

# MODULADORES DE PROGRESIÓN EN CÁNCER DE MAMA

Gisela Ceballos Cancino y Norma A. Hernández Rodríguez

Subdirección de Investigación Básica. Instituto Nacional de Cancerología.

## RESUMEN •

**A**UNQUE EN LOS ÚLTIMOS AÑOS se ha ampliado el espectro de moduladores de progresión en cáncer de mama, en la mayoría de los casos, éstos solo se han estudiado desde el punto de vista biológico; algunos cuantos han sido caracterizados desde el punto de vista clínico, pero no se han validado estadísticamente y es en la minoría de los casos, en la que se ha comprobado su utilidad como factor pronóstico. En este trabajo se analiza el papel que a nivel celular desempeñan las principales familias de factores de crecimiento y sus receptores en la progresión del cáncer de mama. Su estudio permitirá la caracterización de la progresión tumoral, y el mejor entendimiento de la heterogeneidad del cáncer de mama en términos del perfil de progresión biológica.

## ABSTRACT •

*Identification of several modulators of breast cancer progression has emerged during recent years. Most of them are under biological investigation, some of them may be clinically relevant but need further statistics validation and just a few of them may have been already approved as biomarkers of disease outcome. We are reviewing, at cellular level, main growth factor/receptors families and its involvement in breast cancer progression. We are confident this may help to establish a more efficient characterization of the tumor in relation to cell differentiation, growth rate, or metastasis development. Furthermore, this approach may lead us to better understand heterogeneity a key process in breast cancer progression.*



Correspondencia:

**Dra. Norma A. Hernández Rodríguez**

Investigador en Ciencias Médicas "D". Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología  
San Fernando 22, Col. Sección XVI. Tlalpan, México DF, CP 14080

Tel. 56 28 04 79 · Fax. 55 73 46 62 · e-Mail: normahernandez21@yahoo.com

## **INTRODUCCIÓN •**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres; en el año 2002 se reportaron más de un millón de casos, de los cuales 410 712 fallecieron (1). En nuestro país, donde no prevalecen los métodos de detección temprana, las tasas de mortalidad van en aumento; tan solo en el año 2001 se estimó una tasa de mortalidad de 14.7 por 100 000 en mujeres mayores de 25 años (2, 3).

Una de los principales problemas en el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama y en la mayoría de los casos su principal causa de muerte, es la progresión de metástasis a sitios específicos (huesos, pulmón, hígado, etc.). Aunque en algunos casos se observan respuestas transitorias, asociadas al tratamiento convencional, en general se observa la progresión del tumor en los primeros 24 meses con sobrevividas del 20% a 5 años (4). Sin embargo, y en contraste con lo anterior, también se ha observado un cierto número de pacientes que permanece libre de enfermedad por periodos de tiempo muy prolongados. Esta heterogeneidad del padecimiento dificulta la clasificación de pacientes con alto riesgo de desarrollo de metástasis (5).

Los mecanismos celulares básicos involucrados en la progresión tumoral no se conocen; se sabe que algunas clonas agresivas crecen selectivamente, lo que conlleva no solo al desarrollo de metástasis, sino también a resistencia al tratamiento y en casos de enfermedad residual a recurrencia. Aunque en los últimos años se han identificado nuevos marcadores moleculares con uso potencial en pacientes con cáncer de mama, la diversidad de los sistemas utilizados en su estudio, ha complicado la extrapolación de los resultados a pruebas diagnósticas que permitan la identificación de pacientes con alto riesgo de desarrollo de metástasis (6). Por lo que en la presente revisión se analizarán algunos marcadores involucrados en la progresión del cáncer de mama. En forma breve, se mencionará a los genes que modulan la estabilidad genética, la invasividad y el

desarrollo de metástasis. Su función exacta aún se desconoce y en la mayoría de los casos, todavía no se ha documentado una utilidad clínica directa (7). Considerando a la proliferación celular, un evento clave de la progresión tumoral, nos enfocaremos en algunas familias de factores de crecimiento y sus receptores, potencialmente involucrados en la progresión de esta neoplasia.

## **MODULADORES DE ESTABILIDAD GENÉTICA, INVASIÓN Y METÁSTASIS •**

Las anomalías hereditarias en pacientes con cáncer de mama, se observan en la minoría de los casos; las mutaciones en línea germinal generalmente se presentan en genes supresores de tumor como p53 y se asocian a síndromes raros como el de Li-Fraumeni (8, 9). Sin embargo, se sabe que p53 está alterado en el 20 al 30% de los casos, con cerca de 1400 mutaciones somáticas descritas. Estas se presentan en tumores muy agresivos, sin embargo, frecuentemente se asocian con otros factores de mal pronóstico reconocidos (ausencia de receptores de estrógeno y progesterona, alto grado histológico, aneuploidía, y expresión de HER2), por lo que su valor pronóstico es controvertido (10-12).

