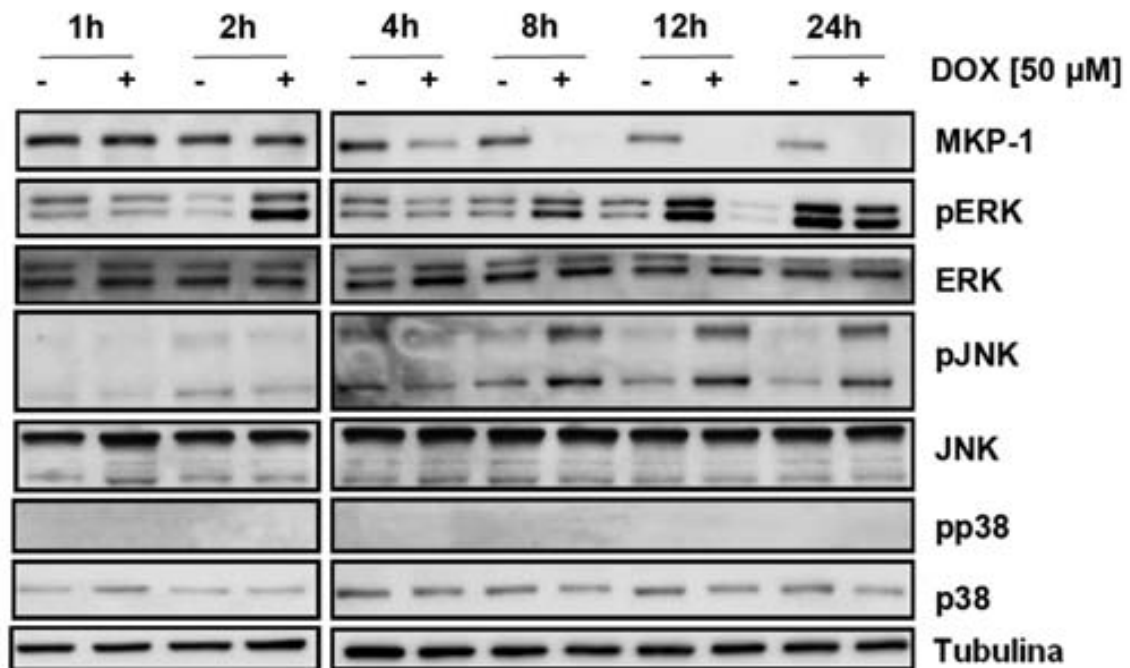


Figura 4.6. Expresión de MKP-1 mediante Western blot sobre células BT-474, en condiciones basales y de tratamiento con doxorubicina a concentración de 50 μM , durante 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Se observan los efectos de la doxorubicina sobre las formas totales y fosforiladas de ERK, JNK y p38.

Como era predecible, la expresión de las formas totales de las proteínas ERK1/2, JNK y p38 no se modificó de forma significativa por el tratamiento con doxorubicina en los diferentes experimentos realizados.

Dada la heterogeneidad del cáncer de mama, se consideró ampliar este estudio de la modulación de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las distintas MAPK producida por la doxorubicina a una única concentración del fármaco, 20 μM , en un panel ampliado de líneas de cáncer de mama, que era representativo de los fenotipos moleculares de cáncer de mama descritos, que incluía las líneas SKBR-3, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MDA-MB-453 (Figura 4.7).

De forma similar a lo observado con BT-474, el tratamiento con doxorubicina en todas las células estudiadas indujo una inhibición profunda de la expresión de MKP-1, especialmente a las 24 horas. De forma concomitante a esta inhibición,

se detectaba un aumento de la expresión de las formas fosforiladas de ERK y de JNK, aunque siguiendo una cinética en el tiempo distinta a las BT-474. En algunas de estas células se detectaron también aumentos variables de la expresión de la forma fosforilada de p38, diferente para cada línea celular estudiada.

La línea MDA-MB-231 mostraba una inhibición de MKP-1 inducida por doxorubicina siguiendo un patrón dependiente del tiempo, con una máxima reducción a las 24 horas de tratamiento. El aumento de la forma fosforilada de ERK1/2 fue similar en todos los tiempos estudiados, mientras que el incremento de la forma fosforilada de JNK fue máximo a las 4 y 24 horas. En esta línea, se detectó elevación de la forma fosforilada de p38 en los tiempos más prolongados incluidos en el estudio.

La línea MDA-MB-453 mostró también una inhibición profunda de MKP-1 por el tratamiento con doxorubicina, que se acompañaba de un incremento de la expresión dependiente del tiempo de las formas fosforiladas de ERK1/2 y JNK. Esta línea celular no expresó la forma fosforilada de p38, al igual que BT-474, en ninguno de los tiempos analizados.

Las células MDA-MB-468 tratadas con doxorubicina también redujeron la expresión de MKP-1. El incremento de las formas fosforiladas de las MAPK, ERK1/2, JNK y p38, fue observado siguiendo un patrón dependiente del tiempo de tratamiento, siendo máximo a las 24 horas.

En la línea celular SKBR-3, la disminución de MKP-1 inducida por el tratamiento con la doxorubicina fue máxima a las 24 horas, acompañándose de aumento de la expresión de la forma fosforilada de ERK1/2. En esta célula, las cinéticas de aumento de las formas activas de JNK y p38 fueron distintas al resto de líneas estudiadas, con un incremento máximo para la primero detectado a las 4 horas y con un aumento máximo para p38 detectado a las 8 horas.

Finalmente, en el modelo dependiente de estrógenos, la línea MCF-7, la expresión de MKP-1 se redujo con el tratamiento con la doxorubicina de forma progresiva en el tiempo, con un máximo de inhibición a las 24 horas. El aumento de las formas fosforiladas de las tres MAPK fue dependiente del

tiempo de tratamiento, con un máximo en el último punto explorado para todas ellas.

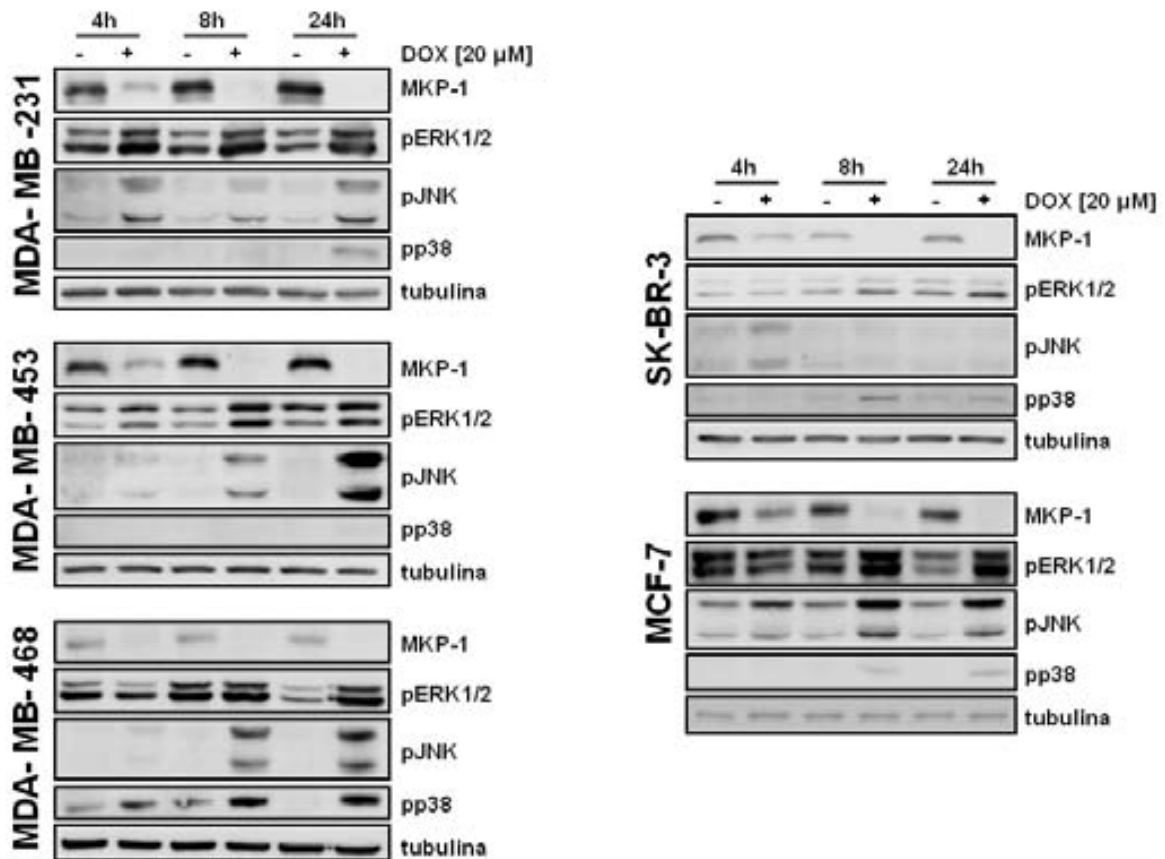


Figura 4.7. Expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las MAPK mediante Western blot sobre lisados de las células SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MDA-MB-453, estudiadas en condiciones basales y de tratamiento con doxorubicina a una concentración de 20 μM, durante 4, 8 y 24 horas.

Este primer grupo de experimentos, de forma global, demuestra que la reducción en los niveles de MKP-1 inducida por la doxorubicina precede en el tiempo a un aumento de la expresión de las formas fosforiladas o activas de las MAPK, ERK1/2, JNK y p38, utilizando para ello diversas líneas de cáncer de mama como modelos y, de una forma más profunda y amplia, con la línea BT-474. También puede observarse una reducción reproducible en diferentes experimentos de los niveles de expresión de la forma fosforilada de ERK1/2 en

los tiempos más cortos estudiados, entre 1 y 4 horas (Figura 4.4), que podrían sugerir que se produce una disminución de la estabilidad de la proteína MKP-1, favoreciendo quizá el descenso de la misma MKP-1 que se observa a tiempos más prolongados de tratamiento con doxorubicina^{58, 149}. Los niveles de expresión de las proteínas MKP-1 y de la forma activa de ERK1/2, medidos de forma semi-cuantitativa mediante análisis de densitometría de bandas de interés del Western-blot y normalizando por los niveles detectados de tubulina como referencia, confirman este hallazgo (Figura 4.8). Estos mismos efectos se observaron también a concentraciones superiores de doxorubicina sobre un panel amplio de células de cáncer de mama representativas de los diferentes fenotipos moleculares de la enfermedad.

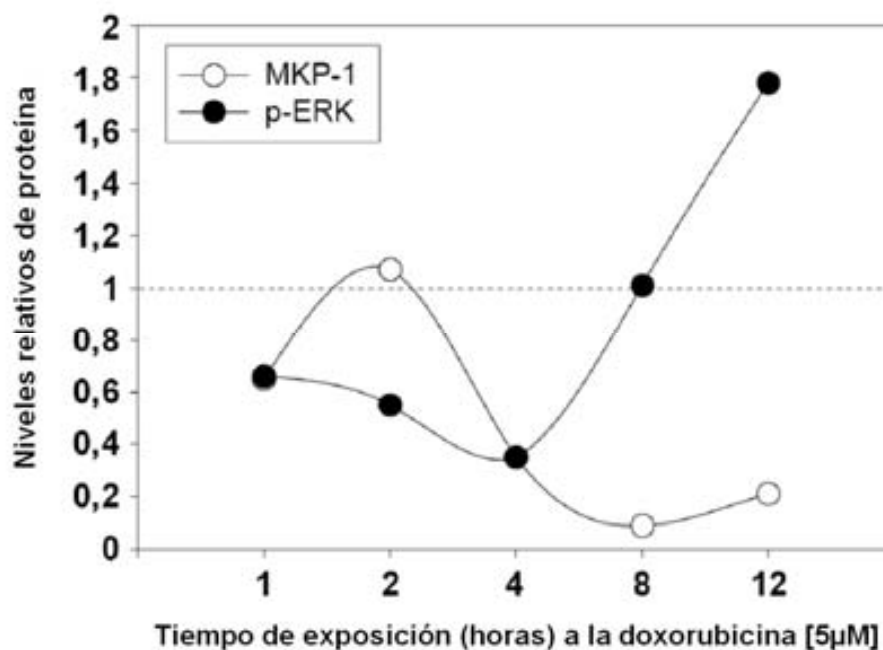


Figura 4.8. Niveles relativos de expresión de MKP-1 y p-ERK en BT-474 tratadas con doxorubicina a 5µM durante 1, 2, 4, 8 y 12 horas, tras cuantificación por densitometría de bandas de interés de Western blot y normalizando por la expresión de tubulina en cada condición. Se observa que la disminución en p-ERK1/2 precede en el tiempo a la de MKP-1. A tiempos prolongados, es evidente la inhibición profunda de MKP-1 por la doxorubicina y el incremento de la expresión de p-ERK1/2

Para confirmar la relevancia de todos estos hallazgos, empleamos a continuación un inhibidor selectivo de PKC y de MKP-1, el Ro-31-8220²¹⁰. Este Ro-31-8220 se utilizó en combinación con las distintas concentraciones de doxorubicina, sobre las mismas células BT-474.

En primer lugar, el tratamiento con Ro-31-8220, utilizado como agente único, demostró, como era esperable, una marcada reducción de los niveles de expresión de la proteína MKP-1 en las células BT-474 mediante ensayos de Western-blot. Esta reducción de MKP-1 se acompañaba de un aumento importante y rápido de la expresión de la formas fosforiladas de JNK, mientras que el aumento de la forma activa de ERK1/2 se producía de una forma más tardía (Figura 4.9).

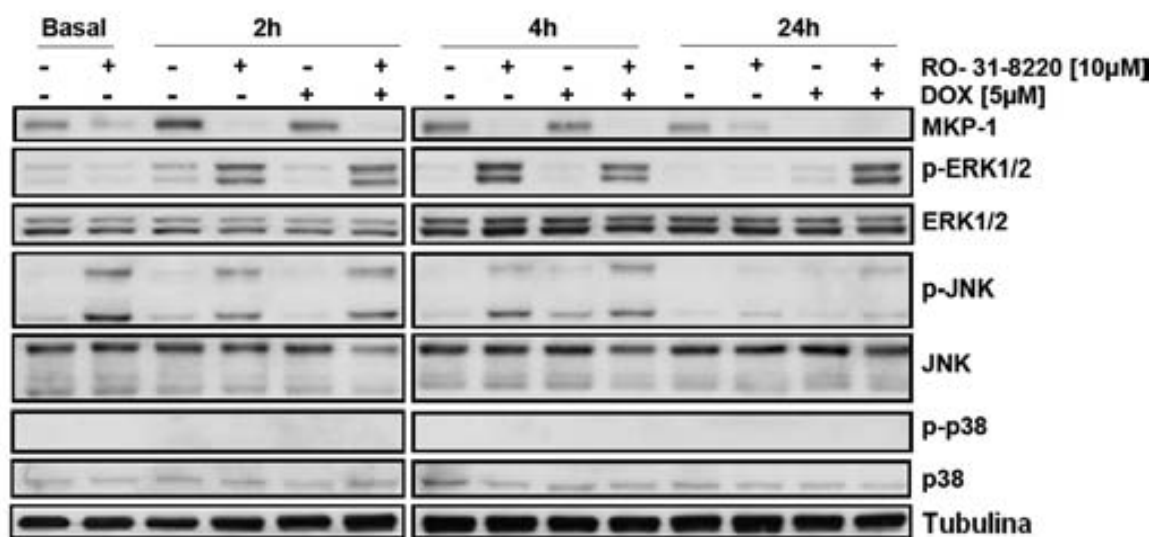


Figura 4.9. Efectos de la combinación de doxorubicina y del inhibidor de MKP-1, Ro-31-8220, sobre la expresión de MKP-1 y las MAPK, analizados mediante Western blot

La exposición de las células BT-474 pre-tratadas con Ro-31-8220 a la doxorubicina produjo un aumento persistente de los niveles detectados de la forma activa de ERK1/2 (Figura 4.9) y una reducción modesta, aunque significativa, de la viabilidad celular comparada con cada una de los

compuestos administrados de forma aislada (Figura 4.10). Este resultado demostró, de una forma clara, que la combinación de dos compuestos que de forma independiente reducen la expresión de MKP-1, probablemente por mecanismos moleculares diferentes, provoca una disminución mayor de la viabilidad celular que cualquiera de los tratamientos administrado por separado²¹⁰, indicando un potencial interés terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama.

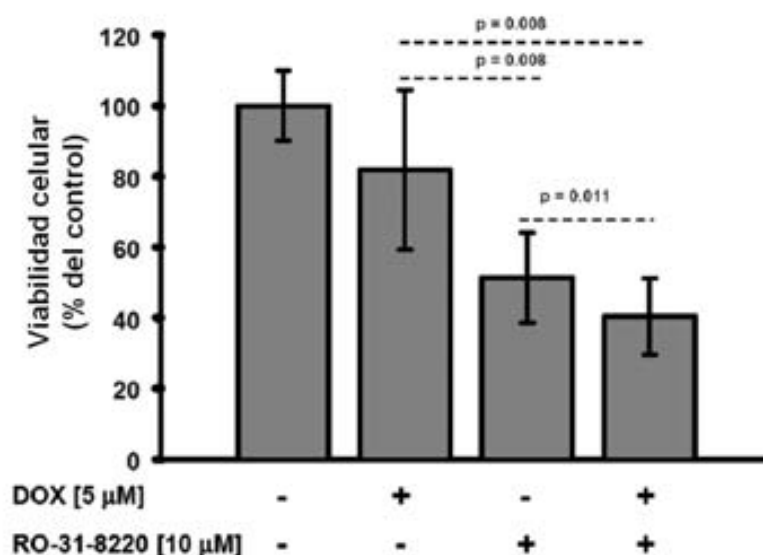


Figura 4.10. Efectos de la combinación de doxorubicina y del inhibidor de MKP-1, Ro-31-8220, sobre la viabilidad celular en BT-474, La combinación de ambos compuestos reduce de forma significativa la viabilidad celular respecto a los tratamientos de forma separada. Las diferencias se han analizado mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas.

4.2. Validación de un ensayo de inmunohistoquímica para MKP-1 utilizando muestras de tejido fijadas en formol y embebidas en parafina

En la literatura científica se ha descrito el papel de MKP-1 en relación a la historia natural de la enfermedad en algunos tipos de cáncer, utilizando ensayos de inmunohistoquímica sobre muestras de tumores fijadas en formol y embebidas en parafina, basados en el uso de anticuerpos no testados previamente para este uso y empleando metodologías muy dispares. De esta forma, algunos de los trabajos publicados han demostrado resultados controvertidos e, incluso contradictorios en algunos casos, como en algunos estudios recientes sobre el rol de MKP-1 en series de cáncer no microcítico de pulmón. En este tipo de tumores se ha citado por algunos grupos que MKP-1 resulta ser un factor de mal pronóstico relacionado con la resistencia adquirida al tratamiento con platino^{148, 184}, mientras que otros trabajos han descrito MKP-1 como indicador o factor de buen pronóstico en este mismo tipo de tumores¹⁸². Por este motivo, consideramos que para llevar a cabo el actual estudio, resultaba imprescindible diseñar un ensayo robusto y reproducible, capaz de trabajar sobre muestras fijadas en formol y embebidas en parafina, siguiendo unos criterios de validación muy estrictos. De esta forma, para establecer este ensayo aplicable sobre las muestras de tejido fijadas en formol, se estudió la sensibilidad y especificidad de los tres anticuerpos comercialmente disponibles contra MKP-1 (V-15, M-18 y C-19, de Santa Cruz Biotech), referenciados de una forma más frecuente en la literatura y que han sido utilizados en diversos estudios para ensayos de Western-blot, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

4.2.1. Ensayos de inmunocitoquímica sobre las células BT-474

En los estudios de inmunocitoquímica destinados a la validación de los tres anticuerpos seleccionados contra MKP-1 sobre portaobjetos tapizados por una monocapa de células BT-474, se realizaron los tratamientos de cada una de las placas en las siguientes condiciones:

- Control
- estimulación con EGF a 100 ng/ml, durante 3 horas
- tratamiento con el inhibidor de proteasoma, MG132, a una concentración de 25µM durante 6 horas
- tratamiento con Ro-31-8220 a una concentración de 10 µM, durante 6 horas
- tratamiento con doxorubicina a una concentración de 5 µM, durante 4 horas
- tratamiento con cisplatino a una concentración de 10 µg/ml, durante 24 horas

En el estudio de las inmunocitoquímicas, las diferencias observadas en el patrón de expresión de MKP-1 en las células y en la modulación de la misma por los distintos tratamientos fueron muy llamativas, en función del anticuerpo empleado en el ensayo. En primer lugar, el anticuerpo M-18 mostraba un patrón de expresión de MKP-1 predominantemente citoplasmático y, de forma más débil, nuclear, apreciándose un aumento de la intensidad de la tinción y del número de células con expresión en las células tratadas con EGF comparadas con las células control. Por el contrario, las células BT-474 tratadas tanto con Ro-31-8220 como con cisplatino, mostraron una importante reducción de la expresión de MKP-1, en términos de número de células con tinción como de intensidad de la misma. Las células tratadas con doxorubicina presentaban niveles intermedios de inhibición de MKP-1.

Los ensayos de inmunocitoquímica sobre las mismas condiciones comentadas sobre las células BT-474 y utilizando el anticuerpo C-19 contra MKP-1, mostraron un patrón de expresión nuclear débil, de forma difusa, sin evidenciarse diferencias en la intensidad de la tinción ni en el número de células con tinción en ninguna de las condiciones ensayadas.

Finalmente, el anticuerpo V-15 mostró una expresión de MKP-1 fundamentalmente nuclear en las células BT-474, y en adición débilmente citoplasmática (Figura 4.11). En las diferentes condiciones experimentales, la

modulación de la cantidad de células con tinción y de su intensidad fue similar a la observada con el anticuerpo M-18.

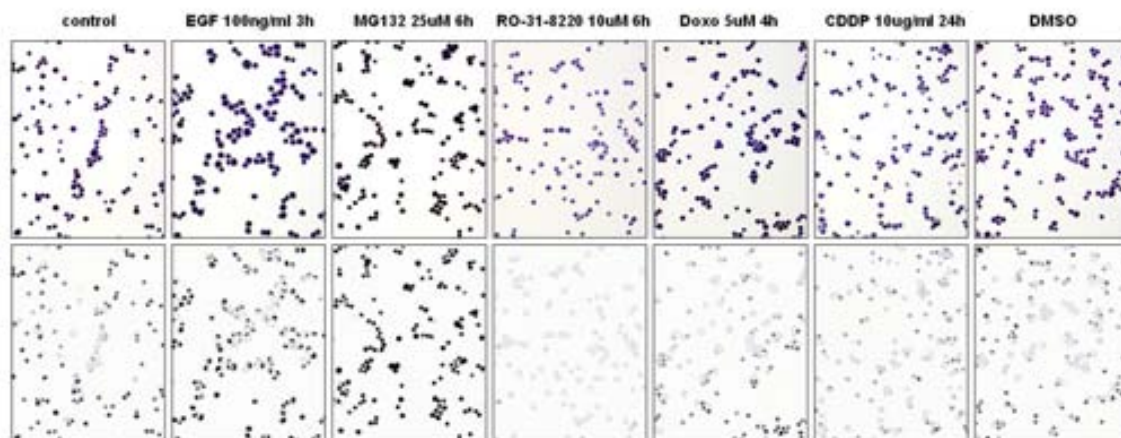


Figura 4.11. Condiciones ensayadas en inmunocitoquímica para la expresión de MKP-1 con el anticuerpo V-15, incluyendo control, estimulación con EGF a 100ng/ml durante 3 horas, tratamiento con el inhibidor de proteasoma, MG132, a 25uM durante 6 horas, con Ro-31-8220 a 10uM durante 6 horas, con doxorubicina a 5uM durante 4 horas y con cisplatino a 10ug/ml durante 24 horas. El panel superior corresponde a campos microscópicos representativos (aumento x200) y el panel inferior a los resultados del análisis de imagen realizado con el programa ImageJ. El DMSO corresponde al vehículo de MG132 y Ro-31-8220

Para confirmar estos resultados y cuantificar los cambios observados, se realizó un análisis de imagen sobre 5 campos microscópicos de aumento intermedio (x200) obtenidos de los cubreobjetos ensayados para la inmunocitoquímica, y que fuesen representativos de cada una de las condiciones del experimento. Este análisis de imagen se llevó a cabo con la aplicación informática en lenguaje Java, Image-J, siguiendo el procedimiento descrito en la literatura²¹¹⁻²¹³. El análisis se encaminó a medir la densidad óptica de la diaminobencidina sumada a la hematoxilina, específica de la expresión tinción nuclear de la proteína, con el objetivo de establecer una

cuantificación de la expresión en esta localización de MKP-1. Para ello, se descompuso la imagen en los colores marrón+rojo y azul según el algoritmo de color HDAB. A continuación se convirtió cada uno de las estructuras azules correspondientes a los núcleos de las células en máscaras opacas que eran representativas de la superficie de estos núcleos, utilizando para ello el algoritmo MASK del programa Image-J. Esta máscara nuclear se superpuso a la imagen correspondiente al color rojo-marrón mediante el algoritmo IMAGE CALCULATION basada en la diferencia matemática de ambas, resultando así depurada cualquier tinción de MKP-1 fuera de las estructuras nucleares. Sobre la imagen resultante, se midió la densidad en escala de grises de la tinción corregida por la superficie que ocupaban los núcleos mediante el algoritmo MEASURE, que podía ser exportada a una tabla de Excel, recogiendo los datos de la intensidad de grises y la superficie correspondiente. Determinando como referencia de la escala, la condición de control de las células BT-474, se calcularon los niveles de cada uno de los tratamientos, demostrando de forma cuantitativa las diferencias observadas en la expresión de MKP-1 en las tres determinaciones. Este análisis demostró de una forma cuantitativa la evaluación realizada de forma manual, revelando que en condiciones control, el 50% de las células BT-474 expresaban MKP-1, en condiciones de estimulación, el 80%, el tratamiento con MG132 inducía expresión en el 60%, el tratamiento con Ro-31-8220 reducía la expresión al 5%, la doxorubicina y el cisplatino al 20% (Figura 4.12).

