

F. Vizoso<sup>a</sup>,  
J. Vázquez<sup>b</sup>,  
A. Martín<sup>c</sup>,  
M.L. Lamelas<sup>b</sup>,  
J.C. Rodríguez<sup>a</sup>,  
L. Alonso<sup>c</sup>

# Aspartil-proteasas y cáncer de mama

## Aspartyl-proteases and breast cancer

### SUMMARY

*Aspartyl-proteases are a family of proteolytic enzymes that are widely distributed by human organism, where they are essential in many physiological functions and play a role in several pathological processes. Cathepsin D (Cat D) is normally located in the lysosomes of all cells in the organism and is related with cell protein catabolism. Cat D expression in breast cancer has been proposed like an oestrogen-dependent marker, like a growth-factor, and like an important protease that plays a crucial role in tumor invasion. However, actual information about its prognostic value in this tumor is confuse. On the other hand, there are data that suggest that cat D presence in breast secretions could be a biologic marker of malignant transformation. Pep C is an aspartyl-protease normally involved in the protein digestion in the stomach, and with very restringed expression in human organism. However, it has been shown that epithelial cells of gross cysts from the breast and a significant percentage of breast carcinomas express this aspartyl-protease. In addition, it has also been demonstrated that pepC expression by breast carcinomas is a new prognostic factor for favorable evolution of the disease, as well as a possible marker of a specific hormonal pathway in these tumors. GCDFP-15 is a major protein component from the cyst fluid of the gross cystic disease of the breast and of the breast secretion obtained by nipple from the majority of the nonlactating women. This protease is also expressed by a high percentage of breast carcinomas, in which represent a marker of apocrine differentiation a possible biological marker of hormone androgenic responsiveness.*

<sup>a</sup>Servicio de Cirugía General. <sup>b</sup>Servicio de Ginecología. <sup>c</sup>Medicina de Familia. Hospital de Jove de Gijón.

Correspondencia: Dr. F. Vizoso.  
Servicio de Cirugía General.  
Hospital de Jove.  
Avda. Eduardo Castro, s/n.  
33290 Gijón. Asturias.  
Correo electrónico:  
fjvizoso@wanadoo.es

### Palabras clave:

Aspartil-proteinasas. Catepsina D. Pepsinógeno C. GCDFP-15. Cáncer de mama. Factor pronóstico.

### Key words:

Aspartyl-proteases. Cathepsin D. Pepsinogen C. GCDFP-15. Breast cancer. Prognosis factor.

## INTRODUCCIÓN

Las aspartil-proteasas tienen una larga historia, ya que, probablemente, representan el primer tipo de enzimas conocidas en la humanidad. Así, en pinturas excavadas en el Sahara libio del período 5500-2000 a.C. se puede intuir la utilización de este tipo de enzimas de origen microbiano, precisamente, en el procesamiento de productos lácteos. Pero ha sido gracias al desarrollo definitivo de la bioquímica moderna, lo que ha permitido el despliegue del conocimiento acerca de las aspartil-proteasas. Durante la década de los 80 se produjo un incremento espectacular sobre el conocimiento de sus propiedades físico-químicas y biológicas. Esas caracte-

rísticas principales incluyen la tenencia de dos residuos de ácido aspártico en su molécula, su susceptibilidad a ser inhibidas por peptatinas (peptapéptidos producidos por varias especies de actinomyces) y su activación a un pH ácido. Entre las aspartil-proteasas humanas conocidas en la actualidad, se encuentran las pepsinas, gastrina, catepsina D, catepsina E, y renina (tabla 1). Estas enzimas se encuentran distribuidas ampliamente por el organismo humano, donde desempeñan funciones fisiológicas tan variadas como la digestión de proteínas en el estómago<sup>1</sup>, licuefacción del semen en la vagina<sup>2</sup>, catabolismo proteico en los lisosomas y remodelación tisular<sup>3</sup>. Además, las aspartil-proteasas también han sido implicadas en procesos patológicos humanos tales como

úlceras gastro-duodenales<sup>4</sup>, infertilidad<sup>2</sup>, anemia perniciosa<sup>5</sup>, enfermedades del tejido conectivo<sup>6</sup> y degenerativas del sistema nervioso central<sup>7</sup>.

Las aspartil-proteasas, especialmente la catepsina D, más recientemente el pepsinógeno C, han despertado un considerable interés en patología mamaria, especialmente en el cáncer. Así durante la década de los 90, se multiplicaron los esfuerzos de diferentes grupos sobre el papel que desempeñan estas enzimas en el diagnóstico, regulación hormonal, y, especialmente, pronóstico del cáncer de mama. Además, recientemente se ha descrito que la proteína del fluido quístico de 15 kDa de la enfermedad de los grandes quistes de la mama (GCDFP-15), o también denominada proteína inducible por la prolactina (PIP) es una nueva aspartil-proteasa.

## CATEPSINA D

La catepsina D (cat D) está normalmente localizada en los lisosomas de todas las células a concentraciones bajas. Su función está relacionada con el catabolismo proteico a pH ácido, y sinérgicamente con otras catepsinas<sup>8</sup>. Además de esa acción proteolítica general en los lisosomas, la cat D también puede tener un papel crucial en la activación de proteínas en el compartimento perilisosomal. Así, se ha propuesto que la enzima podría desempeñar un papel en el procesamiento de antígenos<sup>9</sup>, en la proliferación celular y renovación tisular<sup>10</sup>, así como en la activación de diferentes prohormonas<sup>11,12</sup>. La importancia fisiológica de la cat D está demostrada en ratones "knock-out" de ese gen, en los que se observa que la pérdida de producción de la enzima induce necrosis y hemorragia en el intestino delgado, así como también apoptosis en las células linfoides<sup>10</sup>.