Además, destacan las mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2 que se encuentran en el 50% y el 30% de los casos de cáncer de mama familiar. BRCA1 regula diversos puntos del ciclo celular, la señalización y la susceptibilidad a apoptosis, su deficiencia causa inestabilidad genómica (aneuploidía, amplificación centrosomal, y aberraciones cromosomales). Las funciones de BRCA2 aún no se conocen con exactitud; solo se sabe participa en la reparación del ADN (13-15). Tumores en los que se expresa BRCA1 y 2, se presenta una baja frecuencia de amplificación de HER2; sin embargo, en mujeres con cáncer de mama esporádico y asociado a BRCA1, la enfermedad progresa rápidamente (13, 14, 16). Aunque se desconoce el papel

**CUADRO 1 •***Genes Supresores de Metástasis*

GEN	Actividad Biológica	Relevancia Clínica
E-caderina (18,19)	Invasión	Correlac. con mayor PLE*
Nm23 (18,20,21)	Invasión	Valor pronóstico no comprobado
Maspin (22,23)	Invasión, Angiogénesis Apoptosis	Correlaciona inversamente con HER2
Kai I (18,24,25)	Invasión	Correlaciona con mejor supervivencia
KiSS1 (26,27)	Transformación	Asociación con mayor mortalidad
BRMS1 (19,28,29)	Transformación	Correlaciona con PR+ y HER2-

\*Periodo libre de enfermedad

exacto que desempeñan estas mutaciones en la progresión tumoral, su impacto clínico en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama hereditario es indiscutible (8).

En relación a los genes supresores de metástasis, se han observado asociaciones estadísticamente significativas, entre la ausencia de estos genes y algunos parámetros biológicos esenciales en la progresión tumoral, sin embargo, la traducción de su activación a la clínica ha sido limitada (*Cuadro 1*) (17).

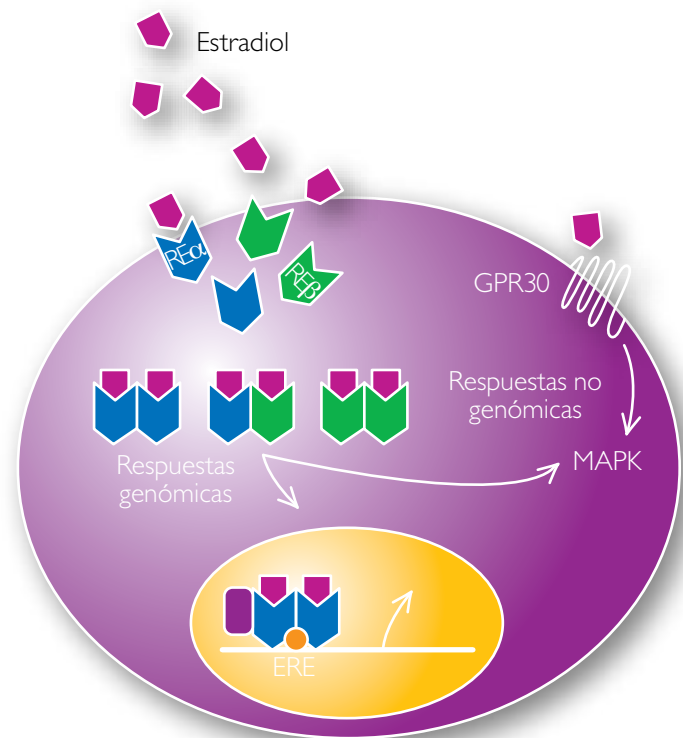
## MODULADORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR •

**Receptores de Estrógeno (RE).** El cáncer de mama es una enfermedad hormono-dependiente; hasta la década pasada el entendimiento sobre el mecanismo de acción del estrógeno y la regulación del RE se basaba en un modelo simplista, que consideraba a un solo receptor (ahora denominado RE $\alpha$ ). Sin embargo, ahora se sabe que los RE pueden ser de tres tipos: los comúnmente llamados clásicos: RE $\alpha$  y RE $\beta$ , y el más recientemente descrito GPR30 (30, 31).