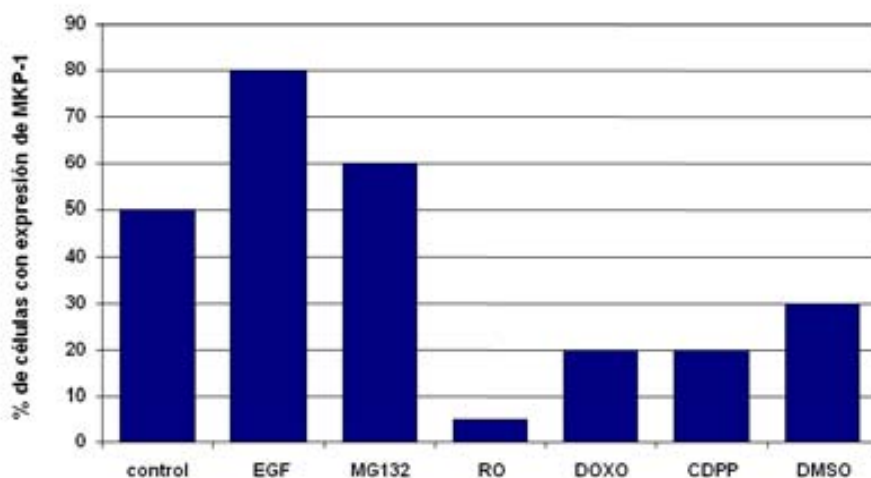


Figura 4.12. Gráfico de barras correspondiente al porcentaje de células BT-474 con expresión de MKP-1, en las condiciones ensayadas en inmunocitoquímica (control, estimulación con EGF a 100ng/ml durante 3 horas, tratamiento con el inhibidor de proteasoma, MG132, a 25uM durante 6 horas, con Ro-31-8220 a 10uM durante 6 horas, con doxorubicina a 5uM durante 4 horas y con cisplatino a 10ug/ml durante 24 horas), analizadas mediante el programa ImageJ

4.2.3. Ensayos de inmunocitoquímica sobre fibroblastos embrionarios

Con el objetivo de confirmar la especificidad de los ensayos de inmunocitoquímica con los tres anticuerpos disponibles contra MKP-1, se utilizaron fibroblastos embrionarios procedentes de ratones silvestres y de animales con doble delección del gen MKP-1. De forma similar a como se realizó con BT-474, estas células se crecieron sobre cubreobjetos circulares.

En primer lugar, se compararon los niveles de expresión de MKP-1 entre ambas estirpes celulares mediante un ensayo de Western-blot para verificar las diferencias en sus niveles de proteína (Figura 4.13). A continuación, se

realizaron las técnicas de inmunocitoquímica, utilizando los tres anticuerpos (Figura 4.14).

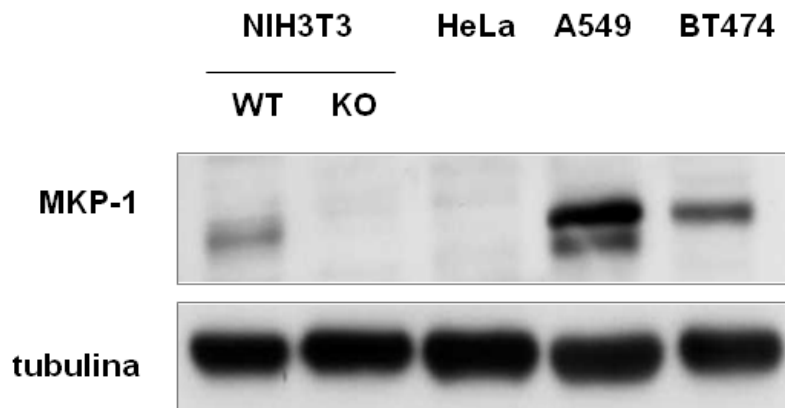


Figura 4.13. Western blot para expresión de MKP-1 en fibroblastos embrionarios silvestres y mutados, células HeLa (carcinoma de cérvix), A549 (adenocarcinoma de pulmón) y BT-474. Los niveles de expresión más elevados corresponden a la línea de pulmón A549 y los menores a la línea HeLa. De forma llamativa, los fibroblastos mutados para MKP-1 demuestran una ausencia total de expresión de MKP-1

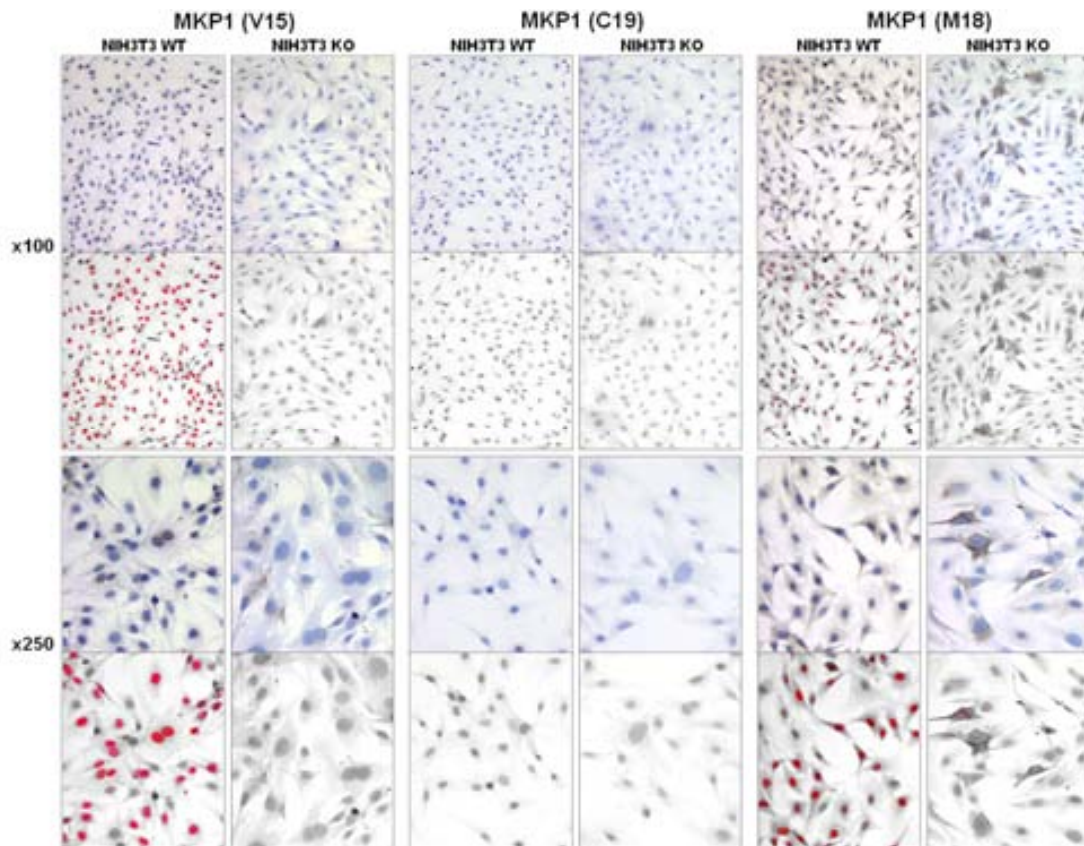


Figura 4.14. Imágenes representativas de los niveles de expresión de MKP-1 mediante inmunocitoquímica en los fibroblastos embrionarios silvestres (WT) y mutados (KO) para el gen, utilizando los anticuerpos V-15, C-19 y M-18. Se presentan imágenes microscópicas x100 y x250, correspondiendo en cada aumento el panel superior a la imagen real y el panel inferior, tras procesamiento de imagen con el programa ImageJ, con el fin de evidenciar únicamente en color rojo la expresión nuclear de la proteína

El anticuerpo V-15 demostró una diferencia evidente de expresión de MKP-1 entre ambas células, confirmando el patrón de expresión predominantemente nuclear de la proteína. El anticuerpo M-18 mostró unos niveles semejantes de tinción entre ambos tipos de fibroblastos, identificándose una expresión intensa a nivel citoplasmático y, de forma más débil, nuclear, y finalmente, el anticuerpo C-19 no demostró tinción en ninguna de las células estudiadas.

4.2.4. Determinación de las condiciones analíticas del ensayo para MKP-1 sobre muestras fijadas en formol

Una vez estudiadas la especificidad y sensibilidad de los anticuerpos contra MKP-1 sobre las líneas celulares mediante inmunocitoquímica, se trasladaron estos conocimientos generados a los ensayos sobre muestras parafinadas. La fijación en formol preserva y estabiliza las proteínas mediante el establecimiento de enlaces covalentes entre las proteínas ²¹⁴. Para detectar estas proteínas mediante técnicas de inmunohistoquímica, los enlaces deben de romperse mediante métodos denominados de forma genérica como desenmascaramiento antigénico (*antigen retrieval*), que incluyen calentamiento de la muestra en diversos tampones a distintos pH, con varias temperaturas o digestión enzimática ^{214, 215}.

Para ello, y utilizando una matriz de tejidos (TMA) que incluía diferentes muestras sanas y tumorales (Tabla 4.1) fijados en formol en unas condiciones conocidas y controladas, con un tiempo de fijación no superior a 24 horas y uso formol tamponado, se estudió el patrón de tinción de los 3 anticuerpos mediante inmunohistoquímica. Para establecer las condiciones experimentales de la técnica, se diseñó una serie de ensayos en paralelo que recogían todas las combinaciones de los diferentes factores que influyen en la técnica: tipo de desenmascaramiento (temperatura, tiempo y método), concentración y tiempo de incubación del anticuerpo primario y sistema de detección, según se describe en la Tabla 4.2.

Tabla 4.1. Muestras incluidas en la matriz de tejidos utilizada como control de las condiciones del ensayo de inmunohistoquímica

Tipo de muestra	Número de casos
carcinoma ductal de mama	3
adenocarcinoma de colon	3
carcinoma de pulmón no microcítico	3
linfoma de Hodgskin	1
linfoma difuso de células B	2
melanoma	2
carcinoma escamoso de cabeza y cuello	2
carcinoma urotelial	3
glioblastoma multiforme	2
carcinoma de células claras de ovario	2
carcinoma seroso	2
carcinoma endometrioide	3
carcinoma ductal de páncreas	1
adenocarcinoma gástrico	2
mucosa de colon	2
endometrio	2
piel	2
mama no tumoral	2
hígado	2
riñón	2
amígdala	3

Tabla 4.2. Condiciones ensayadas en inmunohistoquímica para los anticuerpos contra MKP-1, M-18, C-19 y V-15, incluyendo el tipo de desenmascaramiento antigénico, características de incubación del anticuerpo primario y sistema de detección utilizado

anti-MKP-1 M-18 (sc-1102)				
Anticuerpo	Desenmascaramiento antigénico	Sistema de detección	Dilución del anticuerpo primario	Tiempo de incubación del anticuerpo primario
anti-MKP-1 M-18 (sc-1102)	Sin pretratamiento	EnVision	1/100	30min TA
	Baño termostático 95° 40min citrato pH6		↓	
	Baño termostático 95° 40min citrato pH7.3			
	Baño termostático 95° 40min EDTA pH8			
	Baño termostático 95° 40min TRIS pH9		1/200	60min TA
	Autoclave 3min citrato pH6		↓	
	Autoclave 3min citrato pH7.3			
	Autoclave 3min EDTA pH8			
	Autoclave 3min TRIS pH9	OmniMap	1/1000	60min 37°C
	Sin pretratamiento			
	95°C 60min pH8 (cc1st)			
	95°C 30min pH8 (cc1st)			
	95°C 60min pH6 (cc2st)			
Proteasa1, 4min				

anti-MKP-1 C-19 (sc-370)				
Anticuerpo	Desenmascaramiento antigénico	Sistema de detección	Dilución del anticuerpo primario	Tiempo de incubación del anticuerpo primario
anti-MKP-1 C-19 (sc-370)	Sin pretratamiento	EnVision	1/100	30min TA
	Baño termostático 95° 40min citrato pH6		↓	
	Baño termostático 95° 40min citrato pH7.3			
	Baño termostático 95° 40min EDTA pH8			
	Baño termostático 95° 40min TRIS pH9		1/500	60min TA
	Autoclave 3min citrato pH6		↓	
	Autoclave 3min citrato pH7.3			
	Autoclave 3min EDTA pH8			
	Autoclave 3min TRIS pH9	OmniMap	1/1000	60min 37°C
	Sin pretratamiento			
	95°C 60min pH8 (cc1st)			
	95°C 30min pH8 (cc1st)			
	95°C 60min pH6 (cc2st)			
Proteasa1, 4min				

anti-MKP-1 V-15 (sc-1199)				
Anticuerpo	Desenmascaramiento antigénico	Sistema de detección	Dilución del anticuerpo primario	Tiempo de incubación del anticuerpo primario
anti-MKP-1 V-15 (sc-1199)	Sin pretratamiento	EnVision	1/100	30min TA
	Baño termostático 95° 40min citrato pH6		↓	
	Baño termostático 95° 40min citrato pH7.3			
	Baño termostático 95° 40min EDTA pH8			
	Baño termostático 95° 40min TRIS pH9		1/200	60min TA
	Autoclave 3min citrato pH6		↓	
	Autoclave 3min citrato pH7.3			
	Autoclave 3min EDTA pH8			
	Autoclave 3min TRIS pH9	OmniMap	1/1000	60min 37°C
	Sin pretratamiento			
	95°C 60min pH8 (cc1st)			
	95°C 30min pH8 (cc1st)			
	95°C 60min pH6 (cc2st)			
Proteasa1, 4min				

Los resultados de la expresión de MKP-1 de los tres anticuerpos empleados, según cada una de las condiciones de la técnica inmunohistoquímica ensayadas, revelaron profundas diferencias en el patrón de expresión dentro de las células tumorales e, incluso, entre las células normales.

En las determinaciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo M-18 a una concentración de 1:200 durante 60 minutos bajo la utilización de tampones de desenmascaramiento a pH6, pH7.3 y pH8, mostraron una tinción difusa en todos los elementos del tejido, de intensidad similar, y siguiendo un patrón combinado citoplasmático y nuclear. De forma característica, la utilización de tampón pH6 mediante microondas (MW) mostró de forma adicional un patrón de tinción de membrana celular. La utilización de tampón de desenmascaramiento a pH9 y mediante autoclave durante 3 minutos, se identificó un patrón selectivo de expresión en células tumorales, de mayor intensidad que el detectado en el tejido normal de la misma muestra, junto a escasa tinción en elementos estromales. Como sistema de detección, se empleó EnVision en las condiciones habituales. En estas condiciones seleccionadas como óptimas y que se emplearon en los siguientes estudios de validación, se pone de manifiesto que el anticuerpo M-18 mostraba una expresión de MKP-1 predominantemente citoplasmática, con una mayor intensidad de tinción en las células tumorales comparadas con las normales (Figuras 4.15 y 4.16).

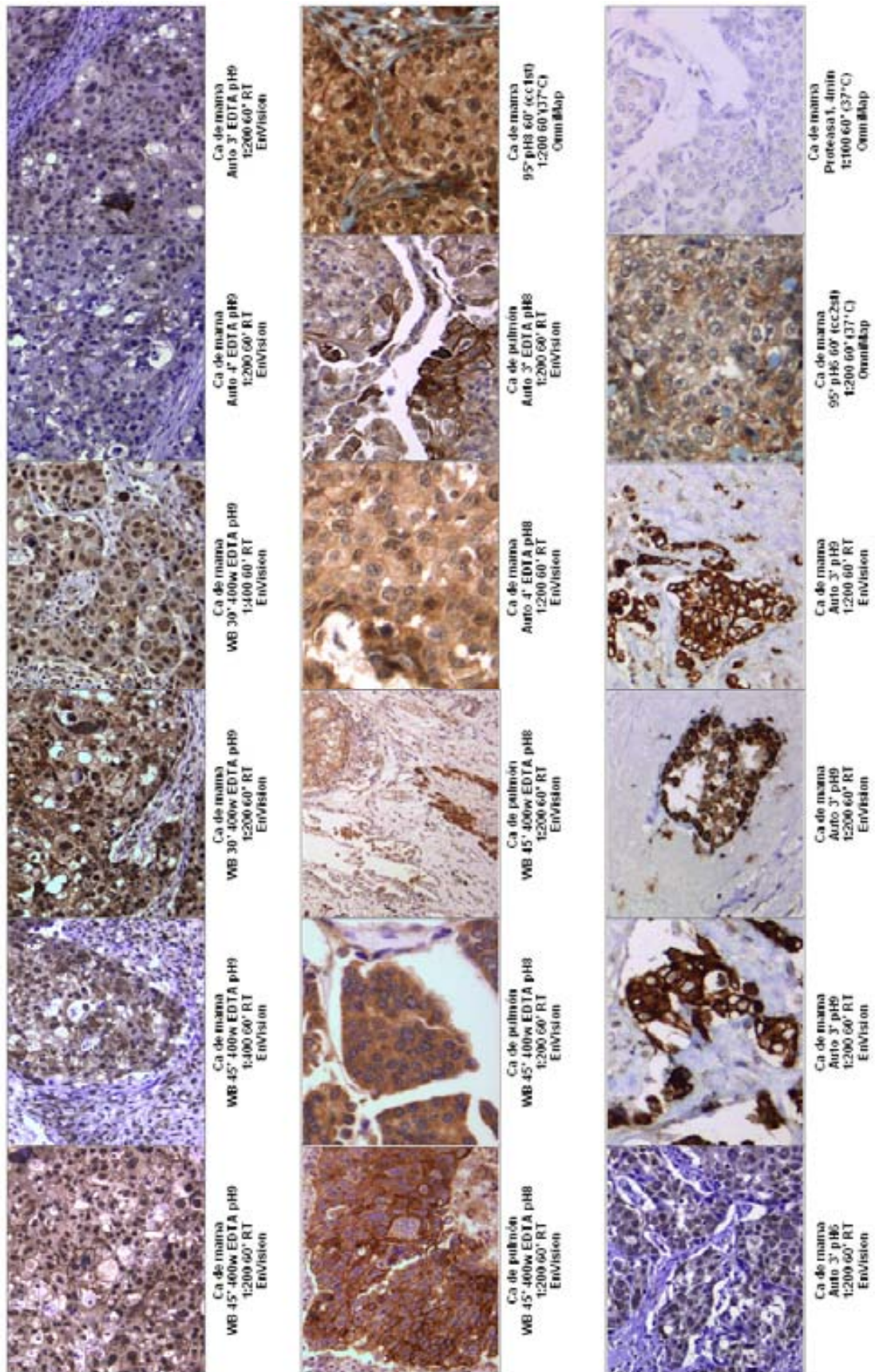


Figura 4.15. Imágenes representativas de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo M-18, estudiando la expresión de MKP-1, sobre tumores malignos de mama y pulmón

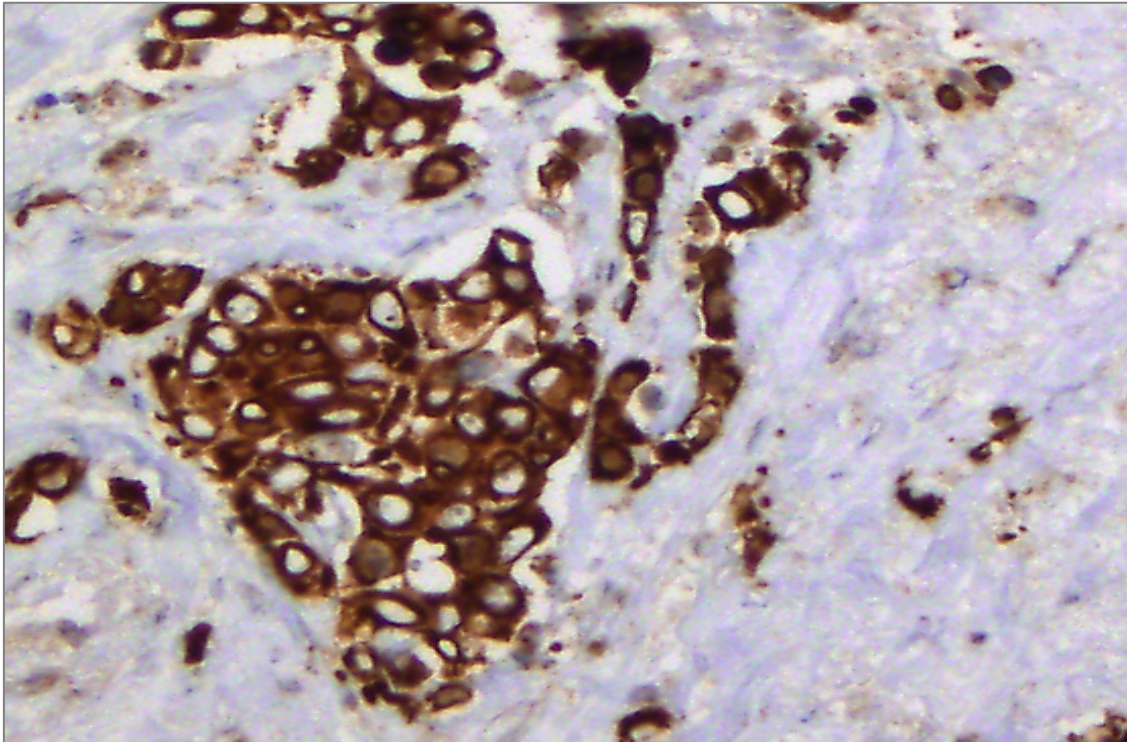


Figura 4.16. Detalle de la expresión de MKP-1 por inmunohistoquímica con el anticuerpo M-18 en un carcinoma de mama, utilizando el anticuerpo a una concentración de 1:200 durante 60 minutos tras desenmascaramiento con una solución de desenmascaramiento a pH9 y autoclave durante 3 minutos, y EnVision como sistema de detección. Se observa expresión fundamentalmente citoplasmática y ocasionalmente nuclear, tanto en las células tumorales como, de forma menos intensa, en las células normales

El anticuerpo C-19 no demostró expresión de MKP-1 en la mayoría de las condiciones ensayadas, fundamentalmente cuando se utilizaba desenmascaramiento con digestión enzimática. Mediante el uso de las diferentes soluciones a pH6, pH7.3, pH8 y pH9, se detectaba una expresión de forma difusa y similar en todas las células tumorales y normales de las muestras, con un patrón de tinción nuclear y citoplasmático, frecuentemente granular (Figuras 4.17 y 4.18), y que se interpretó como inespecífico. Sin embargo, para los posteriores estudios de validación, se consideró el desenmascaramiento antigénico con solución a pH6 y mediante autoclave durante 3 minutos, y el anticuerpo a una dilución de 1:500 durante 30 minutos, como la condición de ensayo más reproducible y en la que se puede observar una semejanza al patrón esperado según los conocimientos de los modelos celulares.