En la glándula mamaria normal, se ha sugerido que la cat D puede estar involucrada en el catabolismo proteico que acontece en la involución de las estructuras ductales y alveolares tras el cese de la lactancia y la involución uterina tras el parto<sup>13</sup>. El interés de esta enzima en el cáncer de mama se situó, en un principio, como un marcador de dependencia estrogénica, ya que representa una de las pocas proteínas cuya expresión está regulada por estrógenos en líneas celulares de cáncer mamario<sup>14</sup>. Aunque la razón de éste último aspecto permanece todavía oscura, sí al menos es evidente que la cat D es expresada en exceso en muchos carcinomas de mama, con unas concentraciones de 2 a 50 veces mayores en comparación a sus concentraciones en otras células tales como fibroblastos de las glándulas mamarias normales<sup>15</sup>, y que la enzima puede promover la pro-

TABLA 1  
LUGAR DE PRODUCCIÓN DE LAS PRINCIPALES ASPARTIL-PROTEASAS

Nombre	Lugar de producción	Funciones
Pepsinógeno A	Mucosa de fundus gástrico	Digestión de proteínas
Pepsinógeno C	Toda la mucosa gástrica, vesículas seminales, glándulas de Brüner del duodeno, conductos secretores pancreáticos, islotes pancreáticos, glándulas sudoríparas	Digestión de proteínas
Gastrina	Glándulas del cardias, glándulas de Brüner, islotes pancreáticos, próstata y glándulas seminales	Regulación de la actividad digestiva y metabólica
Catepsina D	Lisosomas de todas las células	Catabolismo proteico, activación de proteínas y procesamiento de antígenos
Catepsina E	Mucosa gástrica, membrana de eritrocitos y placas de Peyer del intestino	Activación de proteínas, degradación de proteínas y procesamiento de antígenos
Renina	Riñón, glándula submaxilar	Regulación de presión arterial, fragmenta angiotensina

liferación celular actuando como un mitógeno<sup>16,17</sup>. Además existen datos experimentales que sugieren un papel de la enzima en la progresión tumoral. Así, se ha demostrado que la transfección de clones de células de cáncer mamario productoras de cat D en ratones ocasiona metástasis hepáticas de mayor tamaño que en aquellos con clones de células no productoras de la enzima<sup>18,19</sup>.

Todos esos hallazgos han motivado una larga serie de estudios encaminados a investigar la posible significación biológica y clínica de la cat D en el cáncer de mama. Esos estudios evaluaron el contenido de la enzima en los tumores mamarios por métodos diferentes, como análisis inmunoradiométricos, análisis de "Western blot", inmunohistoquímicos, o medición directa

de la actividad enzimática de la catepsina. Sin embargo, en función de esos diferentes métodos empleados en la determinación del contenido tumoral de la enzima, se desprenden resultados discordantes en cuanto a su significación pronóstica en el cáncer de mama. Así, mientras los estudios que evaluaron directamente las concentraciones de la cat D en los citosoles de los carcinomas mamarios describen una asociación significativa entre los niveles elevados de la enzima y una menor supervivencia total de las pacientes<sup>20-29</sup>, la mayoría de los estudios realizados mediante la técnica inmunohistoquímica, o bien no encontraron relación entre la expresión de la enzima por las células tumorales y el pronóstico de la enfermedad<sup>30-32</sup> o, por el contrario, detectaron un valor pronóstico favorable de los valores intratumorales elevados de cat D en determinados subgrupos de pacientes<sup>33,34</sup>. Además, estudios similares también sugieren que la expresión de la cat D por las células estromales, como fibroblastos y macrófagos, más que por las células cancerosas mismas, pueden estar relacionadas de forma más decisiva con un pronóstico adverso de la enfermedad<sup>35-40</sup>. Sin embargo, también cabe señalar que existen trabajos que muestran resultados discordantes con todas esas posibilidades pronósticas de la cat D anteriormente señaladas<sup>41-44</sup>.

El cúmulo de toda esa información conflictiva en la literatura acerca de la significación biológica y clínica de la cat D en el cáncer de mama, ha motivado que la implicación de la cat D en este tipo de neoplasia haya sido considerada como la pieza de un gran "puzzle"<sup>45</sup>. Sin embargo, hay que considerar diferentes aspectos de la cat D en el cáncer de mama para comprender el complejo papel que parece desempeñar en el contexto de la fisiopatología tumoral de la neoplasia. Esos diferentes aspectos incluyen los relacionados con los métodos empleados en su determinación, localización morfológica de su expresión, mecanismo de su acción proteolítica, y otras acciones de la enzima relacionadas con la progresión tumoral.

En primer lugar, en relación con el método de determinación de la Cat D, existen claras ventajas y desventajas de cada uno de los diferentes métodos más habitualmente empleados. La determinación directa de la enzima en citosol de tumores mamarios mediante técnica de enzimoanálisis, aporta la clara ventaja de la objetividad y reproductividad del método, pero también presenta la limitación de que la determinación del contenido total de la proteasa no discrimina el origen celular de la misma. Por el contrario, las determinaciones mediante técnica inmunohistoquímica ofrecen la ventaja de una evaluación morfológica de la expresión tumoral de

la enzima. Sin embargo, ésta última técnica puede adolecer de un falta de objetividad en la interpretación semicuantitativa de los valores de tinción inmunohistoquímica, lo que dificulta una correcta reproductibilidad de la cuantificación proteica. Además, a ello podemos añadir el inconveniente de aspectos técnicos tales como el procesamiento de tejidos mediante fijación, o bien la diferente especificidad de los distintos anticuerpos empleados en las determinaciones.

Pero, independientemente de las diferentes peculiaridades de los métodos empleados en la determinación de la cat D y el origen celular de su producción, debemos considerar cuáles son los mecanismos por los que, finalmente, la enzima está implicada en la progresión tumoral. El interés principal de las enzimas proteolíticas en patología tumoral está motivado por su papel potencial en la degradación de la membrana basal y matriz extracelular, facilitando así la invasión tumoral y las metástasis, que representan aspectos absolutamente claves en la historia natural del cáncer<sup>46</sup>. Si bien se ha demostrado que la cat D puede tener acción degradativa sobre distintos componentes de la matriz extracelular<sup>47,18</sup>, también es sabido que para poder ejercer esa acción proteolítica la enzima ha de ser capaz de actuar a un pH ácido, habitual en el compartimento intracelular, pero impropio del medio extracelular humano. Sin embargo, se han propuesto varias hipótesis para explicar esta asociación. Así se ha señalado que un pH ácido de 5,5, suficiente para la activación proteolítica de la cat D, puede ser alcanzado en algunas circunstancias en el compartimento extracelular de los tumores. Ello puede ser posible debido a la liberación al medio extracelular de protones, a través de la producción de ácido láctico y una bomba  $H^+/Na^+$ ATPasa funcionando en la membrana plasmática, por parte tanto de las células cancerosas como de los macrófagos peritumorales<sup>48</sup>. Además, considerando que las células tumorales pueden fagocitar material extracelular<sup>49,50</sup>, también se ha sugerido que la cat D desempeñaría un papel crucial en la digestión de ese material "engullido"<sup>51</sup>. De esa forma, la cat D no sólo contribuiría a la capacidad invasiva de los tumores, sino que la enzima también facilitaría la producción de nutrientes, tales como aminoácidos de la matriz extracelular, en las células tumorales durante su "emigración" a lugares distantes<sup>48</sup>.