Los RE $\alpha$  y RE $\beta$  pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares; modulan la expresión génica al unirse a sus elementos de respuesta en el núcleo y además inducen respuestas rápidas (no genómicas). Estas últimas también pueden iniciarse por la transactivación del RE vía receptores ti-

rosina cinasa (TK) y/o por los componentes de sus vías de señalización (32-34). Una vez activados, los RE activan a las MAPK y a algunos intermediarios de la señalización (PI3K y AMPc). La interacción entre ambos tipos de respuesta conlleva a la regulación de la activación transcripcional y la modulación de su actividad específica (35,36). Del recientemente descrito GPR30, solo se sabe que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G; que se une con alta especificidad al estrógeno y como agonista al tamoxifen y al ICI 182,780. Su localización subcelular se encuentra todavía en controversia (retículo endoplásmico o membrana plasmática; 31, 37). (*Figura 1*)

Aunque el RE $\alpha$  es expresado en aproximadamente el 50-75% de las pacientes con cáncer de mama, haciéndolas susceptibles al beneficio de la terapia anti-estrógeno, una de cada cuatro pacientes presenta resistencia al tratamiento con progresión de la enfermedad. Esto se ha atribuido a su interacción con otros receptores como el IGFR y HER2; conduciendo a la activación de las vías de AKT y MAPK (38-40). Así mismo, se ha reportado que el

**FIGURA 1 •***Activación de receptores de estrógeno*

RE $\beta$  actúa a nivel transcripcional, como un regulador negativo del RE $\alpha$ , por lo que su co-expresión, reportada en muestras de pacientes con cáncer de mama, podría estar relacionada con la progresión tumoral; sin embargo, los hallazgos experimentales son controversiales (41-44). Por otro lado, se ha postulado al GPR30, como responsable de la resistencia a la hormonoterapia; ya que su activación no es bloqueada por los tratamientos convencionales; su expresión correlaciona con la expresión de HER2 y con el desarrollo de metástasis (39).

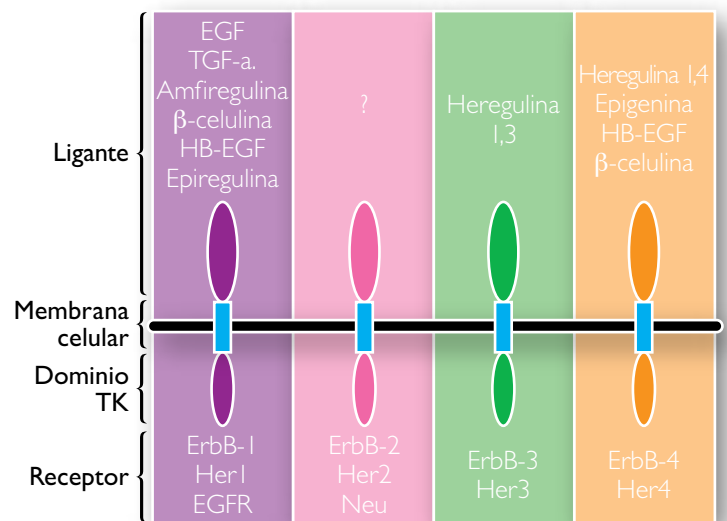
Aunque actualmente existen varios estudios clínicos donde se evalúa el uso de inhibidores de la transducción de la señal y de inhibidores de aromatasa en combinación con la terapia endocrina convencional; existen discordancias entre los datos obtenidos a nivel clínico y molecular. Cobra importancia, entonces conocer la modulación de los RE, para definir la inducción de respuestas celulares involucradas en la progresión del tumor en pacientes con cáncer de mama (36, 40).

**Receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR).** Se ha demostrado la participación de los receptores de membrana tipo tirosina cinaasa en la progresión tumoral del cáncer de mama. Destacan los estudios realizados en la familia del EGFR/HER (45, 46). HER1 es el prototipo de una familia de 4 miembros (EGFR/HER1, neu/erbB2/HER2, erbB3/HER3 y erbB4/HER4); cada uno posee afinidad por diferentes ligantes; a la fecha no se conoce el ligante de HER2 (ver Figura 2); HER1 se presenta en el 30% de las neoplasias malignas; en cáncer de mama, se observa una correlación positiva entre su sobre-expresión, la pérdida de la respuesta a estrógeno y un mal pronóstico para las pacientes. HER2, cercanamente relacionado con HER1, se encuentra amplificado en el 10-35% de las pacientes con cáncer de mama; se ha demostrado ampliamente su asociación con un mal pronóstico clínico (47, 48).

HER1 y HER2 se sobre-expresan en estadios tempranos del desarrollo tumoral, por lo que se han convertido en blancos terapéuticos. A la fecha

están aprobados para el uso oncológico el Erbitux® (cetuximab) empleado en cáncer colorectal metastático y el Herceptin® (trastuzumab) para cáncer de mama; ambos son anticuerpos monoclonales, dirigidos contra HER1 y HER2 respectivamente; sensibilizan a las células tumorales al efecto citotóxico de la quimioterapia. Además, podrían inhibir indirectamente la angiogénesis y los procesos de invasividad y metástasis (49).