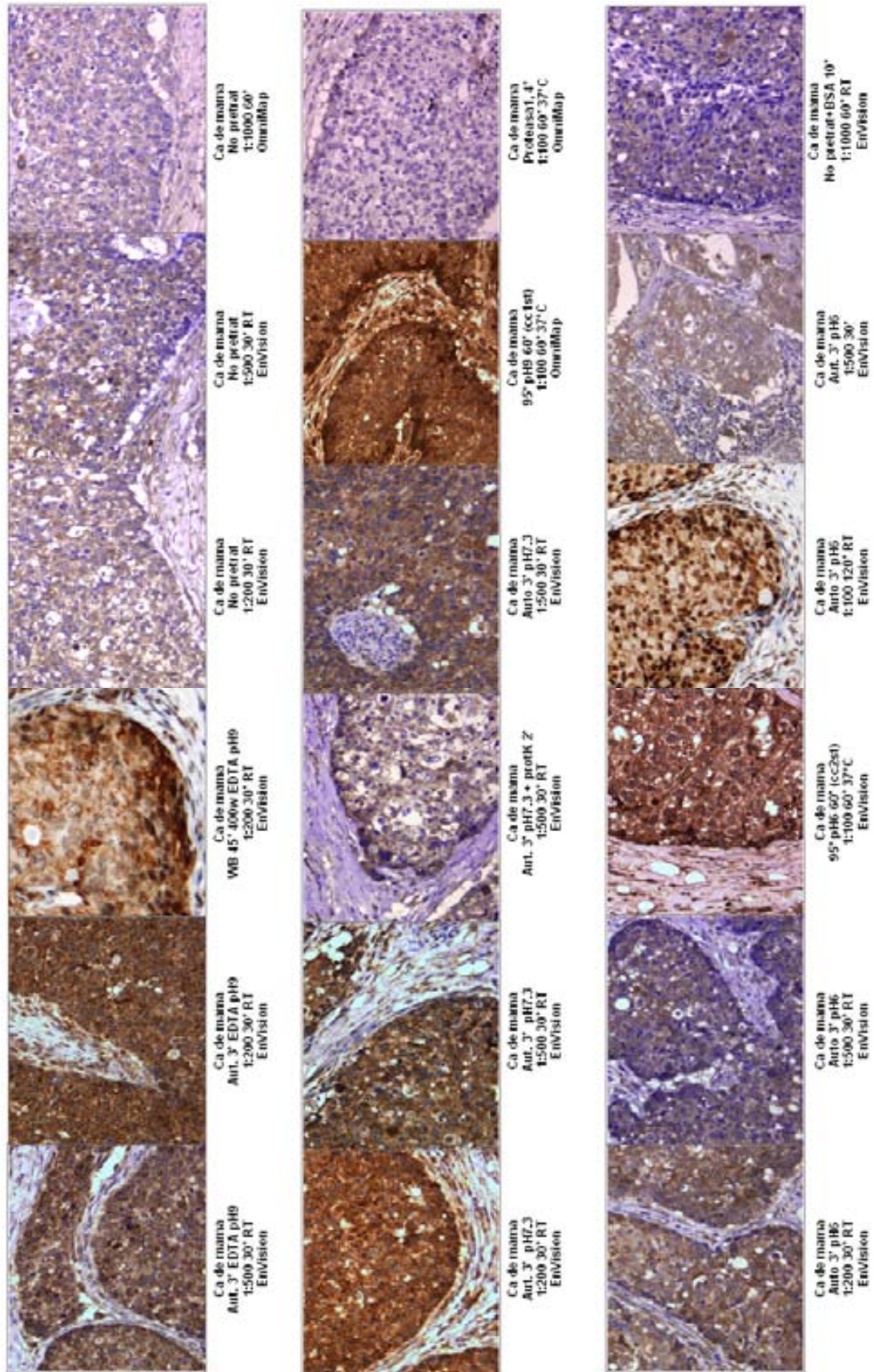


Figura 4.17. Imágenes representativas de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo C-19, estudiando la expresión de MKP-1, sobre tumores malignos de mama y pulmón

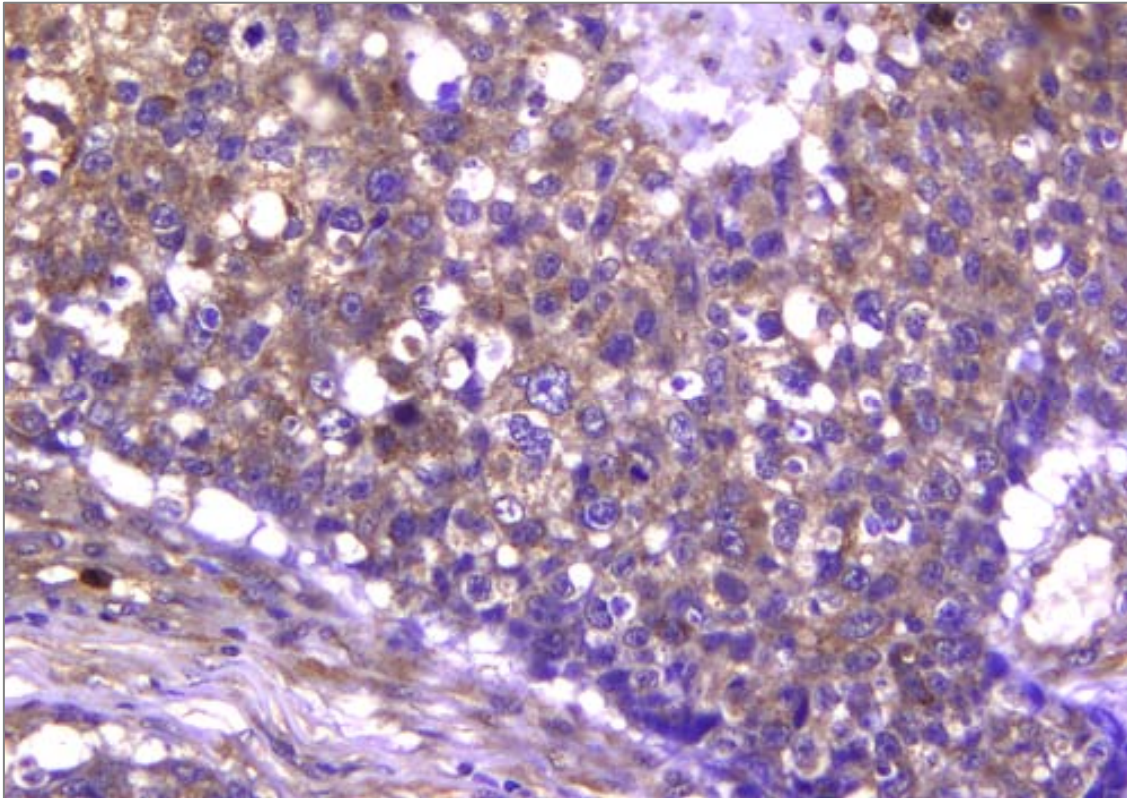


Figura 4.18. Detalle de la expresión de MKP-1 por inmunohistoquímica con el anticuerpo C-19 en un carcinoma de mama, utilizando una solución de desenmascaramiento de pH6 y autoclave durante 3 minutos, además de EnVision como sistema de detección. Se observa expresión exclusivamente citoplasmática similar en células tumorales y normales

Finalmente, el anticuerpo V-15 mostró una expresión de MKP-1 variable entre las distintas muestras estudiadas. La expresión fue fundamentalmente nuclear, tanto en las células tumorales como, de forma más débil, en las células normales, epiteliales y estromales (Figuras 4.19 y 4.20). La tinción mejor definida y restringida al patrón de expresión de MKP-1 esperado se consiguió mediante la utilización de soluciones de desenmascaramiento a pH9 y con el baño termostático durante 40 minutos a 95°C como sistema de calentamiento, con una dilución del anticuerpo a 1:200 incubado durante 60 minutos y EnVision como sistema de detección. El uso de soluciones a pH6, pH7.3 y pH8 reveló tinción similar a la descrita, aunque de menor intensidad y definición. De esta forma, se seleccionó esta condición de tratamiento con solución a pH9 y con baño termostático para el anticuerpo V-15 como método óptimo para el estudio de MKP-1 en muestras parafinadas.

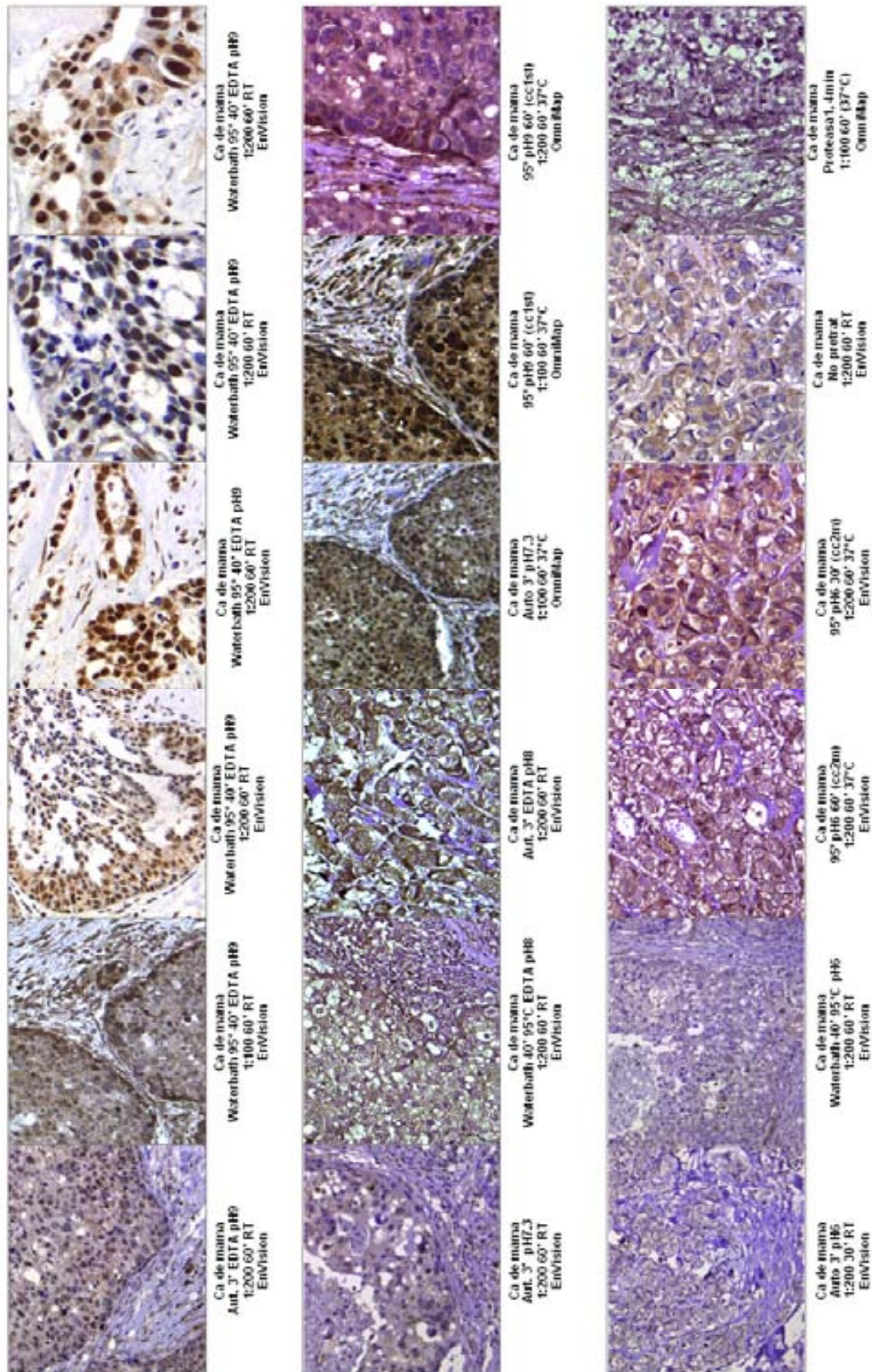


Figura 4.19. Imágenes representativas de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo V-15, estudiando la expresión de MKP-1, sobre tumores malignos de mama

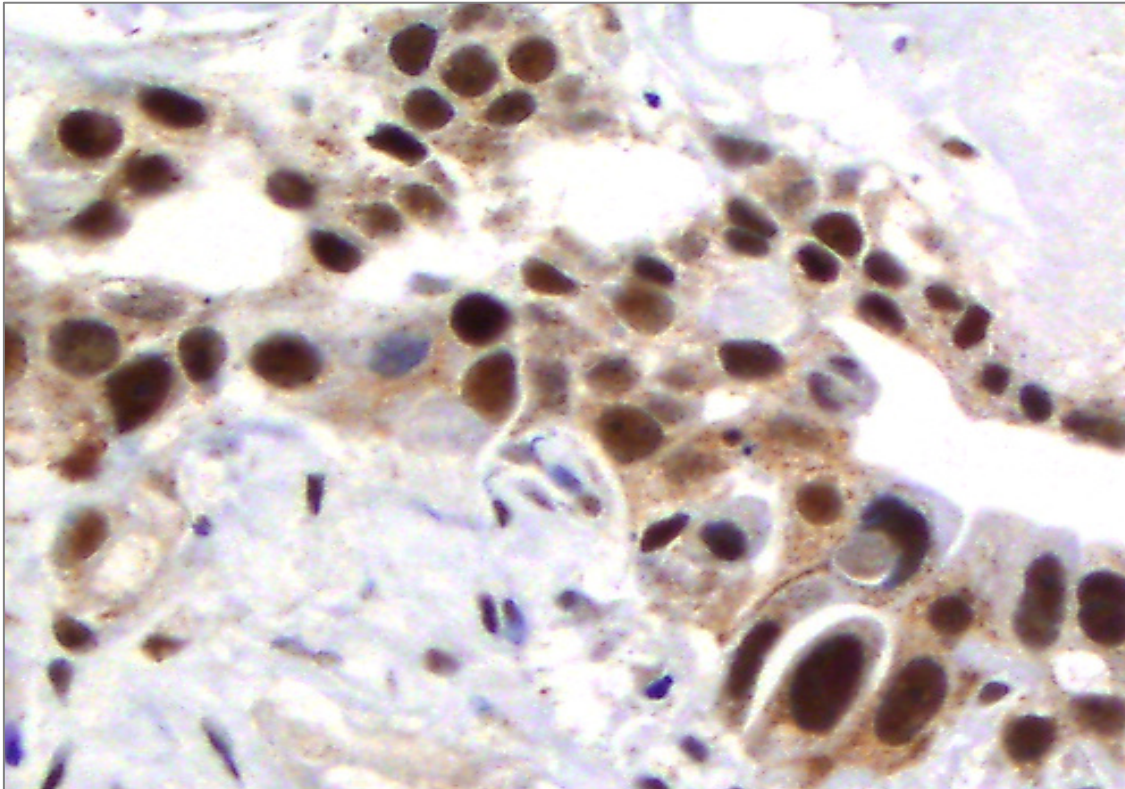


Figura 4.20. Detalle de la expresión de MKP-1 por inmunohistoquímica con el anticuerpo V-15 en un carcinoma de mama, utilizando una solución de pH9 y baño termostático a 95°C durante 40 minutos. El anticuerpo primario se diluyó a 1:200 y se incubó durante 60 minutos, tras lo que se aplicó EnVision como sistema de detección. Se observa expresión fundamentalmente a nivel nuclear, más débil citoplasmática, tanto en las células tumorales y de forma menos intensa en las células normales

Como confirmación de que las condiciones seleccionadas, se procedió a realizar determinaciones inmunohistoquímicas sobre cortes histológicos consecutivos de la misma matriz de tejidos. En estos cortes consecutivos se identificaron los diferentes patrones de expresión de MKP-1 utilizando los tres anticuerpos. Las Figuras 4.21 y 4.22 revelan las importantes divergencias en cuanto a intensidad, patrón y distribución de la expresión de MKP-1 en los mismos tumores y sobre el mismo campo microscópico. Este hecho pone de manifiesto la importancia y dificultad de una correcta adecuación y optimización de las condiciones experimentales en este tipo de ensayos, así como una validación de todos los procesos implicados.

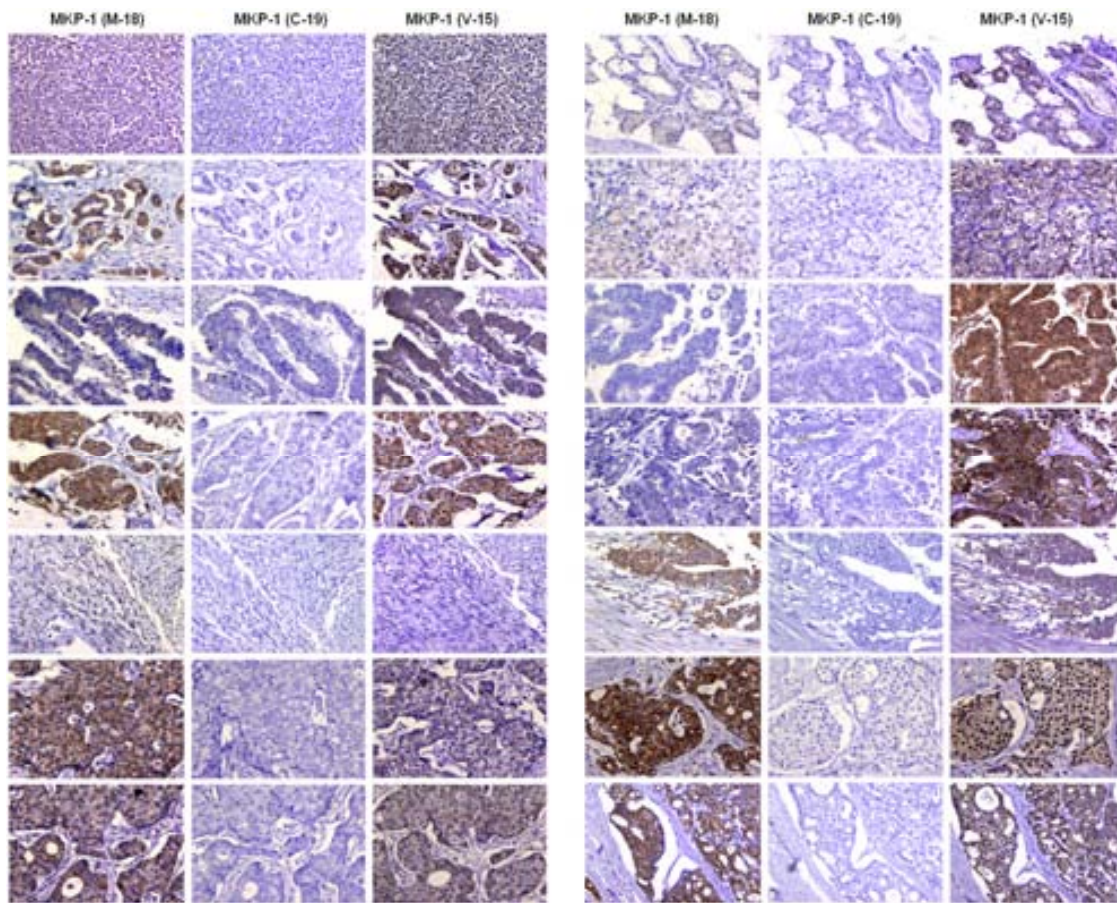


Figura 4.21. Imágenes representativas de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo M-18, C-19 y V-15, estudiando la expresión de MKP-1, sobre secciones consecutivas de diferentes tumores malignos, e identificando el mismo campo microscópico. Cada fila corresponde a dos muestras tumorales ensayadas. Son evidentes las importantes diferencias en la intensidad y patrón de expresión de MKP-1 entre los tres anticuerpos para cada tumor

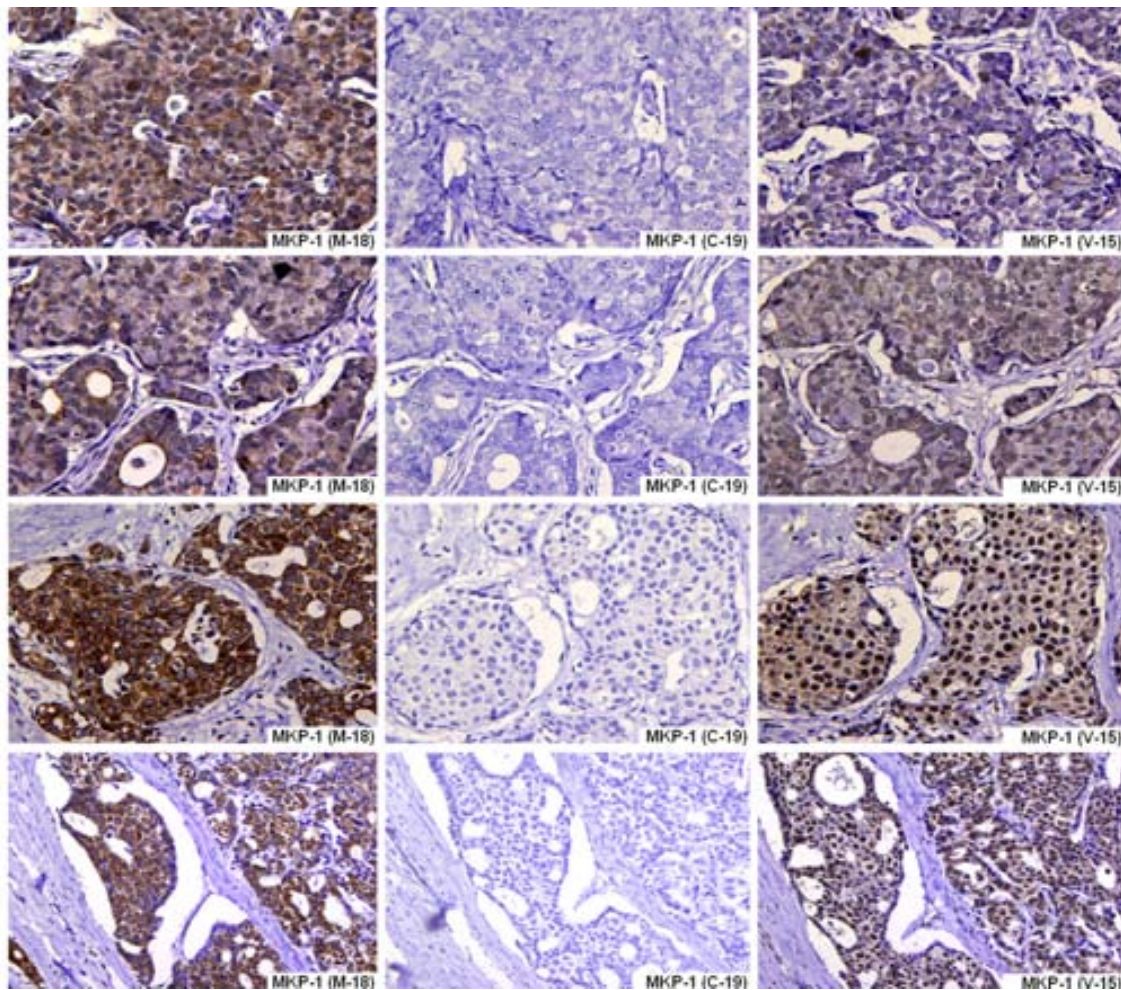


Figura 4.22. Imágenes representativas de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo M-18, C-19 y V-15, estudiando la expresión de MKP-1, sobre secciones consecutivas de tumores de mama, a mayor detalle e identificando el mismo campo microscópico. El anticuerpo M-18 demuestra expresión predominante en el citoplasma de las células, de intensidad fuerte, al anticuerpo C-19 resulta generalmente negativo o débilmente positivo de forma nuclear en todas las células incluidas en la muestra, y el anticuerpo V-15 mostraba expresión nuclear y discretamente citoplasmática en las células, fundamentalmente en las tumorales. De forma adicional, puede detectarse que MKP-1 analizado con V-15 sigue un patrón de distribución heterogéneo en el tumor mientras que M-18 y C-19 producen tinciones difusas

A continuación y como demostración de la especificidad del ensayo escogido, se utilizaron tejidos procedentes de los ratones silvestres y mutados para MKP-1, tal y como se describe en la sección de material y métodos ¹³⁰, para ser estudiados por inmunohistoquímica con los tres anticuerpos. Los tejidos

escogidos por su estructura anatómica fueron riñón, hígado, pulmón y encéfalo. Los anticuerpos M-18 y V-15 (Figuras 4.23 y 4.24, respectivamente) demostraron una expresión de MKP-1 en todos los tejidos procedentes de los ratones silvestres, de una intensidad débil o moderada, el primero de ellos citoplasmático y el segundo predominantemente nuclear. Los tejidos de los ratones mutantes para MKP-1 estudiados con el anticuerpo V-15 no mostraron ningún tipo de tinción, mientras que analizados con el anticuerpo M-18, demostraban una expresión claramente citoplasmática en numerosas células. Estos tejidos, ensayados por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo C-19 contra MKP-1, no mostraron ningún tipo de tinción en las células de los diferentes tejidos (Figura 4.25).

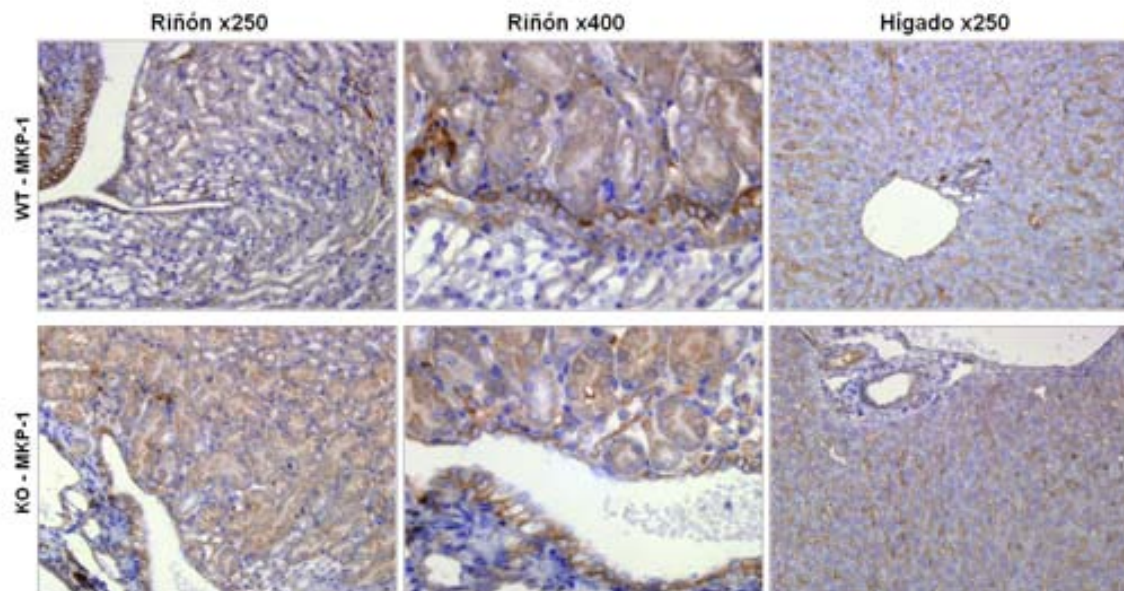


Figura 4.23. Imágenes representativas de inmunohistoquímica estudiando la expresión de MKP-1 en tejido renal y hepático, utilizando el anticuerpo M-18, procedentes de ratones silvestres (WT) y mutados (KO) para el gen. Los tejidos del ratón silvestre presentan una expresión citoplasmática de intensidad intermedia, en hepatocitos, ductos biliares, túbulos renales y urotelio de pelvis renal, acompañada de débil expresión nuclear. Los elementos estromales no demostraron expresión evidente. Los tejidos de ratones mutados mostraron expresión de MKP-1 de intensidad intermedia en ductos y urotelio, no identificándose expresión nuclear en ningún punto.