Por otra parte, existen también otros mecanismos por los que la cat D parece estar implicada en la progresión tumoral. Así, se ha descrito que la sobreexpresión de cat D por las células tumorales incrementa la densidad celular mediante la inactivación de inhibidores del crecimiento liberados por las células confluyentes<sup>18,19</sup>, y, a la

vez, facilita la liberación de factores de crecimiento desde la matriz extracelular. En relación con esta última posibilidad, se ha demostrado que la cat D, al degradar la matriz extracelular, ocasiona una liberación de factores de crecimiento y citoquinas que, como el factor transformante  $\beta$  y el factor de crecimiento fibroblástico, están normalmente atrapados en esa estructura en una forma inactiva<sup>48,52</sup>.

Así pues, todas esas evidencias experimentales de la cat D en la progresión tumoral contrastan con los resultados conflictivos derivados de la investigación clínica. Sin embargo, cabe destacar los resultados recientemente publicados por Foekens et al<sup>26</sup>, ya que esos autores realizaron un estudio sobre 2.810 extractos de citosoles mamarios correspondientes a los tumores de mujeres que fueron sometidas a un período medio de seguimiento clínico de 88 meses. Los resultados de ese estudio realizado sobre un considerable número de mujeres, y con un tiempo adecuado de seguimiento clínico, demostraron que las concentraciones citosólicas de la enzima predicen una temprana recurrencia tumoral y una supervivencia más corta de las pacientes. Esa asociación ocurrió en la totalidad de los subgrupos de pacientes, incluidas aquéllas con ganglios negativos o positivos, y premenopáusicas o posmenopáusicas. Además, el análisis multivariante realizado en ese estudio demostró que el valor predictivo de la cat D fue independiente de otros factores pronósticos considerados. Esos resultados, sin duda, pueden tener un gran interés clínico, principalmente de cara al manejo de pacientes con ganglios negativos, en las que existe todavía la necesidad de identificar nuevos factores pronósticos en base a los que seleccionar pacientes que podrían beneficiarse de terapias sistémicas. Sin embargo, a pesar de esos resultados aparentemente convincentes de Foekens et al<sup>26</sup>, existen aún algunos interrogantes sobre la cat D en patología tumoral, como que una proteasa intracelular pueda facilitar la invasión y metástasis, ya que no existe método en la actualidad que permita cuantificar específicamente la cat D extracelular; o la cuestión aún no definitivamente aclarada de que la cat D pueda desempeñar su acción degradativa a un pH óptimo en el medio extracelular. Así pues, esa falta aún de razones biológicas plenamente demostradas sobre la asociación entre la expresión tumoral de la cat D y un comportamiento biológico agresivo del cáncer de mama limitan, en cierto modo, la toma de decisiones terapéuticas simplemente en base a los valores intratumorales de la enzima. Pero si, por el contrario, se demuestra que la cat D es parcial o totalmente responsable del comportamiento agresivo de los tumo-

res, entonces urgiría el desarrollo de terapias encaminadas a inhibir específicamente la actividad de la enzima.

Finalmente, otro aspecto de interés potencial de la cat D es el del posible valor de su cuantificación en las secreciones mamarias. Así, por una parte, se han descrito concentraciones variables de la enzima en el fluido quístico de las pacientes con enfermedad macroquística de la mama<sup>53,54</sup>, siendo esos niveles intraquísticos de la enzima significativamente más elevados en los quistes tipo I (elevada relación intraquística  $K^+/Na^+$ , y epitelio de recubrimiento tipo apocrino) en relación con los quistes tipo II (baja relación  $K^+/Na^+$ , y epitelio plano)<sup>53</sup>. Así pues, considerando que los quistes tipo I han sido asociados por diferentes grupos con un riesgo aumentado de desarrollar carcinoma mamario<sup>55,56,57</sup>, podemos especular que la cat D podría desempeñar una acción mitogénica en ese epitelio mamario de "riesgo". En esa misma línea, cabe señalar también que se han descrito concentraciones significativamente más elevadas de cat D en las secreciones mamarias obtenidas a través del pezón de mujeres con cáncer de mama en relación con las obtenidas de mujeres controles o con patología mamaria benigna<sup>58</sup>. Por tanto, esos resultados apuntan a un posible valor potencial de la determinación de la enzima en las secreciones mamarias como marcador biológico de transformación maligna.

## PEPSINÓGENO C

A diferencia de la proteasa lisosomal cathepsina D, que se expresa en todos los tipos celulares, el pepsinógeno C (pep C) es una enzima proteolítica de expresión muy restringida en los tejidos humanos. Su expresión en tejidos normales se encuentra limitada a la mucosa gástrica, donde está involucrada en el digestión de proteínas en el estómago, glándulas de Brünner del duodeno, próstata y vesículas seminales, algunos conductos pancreáticos secretorios, y en los islotes de Langerhans del páncreas. Además, recientemente también se ha descrito su expresión en las fibras nerviosas y en las células epiteliales de las glándulas sudoríparas<sup>59</sup>. La relación entre pep C y patología mamaria surge tras el hallazgo de cantidades apreciables de la enzima en el fluido de los quistes mamarios<sup>60</sup>. Ese hecho podría aparentemente enmarcarse en la hipótesis que se ha denominado "mama-intestino"<sup>61</sup>, basada principalmente en la presencia de ácidos biliares en el fluido quístico<sup>62,63</sup>, y que postula que esas proteínas de origen digestivo podrían modular el microambiente del tejido mamario. Sin embargo, se ha demostrado que los ácidos biliares se acumulan

en el fluido quístico, a través de un gradiente, procedentes del plasma<sup>61</sup> y, por el contrario, el epitelio de los quistes mamarios presenta la capacidad de sintetizar y secretar cantidades significativas de pep C<sup>60</sup>.