Aunque los resultados de estudios clínicos fase II y III han demostrado la eficacia de trastuzumab empleado en combinación con docetaxel en pacientes con cáncer de mama metastático (incremento en la supervivencia de las pacientes de 18.3 meses a 27.7 meses; 50); se han observado una ausencia de respuesta clínica en mujeres con cáncer de mama y HER2 amplificado. Esto sugiere la existencia de diversos mecanismos de resistencia. Se ha postulado la participación de moléculas como el IGFR, AKT, MUC4 y por supuesto la interacción entre los diferentes miembros de la familia del EGFR (51-54). En este sentido, destaca el trabajo realizado con el nuevo prototipo pertuzumab (Omnitarg; Genetech, South San Francisco, CA). Este es un anticuerpo monoclonal dirigido contra una epítipe distinta a la empleada por el trastuzumab y que además de inhibir al HER2, impide su dimerización con los otros miembros de la familia (55).



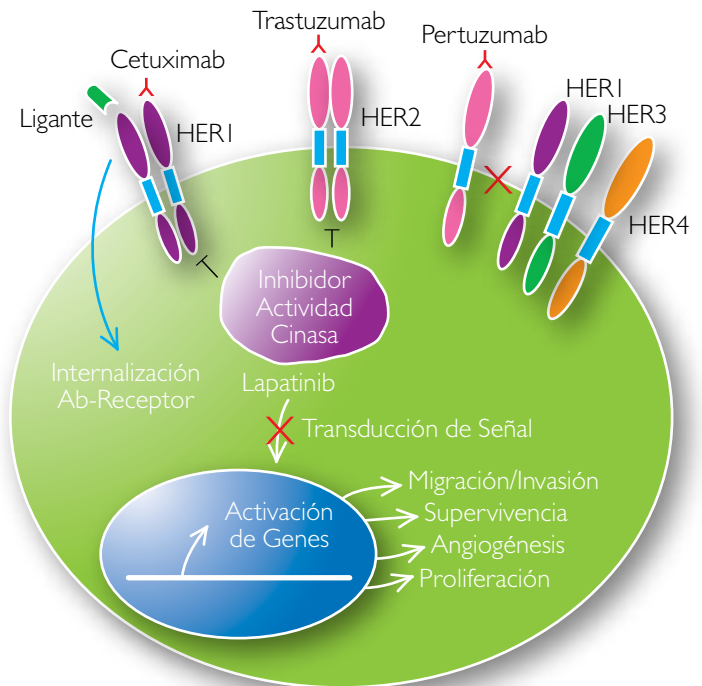
**FIGURA 2 •**  
Familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

Cabe mencionar que trastuzumab, no permite la internalización de este receptor; por el contrario se ha demostrado, induce su reciclaje y permanencia en forma constante en la membrana plasmática (56, 57). Esta observación celular tiene implicaciones importantes a nivel terapéutico. Deben desarrollarse nuevos inmunocombinados que inhiban e internalicen al HER2. Además, pueden emplearse inhibidores selectivos de actividad TK. Es decir, moléculas pequeñas con muy poca toxicidad que inhiban en forma específica la actividad cinasa del HER2. Como ejemplo puede mencionarse al lapatinib (GW572016), un inhibidor dual de HER1 y HER2 (actualmente en fase clínica de prueba; *Figura 3*; 58, 59).

El mejor entendimiento de los mecanismos celulares involucrados en la progresión tumoral del cáncer de mama y la resistencia a los tratamientos conduce al establecimiento de nuevas y mejores terapéuticas. Estos nuevos agentes, podrían emplearse en combinación con la terapéutica convencional y administrarse en forma secuencial incluyendo a varios inhibidores cada uno de ellos con distinta actividad biológica que en conjunto, resultaran en mayor eficacia terapéutica. Es decir, no deberíamos concebir al trastuzumab como la última palabra en el bloqueo de HER2; ni considerar a éste el único miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico involucrado en la progresión del cáncer de mama.

**Receptores Activados por Proteasa.** El receptor de la trombina (Protease Activated Receptor-1, PAR1) está involucrado en la progresión del cáncer de mama. La trombina media, a través de su receptor, múltiples efectos celulares (angiogénesis, proliferación, adhesión a matriz extracelular y metástasis), esenciales en la progresión tumoral (60-62). Aunque todavía no hay pruebas que permitan su empleo en pacientes; se ha documentado *in vitro* e *in vivo* su potencial como nuevo marcador y blanco terapéutico en pacientes con cáncer de mama.

El PAR1 pertenece a una familia de 4 miembros de receptores acoplados a proteínas G: PAR1-4. Se activan por corte proteolítico en su dominio extracel-



**FIGURA 3•**

*Mecanismos de inhibición del EGFR*

lular, por la trombina, la tripsina y la triptasa, disparando una cascada de eventos que induce diversas respuestas celulares (señalización por calcio, acoplamiento de integrinas, adhesión, migración, transcripción y mitogénesis; 63, 64). Aunque se desconoce su mecanismo de señalización exacto, se ha demostrado que PAR1 está involucrado en los procesos de invasión y metástasis del cáncer de mama y de algunas otras neoplasias (cáncer de colon y recto, de pulmón, de páncreas, de próstata y el melanoma). Estudios realizados en líneas celulares, han demostrado una correlación significativa entre la presencia de PAR1 y su capacidad invasiva (65-67).