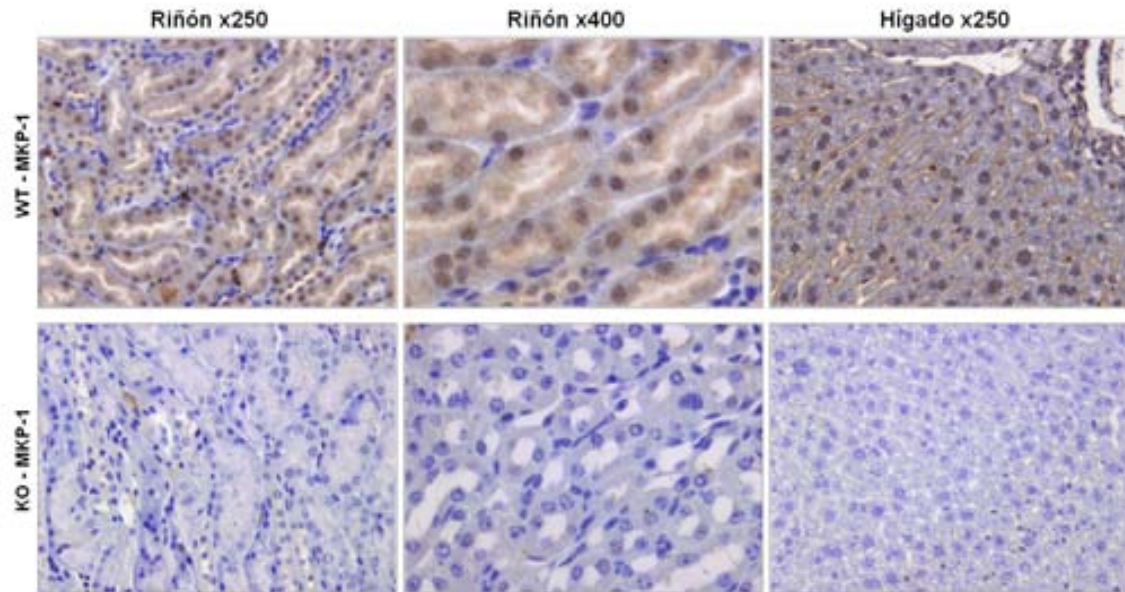


Figura 4.24. Imágenes representativas de inmunohistoquímica estudiando la expresión de MKP-1 en tejido renal y hepático, utilizando el anticuerpo V-15, procedentes de ratones silvestres (WT) y mutados (KO) para el gen. Los tejidos del ratón silvestre presentan una expresión citoplasmática de intensidad intermedia, en hepatocitos, ductos biliares, túbulos renales y urotelio de pelvis renal, acompañada de evidente expresión nuclear. Los elementos estromales no demostraron expresión evidente. Los tejidos de ratones mutados mostraron una ausencia total de expresión de MKP-1.

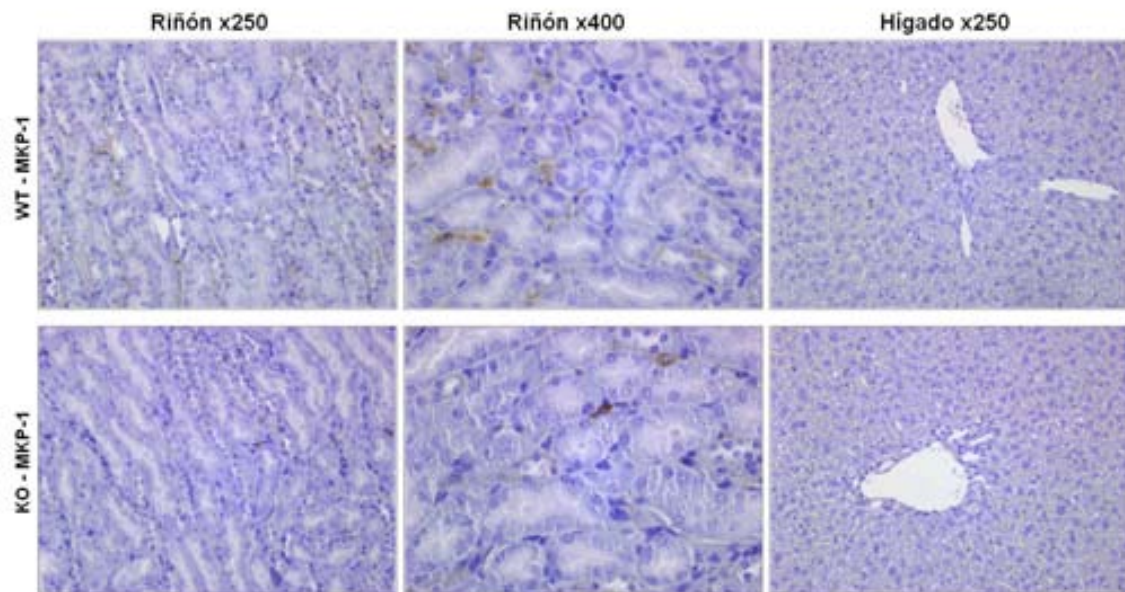


Figura 4.25. Imágenes representativas de inmunohistoquímica estudiando la expresión de MKP-1 en tejido renal y hepático, utilizando el anticuerpo C-19, procedentes de ratones silvestres (WT) y mutados (KO) para el gen. No se identifica expresión de MKP-1 en ninguno de los tejidos analizados. Se observa tinción inespecífica en macrófagos de estroma en diversos órganos.

La validación de las condiciones de la inmunohistoquímica se completó mediante un ensayo en el que se realizó una pre-absorción del anticuerpo primario con un péptido antigénico específico suministrado por Santa Cruz: sc-1199P para V-15, sc-1102P para M-18 y sc-370P para C-19. La pre-absorción se llevó a cabo con la adición a la solución del anticuerpo primario del péptido, siguiendo las especificaciones del suministrador. En todos los casos estudiados mediante este ensayo se demostró una ausencia de tinción absoluta. De forma complementaria, se demostró sobre células BT-474 mediante Western-blot la especificidad del mismo, pre-incubando de la misma forma el anticuerpo primario con el péptido bloqueante sc-370P durante 15 minutos (Figura 4.26).

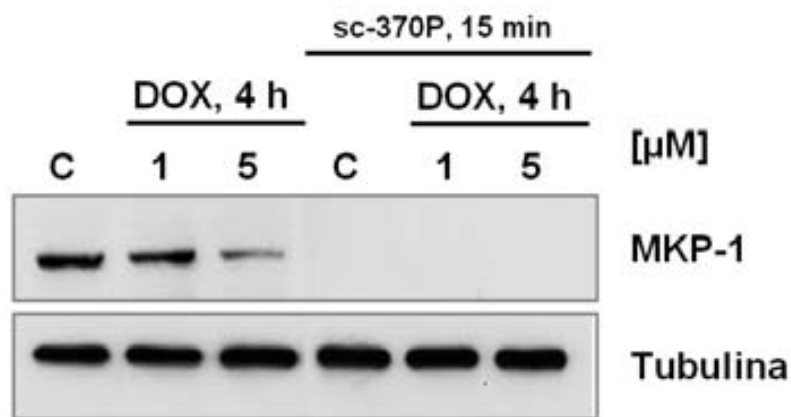


Figura 4.26. Western-blot para MKP-1 con el anticuerpo C-19 en células BT-474 en condiciones basales y en tratamiento con doxorubicina durante 4 horas a concentraciones de 1 y 5 μ M. Los tres primeros carriles representan los niveles de MKP-1 en un ensayo convencional; los tres siguientes, tras pre-incubación del anticuerpo primario con el péptido bloqueante específico sc-370P.

En base a los resultados obtenidos en los diferentes experimentos de inmunohistoquímica destinados a confirmar la especificidad del ensayo, se determinó que el anticuerpo V-15 demostraba una tinción según el patrón esperado por el conocimiento acumulado en la literatura, además que los ensayos con tejidos procedentes de los ratones confirmaban la misma. Este anticuerpo se estandarizó a condiciones de desenmascaramiento antigénico en una solución tamponada a pH9, utilizando durante 40 minutos un baño termostático que contenía las secciones de tejido. El anticuerpo se utilizó a una dilución de 1:200, con una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente y usando el sistema EnVision como método de detección durante 30 minutos, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La sensibilidad del ensayo de inmunohistoquímica escogido se determinó mediante un estudio comparativo de expresión de MKP-1 en una serie de 9 muestras pareadas de cáncer de mama, de las que se disponía de tumor congelado (almacenado a -80°C) y un bloque de parafina representativo, y que fue analizada mediante Western-blot –las muestras congeladas– e inmunohistoquímica –las muestras parafinadas–. Las muestras congeladas se homogeneizaron, lisaron y se extrajeron las proteínas, tal y como se describe

en la sección de Material y Métodos, demostrando mediante un ensayo de Western-blot la expresión de MKP-1 en las mismas como una banda de 39kDa, aproximadamente, de peso molecular, y con una intensidad variable. Mediante inmunohistoquímica se estudiaron las parafinas correspondientes de los mismos casos siguiendo el protocolo descrito para V-15. Los niveles de expresión de MKP-1 mostraron una correlación excelente en la determinación de inmunohistoquímica con la intensidad de las bandas del ensayo de Western blot para la mayoría de los casos estudiados (Figura 4.27).

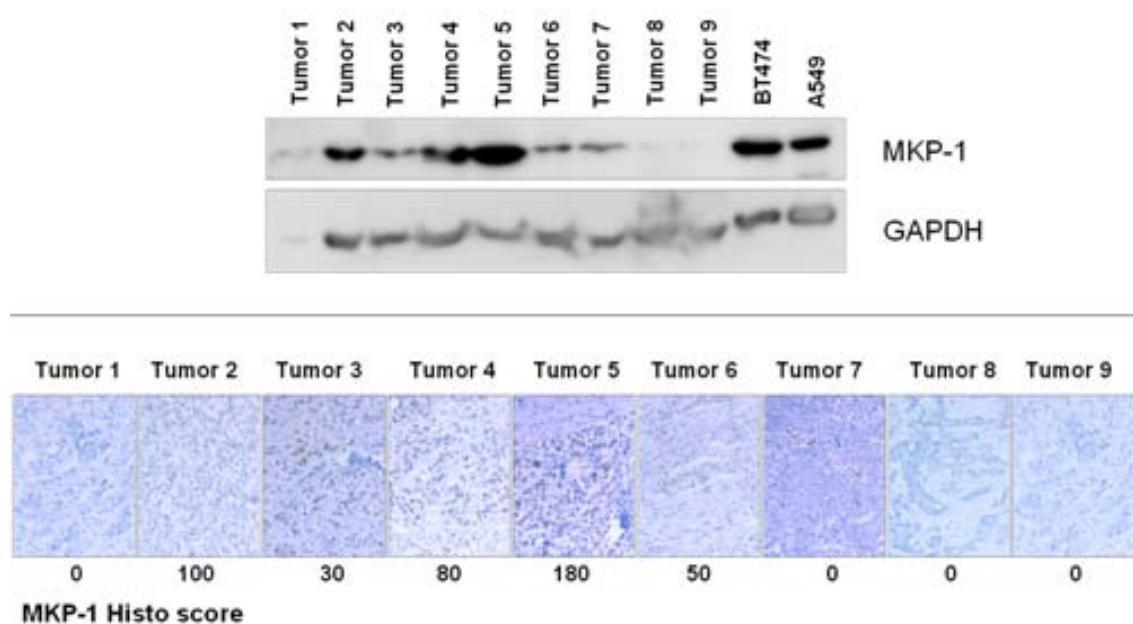


Figura 4.27. Niveles de expresión de MKP-1 en 9 tumores de mama pareados, mediante Western blot sobre lisados procedentes de las muestras congeladas, y mediante inmunohistoquímica sobre secciones de tejido de los bloques de parafina

Mediante estos experimentos se definió un ensayo de inmunohistoquímica robusto y con una sensibilidad y una especificidad suficientes para ser empleado en muestras de tejido humano fijadas en formol y embebidas en parafina. El ensayo tiene como base el uso del anticuerpo policlonal de conejo V-15 en las condiciones previamente comentadas, destinado al análisis del

patrón de expresión en una serie retrospectiva amplia de tumores de mama con seguimiento clínico.

4.3. Estudio del patrón de expresión de MKP-1 en tejido mamario normal y en lesiones patológicas de la mama

En primer lugar, se estudió el patrón de expresión de MKP-1 mediante inmunohistoquímica en una serie de secciones completas de tejido de mama que incluían epitelio mamario normal, lesiones no proliferantes de mama y lesiones proliferantes. Esta serie estaba compuesta por 30 muestras de mama morfológicamente normal, 11 lesiones de hiperplasia ductal usual, 9 lesiones de lesión proliferante con atipia (hiperplasia atípica), 18 lesiones de carcinoma ductal in situ y 30 tumores epiteliales infiltrantes (Figura 4.28).

El tejido mamario morfológicamente normal presentó una expresión nuclear de MKP-1 en las células de ductos y lobulillos mamarios, de intensidad débil, aunque evidente, presente de forma difusa en todas las células estudiadas. En ninguno de los casos se identificó expresión citoplasmática de la proteína. De forma característica, las células mioepiteliales y basales de las estructuras epiteliales mamarias no mostraron MKP-1 detectable en las condiciones utilizadas en este ensayo de inmunohistoquímica. Por el contrario, las células del estroma mamario normal, como los fibroblastos y las células endoteliales, presentaron una expresión nuclear débil de MKP-1. Las lesiones de hiperplasia ductal usual incluidas en este primer estudio mostraban expresión similar a la observada en el epitelio mamario morfológicamente normal, mientras que las lesiones de hiperplasia atípica presentaron una tinción de MKP-1 de una intensidad ligeramente superior. En ninguno de los casos se identificó un aumento del número de células con expresión de la proteína.

La expresión nuclear de MKP-1 fue más intensa en el carcinoma ductal in situ comparada con el epitelio morfológicamente normal (Figura 4.29). Este patrón fue detectado en todos los casos de lesiones ductales in situ analizadas. Este hecho relevante permitió la definición de sobre-expresión de MKP-1 en base al aumento de esta expresión respecto a la referencia del tejido mamario normal.

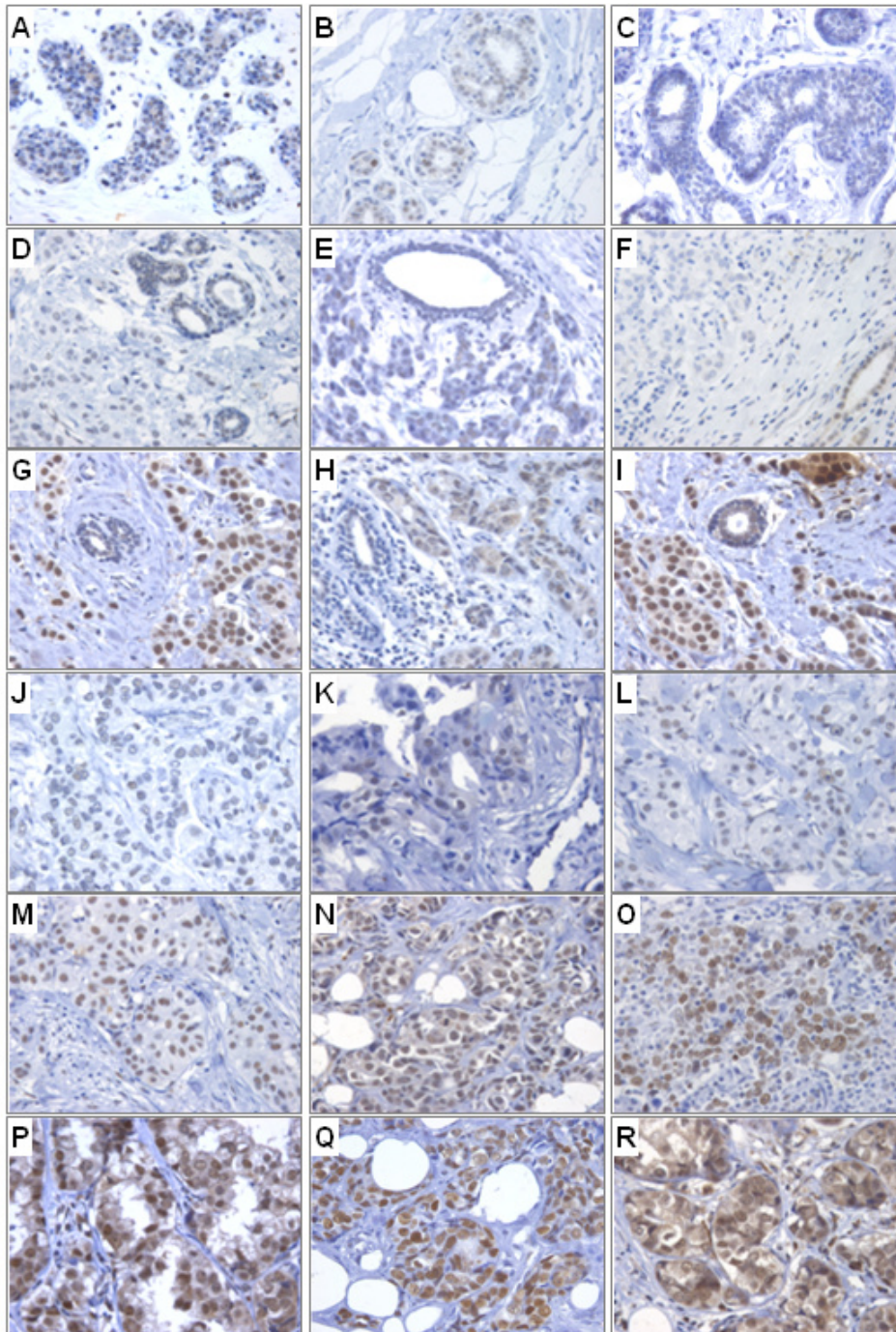


Figura 4.28. Imágenes representativas de la expresión de MKP-1 en lobulillos mamarios morfológicamente normales (A y B) e hiperplasia ductal (C). Se representan diferentes niveles de expresión en diversos tumores junto a estructuras mamarias preservadas adyacentes a los mismos. Los tumores D, E y F muestran una expresión de MKP-1 menor que el tejido morfológicamente normal, mientras que los tumores G, H e I presentan una expresión más elevada. Se observaron casos sin expresión de MKP-1 detectable por inmunohistoquímica (J), con expresión moderada en aisladas células tumorales (K) o débil de forma difusa (L). Los tumores con sobre-expresión de MKP-1 (M a R) muestran diferentes niveles de la proteína en el núcleo de las células tumorales y en casos con intensa expresión, puede detectarse expresión citoplasmática (P y R)

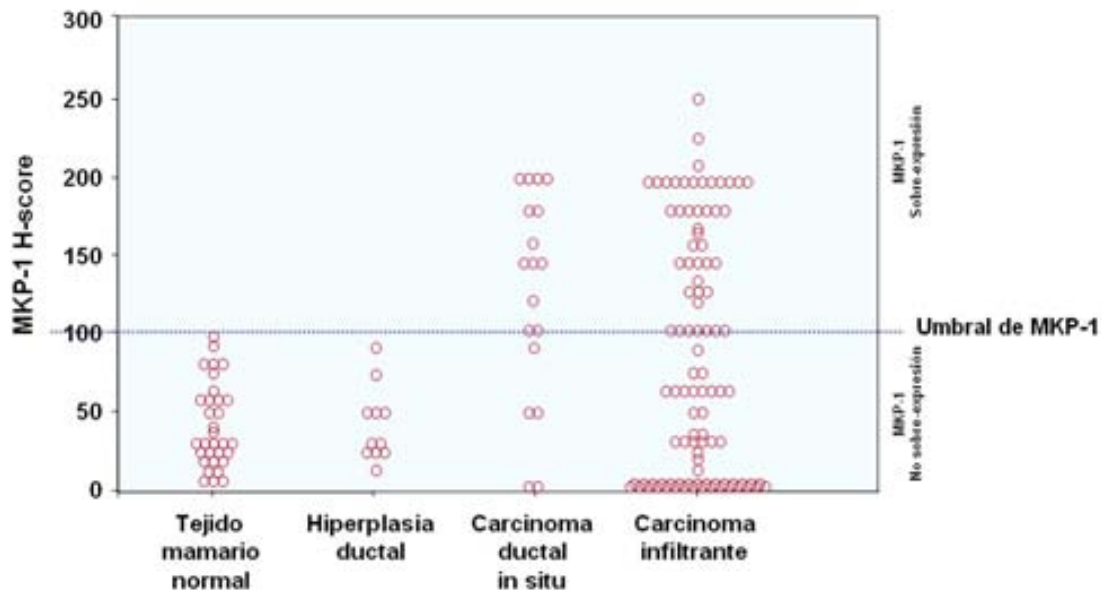


Figura 4.29. Niveles de expresión de MKP-1 en las muestras analizadas correspondientes a tejido mamario morfológicamente normal, hiperplasia ductal, carcinoma ductal in situ y carcinoma infiltrante. De forma llamativa, los niveles detectados en tejido normal e hiperplasia no presentan, en ninguno de los casos estudiados, niveles superiores a un Histo-score de 100. Este valor fue seleccionado como umbral para definir la sobre-expresión de MKP-1

Todas las secciones de tejido mamario estudiadas, representativas de tejido morfológicamente normal, cambios de hiperplasia y lesiones de carcinoma in situ, procedían de especímenes quirúrgicos de pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante. Los niveles de expresión de MKP-1 en los tumores de estas pacientes presentaron un patrón heterogéneo, identificándose variabilidad en la intensidad de la expresión en la serie de casos estudiada como diferente extensión de la misma entre los tumores. De forma general, la sobre-expresión de MKP-1 fue detectada hasta en el 50% de los tumores infiltrantes incluidos en la serie, tanto en aquellos analizados sobre una sección completa como en los tumores de las matrices de tejidos (Figura 4.29). De forma adicional a la expresión nuclear, en algunos tumores se observó la presencia citoplasmática de MKP-1 en células epiteliales malignas, aunque de una intensidad débil. Todos los casos que presentaron esta característica presentaban una expresión nuclear intensa de MKP-1. Este hallazgo puede explicarse por la presencia aumentada de la proteína en su forma

citoplasmática, en la que se induce su degradación tras ubiquitinización, vía proteasoma. En 5 de los casos estudiados sobre sección completa de tejido y que contenían lesiones de carcinoma ductal in situ, se detectó una sobre-expresión de MKP-1 en estas lesiones de carcinoma in situ, mientras que MKP-1 no era detectable en la lesión infiltrante de la misma paciente.

El conjunto de todas estas observaciones sugiere que la sobre-expresión de MKP-1 es un acontecimiento que acontece precozmente durante la transformación maligna de la mama, y que MKP-1 está presente hasta en el 50% de los carcinomas.

4.4. La doxorubicina reduce la expresión de MKP-1 en una proporción elevada de tumores humanos de mama

Ya se demostró que la doxorubicina modula la expresión de MKP-1 en un panel de líneas celulares de cáncer de mama (Figuras 4.3 a 4.8), reproduciendo resultados publicados por otros grupos^{178, 216}. A continuación, se estudió el efecto de la doxorubicina en una serie de tumores de mama procedentes de pacientes de nuestro centro.

Con este último fin, se obtuvieron pequeñas muestras en fresco de tumores de mama intervenidos quirúrgicamente, que fueron expuestas de una forma *ex vivo* a la presencia de la doxorubicina a una concentración de 2µg/ml. Este modelo se designó como ensayo *ex vivo* en cáncer de mama para el estudio de marcadores.

4.4.1. Ensayo ex vivo en cáncer de mama para estudio de marcadores

En primer lugar, se estudio en este modelo la capacidad de permeación en el tejido de moléculas de pequeño tamaño, como la doxorubicina, mediante difusión desde el medio de cultivo. Dado que la doxorubicina presenta una fluorescencia de emisión roja en excitación a 488 nm²¹⁷, se utilizaron secciones de 4 µm de tejido, no procesadas ni teñidas, procedentes de los tumores incubados con el fármaco para estudiar la difusión del fármaco en la

muestra, utilizando para ello un microscopio de fluorescencia Olympus con lámpara de mercurio de 100 w y con un filtro de doble paso para el espectro verde y rojo.

Todas las muestras de tumor incubadas durante 24 horas con doxorubicina presentaron una intensa y difusa fluorescencia roja por difusión del compuesto. Esta doxorubicina se incorporó tanto en el núcleo de las células tumorales como en el de las células normales, incluyendo fibroblastos, células mamarias epiteliales no tumorales o células inflamatorias (Figura 4.30).

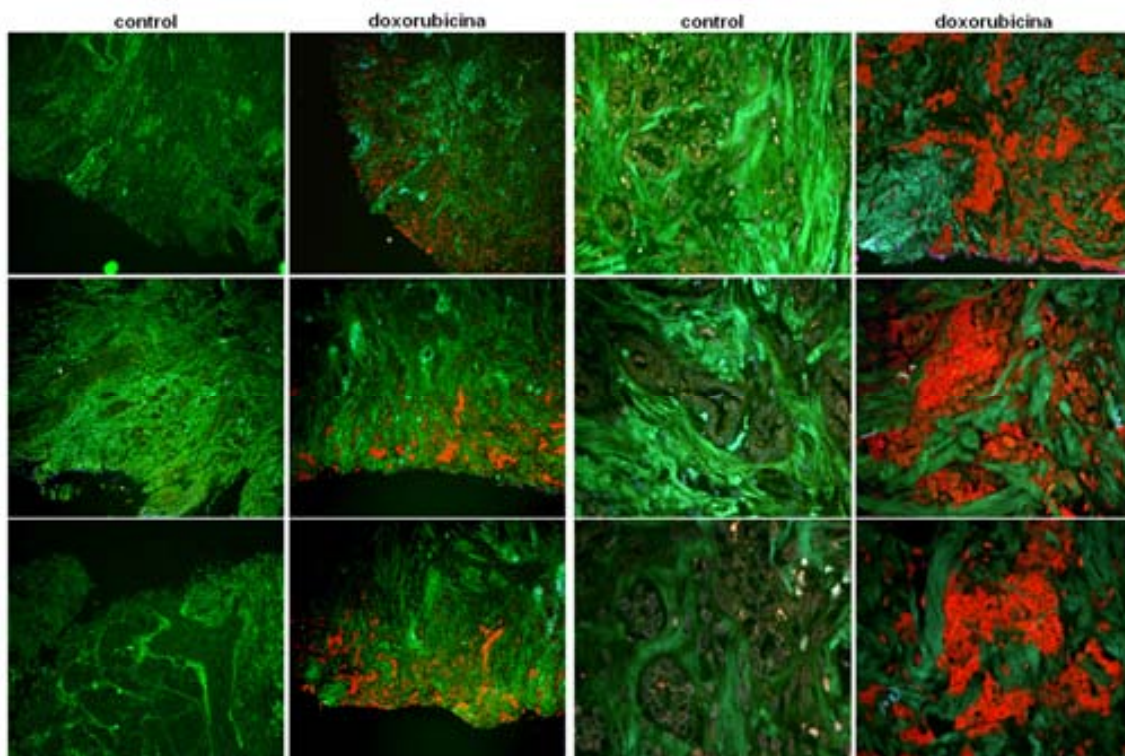


Figura 4.30. Imágenes representativas bajo microscopía óptica de fluorescencia de secciones del modelo de carcinoma de mama ex vivo, incubados con medio (control) o doxorubicina durante 24 horas (aumento x40 en las columnas de la izquierda y x400 en las de la derecha). Se observa la presencia del fármaco incorporado en los núcleos de las células tumorales expuestas al tratamiento tras 24 horas. Se identifica fluorescencia de emisión roja en células tumorales y en células estromales

Con el objetivo de definir la zona de difusión en los tejidos y establecer el área del tumor expuesta a la doxorubicina, se capturaron mediante una cámara digital acoplada al microscopio, Olympus DP50, hasta 100 imágenes microscópicas en campo oscuro a través del filtro de doble paso, utilizando un objetivo x100. A continuación, en estas imágenes se midió la distancia desde el borde físico de la pieza hasta la zona de máxima difusión de la doxorubicina, siguiendo la fluorescencia roja, mediante el programa de análisis ImageJ, corregido por el aumento y diámetro del campo microscópico empleados. Los cálculos demostraron una difusión homogénea de la doxorubicina, con un mínimo de 322.42 μm y un máximo de 990.99 μm , siendo la media de 624.13 μm . Esta distancia fue considerada como la zona susceptible de exposición a la doxorubicina y fue utilizada para la evaluación de los efectos moleculares del tratamiento en todas las muestras estudiadas (Figura 4.31).