Sin embargo, el interés principal del pep C en patología mamaria surge de la observación de que también un porcentaje significativo (en torno a un 40 %) de carcinomas mamarios muestra la capacidad de producir la enzima<sup>60</sup>. También se ha demostrado que esa expresión tumoral de la enzima está localizada en el citoplasma de las células cancerosas, y que los valores de la enzima son significativamente más elevados en los tumores bien diferenciados que en los pobremente diferenciados, así como también en los tumores con receptores de estrógenos positivos en comparación con aquellos negativos para ese parámetro biológico<sup>65</sup>. De acuerdo con esas observaciones, que sugieren una relación del pep C con lesiones de evolución favorable, en un estudio posterior realizado sobre 243 mujeres con cáncer de mama, se ha descrito que el pep C representa un nuevo factor favorable e independiente para predecir la recurrencia tumoral y la supervivencia total de las pacientes<sup>66</sup>. En este mismo sentido, muy recientemente Scorilas et al también detectaron una relación significativa de las concentraciones citosólicas intratumorales de pep C con un pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama<sup>67</sup>.

Así pues, esos datos, indicando la asociación de la expresión de pep C con lesiones tumorales de evolución favorable están, de algún modo, en contraposición con los estudios anteriormente señalados que implican a otra aspartil-proteasa, como es la cat D, con un pronóstico desfavorable en el cáncer de mama. Ello resulta, sin duda, indicativo del complejo papel que parecen desempeñar estas enzimas proteolíticas en el cáncer de mama. Una consideración que podría explicar el hecho de que el pep C no está asociado a lesiones de pronóstico desfavorable, procede de la observación de que esta enzima es secretado como un precursora de alto peso molecular que requiere un pH ácido para desempeñar su activación proteolítica<sup>60</sup>. Esas condiciones ácidas existen en la luz gástrica o en la vagina, donde es sabido que el pep C ejerce su acción proteolítica para la digestión de proteínas y en la licuefacción del semen, respectivamente. Sin embargo, como ya hemos señalado, es difícil que esas condiciones ácidas se puedan alcanzar en el medio extracelular mamario. Por el contrario, otra posibilidad por la que el pep C puede estar involucrado en la fisiopatología tumoral puede ser a través de su participación en una vía específica de señalización hormonal. De hecho, resultan ya suficientemen-

te llamativos datos recientes que demuestran la expresión tumoral de la enzima también por carcinomas humanos con importante implicación hormonal, como los de origen ovárico, endometrial, prostático o melanomas<sup>59,68-70</sup>. Además, a ello podemos añadir la existencia de un cierto paralelismo del pep C con el antígeno prostático específico (PSA), puesto que también es una enzima regulada por andrógenos<sup>71</sup>, también se ha descrito en el fluido de los quistes mamarios<sup>72</sup>, y está presente en un porcentaje significativo de carcinomas mamarios, donde está asociada a un pronóstico favorable<sup>73</sup>. Más recientemente, Balbín y López-Otín mostraron la gran similitud entre la secuencia de nucleótidos que media la respuesta hormonal del gen del pep C en las células del cáncer de mama, con la correspondiente al gen del PSA<sup>74</sup>. Pero resultan aún más demostrativos los datos de esos mismos autores indicando también que los andrógenos, la progesterona y los glucocorticoides estimulan la expresión del pep C en líneas celulares de cáncer mamario, mientras que los estrógenos, los antiestrógenos y ciertos derivados del ácido retinoico no la modifican. Además, en probable relación con estos resultados experimentales, más recientemente se ha descrito que los carcinomas de mama del varón muestran niveles de pep C más elevados que los del sexo femenino<sup>75</sup>, lo que también puede resultar indicativo de diferencias en la biología molecular de esos tumores en función del sexo de los pacientes y, posiblemente, relacionadas con un diferente ambiente hormonal.

En definitiva, todos esos datos sugieren que el análisis de la expresión tumoral del pep C en el cáncer de mama no sólo nos proviene información pronóstica útil, sino que puede resultar indicativa de tumores que muestran una vía específica de respuesta hormonal. Por tanto, futuras investigaciones sobre la expresión del pep C en el cáncer de mama, pueden abrir la posibilidad de seleccionar pacientes de cara a nuevas alternativas terapéuticas de manipulación hormonal diferentes a la ampliamente utilizada de tipo antiestrogénico.

## GCDP-15

La GCDP-15, también denominada proteína inducible por prolactina (PIP)<sup>76</sup>, gp17<sup>77</sup>, proteína secretada ligadora de actina<sup>78</sup>, o glicoproteína extraparotídea<sup>79</sup>, es una proteína secretada por varios tipos de glándulas exocrinas, tales como vesícula seminal, glándula salival y glándula sudorípara. El interés de esta proteína en patología mamaria surge tras el hallazgo de que, junto a la Zn-alfa<sub>2</sub>-glicoproteína, la apolipoproteína D y la albúmina,

es una de las proteínas mayoritarias del fluido quístico de la enfermedad macroquística de la mama<sup>80-82</sup>. Posteriormente, se demostró que todas esas proteínas integran también el patrón proteico mayoritario de las secreciones mamarias obtenidas a través del pezón en aproximadamente el 90 % de las mujeres no lactantes y en el 50 % de las afectas de cáncer mamario<sup>83,84</sup>. Recientemente, se ha demostrado que la GCDFP-15 presenta características bioquímicas que permiten clasificarla como una nueva aspartil-proteinasa, y que su sustrato específico es la fibronectina<sup>85</sup>. El interés de la GCDFP-15 en el cáncer de mama se basa en diferentes aspectos que han sido investigados de esta proteína, como su valor como marcador de cáncer de origen mamario en metástasis de origen desconocido, como marcador de diferenciación apocrina, como posible marcador de respuesta hormonal, y como posible factor pronóstico.