Estos resultados son consistentes con observaciones realizadas en biopsias de pacientes con cáncer de mama. En estas se han reportado niveles elevados del RNAm y la proteína de PAR1 en muestras de tejido del tipo canalicular infiltrante; cabe destacar que la expresión de este receptor, se ha reportado como mínima o ausente en hiperplasias intraductales atípicas pre-malignas, en epitelio de mama normal, y en líneas celulares no invasivas. Además, se ha demostrado una asociación altamente significativa entre la sobre expresión de PAR1 y un alto ries-

go de desarrollo de metástasis y mortalidad en pacientes con cáncer de mama (68, 69).

La expresión selectiva de PAR1 en células tumorales y su capacidad como mediador de angiogénesis, proliferación e inducción de metástasis, permite vislumbrar a este receptor como un candidato ideal para terapia con base molecular. Al respecto, cabe mencionar que estudios recientes han demostrado la activación de PAR1 por la metaloproteasa de matriz 1 (MMP1); ésta se ha observado presente en forma abundante en tumores invasivos y metastáticos y se ha considerado incluso un marcador de mal pronóstico en algunas neoplasias (67).

A nivel celular, se ha sugerido que la activación de PAR1 es mediada por transactivación de HER1 y HER2; esto correlaciona con el valor pronóstico demostrado para HER2 en estas pacientes (48, 70). Por otra parte se ha demostrado un internalización de PAR1 deficiente en células de cáncer de mama y una sobre expresión de PAR-2 en muestras de cáncer de mama de alto grado; lo que sugiere una modulación entre los miembros de la familia (71, 72); aún se requieren más estudios que permitan comprobar su potencial como precursor de la progresión tumoral.

**Receptores del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF).** El PDGF participa en la progresión del cáncer a través de la señalización inducida por sus receptores (PDGFR); éstos modulan la proliferación y la diferenciación de diversas células tumorales y pueden ser de dos tipos, el PDGFR $\alpha$  y el PDGFR $\beta$ ; cada uno es estimulado selectivamente por diferentes dímeros PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y-DD (73).

En pacientes con cáncer de mama avanzado, se ha observado una correlación entre el incremento de los niveles de PDGF en suero, el desarrollo de metástasis y un menor tiempo de supervivencia. Aunque no se ha demostrado correlación entre los niveles del PDGF con algún factor de valor pronóstico conocido como el HER2, la sobre expresión de su

receptor, PDGFR $\beta$ , correlaciona con la expresión del RE $\alpha$ . En contraste, la expresión de PDGFR $\alpha$  correlaciona con parámetros de mal pronóstico clínico (nódulos positivos, la expresión de HER2 y un comportamiento invasivo del tumor; 74-79).

Esta asociación entre la activación del PDGFR $\alpha$  y el potencial metastático, han permitido el desarrollo de estudios in vitro que han demostrado que la inhibición de la vía de PDGF con el fármaco STI571 (Gleevec), conduce a la reducción de la formación de metástasis (78, 79). Estos hallazgos nos permiten clasificarlo entre el grupo de moduladores potencialmente útiles en el tratamiento de la progresión del cáncer de mama.

**Receptores del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF $\beta$ ).** Este es el prototipo de una familia de citocinas, compuesta por tres miembros: TGF $\beta$ I-III; son moduladores de proliferación, migración, apoptosis, adhesión y angiogénesis (80); pertenecen a la superfamilia de factores de crecimiento que incluye a las activinas y las BMP's. Sintetizadas como moléculas precursoras, después de su activación, se unen a un complejo receptor heterodimérico. Este consiste de un par de receptores serina/treonina cinasa, T $\beta$ RI y T $\beta$ RII, y un co-receptor T $\beta$ RIII (betaglicano). Una vez activados fosforilan a un grupo de proteínas llamadas Smads, que regulan la actividad transcripcional; adicionalmente las acciones del TGF $\beta$  pueden ser medidas por las MAP cinasas, PI3K, TAK1, PP2A y GTPasas Rho (81, 82).