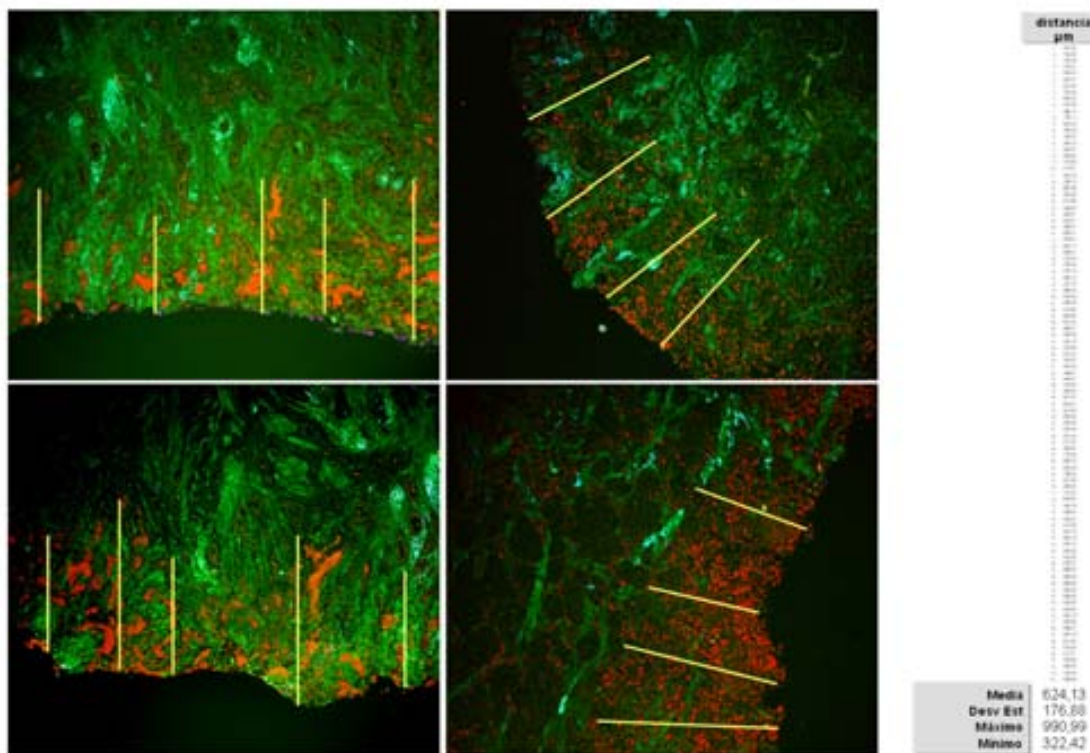


Figura 4.31. Distancia desde el borde del fragmento de tumor de máxima penetración de la doxorubicina por difusión, medida en 100 puntos mediante el programa de análisis de imagen ImageJ (aumento x100), representada como líneas amarillas en cuatro imágenes representativas. La media de estas distancias es de 624.13 μm , el máximo de 990.99 μm y un mínimo de 322.42 μm

La observación de la fluorescencia demostró que el compuesto era capaz de penetrar las secciones de tejido incubadas durante 24 horas en presencia de la doxorubicina, validando este modelo como un ensayo para evaluar los efectos moleculares de un tratamiento sobre un tumor humano, en condiciones *ex vivo*, y manteniendo el contexto de interacción entre la célula tumoral y su microambiente. Como confirmación de los efectos celulares de la doxorubicina, se realizó una determinación inmunohistoquímica para detectar la expresión de la proteína p53 destinada a analizar el daño en el DNA celular producido por el fármaco. En todos los casos analizados se observó una inducción de su expresión de forma significativa respecto a los correspondientes tumores control ($p < 0.001$) (Figura 4.32).

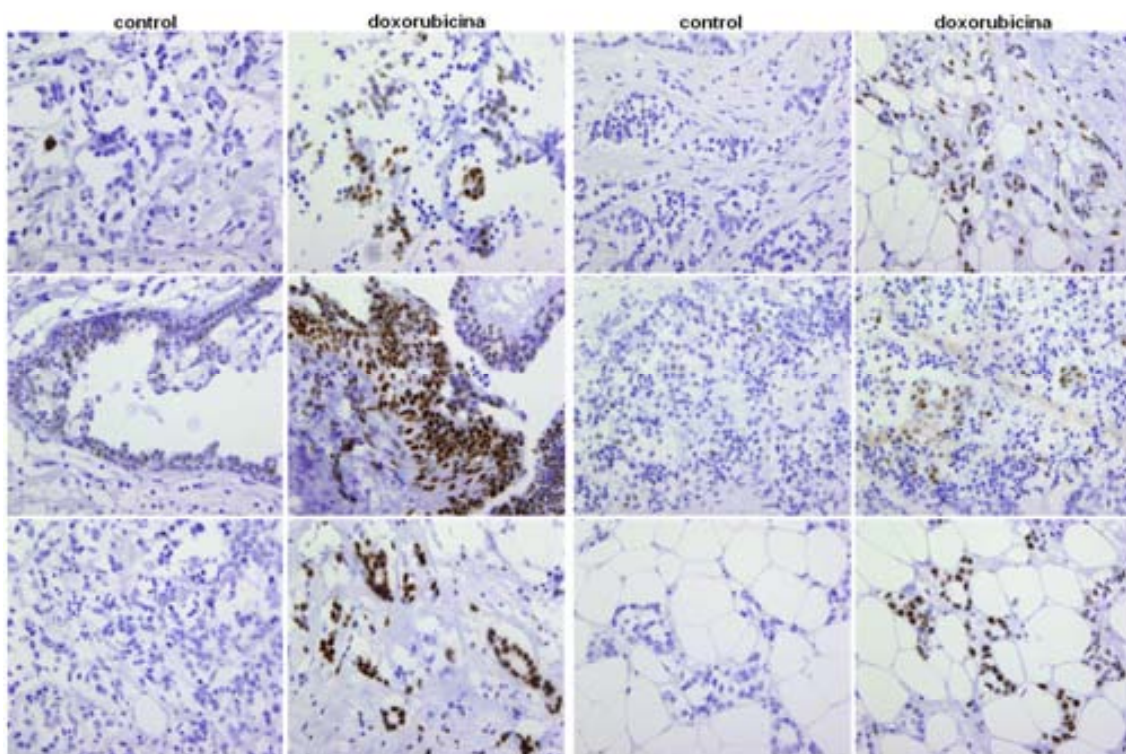


Figura 4.32. Imágenes microscópicas representativas de la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica, en muestras pareadas de tumores control y tratados con doxorubicina (aumento x400). En todos los casos estudiados se observó un incremento significativo de la expresión de p53, tanto en células tumorales como en células normales, incluyendo elementos estromales y células linfoides

4.4.2. Estudio de los efectos moleculares de la doxorubicina sobre MKP-1 y las MAPK en tumores de mama cultivados *ex vivo*

Los efectos de la doxorubicina sobre MKP-1 y las formas fosforiladas de las MAPK se estudió en una serie de 50 tumores procesados para este modelo *ex vivo*. De cada tumor, se obtuvieron 2 fragmentos; el primero de ellos se mantuvo durante 24 horas en medio de cultivo y el segundo en medio suplementado con la doxorubicina a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$, durante el mismo tiempo. En las muestras no expuestas a doxorubicina (muestras control), se detectó una expresión nuclear de MKP-1 con rango de sobre-expresión en 23 (46%) de los casos y no sobre-expresada en los 27 (54%) restantes. Además de estudiar la presencia de sobre-expresión de MKP-1, se cuantificó la misma mediante un Histo-score según se discute en la sección de métodos. Analizando todos los casos de forma global, se observó una disminución de la expresión de MKP-1 (Figura 4.33), en términos de este Histo-score, comparando los casos control con los tratados con doxorubicina: media de Histo-score de MKP-1: 117 ± 64 (desviación estándar, DS) en las muestras control, frente a 72 ± 104 en los tumores tratados ($p < 0.001$).

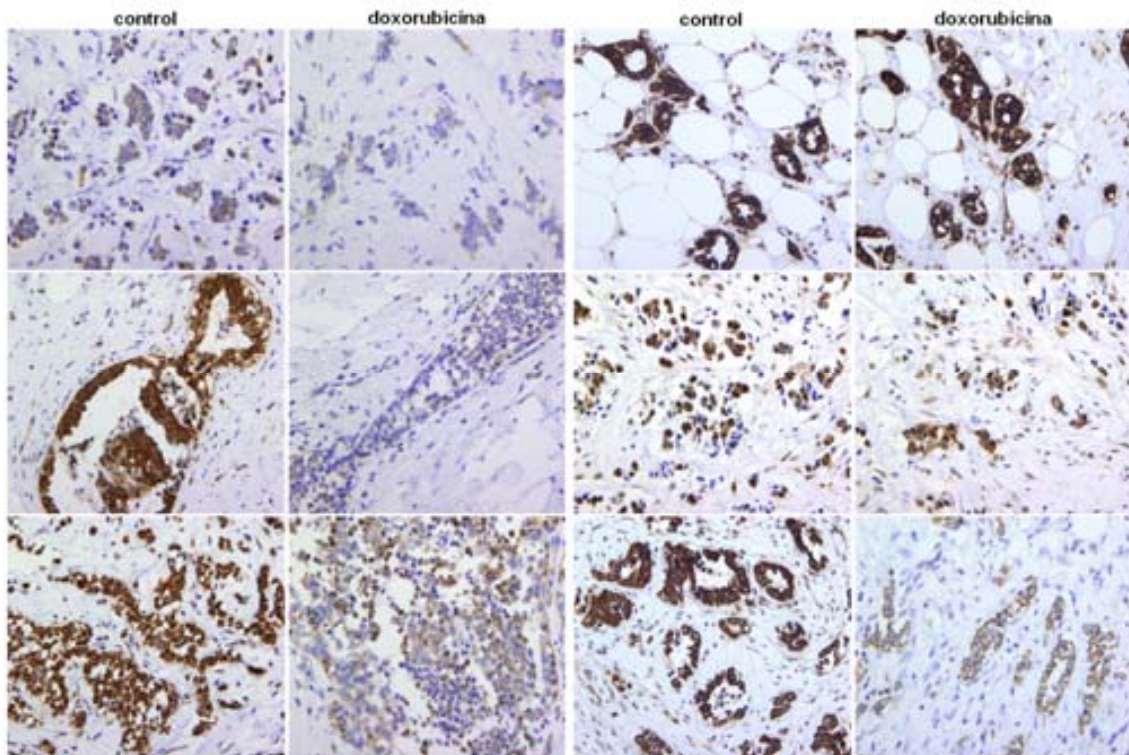


Figura 4.33. Imágenes microscópicas representativas de la expresión de MKP-1 mediante inmunohistoquímica, en los tumores control y tratados con doxorubicina (aumento x400). Las células que expresan MKP-1 presentan tinción nuclear para la proteína. De forma general, se identifica una disminución de los niveles de MKP-1 tras el tratamiento en la mayoría de casos estudiados, tanto a nivel de las lesiones infiltrantes como in situ.

La expresión de las formas fosforiladas de JNK y de ERK1/2 (Figura 4.34) aumentó de forma significativa en los casos tratados con doxorubicina respecto a los controles: Histo-score de p-ERK1/2: 49 ± 47 (DS) en los casos control, frente a 87 ± 65 en los tratados ($p < 0.001$); e Histo-score de p-JNK: 72 ± 50 en los controles, frente a 126 ± 82 en los casos tratados ($p < 0.001$).

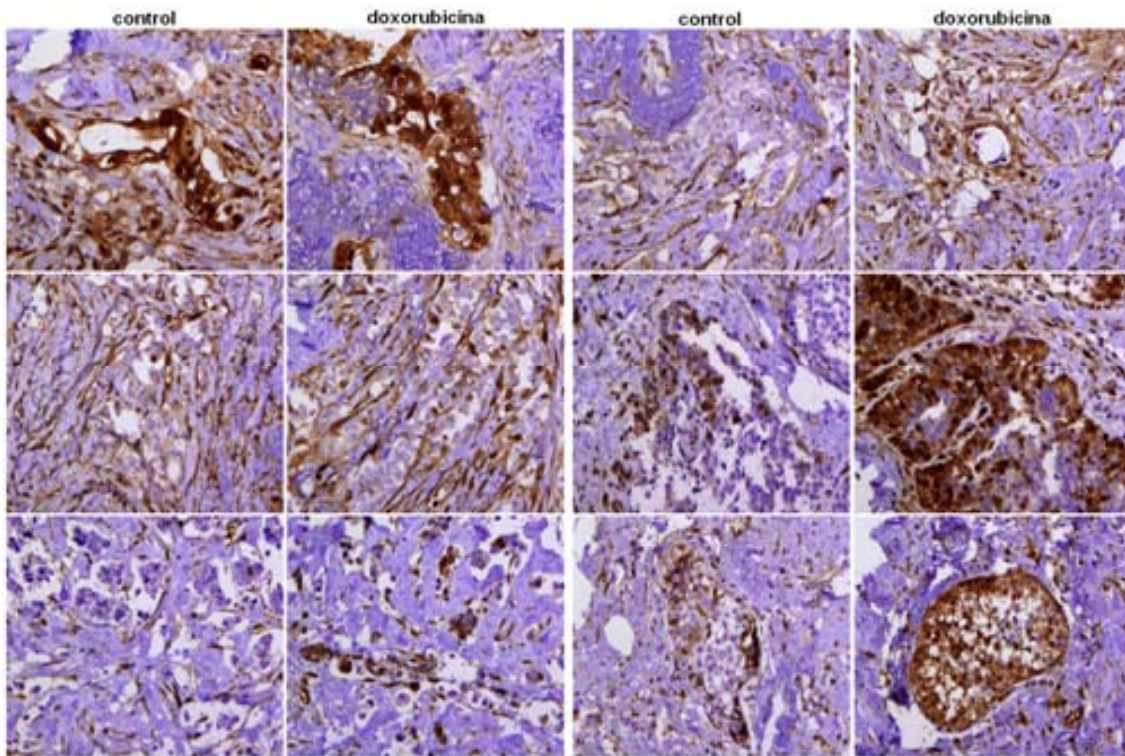


Figura 4.34. Imágenes microscópicas representativas de la expresión de p-ERK mediante inmunohistoquímica, en muestras pareadas de los tumores control y tratados con doxorubicina (aumento x400). Las células que expresan la forma fosforilada de ERK presentan tinción nuclear para la proteína. Se observa expresión citoplasmática de la proteína en células tumorales, que no se considera para el estudio. Así mismo, se detecta p-ERK en células estromales. De forma general, se aprecia aumento de la expresión de p-ERK en los tumores analizados

La expresión de p-p38 fue mayor en las muestras tratadas respecto a los controles, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.29$). Este patrón de cambios moleculares inducidos por la doxorubicina fue similar al observado en las líneas celulares de mama (Figuras 4.4 a 4.7).

Sin embargo, estos hallazgos no fueron uniformes en todos los casos estudiados. Los niveles de MKP-1 disminuyeron en 39 de los tumores expuestos a la doxorubicina, mientras que en los 11 casos restantes, sus niveles se incrementaron. Estos efectos de la doxorubicina sobre la expresión

de MKP-1 y de las diferentes MAPK se expresaron de forma gráfica mediante un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado sobre las medias de expresión de cada uno de los marcadores por separado, utilizando una regla de afinidad que colocaba los casos con un patrón de expresión de marcadores similar más próximos entre sí ^{207, 208} (Figura 4.35). Este análisis se realizó mediante el programa informático en base Java, Genesis, que representa de forma arbitraria los aumentos de expresión inducidos por la doxorubicina para cada uno de los marcadores en color rojo y las disminuciones en color verde.

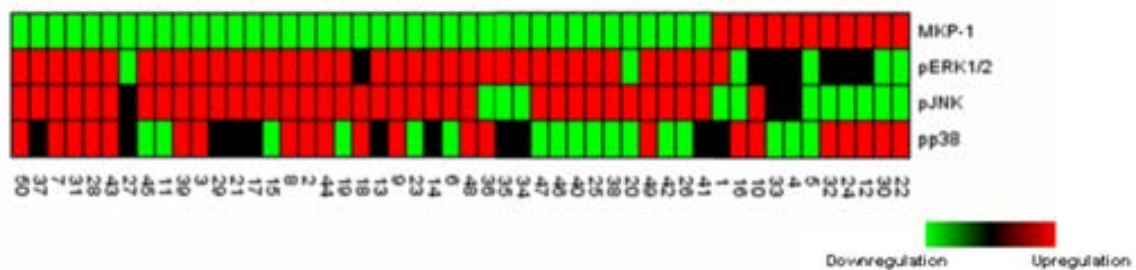


Figura 4.35. Análisis de los cambios de expresión inducidos por la doxorubicina en MKP-1 y las MAPK, mediante el programa informático Genesis. Se representa de forma arbitraria los aumentos de expresión en cada uno de los marcadores en color rojo (upregulation) y las disminuciones (downregulation) en color verde. El color negro representa una no modificación de la expresión

De esta forma, únicamente aquellos tumores que disminuían MKP-1 por el tratamiento con doxorubicina, mostraron un aumento significativo de la expresión de p-ERK1/2 ($p < 0.001$) y p-JNK ($p < 0.001$). Comparando los niveles de expresión basales de MKP-1 en los casos control con la capacidad de disminuir su expresión ante el tratamiento con doxorubicina, encontramos que en los 27 casos que de forma basal no presentaban sobre-expresión de MKP-1, la doxorubicina inducía una disminución de su expresión hasta alcanzar niveles indetectables o casi indetectables mediante el ensayo de inmunohistoquímica empleado (MKP-1 Histo-score: 69 ± 21 en los casos control, frente a 13 ± 14 en los tumores tratados; $p = 0.03$). En este grupo de 27

tumores, el aumento estadísticamente significativo de p-ERK1/2 y p-JNK fue importante (p-ERK1/2 Histo-score: 38 ± 44 en casos control, frente a 96 ± 71 en los tratados; $p < 0.001$; p-JNK Histo-score: 58 ± 44 in controles, frente a 150 ± 65 in los tratados; $p < 0.001$). Por el contrario, en los 23 tumores que presentaban de forma basal una sobre-expresión de MKP-1, el tratamiento con doxorubicina no consiguió modificar de forma significativa su expresión ($p = 0.24$), la de p-ERK1/2 ($p = 0.23$), de p-JNK ($p = 0.72$) ni la de p-p38 ($p = 0.32$) (Figura IV.36).

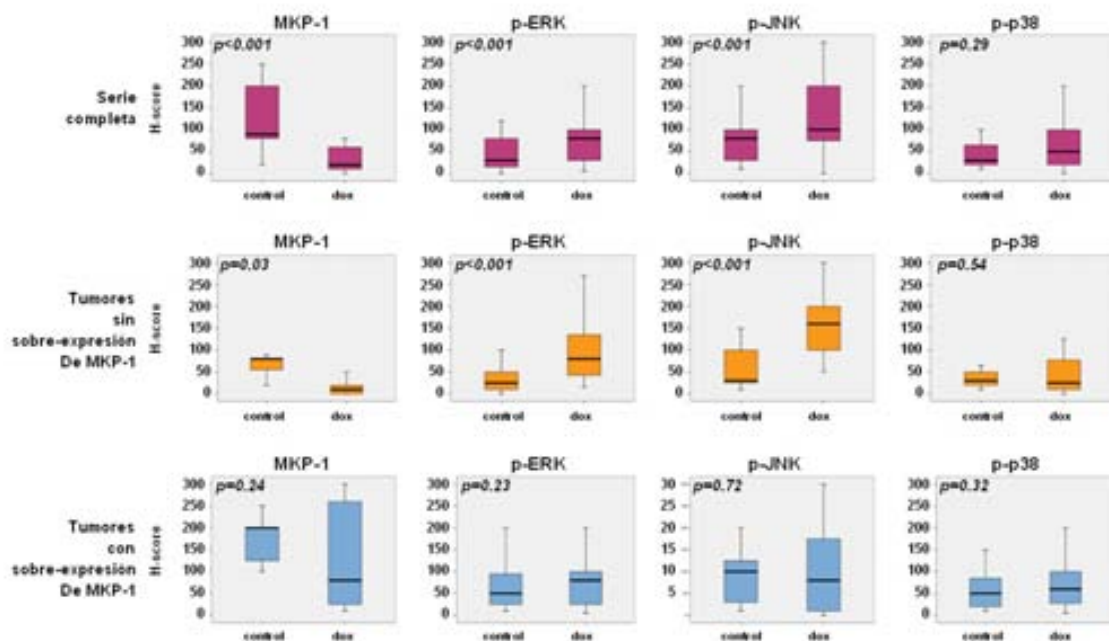


Figura 4.36. Niveles de expresión de MKP-1, p-ERK, p-JNK y p-p38 en las muestras control y tratadas con doxorubicina. Se muestran estos niveles para la serie completa de 50 casos estudiados y para aquellos tumores con y sin sobre-expresión de MKP-1 en la muestra control

Estas observaciones sugieren que en tumores de mama humanos, los niveles de base elevados de MKP-1 podrían estar relacionados con una menor capacidad de la doxorubicina para reducir la expresión de la propia MKP-1, así como de aumentar la activación de ERK1/2 y JNK en las células tumorales.

4.4.3. Estudio de los efectos en proliferación celular y apoptosis de la doxorubicina en tumores de mama cultivados ex vivo

Con el fin de determinar las consecuencias de las modificaciones inducidas por la doxorubicina sobre la expresión de MKP-1 y de las diferentes MAPK en cáncer de mama, se estudiaron la proliferación celular y la apoptosis en estas muestras ex vivo. La proliferación se analizó mediante estudio de los niveles de expresión de Ki-67 en las células tumorales. De forma general, las muestras ex vivo expuestas a la doxorubicina mostraron un descenso de la tasa de proliferación comparadas con sus respectivos controles ($p < 0.001$) (Figura 4.37). La reducción de la proliferación se observó en 36 casos (72%), mientras que Ki67 no se modificó en 14 tumores (28%) tras 24 horas de tratamiento con la doxorubicina. Característicamente, aquellos tumores en los que se producía una inhibición de MKP-1 por el tratamiento, se detectaba de una forma significativa una mayor reducción de la expresión de Ki-67 en las células tumorales, comparada con aquellos tumores que no mostraban inhibición de MKP-1 por la doxorubicina ($p = 0.03$).

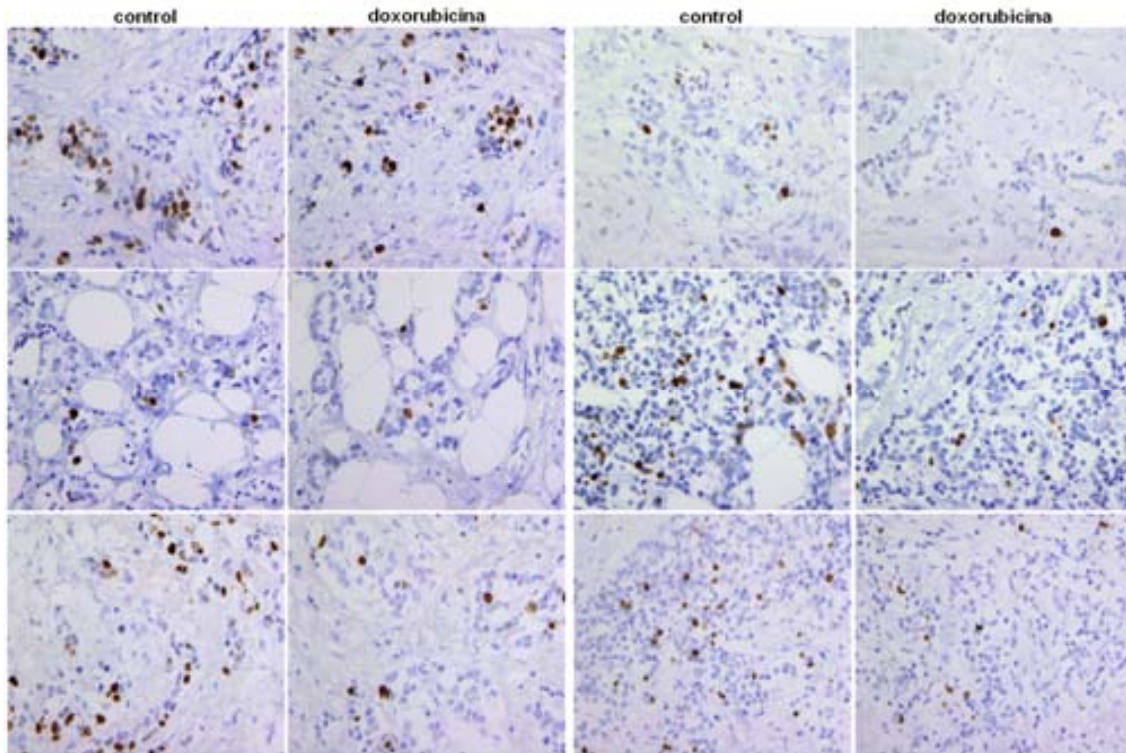


Figura 4.37. Imágenes microscópicas representativas del análisis de proliferación mediante inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo contra la proteína Ki-67, en los tumores control y tratados con doxorubicina (aumento x400). Las células que han entrado en el ciclo celular expresan en el núcleo Ki-67. De forma general se observa un descenso del número de células con expresión de la proteína en las muestras expuestas a la doxorubicina

La apoptosis se estudió mediante dos métodos complementarios, la expresión de la forma truncada o activa de la caspasa-3 (Figura 4.38) y mediante el ensayo de TUNEL (Figura 4.39). Con ambos métodos, se observó un aumento significativo de las figuras de apoptosis en los tumores tratados con doxorubicina, tomando como referencia las muestras mantenidas 24 horas en medio de cultivo ($p < 0.001$ para ambos marcadores). No se pudieron identificar diferencias de aumento de apoptosis entre los tumores que presentaban inhibición de MKP-1 por la doxorubicina y aquellos que no modifican o aumentaban sus niveles.