Estudios realizados mediante técnica inmunohistoquímica revelan que la GCDFP-15 es la proteína más comúnmente expresada por los carcinomas mamarios<sup>86-93</sup>. Así, por ejemplo, Mazoujian et al<sup>87</sup> detectaron un 53 % de estos tumores positivos para la proteína, y Wick et al<sup>93</sup> un 70 %. Asimismo, se ha señalado que el mRNA de esta proteína es también detectado en la mayoría de los carcinomas mamarios y en las metástasis ganglionares axilares<sup>94</sup>. Por tanto, en base a la elevada especificidad que muestran los carcinomas mamarios para expresar la GCDFP-15, se ha propuesto su utilidad como marcador en la detección de lesiones metastásicas de origen mamario, ya que las metástasis de otros tumores que también pueden expresarla, como los carcinomas de glándulas salivales, de glándulas sudoríparas y próstata, son infrecuentemente confundidas con las de origen mamario<sup>95-99</sup>.

Por otra parte, la expresión de la GCDFP-15 ha sido propuesta como un índice muy válido de diferenciación apocrina de las células de cáncer mamario<sup>86,87,100-104</sup>. Este aspecto tiene una especial relevancia si consideramos que la morfología apocrina define un subgrupo de carcinomas mamarios que parecen responder preferentemente a un estímulo hormonal específico. En relación con este aspecto, estudios experimentales demostraron que la producción de GCDFP-15 es inducida por andrógenos en células de cáncer de mama<sup>105,106</sup>, a través de la mediación de los receptores de andrógenos<sup>107,108</sup>, mientras que los antiandrógenos la inhiben<sup>108</sup>. También se ha descrito una co-expresión de la GCDFP-15 con el antígeno prostático específico y con la positividad para los receptores de andrógenos, pero no para los receptores de estrógenos y progesterona,

en los carcinomas mamarios primarios<sup>109</sup>. Así pues, esas observaciones pueden explicar el hallazgo de Bundred et al<sup>104</sup> que detectaron un fallo de respuesta al tratamiento hormonal antiestrogénico en las pacientes con tumores que presentan una secreción elevada de GCDFP-15; mientras que aquellas pacientes que respondieron a esa manipulación hormonal tuvieron una producción tumoral de la proteína significativamente más baja, así como unos altos niveles de receptores estrogénicos. Finalmente, aunque la posible significación pronóstica de la expresión tumoral de la GCDFP-15 no ha sido bien establecida en el cáncer de mama, se ha descrito que las pacientes con tumores con elevados niveles de mRNA de la proteína tienen un pronóstico más favorable<sup>110</sup>.

## CONCLUSIONES

Se han desarrollado investigaciones prometedoras sobre la implicación de las aspartil-proteinases en la fisiopatología tumoral del cáncer de mama. De esas investigaciones se desprende una posible implicación de esas enzimas en diferentes mecanismos hormonales asociados al desarrollo tumoral. La evaluación de su expresión tumoral también puede ser de utilidad clínica, ya que pueden tener valor pronóstico para predecir el curso brusco de la enfermedad. Por último, también existen datos que sugieren que su cuantificación en las secreciones mamarias podrían aportar información sobre los estados precursores del carcinoma mamario.

## RESUMEN

Las aspartil-proteasas son un conjunto de enzimas proteolíticas ampliamente distribuidas por el organismo humano, donde desempeñan funciones fisiológicas muy variadas, además de estar implicadas en diferentes procesos patológicos. La catepsina D (Cat D), el pepsinógeno C (pep C) y la GCDFP-15, son tres aspartil-proteasas que han sido implicadas en la patología mamaria.

La Cat D se localiza normalmente en los lisosomas de todas las células del organismo y se relaciona con el catabolismo proteico celular. Su expresión en el cáncer de mama se ha propuesto como marcador de dependencia estrogénica, como factor de crecimiento y como proteasa importante involucrada en la invasión tumoral. Sin embargo, la información existente sobre su valor pronóstico en esta neoplasia resulta algo conflictiva. Por

otra parte, existen datos que sugieren la presencia de Cat D en las secreciones mamarias podría representar un marcador biológico de transformación maligna.

El Pep C es una enzima normalmente involucrada en la digestión de proteínas en el estómago y de expresión muy restringida en el resto de los tejidos del organismo humano. Sin embargo, se ha observado que el epitelio de los quistes de mama y un porcentaje significativo de carcinomas de mama expresan esta aspartil-proteasa. Además, también se ha demostrado que la expresión de Pep C por los carcinomas de mama representa un nuevo factor pronóstico de evolución favorable, así como un posible marcador de una vía específica de respuesta hormonal en estos tumores.

La GCDFP-15 es un componente proteico mayoritario del fluido quístico de la enfermedad macroquística de la mama y de la secreción mamaria obtenida a través del pezón de la mayoría de las mujeres no lactantes. Esta proteasa es también expresada por un porcentaje elevado de carcinomas mamarios, en los cuales representa un marcador de diferenciación apocrina y un posible marcador biológico de respuesta hormonal androgénica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Samloff IM. Petit ulcer: the many proteinases of aggression. *Gastroenterology* 1989;96:586-95.
- Szecei PB, Dalgaard D, Stakemann G, Wagner G, Foltmann B. The concentration of pepsinogen C in human semen and the physiological activation of zymogen in the vagina. *Biol Reprod* 1989;40:653-9.
- Takaoka M, Hukumori Y, Shigami K, Ikegawa R, Matsumura Y, Morimoto S. Proteolytic processing of porcine big endothelin-1 catalyzed by cathepsin D light. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:1218-23.
- Samloff IM, Taggart RT. Pepsinogens, pepsins, and petit ulcer. *Clin Invest Med* 1987;10:215-21.
- Varis K, Samloff IM, Ihamäki T, Siurala M. An appraisal of tests for severe atrophic gastritis in relatives of patients with pernicious anemia. *Dig Dis Sci* 1979;23:187-91.
- Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J, Geiler T, et al. Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by in situ hybridisation. *Arthritis Rheum* 1995;38:976-84.
- Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S et al. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* 1995;14:671-80.
- Barret AJ. Cathepsin D: purification of isoenzymes from human chicken liver. *Biochem J* 1970;117:601-7.
- Van Noort JM, Van der Drift AC. The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of enzyme in the generation of T-cell epitopes. *J. Biol Chem* 1989;264:14159-64.
- Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K et al. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 1995;14:3599-608.
- Krieger TJ, Hook VYH. Purification and characterization of a cathepsin D protease from bovine chromaffin granules. *Biochemistry* 1992;31:4223-31.
- Diment S, Martín KJ, Stahl PD. Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins. *J. Biol Chem* 1989;264:13403-6.
- Westley BR, May FE. Oestrogen regulates cathepsin D mRNA levels in oestrogen responsive human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 1987;15:3773-86.
- Westley BR, May FEB. Cathepsin D and breast cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A:15-24.
- Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavailles V, Salazar G, Rochefort H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* 1989;49:3904-9.
- Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G. Autocrine growth stimulation of the MCF-7 breast cancer cells by oestrogen regulated 52 Kd proteins. *Endocrinology* 1986;118:1537-45.
- Stewart AJ, Piggott NH, May FEB, Westley BR. Mitogenic activity of procathepsin D purified for the conditioned medium of the breast cancer cells by affinity chromatography on pepstatinyl agarose. *Int J Cancer* 1994;57:715-8.
- García M, Dereocq D, Pujol P, Rochefort H. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* 1990;5:1809-14.
- Liaudet E, García M, Rochefort H. Cathepsin D maturation and its stimulatory effect on metastasis are prevented by addition of KDEL retention signal. *Oncogene* 1994;9:1145-54.
- Spyratos F, Mauldelonde T, Brouillet JP, Brunet M, et al. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989;8672:1115-8.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990;332:297-302.
- Kute TE, Shao ZM, Sugg NK, Long RT, Russell GB, Case LD. Cathepsin D as a prognostic indicator for node-negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assays. *Cancer Res* 1992;52:5198-203.
- Westley BR, May FEB. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer. *Br J Cancer* 1999;79:189-90.
- Ferrandina G, Scambia G, Benedetti Panici P, Mancuso, Messori A. Relationship between cathepsin D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1997;76:661-6.
- Ardavanis A, Scorilas A, Amanatidou A, Gerakini F, et al. Cathepsin D concentration in tumour cytosols improves the accuracy of prognosis evaluation of primary breast cancer. *Anticancer Res* 1997;17:1405-10.
- Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin D in primary bre-