Aunque en una neoplasia maligna predomina su acción pro-oncogénica, el TGF $\beta$  posee una acción supresora de tumores intrínseca (80, 83). En cáncer de mama, se ha reportado una asociación entre el incremento de la concentración plasmática de TGF $\beta$ 1, una menor supervivencia y una mayor agresividad (84-86). Adicionalmente se ha reportado que la modulación ejercida por otros receptores, como el RE, determina su actividad como supresor o promotor tumoral. En tumores negativos para RE, la expresión de T $\beta$ RII se asocia a un comportamiento altamente agresivo y tiempo de

supervivencia global más corto (87). Además se ha demostrado que una variante del T $\beta$ RI mutada en línea germinal, se asocia con progresión tumoral (88). Mientras que T $\beta$ RIII inhibe la invasividad, angiogénesis y metástasis; su expresión en niveles bajos correlaciona con tiempos menores libres de enfermedad (81). Aunque se sabe TGF $\beta$  induce la activación de eventos celulares importantes en la progresión tumoral, se ha observado que su activación es suprimida en tumores que sobre expresan a HER2 (87, 89). En relación al diseño de terapias dirigidas al bloqueo de su actividad, se puede mencionar el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanizados que se han empezado a probar en estudios in vitro (80, 82).

## CONCLUSIÓN

Las familias de factores de crecimiento y sus receptores, mencionados en la presente revisión, son solo un ejemplo del sin número de nuevos mediadores que podrían estar involucrados en la progresión tumoral del cáncer de mama. Sin embargo, debe considerarse que éstas están formadas por diversos miembros y sus actividades pueden ser moduladas entre ellos o bien entre familias; esto hace difícil establecer el papel que desempeñan y medir su alcance real en el tratamiento de cada paciente.

A futuro tendremos que dirigir nuestras estrategias de estudio en progresión tumoral, a la descripción y análisis de los eventos tempranos del desarrollo de la metástasis y que a nivel celular podrían tener repercusiones clínicas. Creemos que el mejor entendimiento de este proceso nos permitirá establecer los factores determinantes del pronóstico del padecimiento y a futuro nos brindará nuevos puntos clave para la inhibición específica de la progresión; esto será útil en el tratamiento y prevención de la metástasis en pacientes.

Para lograr este objetivo se requiere de la coordinación de actividades de Investigación básica y clínica, en un entorno multidisciplinario, ahora denominada Investigación translacional; en donde con la participación de Investigadores básicos, oncólogos, cirujanos,

patólogos y epidemiólogos, se logre un avance en el objetivo común de la elucidación de los mecanismos de la progresión tumoral, que redunde a su vez en un mejor tratamiento para las pacientes.

## REFERENCIAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Global Cancer Statistics, 2002. *Cancer J Clin* 2005; 55:74-108 •
2. Secretaría de Salud. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. 2002 •
3. Lopez-Carrillo L, Torres-Sanchez L, Lopez-Cervantes M. Identificación de lesiones mamarias malignas en México. *Salud Pública México* 2001; 43:199-202 •
4. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz ThA, et al Cyclin E and Survival in patients with breast cancer *N Engl J Med* 2002; 347:1556-1575 •
5. Atalay G, Biganzoli L, Renard F et al. Clinical outcome of breast cancer patients with liver metastases alone in the anthracycline-taxane era: a retrospective analysis of two prospective, randomized metastatic breast trials *Eur J Cancer* 2003; 39: 2439-2449 •
6. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:563-572 •
7. Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:55-63 •
8. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004; 9:361-377 •
9. Walsh T, King M. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell*, 11:103-105, 2007 •
10. Lacroix M, Toillon R, Leclercq G p53 and breast cancer, an update *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:293-325 •
11. Overgaard J, Yilmaz M, Guldborg P, et al. TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta Onco* 2000;39:327-333 •
12. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, et al The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer *Clin Cancer Res*. 2006; 12:1157-1167 •
13. Yarden RI, Moshe ZP. BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions *Mol Cancer Ther*. 2006; 5:1396-1404 •
14. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1/2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:665-676 •
15. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage *Cancer Sci*. 2004; 95:866-871 •
16. Honrado E, Osorio A, Palacios J, et al. Pathology & gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1/2 and CHEK2 gene mutations. *Oncogene*. 25:5837-5845, 2006 •
17. Welch D, Steeg P Rinker-Schaeffer C Molecular biology of breast cancer metastasis genetic regulation of human breast carcinoma metastasis *Breast Cancer Res* 2000; 2:408-416 •
18. Park D, Karesen R, Axcróna U, Noren T, Saber T. Expression pattern of adhesion molecules, their in-

fluence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. *APMIS* 2007; 115:52-65 •

**19.** Debies MT, Welch DR. Genetic Basis of Human Breast Cancer Metastasis. *J Mammary Gland Biology* 2001; 6:441-451 •

**20.** Gohring UJ, Eustermann I, Becker M, Neuhaus W, Rein DT, Schondorf T. Lack of prognostic significance of nm23 expression in human 1ry breast cancer. *Oncology Rep* 2002; 9:1205-1208 •

**21.** Sirotkovic-Skerley M, Krizanac S, Kapitanovic S, et al. Expression of c-myc, erbB-2, p53 and nm23-H1 gene product in benign and malignant breast lesions: co-expression and correlation with clinicopathologic parameters. *Exp Mol Path* 2005; 79:42-50 •