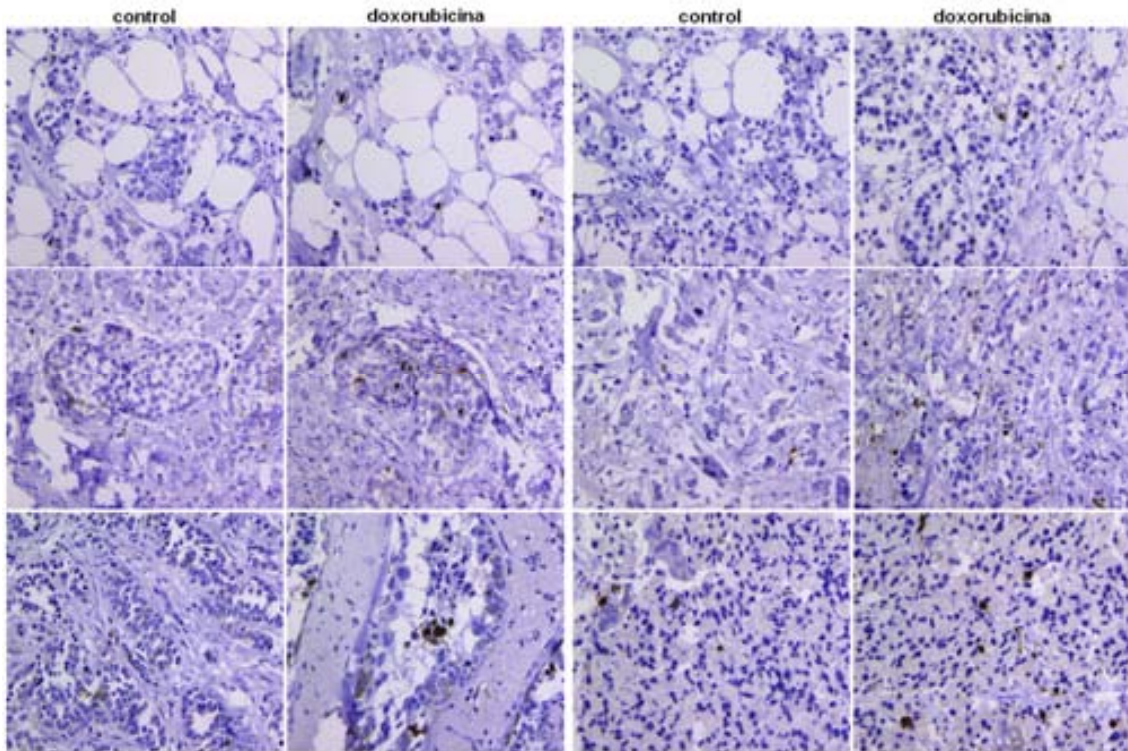


Figura 4.38. Imágenes microscópicas representativas del análisis de apoptosis mediante inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo contra la forma truncada de la caspasa 3, en los tumores control y tratados con doxorubicina (aumento x400). Las células apoptóticas expresan en el núcleo la forma truncada de la caspasa 3. Se identifica aumento de su expresión en todos los casos tratados con doxorubicina respecto a sus controles

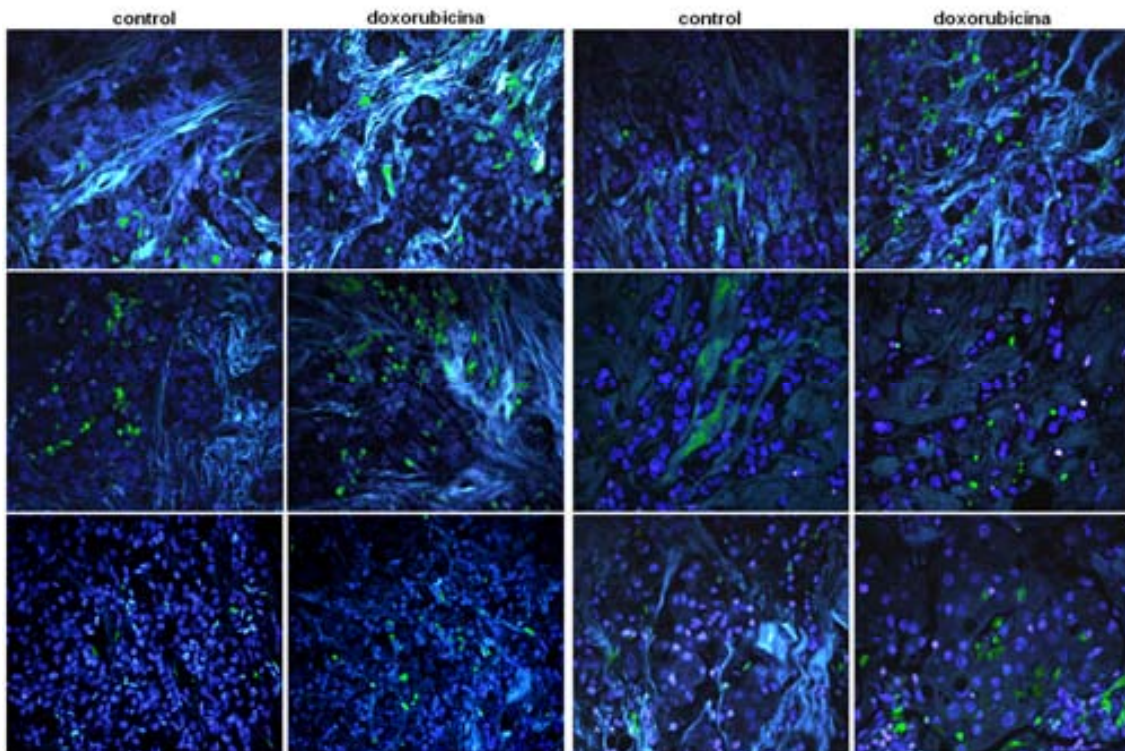


Figura 4.39. Imágenes representativas del análisis de apoptosis mediante la técnica de TUNEL en los tumores control y tratados con doxorubicina (aumento x400). Las células apoptóticas se marcan en fluorescencia verde intensa. El tejido está contrastado con DAPI, en color azul. Se observa aumento de células con fluorescencia verde en todos los tumores expuestos a la doxorubicina respecto a sus controles

4.5. La expresión de MKP-1, de las formas fosforiladas de las MAPK y las variables clínico-patológicas en los tumores de mama

Con el objetivo de determinar el papel de MKP-1 en el cáncer de mama, se analizó su expresión mediante inmunohistoquímica en una amplia serie retrospectiva de 96 tumores infiltrantes, procedentes de pacientes con un seguimiento clínico exhaustivo (Tabla IV.3). En esta serie, la mediana de edad de las pacientes fue de 63 años (rango: 26-90 años) y la mediana de seguimiento clínico fue de 69 meses (rango: 9-128 meses). Cuarenta y tres

casos (45%) demostraron sobre-expresión de MKP-1 y 53 tumores (55%), no. La media del Histo-score para MKP-1 fue de 85.3 (\pm 79.5 SD).

Las siguientes características fueron más frecuentes en los tumores con sobre-expresión de MKP-1, aunque ninguna de ellas correlacionó de forma significativa con MKP-1 (Tabla 4.3):

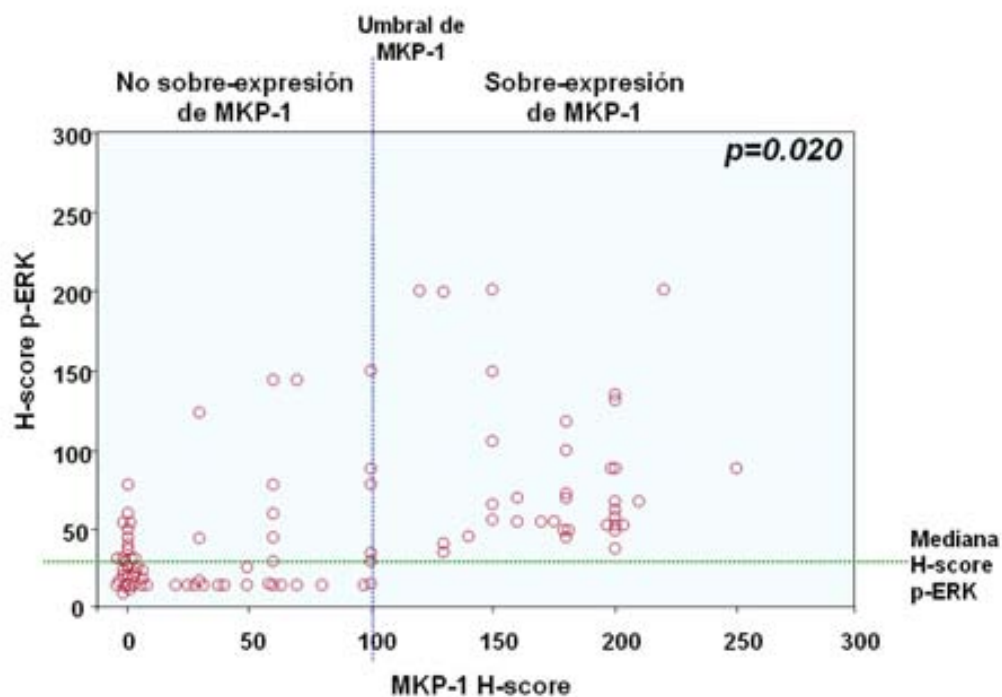
- Carcinoma infiltrante de tipo lobulillar
- Escasa diferenciación (grado III de SBR)
- Negatividad para receptores de estrógenos
- Negatividad para receptores de progesterona
- Sobre-expresión y amplificación de HER2
- Mayor tamaño tumoral
- Presencia de ganglios axilares invadidos en el momento del diagnóstico
- Estadio avanzado

En la serie estudiada, un total de 44 pacientes recibieron tratamiento adyuvante sistémico, bien quimioterapia, bien terapia hormonal o ambas. De estas pacientes, hasta 24 de ellas (54%) presentaron una sobre-expresión de MKP-1 en los tumores, mientras que en las 52 pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante, sólo 17 (33%) tuvieron sobre-expresión de MKP-1. Aunque existen diferencias numéricas entre ambos grupos en cuanto a la expresión de MKP-1, éstas no fueron significativas ($p=0.16$), probablemente por el pequeño tamaño muestral. En todo caso, la necesidad del tratamiento adyuvante en las pacientes con una sobre-expresión de MKP-1 de forma más frecuente podría reflejar el hecho de que esta sobre-expresión ocurre con mayor incidencia en aquellas pacientes con un estadio avanzado de la enfermedad o con la asociación de factores de mal pronóstico, aunque sin alcanzar esa significancia estadística.

Tabla 4.3. Características clínico-patológicas de la serie de pacientes analizada en el estudio, niveles de expresión de MKP-1 detectados y correlación de esta expresión con las variables incluidas

		Serie completa (n=96)	MKP-1 con baja expresión (n=53)	MKP-1 con sobre-expresión (n=43)	Valor estadístico (p)
Media de edad, años (rango)		63.3 (26-90)			
Media de seguimiento, meses (rango)		69 (9-128)			
Estadio inicial del tumor					0.458
	T1	48 (50%)	29 (60.4%)	19 (39.6%)	
	T2	37 (38.5%)	20 (54.1%)	17 (45.9%)	
	T3	7 (7.3%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
	T4	4 (4.2%)	2 (50%)	2 (50%)	
Estadio ganglionar					0.144
	N0	57 (59.4%)	35 (61.4%)	22 (38.6%)	
	N1	18 (18.8%)	8 (44.4%)	10 (55.6%)	
	N2	10 (10.4%)	6 (60%)	4 (40%)	
	N3	6 (6.3%)	1 (16.7%)	5 (83.3%)	
	Nx	5 (5.2%)			
Estadio TNM					0.223
	I	42 (43.8%)	27 (64.3%)	15 (35.7%)	
	II	28 (29.2%)	14 (50%)	14 (50%)	
	III	20 (20.8%)	8 (40%)	12 (60%)	
	IV	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	
	Desconocido	5 (5.2%)			
Terapia adyuvante					0.164
	Sí	44 (45.8%)	21 (46.7%)	24 (53.3%)	
	No	52 (54.2%)	27 (61.4%)	17 (38.6%)	
Tipo tumoral					0.122
	Ductal	78 (81.3%)	46 (58.9%)	32 (41.1%)	
	Lobulillar	18 (18.7%)	7 (38.9%)	11 (61.1%)	
Grado del tumor					0.554
	I	24 (25%)	14 (58.3%)	10 (41.7%)	
	II	46 (47.9%)	27 (58.7%)	19 (41.3%)	
	III	26 (27.1%)	12 (46.2%)	14 (53.8%)	
Receptores de estrógenos					0.599
	Negativo	20 (20.8%)	10 (50%)	10(50%)	
	Positivo	76 (79.2%)	43 (56.6%)	33 (43.4%)	
Receptores de progesterona					0.084
	Negativo	28 (29.2%)	11 (40.7%)	16 (59.3%)	
	Positivo	68 (70.8%)	41 (60.3%)	27 (39.7%)	
HER2					0.726
	Negativo	77 (80.2%)	44 (57.2%)	33 (42.8%)	
	Positivo	19 (18.8%)	9 (47.4%)	10 (52.6%)	
Recidiva (cualquier localización)		18 (18.8%)	3 (16.7%)	15 (83.3%)	<0.001
Metástasis		14 (14.6%)	1 (7.1%)	13 (92.4%)	<0.001
Muerte		13 (13.5%)	0 (0%)	13 (100%)	<0.001

Posteriormente, se analizó la relación entre la expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las distintas MAPK, ERK1/2, JNK y p38. Todos los tumores infiltrantes estudiados expresaron en algún grado las formas fosforiladas de ERK1/2, JNK y p38. Las medias de los Histo-scores, y sus desviaciones estándar, fueron para la forma fosforilada de ERK1/2 de 58.3 ± 58.7 , para la de JNK de 32.7 ± 47.7 y para la de p38 de 120.6 ± 76.7 . De forma relevante, se observó una relación significativa directa entre los niveles de expresión de MKP-1 en los tumores analizados y de activación de ERK1/2 ($p=0.020$) y, de forma inversa, entre los niveles de MKP-1 y de la forma fosforilada de p38 ($p=0.005$) (Figura 4.40). La correlación entre MKP-1 y la forma fosforilada de JNK no pudo demostrarse en los tumores incluidos en esta serie ($p=0.098$).



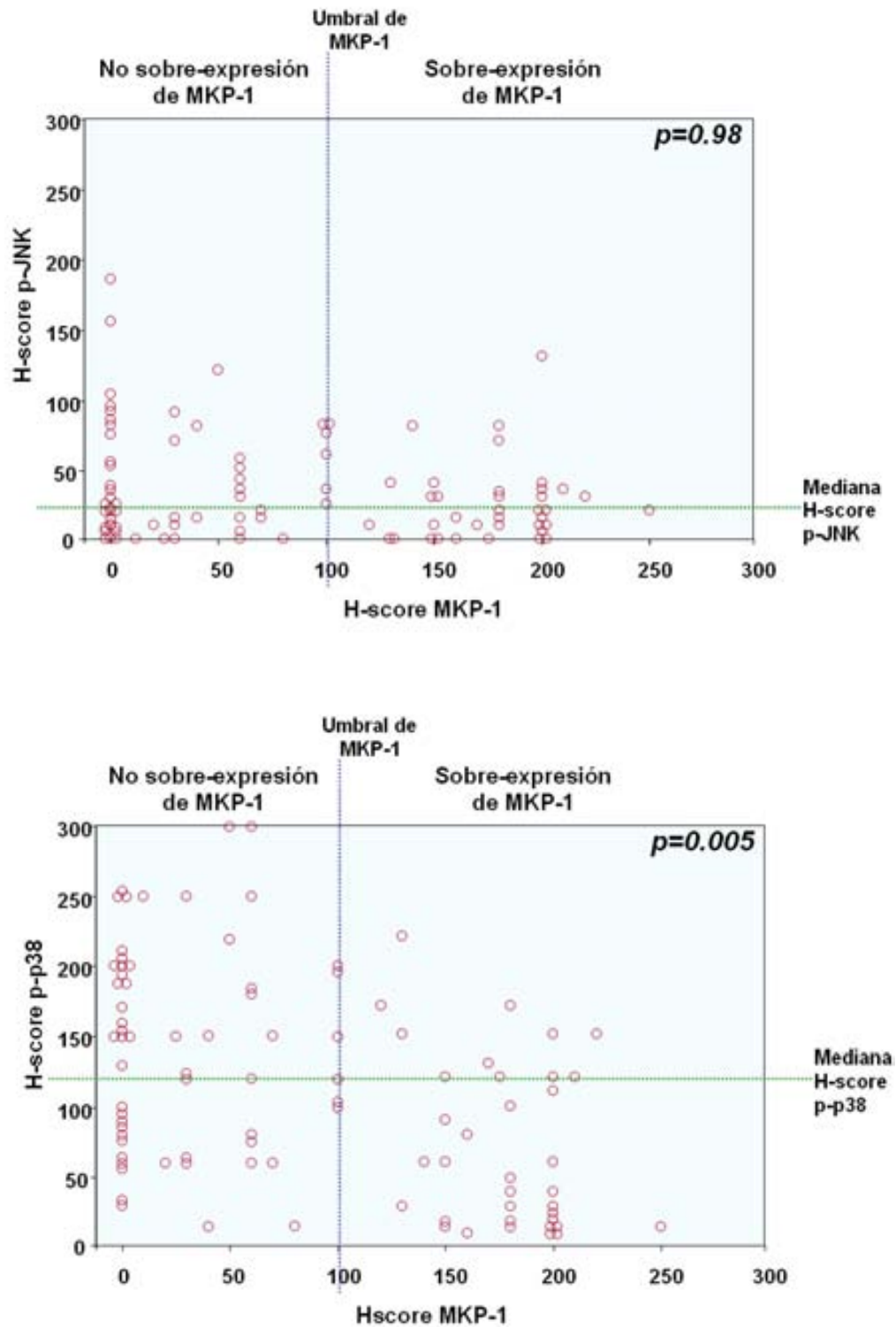


Figura 4.40. Correlación entre la expresión de MKP-1 y las distintas proteínas fosforiladas de la familia de MAPK, para cada caso de carcinoma de mama. En el eje de coordenadas, se indica la expresión de MKP-1 en Histo-score, y en el eje de abscisas, la expresión de las distintas formas fosforiladas de las MAPK, también en Histo-score. Se

indican las medianas de cada una de las MAPK y el umbral de sobre-expresión de MKP-1. Se calculó la correlación bivariada mediante el test de Spearman para cada MAPK

Teniendo en cuenta la definición de sobre-expresión de MKP-1 en los tumores de mama, se compararon los niveles cuantitativos de cada una de las formas fosforiladas de las MAPK para aquellos casos con y sin esta sobre-expresión. Así, la expresión de la forma fosforilada de ERK1/2 tenía un Histo-score de 61.4 (media) \pm 54.2 (desviación estándar) en los tumores con sobre-expresión de MKP-1, frente a un Histo-score de 55.8 \pm 62.4 en los tumores sin sobre-expresión, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.034$). Los valores de los Histo-scores de la forma fosforilada de JNK fueron de 29.6 \pm 29.7 en aquellos tumores con sobre-expresión de MKP-1, frente a un Histo-score de 35.2 \pm 41.6 en los tumores sin esta sobre-expresión ($p=0.056$); Las diferencias entre la expresión de la forma fosforilada de p38 fueron significativas ($p<0.001$) entre los tumores con sobre-expresión de MKP-1, con una media de 95.5 \pm 71.6, frente a los casos sin sobre-expresión, con una media de 140.9 \pm 75.4 (Tabla 4.4). Las diferencias observadas fueron atribuidas tanto al número de células con expresión de cada una de las proteínas estudiadas, como de la intensidad de la tinción de las mismas.

Tabla 4.4. Correlación entre la expresión de MKP-1 y las distintas proteínas fosforiladas de la familia de MAPK y el marcador de proliferación Ki-67. Se indica el valor medio de expresión de cada marcador por Histo-score (HS) y su desviación estándar (SD) y las correlaciones calculadas mediante Chi cuadrado

	Serie completa	MKP-1 con baja expresión	MKP-1 con sobre-expresión	Valor estadístico (p)*
Pacientes (%)	96 (100%)	53 (45.2%)	43 (44.8%)	
MKP-1				
Media HS \pm SD	85.3 \pm 79.5	20.5 \pm 26.5	165.2 \pm 39.6	
pERK1/2				
Media HS \pm SD	58.3 \pm 58.7	55.8 \pm 62.4	61.4 \pm 54.2	0.034
pJNK1/2				
Media HS \pm SD	32.7 \pm 36.7	35.2 \pm 41.6	29.6 \pm 29.7	0.056
pp38				
Media HS \pm SD	120.6 \pm 76.7	140.9 \pm 75.4	95.5 \pm 71.6	<0.001
Ki67				
Media % \pm SD	13.8 \pm 16.1	12.3 \pm 16	14.9 \pm 16.3	0.1

*Chi Square test

4.6. Sobre-expresión de MKP-1 y recidiva en cáncer de mama

Con el objetivo de determinar el papel pronóstico de MKP-1 en el cáncer de mama, se analizó la asociación de los niveles de su expresión y la evolución clínica de las pacientes con esta enfermedad. En la serie estudiada, 18 pacientes presentaron recidiva de la enfermedad. De éstas, 15 (83.3%) presentaban tumores con sobre-expresión de MKP-1, mientras que solo 3 (16.7%), fueron pacientes sin sobre-expresión detectable de MKP-1 en las lesiones. La mayoría de las pacientes (15 casos, 83.3%) con recidiva habían recibido tratamiento adyuvante sistémico, incluyendo el uso de antraciclinas en 7 de las 15 pacientes que sobre-expresaban MKP-1 y sólo en una de las 3 pacientes sin sobre-expresión de MKP-1. Desgraciadamente, estas cifras son demasiado pequeñas para realizar un análisis de comparación entre el grado

de expresión de MKP-1 y el efecto potencial del uso de las antraciclinas adyuvantes sobre el riesgo de recidiva en las pacientes con cáncer de mama. El riesgo de recidiva y su asociación con los niveles de expresión de MKP-1 se analizó mediante el test de supervivencia de Kaplan-Meier. Este análisis sobre el periodo libre de enfermedad confirmó que la sobre-expresión de MKP-1 era un factor pronóstico para la recidiva de la enfermedad (Figura 4.41; log-rank test, $p < 0.001$). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para la recidiva y el test de rangos demostraron también que el estadio del tumor primario ($p = 0.035$), el grado tumoral ($p = 0.013$), el tamaño tumoral ($p = 0.025$), la afectación de ganglios linfáticos axilares ($p < 0.001$), la ausencia de expresión de los receptores de estrógenos ($p = 0.008$), la ausencia de expresión de los receptores de progesterona ($p = 0.004$) y los niveles bajos de expresión de p-p38 ($p < 0.001$) se asociaban con un mayor riesgo de recidiva.