- ast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999;79:300-7.
27. Scorilas A, Trangas T, Yotis J, Pateras C, Tallieri M. Determination of c-myc amplification and overexpression in breast cancer patients: evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, cathepsin-D and clinicopathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;81:1385-91.
28. Billgren AM, Rutqvist LE, Johansson H, Hagerstrom T, Skoog L. The role of cathepsin D and PAI-1 in primary invasive breast cancer as prognosticators and predictors of treatment benefit with adjuvant tamoxifen. *Eur J Cancer* 2000;36(11):1374-80.
29. Harbeck N, Alt U, Berger U, Kates R, Kruger A, Thomsen C, Janicke F, Graeff H, Schmitt M. Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15:79-83.
30. Hurlimann J, Gebhard S, Gómez F. Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology* 1993;23:239-48.
31. Kandalaf PL, Chang KL, Ahn CW, Traweek ST, Metha P, Battifora H. Prognostic significance of immunohistochemical analysis of cathepsin D in low-stage breast cancer. *Cancer* 1993;71:2756-63.
32. Ravdin PM, Tandon AK, Allres DC, Clark GM, et al. Cathepsin D by Western blotting and immunohistochemistry: failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:467-4.
33. Henry JA, McCarthy AL, Angus B, Westley BR et al. Prognostic significance of the oestrogen-regulated protein, cathepsin D in breast cancer: an immunohistochemical study. *Cancer* 1990;65:265-71.
34. Domagala W, Stiker G, Szadowska A, Dukowitz A, Weber K, Osborn M. Cathepsin D in invasive ductal NOS breast carcinoma as defined by immunohistochemistry: no correlation with survival at 5 years. *Am J Pathol* 1992;141:1003-12.
35. Tetu B, Brisson J, Cote C, Brisson S, Potvin D, Roberge N. Prognostic significance of cathepsin D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1993;429-35.
36. Joensuu H, Toikkanen S, Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer. *Br J Cancer* 1995;71:155-9.
37. O'Donoghue AEMA, Poller M, Bell JA, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. Cathepsin D in primary breast carcinoma: Adverse prognosis is associated with expression in cathepsin D in stromal cells. *Breast Cancer Res Treat* 1995;33:137-45.
38. Nadji M, Fresno M, Nassiri M, Conner G, Herrero A, Morales AR. Cathepsin D in host stromal cells, but not in tumour cells, is associated with aggressive in node-negative breast cancer. *Human Pathol* 1996;27:890-5.
39. Razumovic JJ, Stojkovic RR, Petroveck M, Gamulin S. Correlation of two methods for determination of cathepsin D in breast carcinoma (immunohistochemistry and ELISA in cytosol). *Breast Cancer Res Treat* 1997;43:117-22.
40. Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Shu Wang C, Bernard P, Blanchette C. Cathepsin D expression by cancer and stromal cells in breast cancer: an immunohistochemical study of 1348 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55:137-47.
41. Löscher A, Tempfer C, Kohlberger P, Joura EA, Denk M, Zajic B, Breitenecker G, Kainz C. Prognostic value of cathepsin D expression and association with histomorphological subtypes in breast cancer. *Br J Cancer* 1998;72:205-9.
42. Meijer-van Gelder ME, Look MP, Bolt-de Vries J, Peters HA, Klijn JGM, Foekens JA. Breast-Conserving Therapy: Proteases as Risk Factors in Relation to Survival After Local Relapse. *J Clin Oncol* 1999;17:1449-57.
43. Lah TT, Kalman E, Najjar D, Gorodetsky E, Brennan P, Somers R, Daskal I. Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis. *Human Pathol* 2000;31:149-60.
44. Aziz S, Pervez S, Khan S, Kayani N, Rahbar M. Immunohistochemical cathepsin D expression in breast cancer: correlation with established pathological parameters and survival. *Pathol Res Pract* 2001;197:551-7.
45. Emmert-Buck MR. Cathepsin D and prognostic in breast cancer: one piece of a larger puzzle? *Human Pathol* 1996;27:869-71.
46. Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* 1992;266:54-9.
47. Briozzo P, Morisset M, Capony F, Rougeot C, Rochefort H. In vitro degradation of extracellular matrix with M<sub>r</sub> 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res* 1998;48:3688-92.
48. García M, Planet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet J-P, Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* 1996;14:642-50.
49. Spivak JL. Phagocytic tumour cells. *Scand J Hematol* 1973;11:253-6.
50. Van Peteghem MC, Mareeel MM, De Bruyne GK. Phagocytic capacity of invasive malignant cells in the three-dimensional culture. *Virchows Arch B Cell Path* 1980;55: 167-93.
51. Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 1992;31:125-30.
52. Briozzo P, Badet J, Caponu F, Pieri I, Montcourrier P, Barritault D et al. MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalise it following its release from extracellular matrix. A permissive role of cathepsin D. *Exp Cell Res* 1991;194:252-9.
53. Sánchez LM, Vizoso F, Allende MT, Ruibal A, López-Otín C. Quantification and molecular analysis of cathepsin D in breast cyst fluids. *Eur J Cancer* 1992;28A:828-32.
54. Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandia G, Battaglia F, Rossi S, Bellatone R et al. Cathepsin D epidermal growth factor in human breast cyst fluid. *Br J Cancer* 1991;64: 965-7.
55. Naldoni C, Constantini M, Dogliotti L, Bruzzi P, Bucchi L, Buzzi G et al. Association of cyst type with risk factors for breast cancer and relapse rate in women with gross cystic disease. *Cancer Res* 1992;52:1791-5.
56. Izoso F. Comportamiento evolutivo de los tipos de quiste en mujeres afectas de enfermedad macroquística de la mama. *Rev Senología y Patol Mam* 1993;6:69-76.