**22.** Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Hendrix MJC. Biological Functions of Maspin. *Journal of Cellular Physiology* 2006; 209:617-624 •

**23.** Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, Craig AD Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. *Journal of Pathology* 2003; 199:432-435 •

**24.** Yang X, Wei LL, Tang C, et al Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Research* 2001; 61:5284-5288 •

**25.** Son BH, Choi JS, Lee JH Prognostic values of KAI1 and survivin expression in an infiltrating ductal carcinoma of the breast *Pathology* 2005; 37:131-136 •

**26.** Harms JF, Welch DR, Miele ME KISS1 metastasis suppression and emergent pathways *Clinical & Experimental Metastasis* 2003; 20:11-18 •

**27.** Martin TA, Watkins G, Jiang WG KISS1 expression in human breast cancer *Clinical & Experimental Metastasis* 2005; 22:503-511 •

**28.** Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. Reduced expression of the breast cancer metastasis supresor 1 mRNA is correlated with poor progress in breast cáncer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6410-6414 •

**29.** Hicks DG, Yoder BJ, Short S, et al. Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 protein expression predicts reduced disease-free survival in subsets of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6702-6708 •

**30.** Sommer S, Fuqua SAW Estrogen Receptors alpha and beta. *Focus On* 2001; 6 •

**31.** Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005; 307:1625-1630 •

**32.** Matthews J, Gustafsson J. Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol Interv* 2003; 3:281-292 •

**33.** Ikeda K, Inoue S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Hystol Cytol.* 2004; 67:435-442 •

**34.** Gururaj AE, Rayala SK, Vadlamudi RK, Kumar R. Novel mechanism of resistance to endocrine therapy: genomic and nongenomic considerations. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (3 Suppl):1001s •

**35.** Norman AW, Mizwicki MT, Norman DPG Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev.* 2004; 3:27-41 •

**36.** Moriarty K, Kim KH, Bender JR. ER-mediated rapid signaling. *Endocrinol* 2006; 147:5557-5563 •

**37.** Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrana receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinol* 2005; 146:624-632 •

**38.** Fuqua SAW, Schiff R, Parra I, et al Estrogen receptor alpha protein in human breast cancer *Cancer Res.* 2003; 63:2434-2439 •

**39.** Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, et al Distribution of GPR30, a 7-membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression *Clin Cancer Res* 2006; 12:6359-6366 •

**40.** Moy B, Goss PE Estrogen receptor pathway: resistance to endocrine therapy and new therapeutic approaches *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4790-4793 •

**41.** Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, Walton DS, Carleton PJ, Fox JN, Atkin SL. Coexpression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : poor prognostic factors in human breast cancer? *Cancer Res* 1999; 59:525-528 •

**42.** Skliris GP, Carder PJ, Lansdown MRJ, Speirs V Immunohistochemical detection of ER $\beta$  in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer* 2001; 84:1095-1098 •

**43.** Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, et al. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice *Mol Endocrinol.* 2003; 17:203-208 •

**44.** Paruthiyil S, Paramar H, Kerekatte V, et al. ER $\beta$  inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest *Cancer Res* 2004; 64:423-428 •

**45.** Paul MK and Mukhopadhyay AK Tyrosine kinase – Role and significance in *Cancer Int J Med Sci.* 2004; 1:101-115 •

**46.** Biscardi JS, Ishizavar RC, Silva CM, Parsons SA TK signalling in breast cancer epidermal growth factor receptor and c-Src interactions *Breast Cancer Res* 2000; 2:203-210 •

**47.** Toi M, Osaki A, Yamada H, Toge T. epidermal growth factor receptor expresión as a prognostic indicator in breast cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27:977-980 •

**48.** Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene *Science* 1987; 235:177-182 •

**49.** Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer *Lancet Oncol* 2004; 5:292-302 •

**50.** Slamon DJ et al Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2. *NEJM* 2001; 244:783-792 •

**51.** Lu Y, et al Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cell lines *Int J Cancer* 2004; 108:334 •

**52.** Yakes Y, et al Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclinD1, and anti-tumor action. *Cancer Res.* 2002; 62:4132 •

**53.** Priece-Shiavi SA et al, Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanisms for herceptin resistance. *Int J Cancer* 2002; 99:783-791 •