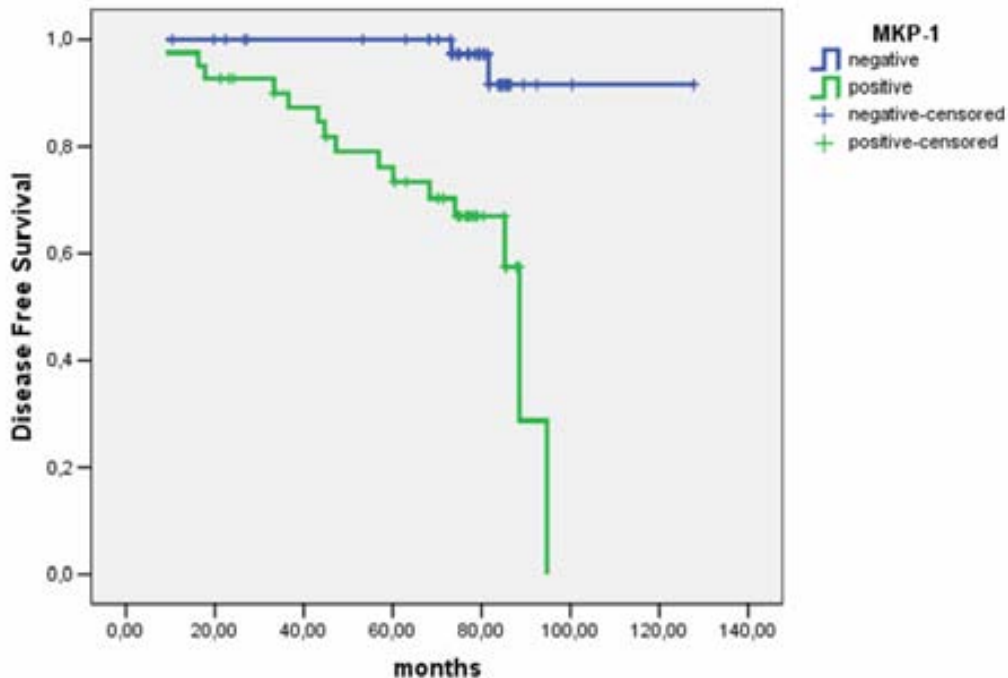


Figura 4.41. Curva de supervivencia libre de enfermedad en la serie de pacientes analizadas con cáncer de mama, estratificadas de acuerdo a la sobre-expresión o no de MKP-1

Los estudios de supervivencia multivariados se calcularon incluyendo todas las variables clínico-patológicas y la expresión de MKP-1 (Tabla 4.3). Estos análisis multivariados demostraron que la sobre-expresión de MKP-1 ($p=0.016$) fue un factor independiente de mal pronóstico en nuestra serie. Del resto de factores clínico-patológicos estudiados, la edad ($p=0.015$), el tamaño tumoral ($p=0.050$) y la afectación de ganglios linfáticos axilares ($p=0.010$) fueron también factores pronósticos independientes, mientras que los receptores de estrógenos ($p=0.60$), los receptores de progesterona ($p=0.99$), la sobre-expresión y/o amplificación de HER2 ($p=0.94$), el estadio TNM ($p=0.72$), el grado del tumor ($p=0.49$) y el estado menopáusico ($p=0.19$) no se comportaron como factores pronósticos independientes (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Riesgos proporcionales siguiendo el análisis multivariado de riesgos de Cox para los factores pronósticos en relación a recidiva, en la serie de pacientes con cáncer de mama

Dado que la expresión de la forma fosforilada de p38 fue un factor de mal pronóstico en el análisis univariado de supervivencia, se realizó un segundo estudio multivariado, incluyendo MKP-1, la misma p-p38 y las variables clínico-patológicas mencionadas anteriormente. En este análisis, MKP-1 seguía demostrando ser un factor pronóstico independiente ($p=0.015$) mientras que p-p38 perdía su significancia estadística ($p=0.13$). Sin embargo, ninguno de los pacientes con tumores que no sobre-expresaban MKP-1 fallecieron en el momento del análisis, hecho que impide el estudio de MKP-1 como factor pronóstico de supervivencia global.

5. Discusión

Los resultados del presente estudio en modelos celulares, tumores humanos cultivados *ex vivo* y en una serie retrospectiva de pacientes con cáncer de mama, confirman y extienden los hallazgos previos sobre la relevancia de la expresión de MKP-1 y, en general, de las MAPK sobre la sensibilidad a la doxorubicina como fármaco anti-tumoral^{177, 178, 216}. De forma concreta, el trabajo demuestra en que los tumores malignos de mama en seres humanos expuestos a la doxorubicina, mediante la utilización de un modelo *ex vivo* de cáncer de mama, MKP-1 es una enzima regulable y que en la mayoría, aunque no en todos, de los tumores estudiados, la doxorubicina reduce significativamente su expresión. Este hecho de gran relevancia parece asociarse de forma constante y característica a un aumento de la activación de las vías de señalización celular JNK y ERK1/2, siguiendo un patrón semejante al observado en los modelos celulares de cáncer de mama.

El estudio de la expresión de MKP-1 en una serie retrospectiva amplia de casos que incluía tejido mamario morfológicamente sano, lesiones de hiperplasia ductal, carcinoma *in situ* y tumores invasivos de mama, apunta a que la sobre-expresión de MKP-1 es un evento común durante la transformación maligna de las lesiones del tejido mamario, detectándose ya en las lesiones *in situ*. Por otra parte, la sobre-expresión de MKP-1 en los tumores infiltrantes de mama de esta serie se asociaba a niveles significativamente bajos de expresión de la forma fosforilada o activa de p38. De forma relevante, la sobre-expresión de MKP-1 detectada por inmunohistoquímica ha demostrado ser un factor independiente de mal pronóstico en las pacientes con cáncer de mama, proporcionando una evidencia clínica novedosa para el uso de MKP-1 como un marcador del comportamiento clínico en esta enfermedad.

5.1. La doxorubicina modifica la expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las MAPK en líneas celulares de cáncer de mama

En los modelos celulares de cáncer analizados en la literatura, la inducción de la expresión de MKP-1 se produce en las células tumorales ante la exposición

a fármacos anti-neoplásicos como el cisplatino o los agentes alquilantes, y de forma característica se asocia a una disminución de los niveles de expresión o a una inactivación de la vía de señalización de la JNK^{128, 178, 184, 218}. Sin embargo, otros agentes anti-tumorales, como la doxorubicina o la aplidina, reducen la expresión de MKP-1, sugiriéndose que esta reducción junto al aumento subsecuente de la forma fosforilada de JNK son una manifestación del mecanismo de acción anti-tumoral de estos fármacos^{176, 178}.

Algunos estudios previos parecen demostrar que MKP-1 actúa como un mediador de quimioresistencia en varios modelos celulares de cáncer de mama¹⁷⁸. En estos estudios se demostró que la sobre-expresión, de forma estable o de forma transitoria, de MKP-1 en las células tumorales de cáncer de mama, reducía la activación de la vía de JNK y disminuía la capacidad citotóxica de agentes alquilantes, como la meclorotamina, de las antraciclinas, como la doxorubicina, y de los inhibidores de la formación de los microtúbulos, como el paclitaxel. Por el contrario, la reducción de los niveles de expresión de MKP-1 en los mismos modelos celulares, bien utilizando RNA de interferencia de pequeño tamaño o bien empleando inhibidores selectivos de MKP-1, aumentaba la sensibilidad a todos los fármacos antes comentados. Además en todos los casos, este aumento de la quimiosensibilidad en los modelos celulares se asociaba a un aumento en la actividad de la vía de señalización de JNK. Algunos experimentos adicionales, en los que se bloqueaba farmacológicamente la actividad de JNK o de p38 utilizando inhibidores selectivos, demostraron efectos similares a los de la sobre-expresión de MKP-1, con una reducción a la sensibilidad a los agentes anti-neoplásicos estudiados. Por otra parte, el tratamiento combinado en condiciones *in vitro* con doxorubicina y meclorotamina demostró tener un efecto potenciador de la eficacia de la quimioterapia sobre la muerte celular, mientras que una inducción de la expresión de MKP-1 en estas condiciones de tratamiento, revertía el efecto observado de la sensibilidad a la terapia. De forma general, estos hallazgos sugieren que una combinación de agentes alquilantes con antraciclinas podría tener un efecto potenciador de la actividad o eficacia anti-tumoral del tratamiento, y que esta potenciación puede deberse, al menos en

parte, a una inhibición profunda de la expresión de MKP-1 por la acción de la doxorubicina^{178, 216}.

Dado que la doxorubicina es un agente quimioterápico utilizado de forma universal en la actualidad en el tratamiento del cáncer de mama, resulta por tanto una prioridad un estudio en profundidad de los efectos de la doxorubicina sobre MKP-1 y de la cinética de la activación de las diferentes MAPK a partir de esta modulación de la expresión de MKP-1^{57, 216}. En primer lugar, en este estudio se ha confirmado que en líneas de cáncer de mama la doxorubicina disminuye los niveles de transcritos de MKP-1 y también de la misma proteína siguiendo un patrón claramente dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento. Esta disminución de MKP-1 inducida por la doxorubicina comienza a observarse en las células a concentraciones próximas a la IC50. De forma llamativa, el descenso detectado de MKP-1 parece preceder en el tiempo a un aumento en la expresión de las formas fosforiladas o activadas de ERK1/2 y de JNK.

El papel de JNK en la regulación e inicio de los mecanismos de apoptosis está bien establecida en la literatura científica, utilizando diversos modelos^{219, 220}, mientras que las consecuencias de un aumento de la activación de ERK1/2 por el tratamiento con doxorubicina están hasta ahora poco caracterizadas en el cáncer de mama. Dado que la señalización mediada por ERK1/2 está relacionada con la proliferación celular, la migración y la diferenciación, un aumento de su actividad de forma persistente probablemente esté asociado a un efecto anti-apoptótico en las células²²¹, siendo responsable de parte de la resistencia a las terapias anti-tumorales.

Mientras que el aumento de las formas fosforiladas de ERK1/2 y de JNK está bien constatado que ocurre tras la exposición a la doxorubicina, no se ha podido demostrar inducción de la expresión de las formas fosforiladas de p38, al menos en algunos de los modelos estudiados. Es posible que, al menos en estas líneas de cáncer de mama, la actividad de p38 en condiciones basales sea muy baja y que ésta sea mínimamente modificable ante la exposición a doxorubicina. Este hecho ha sido demostrado y descrito también por otro grupo utilizando al menos dos líneas celulares de cáncer de mama diferentes. En este trabajo, el aumento de la expresión de MKP-1 inducido por dexametasona se

correlacionó de forma clara con una reducción en la expresión de ERK1/2 y de JNK en las células de cáncer de mama, pero no con un descenso detectable de p38²²². De la misma forma, en otro estudio previo y utilizando líneas celulares de cáncer no microcítico de pulmón, la inhibición de la actividad de MKP-1 mediante la utilización de un dominante negativo para MKP-1, correlacionó con un aumento inducido de las formas fosforiladas de JNK, pero no de p38¹⁴⁸.

5.2. La doxorubicina reduce la expresión de MKP-1 en una proporción elevada de tumores humanos de mama tratados *ex vivo*

Trabajos de diversos laboratorios han estudiado los efectos de fármacos anti-neoplásicos sobre cultivos primarios de tumores humanos o directamente sobre muestras de tejido tumoral humano, mantenidos durante periodos de tiempo variables en ausencia o presencia de los diferentes compuestos^{180, 181}. En el trabajo aquí presentado, hemos evaluado, según un modelo *ex vivo*, los efectos sobre MKP-1 y otras moléculas de la exposición a la doxorubicina, utilizando para ellos muestras de tejido tumoral de mama procedentes de pacientes intervenidas quirúrgicamente. En este sentido, una serie amplia de muestras de tumores malignos de mama fueron incubados *ex vivo* durante 24 horas con una concentración de doxorubicina calculada en base a los niveles séricos medios de las pacientes tratadas con esquemas de quimioterapia que incluyen este fármaco.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica hemos estudiado en estos tumores *ex vivo* los niveles de expresión de MKP-1 y de las diferentes formas fosforiladas de las MAPK, además de la tasa de proliferación celular y del índice de apoptosis, comparando los niveles detectados en condiciones control –incubados sólo con medio de cultivo– con los tratados con doxorubicina. En esta serie de tumores analizada, se observó de forma global un descenso significativo de la expresión de MKP-1 en las células malignas, así como un aumento de la expresión de las formas fosforiladas de ERK1/2 y de JNK, comparando los niveles detectados en las muestras expuestas a la doxorubicina con la expresión de los casos control. De forma similar a los

hallazgos observados en las líneas celulares y a los resultados de otros estudios en la literatura, la forma fosforilada de p38 tampoco se modificó de una forma significativa en este modelo ²²².

Analizando de una forma más detallada los cambios moleculares inducidos por la doxorubicina en este modelo de cáncer de mama *ex vivo*, podemos obtener otras conclusiones interesantes. Así, el descenso de MKP-1 inducido por la doxorubicina se produjo en 39 de los 50 casos estudiados, mientras que en los 11 casos restantes, los niveles de expresión de MKP-1 no se redujeron por este tratamiento, al menos a la dosis estudiada. En aquellos tumores en los que se observó un descenso en la expresión de MKP-1, se detectó de forma característica y constante un aumento significativo en las células tumorales de la expresión de las formas fosforiladas de ERK1/2 y de JNK, además de una reducción significativa de la proliferación de las células tumorales en este modelo *ex vivo*.

Comparando los niveles detectados en condiciones de control con los cambios observados por el tratamiento con la doxorubicina, se constató que aquellos tumores que presentaban de forma basal unos niveles elevados o de sobreexpresión de MKP-1 en sus células, no eran capaces de reducir su expresión ante el tratamiento con doxorubicina, pudiendo incluso aumentar esta MKP-1.

Los mecanismos por los que se produce esta resistencia a nivel molecular a la doxorubicina no están caracterizados, pero puede hipotetizarse que en aquellos tumores de mama que de forma constitutiva expresan niveles elevados de MKP-1, y que éstos no sean modificables, por los mecanismos que sean, la capacidad de la doxorubicina de aumentar la eficacia citotóxica de los agentes alquilantes podría estar reducida de forma significativa ¹⁷⁸. Independientemente del mecanismo que este implicado, podría postularse que una reducción de los niveles de MKP-1 podría aumentar, por tanto, la capacidad de la doxorubicina de producir un efecto citotóxico importante en el tumor. Este postulado queda apoyado por los hallazgos sobre células BT-474 pre-tratadas con Ro-31-8220, un compuesto que reduce la expresión de MKP-1, en las que la sensibilidad a muerte celular por la doxorubicina está aumentada por la inhibición de la fosfatasa. No solo mediante este experimento utilizando el Ro-31-8220 como inhibidor de MKP-1 puede apoyarse este

postulado, sino que un gran número de evidencias en diferentes modelos sugieren unas conclusiones idénticas ²¹⁰. De esta forma, se ha observado un aumento de la citotoxicidad por la doxorubicina en líneas tumorales de cáncer de mama en las que se ha inducido una supresión genética de MKP-1 o también en fibroblastos procedentes de embriones de ratón doble deficiente para MKP-1, que presentan mayor sensibilidad a este fármaco ¹⁷⁸.

Se ha descrito también que la expresión de MKP-1 aumenta en modelos celulares como respuesta al tratamiento con radioterapia, limitando sus efectos apoptóticos y actuando como un mecanismo de radioresistencia ²²³. De forma interesante, MKP-1 también se ha propuesto como un mediador intermedio de supervivencia celular dependiente de JNK, que sería modulado por la señalización a través de la cascada de señalización de NF- κ B. Así, una inhibición de MKP-1 podría actuar como un mecanismo mediado por JNK de sensibilización al tratamiento en estos modelos ²²³.

El papel de MKP-1 como factor de quimioresistencia también ha sido descrito en otros sistemas celulares, como en los de cáncer de ovario y de cáncer no microcítico de pulmón, ambos en relación al tratamiento con cisplatino ^{148, 149, 218}. En este sentido, nuestro grupo ha observado un aumento dramático de la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en líneas humanas de cáncer no microcítico de pulmón cuando se reduce de forma simultánea la actividad de MKP-1, mediante el uso de RNA de interferencia, y actividad de la vía de NF- κ B, mediante el uso de un inhibidor químico selectivo de IKK α ²²⁴. Sin embargo, una cooperación similar a ésta, entre NF- κ B y MKP-1 como mediadores de quimiosensibilidad, no ha sido aún descrita en el cáncer de mama.

La complejidad del estudio de las fosfatasa en cáncer, sin embargo, podría ser mucho mayor de lo descrito hasta el momento y analizado en este trabajo. Otros miembros de la misma familia de MKP-1 también se han relacionado con la sensibilidad a diversos fármacos anti-tumorales. En este sentido, MKP-3 se ha descrito que está sobre-expresada en una proporción importante de tumores de mama y que este aumento de expresión parece relacionarse con una resistencia a fármacos inhibidores selectivos de los receptores de estrógenos, como el tamoxifeno ²²⁵.

5.3.. MKP-1 se sobre-expresa en una proporción importante de tumores de mama humanos, y esta sobre-expresión es un evento precoz en el proceso de la transformación maligna de la mama

Hasta la fecha, hay dos trabajos en la literatura que describen el papel de MKP-1 en tumores malignos de mama ^{167, 179}. En el primero de ellos, se han estudiado los niveles de expresión de MKP-1 a nivel de proteína, mediante un abordaje de técnicas de inmunohistoquímica, y de ensayo de RNA mensajero, mediante hibridación in situ, utilizando cortes de tejido procedentes de bloques de parafina. En este trabajo, se han comparado los niveles de expresión de MKP-1 entre el epitelio no tumoral y las lesiones malignas en diferentes localizaciones. Los autores describen que en fases iniciales de la carcinogénesis en colon, próstata y vejiga se detecta una sobre-expresión de MKP-1, y que ésta se pierde cuando se alcanzan estadios más avanzados de la lesión o cuando se estudian muestras tumorales procedentes de metástasis de las neoplasias analizadas ¹⁶⁷. Sin embargo, en este trabajo, en los tumores de mama estudiados se detecta una expresión elevada de MKP-1 tanto en las lesiones proliferantes con atipia de la mama, como en las lesiones malignas escasamente diferenciadas e incluso en los tejidos metastáticos analizados. De forma similar a nuestro estudio, en un número importante de casos se detectó una co-expresión en las células tumorales de MKP-1, ERK-1 y de ERK-2, aunque los autores no encontraron ninguna correlación entre los niveles de expresión la MKP-1 y las ERK ni analizaron de forma pronóstica estos hallazgos ¹⁶⁷. En las diferentes series de tumores estudiadas, los autores identifican un grupo de 15 tumores de mama en los que, aunque la actividad enzimática de ERK-1 era elevada, los niveles de MKP-1 eran indetectables por los métodos empleados. De forma muy interesante, en ninguno de estos 15 tumores se observaron deleciones de la región 5q35-ter, que contiene el locus del gen MKP-1, ni mutaciones en el dominio catalítico de MKP-1. Estos datos en conjunto parecen indicar que MKP-1 podría ser un marcador precoz de la transformación maligna en un gran número de tumores, aunque los estudios

sobre cáncer de mama también han puesto de manifiesto que la expresión de MKP-1 es detectable en estadios avanzados de la enfermedad (31,32).

En este trabajo, hemos estudiado mediante inmunohistoquímica los niveles de expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las distintas MAPK (ERK1/2, p38 y JNK) en una serie de tumores malignos de mama procedentes de pacientes con seguimiento clínico, con el objetivo de determinar cuál es el verdadero papel de MKP-1 como factor pronóstico y predictivo de respuesta en esta enfermedad.

5.4. La expresión de MKP-1 en los tumores de mama analizados correlaciona con los niveles de actividad de las MAPK, ERK1/2 y p38

El patrón de expresión de MKP-1 que hemos observado en una serie de muestras que incluyen desde tejido mamario normal hasta lesiones infiltrantes, confirma que la sobre-expresión de esta MKP-1 ocurre durante la transformación maligna en la mama ¹⁶⁷. El tejido mamario histológicamente normal presenta expresión nuclear difusa pero débil de MKP-1, tanto en las células ductales como en los lobulillos mamarios. Por el contrario, las lesiones de carcinoma in situ presentan una sobre-expresión constante de MKP-1. En los tumores infiltrantes o invasivos, la sobre-expresión de MKP-1 ocurre en cerca del 50% de los casos. De forma característica, la sobre-expresión de MKP-1 en algunas de las muestras estudiadas se detecta a nivel de las lesiones de carcinoma ductal in situ pero no de la lesión infiltrante. Este hallazgo está en concordancia con un estudio previo ya publicado ¹⁶⁷ y es similar al patrón descrito para otras alteraciones moleculares como en el caso del oncogén HER2, que es detectada hasta en el 60-80% de las lesiones in situ en la mama y sólo en el 20-25% de las lesiones invasivas ²²⁶. De una forma similar a la que se ha postulado para HER2, este hallazgo indica que la sobre-expresión de MKP-1 podría no ser suficiente para una progresión uniforme desde un carcinoma ductal in situ hasta la lesión verdaderamente infiltrante ¹⁶⁷.

5.5. La sobre-expresión de MKP-1 en cáncer de mama es un factor de mal pronóstico y correlaciona con recidiva de la enfermedad

En relación a los tumores infiltrantes de mama estudiados, los factores clínico-patológicos adversos fueron más frecuentes en las pacientes con lesiones con sobre-expresión de MKP-1 (Tabla IV.3), sugiriendo una posible asociación entre la sobre-expresión de MKP-1 y factores de mal pronóstico. Sin embargo, esta conclusión debe ser tomada con cautela, dado que no hay correlaciones estadísticamente significativas.

También se estudió la relación entre MKP-1 y las formas fosforiladas de las MAPK. La única asociación estadística significativa que se ha encontrado ha sido entre los niveles elevados de expresión de MKP-1 y los niveles bajos de la forma activada de p38. De forma adicional, los niveles detectados en nuestra serie con sobre-expresión de MKP-1 de la forma fosforilada de JNK fueron bajos, mientras que los de la forma fosforilada de ERK1/2 estaban aumentados, tal y como se ha descrito en otros trabajos ¹⁷⁹.

De forma global, estos hallazgos sugieren que en el cáncer de mama en humanos, MKP-1 podría defosforilar o inactivar JNK y a p38, mientras que no a ERK1/2. De hecho, una expresión o actividad elevada de ERK1/2 puede darse en tumores de mama con sobre-expresión de MKP-1, indicando que, al menos en parte, la actividad de ERK1/2 podría ser responsable de la expresión aumentada de MKP-1 ^{58, 167}.

Otros estudios que hayan abordado el papel de MKP-1 como factor pronóstico en procesos neoplásicos aún son limitados. En pacientes con tumores malignos de ovario, la sobre-expresión de MKP-1 en el tumor se ha asociado con un periodo libre de enfermedad menor ¹⁷⁴. Por el contrario, en una serie con pacientes con cáncer no microcítico de pulmón, la sobre-expresión de MKP-1 se ha relacionado con un mejor pronóstico ¹⁸². Estos resultados contradictorios podrían justificarse por los diferentes roles de MKP-1 en las distintas neoplasias, a diferencias inherentes a las poblaciones estudiadas o los diferentes abordajes metodológicos empleados.

En este trabajo, se establece una asociación entre la sobre-expresión de MKP-1 y un riesgo aumentado de recidiva en cáncer de mama. En la serie estudiada, de un total de 18 pacientes con recidiva de la enfermedad, 15 (83.3%) presentaron sobre-expresión de MKP-1 en los tumores primarios. Esta diferencia en el riesgo de recidiva de la enfermedad fue estadísticamente significativa en el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. En nuestra serie no es factible estudiar el impacto de los tratamientos adyuvantes sobre la importancia del papel de MKP-1 como factor pronóstico en la enfermedad dado que la inclusión de pacientes no siguió un criterio sistemático por grupos sino que se realizó sobre un periodo de tiempo determinado. En el estudio multivariado incluyendo todas las variables clínico-patológicas recogidas, la sobre-expresión de MKP-1 resultó ser un factor pronóstico independiente.

Estos resultados proporcionan una nueva evidencia del papel de MKP-1 como factor pronóstico en el cáncer de mama. Así, se ha demostrado que la doxorubicina reduce en tumores humanos los niveles de expresión de MKP-1, y que este hecho se acompaña de un aumento en la expresión de las formas fosforiladas o activadas de ERK1/2 y de JNK. Además, se ha corroborado que la sobre-expresión de MKP-1 ocurre durante la transformación maligna de la mama y que es un factor pronóstico independiente en las pacientes con cáncer de mama. De forma conjunta, estos resultados añaden una relevancia clínica al concepto de que MKP-1 puede ser utilizada como potencial diana terapéutica en el cáncer de mama.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el trabajo aquí presentado analizan el papel de MKP-1 en el cáncer de mama sobre la sensibilidad a la quimioterapia de las células tumorales, y permiten concluir que:

1. La doxorubicina modificó la expresión de MKP-1 y de las formas fosforiladas de las MAPK en líneas celulares de cáncer de mama:

El tratamiento con doxorubicina a las dosis estudiadas disminuyó la expresión de MKP-1 en los modelos estudiados. De forma dependiente a esta reducción de MKP-1, el tratamiento con doxorubicina aumentó la expresión de las formas fosforiladas de las MAPK (ERK1/2, p38 y JNK). Además, el aumento de expresión de MKP-1 observado en las diferentes condiciones podría deberse, al menos en parte, a una respuesta de retroalimentación negativa a la actividad de ERK1/2 como vía de señalización intracelular.

2. La doxorubicina redujo la expresión de MKP-1 en una proporción elevada de tumores humanos de mama:

tras la validación de un ensayo de inmunohistoquímica para MKP-1 para muestras de tejido fijadas en formol y embebidas en parafina, y sobre un modelo o ensayo *ex vivo* de cáncer de mama desarrollado por nuestro grupo para el estudio de marcadores, puede concluirse que el tratamiento con doxorubicina inhibió MKP-1 en la mayoría de los tumores estudiados, y que esta reducción se asoció a un aumento de la expresión de las formas fosforiladas de ERK1/2, JNK y p38, a un aumento de la apoptosis y a una reducción de la proliferación de las células tumorales.

3. MKP-1 se sobre-expresó en una proporción importante de tumores de mama humanos, y esta sobre-expresión fue un evento precoz en el

proceso de la transformación maligna de la mama: el estudio del patrón de expresión de MKP-1 en tejido mamario normal y en lesiones patológicas de la mama, permite confirmar que la sobre-expresión se observó en lesiones malignas *in situ* y se conservaba en las infiltrantes, alcanzando el grado de sobre-expresión en el 50% de los tumores invasivos.

4. La expresión de MKP-1 en los tumores de mama analizados correlacionó significativamente con los niveles de actividad de las MAPK, ERK1/2 y p38: en la serie de pacientes estudiada, la expresión de MKP-1 mostró una correlación significativa positiva con la expresión de la forma fosforilada de ERK1/2, sugiriendo que, *in vivo*, MKP-1 podría actuar como un mecanismo de control de la actividad de esta vía. Además, MKP-1 correlacionó significativamente, de forma inversa, con la expresión de la forma fosforilada de p38, confirmando que la actividad de esta vía está, al menos en parte, también regulada por MKP-1.