57. Dixon JM, Mc Donald C, Elton RA, Miller WR. Risk of breast cancer in women with palpable breast cyst: a prospective study. *Lancet* 1999;353:1742-5.
58. Sánchez LM, Ferrando AA, Díez-Itza I, Vizoso F, Ruibal A, López-Otín C. Cathepsin D in breast secretions from women with breast cancer. *Br J Cancer* 1993;67:1076-81.
59. Merino AM, Vázquez J, Rodríguez JC, Fernández R, Quintela I, González LO et al. Pepsinogen C expression in tumours from extragastric origin. *Int J Biol. Markers* 2000;15:165-70.
60. Sánchez LM, Freire JP, Merino AM, Vizoso F, Foltmann B, López-Otín C. Isolation and characterization of a pepsin C zymogen produced by human breast tissues. *J Biol Chem* 1992;267:24725-31.
61. Javitt NB, Budai K, Miller DG, Cahan AC, Rajau U, Levitz M. Breast-gut connection: origin of chenodeoxycholic acid in breast cyst fluid. *Lancet* 1994;343:633-5.
62. Baker PR, Reid AD, Siow Y, Baty JD, Willis RG. Identification of bile acids in breast cyst fluid. *Biochem Soc Trans* 1988;16:741-2.
63. Raju U, Levitz M, Javitt NB. Bile acids in human breast cyst fluid: identification of lithocholic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1030-4.
64. Borchert GH, Melegos DN, Yu H, Giai M, Roagna R, Ponzone R, Sgro L, Diamandis EP. Quantification of pepsinogen C prostaglandin D synthase in breast cyst fluid and their utility for cyst type classification. *Clin Biochem* 1999;32:39-44.
65. Díez-Itza, Merino AM, Tolivia, Vizoso F, Sánchez LM, López-Otín C. Expression of pepsinogen C in human tumours and correlation with clinicopathologic parameters. *Br J Cancer* 1993;68:637-40.
66. Vizoso F, Sánchez LM, Díaz-Itza I, Merino AM, López-Otín. Pepsinogen C is a new prognostic marker in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:54-61.
67. Scorilas A, Diamandis EP, Levesque MA, Papanastasiou-Diamandi A, Khosravi MJ, Giai M, et al. Immunoenzymatically determined Pepsinogen C concentration in breast tumour cytosols: an independent favourable prognostic factor in node-positive patients. *Clin Cancer Res* 1999;7:1778-85.
68. Tenti P, Aguzzi A, Riva C, Usellini L, Zappatore R, Bara J et al. Ovarian mucinous tumours frequently express markers of gastric, intestinal, and pancreatobiliary epithelial cells. *Cancer* 1992;69:2131-42.
69. Vázquez J. Expresión y significación clínica de la apolipoproteína D, el Pepsinógeno C y la collagenasa-3 en los tumores de origen ginecológico. Tesis Doctoral. Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo, 1998.
70. Konishi N, Nakaoka S, Matsumoto K, Nakamura M, Kuwashima S, Hiasa Y et al. Expression of pepsinogen II with androgen and oestrogen receptors in human prostate carcinoma. *Pathol Int* 1999;49:203-7.
71. Henttu P, Liao S, Vihko P. Androgens up-regulate the prostates antigen messenger ribonucleic acid (mRNA), but down-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. *Endocrinology* 1992;130:766-72.
72. Diamandis E, Yu H, López-Otín C. Prostate specific antigen- a new constituent of breast cyst fluid. *Breast Cancer Res Treat* 1996;38:259-64.
73. Yu H, Giai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJ, Levesque Ma et al. Prostate-specific antigen is a new favourable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:2104-10.
74. Balbín M, López-Otín C. Hormonal regulation of the human pepsinogen C gene in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996;271:15175-81.
75. Serra C, Vizoso F, Rodríguez JC, Merino AM, González LO, Baltasar A et al. Expression of pepsinogen C in gynecomasias and male breast carcinomas. *World J Surg* 1999;23:439-45.
76. Murphy LC, Tsuyuki D, Myal Y, Shiu RP. Isolation and sequencing of a cDNA clone for a prolactin-inducible protein (PIP). Regulation of PIP gene expression in the human breast cancer cell line, t-47D. *J Biol Chem* 1987;262:15236-41.
77. Autiero M, Abrescia P, Guardiola J. Interaction of seminal plasma proteins with cell surface antigens: presence of a CD4-binding glycoprotein in human seminal plasma. *Exp Cell Res* 1991;197:268-71.
78. Akiyama K, Kimura H. Isolation of a new actin-binding protein from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1990;1040:206-10.
79. Schenkels LC, Schaller J, Walgreen-Weterings E, Schadee-Eestermans IL, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Identity of human extra parotid glycoprotein (EP-GP) with secretory actin binding protein (SABP) and its biological properties. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994;375:609-15.
80. Haagensen DE Jr, Mazoujian G, Dilley WG, Pedersen CE, Kister SJ, Wells SA Jr. Breast gross cystic disease fluid analysis 1. Analysis and radioimmunoassay for a major component protein. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:239-47.
81. Balbín M, Freije JMP, Fueyo A, Sánchez LM, López-Otín C. Apolipoprotein D is major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem J* 1990;271:803-7.
82. Sánchez LM, Díez-Itza I, Vizoso F, López-Otín C. Cholesterol and apolipoprotein D in gross cystic disease of the breast. *Clin Chem* 1992;38:695-8.
83. Sánchez LM, Vizoso F, Díez-Itza I, López-Otín C. Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. *Cancer Res* 1992;52:95-100.
84. Vizoso F, Sanchez LM, Díez-Itza I, Lamelas ML, López-Otín C. Factors affecting protein composition of breast secretions from nonlactating women. *Breast Cancer Res Treat* 1992;23:251-8.
85. Caputo E, Manco G, Mandrich L, Guardiola J. A novel aspartyl protease from apocrine epithelia and breast tumors. *J Biol Chem* 2000;275:7935-41.
86. Mazoujian G, Parish TM, Haagensen DE Jr. Immunoperoxidase localization of GCDP-15 with mouse monoclonal antibodies versus rabbit antiserum. *J Histochem Cytochem* 1988;36:377-82.
87. Mazoujian G, Bodian C, Haagensen DE Jr, Haagensen DE. Expression of GCDP-15 in breast carcinomas: relationship to pathologic and clinical factors. *Cancer* 1989;63:2156-61.
88. Mazoujian G, Pinkus GS, Davis S, Haagensen DE Jr. Immunohistochemistry of a breast gross cystic disease fluid