**54.** Pegram M, Salmon D. Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody the-

- rapy. *Semin Oncol.* 2000; 27(5 suppl 9):13-19 •
- 55.** Franklin MC et al Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004; 5:317-328 •
- 56.** Austin CD et al Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin *Mol Biol Cell* 2004;15:5268-5282 •
- 57.** Hommelgaard AM et al Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor *Mol Biol Cell* 2004;15:1557-1567 •
- 58.** Konecny GE, Venkatesan N, Beryl M, et al Therapeutic advantage of a dual tk inhibitor (GW2016) in combination with chemotherapy drugs or trastuzumab against human breast cancer cells with HER2 overexpression *PNAS* 2002;43:1003 (abts 4974) •
- 59.** Burris HA 3rd: Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with EGFR/ErbB2 kinase inhibitor lapatinib. *Oncologist* 2004;9:10-15 •
- 60.** Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, et al. Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation *Amer J Respir Cell Mol Biol.* 1994; 6:123-130 •
- 61.** Nierodzik ML, Chen K, Takeshita K, et al. Protease-activated receptor 1 PAR1 is required and rate limiting for thrombin enhanced experimental pulmonary metastases *Blood* 1998; 92:3694-3700 •
- 62.** Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW II, Pentecost BT Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness *Br J Cancer* 1999; 79: 401-406 •
- 63.** Coughlin SR Thrombin signaling and protease-activated receptor *Nature* 2000; 407:258-264 •
- 64.** Trejo, J. Protease-Activated Receptors: New Concepts in Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 307:437-442 •
- 65.** Bangham J Moving PARts *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 247 •
- 66.** Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulus A Signaling from Protease-activated receptors-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells *Cancer Res.* 2001; 61:5933-5940 •
- 67.** Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sheriffi., S., Kuliopulos, A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 2005; 120:303-313 •
- 68.** Even-Ram SC, Maoz M, Pokroy E, et al. Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the alpha vbeta 5 integrin *J Biol Chem.* 2001; 276:10952 •
- 69.** D' Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P Differential expression of protease activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal benign and malignant human tissues *Am J Pathol* 2001; 158:2031-2041 •
- 70.** Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein coupled receptors *Current Opinion Cell Biol.* 1999; 11:177-183 •
- 71.** Booden, M. A., Eckert, L. B., Der, C. J., Trejo, J. Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:1990-1999 •
- 72.** Li, S., Huang, S., Peng, S. Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: Involvement in tumor progression. *Int J Oncol.* 2005; 27:1329-1339 •
- 73.** Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15:205-213 •
- 74.** Ariad S, Seymour L, Bezwoda WR. Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 1991; 20:11-17 •
- 75.** Coltrera MD, Wang J, Porter PL, Gown AM. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  subunit in human breast tissue and breast carcinoma. *Cancer Research* 1995; 55:2703-2708 •
- 76.** Seymour L, Dajee D, Bezwoda WR. Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1993; 26:247-252 •
- 77.** Bhardwaj B, Klassen J, Cossette N, Sterns E, Tuck A, Deeley R, Sengupta S, Elliott B. Localization of platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor expression in the periepipithelial stroma of human breast carcinoma. *Clinical Cancer Res.* 1996; 2:773-782 •
- 78.** Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt F. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  in breast cancer is associated with tumor progression. *Breast Cancer Res.* 2005; 7:R788-R795 •
- 79.** Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H, Grönert S. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J. Clin Invest.* 2006; 116:1561-1570 •
- 80.** Jakowlew SB. Transforming growth factor-b in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25:435-457 •
- 81.** Dong M, How T, Kirkbride KC, Gordon KJ, Lee JD, Hempel N, Kelly P, Moeller BJ, Marks JR, Blobel JC. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *J Clin Invest.* 2007; 117:206-217 •
- 82.** Kang Y. Pro-metastasis functions of TGF $\beta$  mediated by the Smad pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 98:1380-1390 •
- 83.** Benson JR. Role of transforming growth factor b in breast carcinogenesis. *The Lancet Oncology* 2004; 5:229-239 •
- 84.** Ivanovic V, Demajo M, Krtolica K, et al Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. *Clin. Chim Acta* 2006; 371:191-193 •
- 85.** Sheen-Chen SM, Chen HS, Sheen CW, Eng HL, Chen WJ. Serum levels of transforming growth factor beta 1 in patients with breast cancer. *Arch. Surg.* 2001; 136:937-940 •
- 86.** Lebrecht A, Grimm C, Euler G, et al. TGF $\beta$ 1 serum levels in patients with pre-invasive and invasive lesions of the breast. *Int J Biol Markers* 2004; 19:236-239 •
- 87.** Buck MB, Knabbe C. TGF-beta signaling in breast cancer. *Ann Acad Sci.* 2006; 1089:119-126 •
- 88.** Chen T, Jackson CR, Link A, et al. Int7G24A variant of transforming growth factor-beta receptor type I is associated with invasive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:392-397 •
- 89.** Landis MD, Seachrist DD, Montanez-Wiscovich ME, Danielpour D, Keri RA. Gene expression profiling of cancer progression reveals intrinsic regulation of TGF $\beta$  signaling in ErbB2/Neu-induced tumors from transgenic mice. *Oncogene* 2005; 24:5173-90 •