5. La sobre-expresión de MKP-1 en cáncer de mama fue un factor de mal pronóstico y correlacionó con la recidiva de la enfermedad: La sobre-expresión de MKP-1 en cáncer de mama parece conferir mal pronóstico a las pacientes con cáncer de mama, reduciendo el periodo de supervivencia libre de enfermedad frente a las pacientes que no la sobre-expresan, probablemente mediando la sensibilidad a la quimioterapia en estas pacientes.

7. Bibliografía

1. Cabanes-Domenech, A., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., Pollán, M. & López-Abente, G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. (2009).
2. Pons-Vigues, M., Puigpinos, R., Cano-Serral, G., Mari-Dell'Olmo, M. & Borrell, C. Breast cancer mortality in Barcelona following implementation of a city breast cancer-screening program. *Cancer Detect Prev* 32, 162-7 (2008).
3. Melchor, L. & Benitez, J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* 29, 1475-82 (2008).
4. Dillon, D. A., Howe, C. L., Bosari, S. & Costa, J. The molecular biology of breast cancer: accelerating clinical applications. *Crit Rev Oncog* 9, 125-40 (1998).
5. Wang, T. C. et al. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369, 669-71 (1994).
6. Shin, I. et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8, 1145-52 (2002).
7. Alsner, J. et al. A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients. *Acta Oncol* 47, 600-7 (2008).
8. Blaszyk, H. et al. A prospective trial of midwest breast cancer patients: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int J Cancer* 89, 32-8 (2000).
9. Perou, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52 (2000).
10. Sorlie, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-74 (2001).
11. Hu, Z. et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7, 96 (2006).
12. Ross, J. S., Symmans, W. F., Pusztai, L. & Hortobagyi, G. N. Standardizing slide-based assays in breast cancer: hormone receptors, HER2, and sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res* 13, 2831-5 (2007).
13. Pusztai, L., Cristofanilli, M. & Paik, S. New generation of molecular prognostic and predictive tests for breast cancer. *Semin Oncol* 34, S10-6 (2007).
14. Andre, F. et al. Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 13, 2061-7 (2007).
15. Ring, B. Z. et al. Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24, 3039-47 (2006).
16. Davis, L. M. et al. Amplification patterns of three genomic regions predict distant recurrence in breast carcinoma. *J Mol Diagn* 9, 327-36 (2007).
17. Paik, S., Kim, C. Y., Song, Y. K. & Kim, W. S. Technology insight: Application of molecular techniques to formalin-fixed paraffin-embedded tissues from breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2, 246-54 (2005).

18. Paik, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351, 2817-26 (2004).
19. van de Vijver, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347, 1999-2009 (2002).
20. Buyse, M. et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 98, 1183-92 (2006).
21. Foekens, J. A. et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 24, 1665-71 (2006).
22. Ross, J. S. Multigene classifiers, prognostic factors, and predictors of breast cancer clinical outcome. *Adv Anat Pathol* 16, 204-15 (2009).
23. Yarden, Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2, 1-13 (2001).
24. Rubin, I. & Yarden, Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12 Suppl 1, S3-8 (2001).
25. Alroy, I. & Yarden, Y. Biochemistry of HER2 oncogenesis in breast cancer. *Breast Dis* 11, 31-48 (2000).
26. Hudelist, G. et al. Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 80, 353-61 (2003).
27. Way, T. D. & Lin, J. K. Role of HER2/HER3 co-receptor in breast carcinogenesis. *Future Oncol* 1, 841-9 (2005).
28. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-37 (2001).
29. Olayioye, M. A. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 3, 385-9 (2001).
30. Slamon, D. J. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Cancer Invest* 8, 253 (1990).
31. Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A. & Slamon, D. J. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 17, 2235-49 (1998).
32. Mendelsohn, J. & Baselga, J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-65 (2000).
33. Doyle, D. M. & Miller, K. D. Development of new targeted therapies for breast cancer. *Breast Cancer* 15, 49-56 (2008).
34. Stern, D. F. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 215-23 (2008).
35. Yuan, T. L. & Cantley, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-510 (2008).
36. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-7 (2002).
37. Luo, J. & Cantley, L. C. The negative regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by p85 and its implication in cancer. *Cell Cycle* 4, 1309-12 (2005).

38. Bacus, S. S. et al. AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. *Oncogene* 21, 3532-40 (2002).
39. Lane, H. A. et al. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* 20, 3210-23 (2000).
40. Keniry, M. & Parsons, R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 27, 5477-85 (2008).
41. Yin, Y. & Shen, W. H. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene* 27, 5443-53 (2008).
42. Kim, D. & Chung, J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* 35, 106-15 (2002).
43. Steelman, L. S. et al. Akt as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 12, 1139-65 (2008).
44. Tokunaga, E. et al. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 27-36 (2008).
45. Jiang, B. H. & Liu, L. Z. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1784, 150-8 (2008).
46. Berns, K. et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12, 395-402 (2007).
47. Page, C. et al. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res* 20, 407-16 (2000).
48. Lentzsch, S. et al. PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 18, 1883-90 (2004).
49. Busse, D. et al. Reversible G(1) arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27(KIP1) independent of MAPK activity. *J Biol Chem* 275, 6987-95 (2000).
50. Liu, N. et al. Erbin-regulated sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to TRAIL via ErbB2/AKT/NF-kappaB pathway. *J Biochem* 143, 793-801 (2008).
51. Wada, T. & Penninger, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838-49 (2004).
52. Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-52 (2000).
53. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40 (2001).
54. Johnson, G. L. & Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-2 (2002).
55. Pearson, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-83 (2001).
56. Cohen, P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 7, 353-61 (1997).
57. Hutter, D., Chen, P., Barnes, J. & Liu, Y. Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP

- kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation. *Biochem J* 352 Pt 1, 155-63 (2000).
58. Brondello, J. M., Pouyssegur, J. & McKenzie, F. R. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286, 2514-7 (1999).
 59. Owens, D. M. & Keyse, S. M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26, 3203-13 (2007).
 60. Goodsell, D. S. The molecular perspective: the ras oncogene. *Stem Cells* 17, 235-6 (1999).
 61. Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N. & Ullrich, A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 184-9 (1999).
 62. Luttrell, L. M., Daaka, Y., Della Rocca, G. J. & Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J Biol Chem* 272, 31648-56 (1997).
 63. Adeyinka, A. et al. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 8, 1747-53 (2002).
 64. Ben-Levy, R., Paterson, H. F., Marshall, C. J. & Yarden, Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *Embo J* 13, 3302-11 (1994).
 65. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-90 (2007).
 66. Lin, A. & Dibling, B. The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell* 1, 112-6 (2002).
 67. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. & Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7, 2135-48 (1993).
 68. Derijard, B. et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-37 (1994).
 69. Prasad, M. V., Dermott, J. M., Heasley, L. E., Johnson, G. L. & Dhanasekaran, N. Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J Biol Chem* 270, 18655-9 (1995).
 70. Dhanwada, K. R., Dickens, M., Neades, R., Davis, R. & Pelling, J. C. Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. *Oncogene* 11, 1947-53 (1995).
 71. Westwick, J. K., Weitzel, C., Minden, A., Karin, M. & Brenner, D. A. Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J Biol Chem* 269, 26396-401 (1994).
 72. Cano, E., Hazzalin, C. A. & Mahadevan, L. C. Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol* 14, 7352-62 (1994).

73. Cano, E. & Mahadevan, L. C. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20, 117-22 (1995).
74. Dai, T. et al. Stress-activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene* 10, 849-55 (1995).
75. Sluss, H. K., Barrett, T., Derijard, B. & Davis, R. J. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol* 14, 8376-84 (1994).
76. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516 (2007).
77. Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J. & Tan, T. H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271, 31929-36 (1996).
78. Ruiters, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J. & Verheij, M. Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 2457-63 (1999).
79. Wilson, D. J. et al. JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol* 26, 989-94 (1996).
80. Zanke, B. W., Lee, C., Arab, S. & Tannock, I. F. Death of tumor cells after intracellular acidification is dependent on stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) pathway activation and cannot be inhibited by Bcl-2 expression or interleukin 1beta-converting enzyme inhibition. *Cancer Res* 58, 2801-8 (1998).
81. Tournier, C. et al. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 15, 1419-26 (2001).
82. Uehara, T. et al. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* 42, 850-9 (2005).
83. Ferrandi, C. et al. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 142, 953-60 (2004).
84. Kennedy, N. J. & Davis, R. J. Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle* 2, 199-201 (2003).
85. Kennedy, N. J. et al. Suppression of Ras-stimulated transformation by the JNK signal transduction pathway. *Genes Dev* 17, 629-37 (2003).
86. Sanchez-Perez, I., Murguia, J. R. & Perona, R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 16, 533-40 (1998).
87. Chen, Y. R. & Tan, T. H. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol* 16, 651-62 (2000).
88. Han, J. & Sun, P. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 32, 364-71 (2007).
89. Kennedy, N. J., Cellurale, C. & Davis, R. J. A radical role for p38 MAPK in tumor initiation. *Cancer Cell* 11, 101-3 (2007).
90. Conrad, P. W., Rust, R. T., Han, J., Millhorn, D. E. & Beitner-Johnson, D. Selective activation of p38alpha and p38gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin D1 by hypoxia in PC12 cells. *J Biol Chem* 274, 23570-6 (1999).

91. Rausch, O. & Marshall, C. J. Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation. *J Biol Chem* 274, 4096-105 (1999).
92. Matsumoto, T. et al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem* 274, 13954-60 (1999).
93. Chen, G., Hitomi, M., Han, J. & Stacey, D. W. The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem* 275, 38973-80 (2000).
94. Pruitt, K., Pruitt, W. M., Bilter, G. K., Westwick, J. K. & Der, C. J. Raf-independent deregulation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases are critical for Ras transformation. *J Biol Chem* 277, 31808-17 (2002).
95. Timofeev, O., Lee, T. Y. & Bulavin, D. V. A subtle change in p38 MAPK activity is sufficient to suppress in vivo tumorigenesis. *Cell Cycle* 4, 118-20 (2005).
96. Bulavin, D. V. et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* 36, 343-50 (2004).
97. Awad, M. M., Enslin, H., Boylan, J. M., Davis, R. J. & Gruppuso, P. A. Growth regulation via p38 mitogen-activated protein kinase in developing liver. *J Biol Chem* 275, 38716-21 (2000).
98. Engel, F. B. et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19, 1175-87 (2005).
99. Senokuchi, T. et al. Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 280, 6627-33 (2005).
100. Park, J. M., Greten, F. R., Li, Z. W. & Karin, M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* 297, 2048-51 (2002).
101. Lin, W. W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117, 1175-83 (2007).
102. Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1358-75 (2007).
103. Cocolakis, E., Lemay, S., Ali, S. & Lebrun, J. J. The p38 MAPK pathway is required for cell growth inhibition of human breast cancer cells in response to activin. *J Biol Chem* 276, 18430-6 (2001).
104. Pomerance, M., Quillard, J., Chantoux, F., Young, J. & Blondeau, J. P. High-level expression, activation, and subcellular localization of p38-MAP kinase in thyroid neoplasms. *J Pathol* 209, 298-306 (2006).
105. Elenitoba-Johnson, K. S. et al. Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7259-64 (2003).
106. Puri, P. L. et al. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev* 14, 574-84 (2000).

107. Morooka, T. & Nishida, E. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273, 24285-8 (1998).
108. Iwasaki, S. et al. Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 274, 26503-10 (1999).
109. Perdiguero, E. et al. Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *Embo J* 26, 1245-56 (2007).
110. Uddin, S., Ah-Kang, J., Ulaszek, J., Mahmud, D. & Wickrema, A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 147-52 (2004).
111. Efimova, T., Broome, A. M. & Eckert, R. L. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem* 278, 34277-85 (2003).
112. Qi, X. et al. Estrogen receptor inhibits c-Jun-dependent stress-induced cell death by binding and modifying c-Jun activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 279, 6769-77 (2004).
113. Qi, X. et al. p38 MAPK activation selectively induces cell death in K-ras-mutated human colon cancer cells through regulation of vitamin D receptor. *J Biol Chem* 279, 22138-44 (2004).
114. Poizat, C., Puri, P. L., Bai, Y. & Kedes, L. Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 25, 2673-87 (2005).
115. Mansouri, A. et al. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 278, 19245-56 (2003).
116. Kumar, P., Miller, A. I. & Polverini, P. J. p38 MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway. *J Biol Chem* 279, 43352-60 (2004).
117. Bulavin, D. V. et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J* 18, 6845-54 (1999).
118. Dolado, I. et al. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 11, 191-205 (2007).
119. Ventura, J. J. et al. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* 39, 750-8 (2007).
120. Sun, P. et al. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 128, 295-308 (2007).
121. Wu, R. et al. Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *J Biol Chem* 282, 21598-608 (2007).
122. De Chiara, G. et al. Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J Biol Chem* 281, 21353-61 (2006).

123. Kim, M. S., Lee, E. J., Kim, H. R. & Moon, A. p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res* 63, 5454-61 (2003).
124. Matsuo, Y. et al. Involvement of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lung metastasis of tumor cells. *J Biol Chem* 281, 36767-75 (2006).
125. Dreissigacker, U. et al. Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cell Signal* 18, 1156-68 (2006).
126. Xu, L., Chen, S. & Bergan, R. C. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* 25, 2987-98 (2006).
127. Marshall, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-85 (1995).
128. Keyse, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27, 253-61 (2008).
129. Theodosiou, A. & Ashworth, A. MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* 3, REVIEWS3009 (2002).
130. Wu, J. J. & Bennett, A. M. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem* 280, 16461-6 (2005).
131. Liu, Y., Lagowski, J., Sundholm, A., Sundberg, A. & Kulesz-Martin, M. Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4. *Cancer Res* 67, 10711-9 (2007).
132. Bhalla, U. S., Ram, P. T. & Iyengar, R. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science* 297, 1018-23 (2002).
133. Kondoh, K. & Nishida, E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1227-37 (2007).
134. Li, C., Scott, D. A., Hatch, E., Tian, X. & Mansour, S. L. Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development* 134, 167-76 (2007).
135. Farooq, A. & Zhou, M. M. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16, 769-79 (2004).
136. Liu, Y., Shepherd, E. G. & Nelin, L. D. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* 7, 202-12 (2007).
137. Dickinson, R. J. & Keyse, S. M. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci* 119, 4607-15 (2006).
138. Chi, H. et al. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2274-9 (2006).
139. Hammer, M. et al. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med* 203, 15-20 (2006).

140. Zhao, Q. et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med* 203, 131-40 (2006).
141. Kassel, O. et al. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J* 20, 7108-16 (2001).
142. Tchen, C. R. et al. Glucocorticoid regulation of mouse and human dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) genes: unusual cis-acting elements and unexpected evolutionary divergence. *J Biol Chem* 285, 2642-52.
143. Abraham, S. M. et al. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J Exp Med* 203, 1883-9 (2006).
144. Dorfman, K. et al. Disruption of the *erp/mkp-1* gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene* 13, 925-31 (1996).
145. Kim, H. S., Song, M. C., Kwak, I. H., Park, T. J. & Lim, I. K. Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence. *J Biol Chem* 278, 37497-510 (2003).
146. Wu, J. J. et al. Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity. *Cell Metab* 4, 61-73 (2006).
147. Mizuno, R. et al. Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells. *J Urol* 172, 723-7 (2004).
148. Sanchez-Perez, I., Martinez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S. M. & Perona, R. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 19, 5142-52 (2000).
149. Wang, J., Zhou, J. Y. & Wu, G. S. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67, 11933-41 (2007).
150. Martell, K. J., Kwak, S., Hakes, D. J., Dixon, J. E. & Trent, J. M. Chromosomal localization of four human VH1-like protein-tyrosine phosphatases. *Genomics* 22, 462-4 (1994).
151. Kwak, S. P., Hakes, D. J., Martell, K. J. & Dixon, J. E. Isolation and characterization of a human dual specificity protein-tyrosine phosphatase gene. *J Biol Chem* 269, 3596-604 (1994).
152. Pursiheimo, J. P., Saari, J., Jalkanen, M. & Salmivirta, M. Cooperation of protein kinase A and Ras/ERK signaling pathways is required for AP-1-mediated activation of fibroblast growth factor-inducible response element (FiRE). *J Biol Chem* 277, 25344-55 (2002).
153. Ryser, S., Massiha, A., Piuze, I. & Schlegel, W. Stimulated initiation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) gene transcription involves the synergistic action of multiple cis-acting elements in the proximal promoter. *Biochem J* 378, 473-84 (2004).
154. Liao, Q. et al. Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 124, 1830-45 (2003).
155. Sommer, A., Burkhardt, H., Keyse, S. M. & Luscher, B. Synergistic activation of the *mkp-1* gene by protein kinase A signaling and USF, but not c-Myc. *FEBS Lett* 474, 146-50 (2000).

156. Wang, X. & Liu, Y. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell Signal* 19, 1372-82 (2007).
157. Ishibashi, T. et al. Identification of dual specificity phosphatases induced by olfactory bulbectomy in rat olfactory neuroepithelium. *Brain Res* 902, 205-11 (2001).
158. Franklin, C. C. & Kraft, A. S. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem* 272, 16917-23 (1997).
159. Nichols, A. et al. Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *J Biol Chem* 275, 24613-21 (2000).
160. Slack, D. N., Seternes, O. M., Gabrielsen, M. & Keyse, S. M. Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* 276, 16491-500 (2001).
161. Cartier, E. A., Shen, S. & Shyng, S. L. Modulation of the trafficking efficiency and functional properties of ATP-sensitive potassium channels through a single amino acid in the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* 278, 7081-90 (2003).
162. Bordo, D. & Bork, P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* 3, 741-6 (2002).
163. Zhang, Y. et al. Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature* 430, 793-7 (2004).
164. Jeffrey, K. L. et al. Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol* 7, 274-83 (2006).
165. Eblaghie, M. C. et al. Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol* 13, 1009-18 (2003).
166. Christie, G. R. et al. The dual-specificity protein phosphatase DUSP9/MKP-4 is essential for placental function but is not required for normal embryonic development. *Mol Cell Biol* 25, 8323-33 (2005).
167. Loda, M. et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* 149, 1553-64 (1996).
168. Li, M., Zhou, J. Y., Ge, Y., Matherly, L. H. & Wu, G. S. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 278, 41059-68 (2003).
169. Emslie, E. A., Jones, T. A., Sheer, D. & Keyse, S. M. The CL100 gene, which encodes a dual specificity (Tyr/Thr) MAP kinase phosphatase, is highly conserved and maps to human chromosome 5q34. *Hum Genet* 93, 513-6 (1994).
170. Laderoute, K. R. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments. A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase activity. *J Biol Chem* 274, 12890-7 (1999).

171. Magi-Galluzzi, C., Montironi, R., Cangi, M. G., Wishnow, K. & Loda, M. Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN. *Virchows Arch* 432, 407-13 (1998).
172. Magi-Galluzzi, C. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Lab Invest* 76, 37-51 (1997).
173. Srikanth, S., Franklin, C. C., Duke, R. C. & Kraft, R. S. Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. *Mol Cell Biochem* 199, 169-78 (1999).
174. Denkert, C. et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 102, 507-13 (2002).
175. Chen, Y. W., Huang, S. C., Lin-Shiau, S. Y. & Lin, J. K. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* 26, 1296-306 (2005).
176. Gonzalez-Santiago, L. et al. Aplidin induces JNK-dependent apoptosis in human breast cancer cells via alteration of glutathione homeostasis, Rac1 GTPase activation, and MKP-1 phosphatase downregulation. *Cell Death Differ* 13, 1968-81 (2006).
177. Pervin, S., Singh, R., Freije, W. A. & Chaudhuri, G. MKP-1-induced dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase is essential for triggering nitric oxide-induced apoptosis in human breast cancer cell lines: implications in breast cancer. *Cancer Res* 63, 8853-60 (2003).
178. Small, G. W., Shi, Y. Y., Higgins, L. S. & Orłowski, R. Z. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res* 67, 4459-66 (2007).
179. Wang, H. Y., Cheng, Z. & Malbon, C. C. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Lett* 191, 229-37 (2003).
180. Di Nicolantonio, F. et al. Ex vivo characterization of XR11576 (MLN576) against ovarian cancer and other solid tumors. *Anticancer Drugs* 15, 849-60 (2004).
181. van der Kuip, H. et al. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* 6, 86 (2006).
182. Vicent, S. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin Cancer Res* 10, 3639-49 (2004).
183. Lim, E. H. et al. Feasibility of using low-volume tissue samples for gene expression profiling of advanced non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 9, 5980-7 (2003).
184. Chattopadhyay, S. et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 25, 3335-45 (2006).
185. Small, G. W. et al. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol* 66, 1478-90 (2004).

186. Sieben, N. L. et al. Differential gene expression in ovarian tumors reveals Dusp 4 and Serpina 5 as key regulators for benign behavior of serous borderline tumors. *J Clin Oncol* 23, 7257-64 (2005).
187. Yip-Schneider, M. T., Lin, A. & Marshall, M. S. Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 992-7 (2001).
188. Givant-Horwitz, V. et al. The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 93, 517-23 (2004).
189. Kim, S. C. et al. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* 93, 3893-9 (1999).
190. Furukawa, T. et al. Genomic analysis of DUSP6, a dual specificity MAP kinase phosphatase, in pancreatic cancer. *Cytogenet Cell Genet* 82, 156-9 (1998).
191. Warmka, J. K., Mauro, L. J. & Wattenberg, E. V. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 is a tumor promoter target in initiated cells that express oncogenic Ras. *J Biol Chem* 279, 33085-92 (2004).
192. Croonquist, P. A., Linden, M. A., Zhao, F. & Van Ness, B. G. Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells. *Blood* 102, 2581-92 (2003).
193. Bloethner, S. et al. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis* 26, 1224-32 (2005).
194. Marchetti, S. et al. Inducible expression of a MAP kinase phosphatase-3-GFP chimera specifically blunts fibroblast growth and ras-dependent tumor formation in nude mice. *J Cell Physiol* 199, 441-50 (2004).
195. Furukawa, T., Sunamura, M., Motoi, F., Matsuno, S. & Horii, A. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol* 162, 1807-15 (2003).
196. Hata, T. et al. RNA interference targeting aurora kinase a suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 65, 2899-905 (2005).
197. Furukawa, T. et al. Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 18, 1034-42 (2005).
198. Levy-Nissenbaum, O. et al. cDNA microarray analysis reveals an overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia. *Methods Enzymol* 366, 103-13 (2003).
199. Codony-Servat, J. et al. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5, 665-75 (2006).
200. Albanell, J. et al. Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and

- inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 61, 6500-10 (2001).
201. Dalton, L. W. et al. Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. *Mod Pathol* 13, 730-5 (2000).
 202. Wolff, A. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25, 118-45 (2007).
 203. Singletary, S. E. et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 3628-36 (2002).
 204. Kononen, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844-7 (1998).
 205. Piazza, E. et al. Early phase pharmacokinetics of doxorubicin (adriamycin) in plasma of cancer patients during single- or multiple-drug therapy. *Cancer Treat Rep* 64, 845-54 (1980).
 206. Rojo, F. et al. Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 4309-16 (2006).
 207. Liu, C. L. et al. Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays. *Am J Pathol* 161, 1557-65 (2002).
 208. Sturn, A., Quackenbush, J. & Trajanoski, Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18, 207-8 (2002).
 209. Fujino, H. et al. Extracellular signal regulated protein kinase and c-jun N-terminal kinase are involved in ml muscarinic receptor-enhanced interleukin-2 production pathway in Jurkat cells. *Biol Pharm Bull* 23, 1198-205 (2000).
 210. Beltman, J., McCormick, F. & Cook, S. J. The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 271, 27018-24 (1996).
 211. Collins, T. J. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43, 25-30 (2007).
 212. Bearer, E. L. Overview of image analysis, image importing, and image processing using freeware. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 14, Unit 14 15 (2003).
 213. Papadopoulos, F. et al. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol* 31, 401-7 (2007).
 214. Yamashita, S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 41, 141-200 (2007).
 215. MacIntyre, N. Unmasking antigens for immunohistochemistry. *Br J Biomed Sci* 58, 190-6 (2001).
 216. Small, G. W., Somasundaram, S., Moore, D. T., Shi, Y. Y. & Orlowski, R. Z. Repression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 by anthracyclines contributes to their antiapoptotic activation of p44/42-MAPK. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 861-9 (2003).

217. Duray, P. H., Cuono, C. B. & Madri, J. A. Demonstration of cutaneous doxorubicin extravasation by rhodamine-filtered fluorescence microscopy. *J Surg Oncol* 31, 21-5 (1986).
218. Wang, Z., Xu, J., Zhou, J. Y., Liu, Y. & Wu, G. S. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res* 66, 8870-7 (2006).
219. Mahalingam, D. et al. Differential activation of JNK1 isoforms by TRAIL receptors modulate apoptosis of colon cancer cell lines. *Br J Cancer* (2009).
220. Dhanasekaran, D. N. & Reddy, E. P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-51 (2008).
221. Stanciu, M. & DeFranco, D. B. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated protein kinase promotes cell death generated by oxidative toxicity or proteasome inhibition in a neuronal cell line. *J Biol Chem* 277, 4010-7 (2002).
222. Wu, W., Pew, T., Zou, M., Pang, D. & Conzen, S. D. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem* 280, 4117-24 (2005).
223. Wang, Z. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 represses c-Jun NH2-terminal kinase-mediated apoptosis via NF-kappaB regulation. *J Biol Chem* 283, 21011-23 (2008).
224. Cortes Sempere, M., Rodriguez Fanjul, V., Sanchez Perez, I. & Perona, R. The role of the NFkappaB signalling pathway in cancer. *Clin Transl Oncol* 10, 143-7 (2008).
225. Cui, Y. et al. Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: a mechanism of tamoxifen resistance. *Cancer Res* 66, 5950-9 (2006).
226. Latta, E. K., Tjan, S., Parkes, R. K. & O'Malley, F. P. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 15, 1318-25 (2002).