- protein (GCDFP-15): a marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features. *Am J Pathol* 1983;110:105-12.
89. Papotti M, Gugliotta P, Eusevi V, Bussolati G. Immunohistochemical analysis of benign and malignant papillary lesions of the breast. *Am J Surg Pathol* 1983;7:451-61.
  90. Eusevi V, Betts C, Haagensen DE Jr, Gugliotta P, Bussolati G, Azzopardi JG. Apocrine differentiation in lobular carcinoma of the breast. *Human Pathol* 1984;15:134-40.
  91. LeDoussal V, Zangerle PF, Collete J, et al. Immunohistochemistry of a component protein of the breast cystic disease fluid of mol wt 15.000. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21:715-25.
  92. Eusevi V, Millis RR, Cattani MG, Bussolati G, Azzopardi JG. Apocrine carcinoma of the breast. A morphologic and immunocytochemical study. *Am J Pathol* 1986;123:532-41.
  93. Wick MR, Lillemoc TJ, Copland GT, Swanson PE, Manivel C, Kiang DT. Gross cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer: immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with alpha-lactalbumin. *Human Pathol* 1989;20:281-7.
  94. Clark JW, Snell L, Shiu RP, Orr FW, Maitre N, Vary CP, Cole DJ, Watson PH. The potential role for prolactin-inducible protein (PIP) as a marker of human breast cancer micrometastasis. *Br J Cancer* 1999;81:1002-8.
  95. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc* 1994;69:57-8.
  96. Ormsby AH, Snow JL, Su WP, Goellner JR. Diagnostic immunohistochemistry of cutaneous metastatic breast carcinoma: a statistical analysis of the utility of gross cystic disease fluid protein-15 and oestrogen receptor protein. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:711-6.
  97. Fiel Mi, Cernaianu G, Burstein DE, Batheja N. Value of GCDFP-15 (BRST-2) as a specific immunohistochemical marker for breast carcinoma in cytologic specimens. *Acta Cytol* 1996;40:637-41.
  98. Satoh F, Umemura S, Osamura RY. Immunohistochemical analysis of GCDFP-15 and GCDFP-24 in mammary and non-mammary tissue. *Breast Cancer* 2000;7(1):49-55.
  99. Nonami Y, Hisa S, Yamamoto A, Sasaguri S, Kiyoku H, Kurumaya H. Immunohistochemical study with antibody to glycoprotein GCDFP-15 for metastasis lung cancer from breast cancer. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2001;42:561-4.
  100. Mazoujian G, Haagensen DE Jr. The immunopathology of gross cystic disease fluid proteins. *NY Acad Sci* 1990;586:188-97.
  101. Mazoujian G, Pinkus GS, Davis S, Haagensen DE Jr. Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15): a marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features. *Am J Pathol* 1983;110:105-12.
  102. Mazoujian G, Warhol Mj, Haagensen DE Jr. The structural localization of gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) in breast epithelium. *Am J Pathol* 1984;116:301-5.
  103. Bundred NJ, Miller WR, Walker RA. An immunohistochemical study of the tissue distribution of the breast cyst fluid protein, Zn-alpha<sub>2</sub>glycoprotein. *Histopathology* 1987;11:603-10.
  104. Bundred NJ, Stewart HJ, Shaw DA, Forrest APM, Miller WR. Relation between apocrine differentiation and receptor status, prognosis and hormonal response in breast cancer. *Eur J Cancer* 1990;26:1145-7.
  105. Chalbos D, Haagensen D, Parish T, Rochefort H. Identification and androgen regulation of two proteins released by T47D human breast cancer cells. *Cancer Res* 1987;47:2787-92.
  106. Myal Y, Iwasio B, Cosby H, Yarmill A, Blanchard A, Tsuyuki D, Fresnoza A, Duckworth ML, Shiu RP. Analysis of tissue- and hormone-specific regulation of the human prolactin-inducible protein/gross cystic disease fluid protein-15 gene in transgenic mice. *J Mol Endocrinol* 1998;21:217-23.
  107. Miller WR, Shivas AA, Franchimont P, Haagensen DE Jr. Breast gross cystic disease protein 15 in human breast cancer in culture. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:223-8.
  108. Loos S, Schulz KD, Hackenberg R. Regulation of GCDFP-15 expression in human mammary cancer cells. *Int J Mol Med* 1999;4:135-40.
  109. Hall RE, Clements JA, Birrell SN, Tilley WD. Prostate-specific antigen and gross cystic disease fluid protein-15 are co-expressed in androgen receptor-positive breast tumours. *Br J Cancer* 1998;78:360-5.
  110. Hahnel R, Hahnel E. Expression of the PIP/GCDFP-15 gene and survival in breast cancer. *Virchows Arch* 1996;429:365-9.