

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

**ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC DE LES CASPASES EN EL  
CÀNCER DE MAMA. RELACIÓ AMB ALTRES FACTORS  
PRONÒSTICS**

TESI DOCTORAL

Presentada per:

SUSANA BLÁZQUEZ VILÀS

Dirigida per:

Dr Joan Josep Sirvent Calvera

Reus, Novembre 2004



# **AGRAÏMENTS**



El projecte d'aquesta tesi s'ha realitzat gràcies a l'ajuda de grans professionals de la medicina als quals vull agrair la seva col·laboració:

Al Dr Joan Josep Sirvent per què, com a director d'aquesta tesi, cap de servei, professor i un gran amic ha estat un gran puntal en aquest treball. Sense la seva insistència, ànims, ajuda i comprensió aquesta tesi no hauria estat pas possible.

Al Dr Amadeu Pelegrí, per la seva ajuda a l'hora de revisar les històries clíniques i les dades oncològiques dels casos inclosos en aquesta sèrie.

A la Dra Montserrat Olona, per la seva ajuda en l'elaboració i processament de les dades des del punt de vista estadístic.

A la Sra Carmen Aguilar per la seva cooperació desinteressada i els constants ànims durant el temps d'elaboració d'aquesta tesi.

Al servei d'Anatomia Patològica de l'hospital Joan XXIII que de diferents maneres han col·laborat en la realització d'aquesta tesi.



## **ABREVIATURES**





## LLISTAT D'ABREVIACIONS

<b>ADN</b>	<b>Àcid Desoxiribonucleic</b>
<b>ARN</b>	<b>Àcid Ribonucleic</b>
<b>ARG</b>	<b>Arginina</b>
<b>ASP</b>	<b>Àcid aspàrtic</b>
<b>CASPASE</b>	<b><i>Cysteine ASPartate cleaving proteASE</i></b>
<b>CDI</b>	<b>Carcinoma Ductal Infiltrant</b>
<b>cga</b>	<b>Camps de gran augment</b>
<b>FAS-L</b>	<b>Fas-Ligand</b>
<b>GDH-SBR</b>	<b>Grau Diferenciació Histològica (Scarff-Bloom-Richardson)</b>
<b>GLY</b>	<b>Glicina</b>
<b>H&amp;E</b>	<b>Tinció Hematoxilina - Eosina</b>
<b>IA</b>	<b>Índex Apoptòtic</b>
<b>IP</b>	<b>Índex Proliferació cel·lular</b>
<b>ISEL</b>	<b><i>In Situ End-Labeling</i></b>
<b>kDa</b>	<b>KiloDalton</b>
<b>NOS</b>	<b><i>Not Otherwise Specified</i></b>
<b>OMS</b> (WHO)	<b>Organització Mundial de la Salut (<i>World Health Organization</i>)</b>
<b>PBS</b>	<b>Fosfat-buffer-salí</b>
<b>TGF</b>	<b><i>Tumoral Growth Factor</i></b>
<b>TNF</b>	<b><i>Tumoral Necrosis Factor</i></b>
<b>TUNEL</b>	<b><i>Terminal Deoxynucleotide Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End-Labeling</i></b>
<b>tTG</b>	<b>Transglutaminasa tissular</b>



# ÍNDEX



**ÍNDEX GENERAL**

<b>1</b>	<b><u>INTRODUCCIÓ</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>CÀNCER DE MAMA</b>	<b>3</b>
1.1.1	EPIDEMIOLOGIA	3
1.1.2	FACTORS DE RISC	4
1.1.3	CLÍNICA I RADIOLOGIA	8
1.1.4	CLASSIFICACIÓ HISTOLÒGICA DE LES LESIONS EPITELIALS MALIGNES DE MAMA	10
1.1.5	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANT	11
1.1.6	FACTORS PRONÒSTICS	18
1.1.6.1	<i>FACTORS CLÍNICS:</i>	18
1.1.6.2	<i>FACTORS MORFOLÒGICS:</i>	18
1.1.6.3	<i>FACTORS MOLECULARS I GENÈTICS:</i>	21
<b>1.2</b>	<b>APOPTOSI</b>	<b>25</b>
1.2.1	PROCÉS APOPTÒTIC	27
1.2.2	PAPER DE LES CASPASES EN L'APOPTOSI	33
1.2.3	TIPUS DE CASPASES	35
1.2.3.1	<i>CASPASA 1 (ICE-1)</i>	35
1.2.3.2	<i>CASPASA 2 (ICH-1/Nedd2)</i>	36
1.2.3.3	<i>CASPASA 3 (CPP32)</i>	36
1.2.3.4	<i>CASPASA 4 (ICH-2/TX/ICE<sub>relII</sub>)</i>	37
1.2.3.5	<i>CASPASA 5 (ICE<sub>relIII</sub>/TY)</i>	37
1.2.3.6	<i>CASPASA 6 (Mch2)</i>	37
1.2.3.7	<i>CASPASA 7 (Mch3/ICE-LAP3/CMH-1)</i>	38
1.2.3.8	<i>CASPASA 8 (MACH/FLICE/Mch5)</i>	38
1.2.3.9	<i>CASPASA 9 (ICE-LAP6/Mch6)</i>	39

---

1.2.3.10	CASPASA 10 ( <i>Mch4</i> )	40
1.2.4	MECANISMES D'ACTIVACIÓ DE LES CASPASES (Cascada de Proteases)	41
1.2.5	DETECCIÓ I MESURA DE LES CÈL·LULES APOPTÒTIQUES	45
1.2.6	DETECCIÓ DE CANVIS MORFOLÒGICS	45
1.2.6.1	<i>Índex Apoptòtic</i>	45
1.2.6.2	<i>Microscopia electrònica</i>	45
1.2.6.3	<i>Citometria de flux</i>	45
1.2.7	DETECCIÓ DE LA FRAGMENTACIÓ DE L'ADN	46
1.2.7.1	<i>Mesurar l'activitat de l'endonucleasa</i>	46
1.2.7.2	<i>Mesurar la quantitat d'ADN per citometria de flux</i>	46
1.2.7.3	<i>Mètode TUNEL i mètode ISEL</i>	46
1.2.8	DETECCIÓ DE CANVIS CITOPLASMÀTICS	46
1.2.8.1	<i>Activitat enzimàtica intracel·lular</i>	46
1.2.8.2	<i>Canvis en el calci citoplasmàtic</i>	47
1.2.8.3	<i>Alteració de la funció mitocondrial</i>	47
1.2.9	DETECCIÓ DE CANVIS EN LA MEMBRANA CEL·LULAR	47
1.2.9.1	<i>Capacitat d'eliminar colorants</i>	47
1.2.9.2	<i>Distribució de fosfolípids</i>	48
<b>1.3</b>	<b>APOPTOSI I CÀNCER DE MAMA</b>	<b>49</b>
1.3.1	RELACIÓ ENTRE ELS GENS REGULADORS DE L'APOPTOSI I EL CÀNCER DE MAMA	49
1.3.2	RELACIÓ ENTRE L'ÍNDIX APOPTÒTIC I D'ALTRES PARÀMETRES	51
1.3.2.1	<i>Mida tumoral</i>	51
1.3.2.2	<i>Mitosis i Índex de proliferació cel·lular (Ki-67)</i>	51
1.3.2.3	<i>Grau histològic</i>	52
1.3.2.4	<i>Ploidia de l'ADN i fracció de la fase S</i>	52
1.3.2.5	<i>Receptors d'estrògens i progesterona</i>	52

1.3.2.6	<i>p53</i>	53
1.3.2.7	<i>Bcl-2</i>	54
1.3.2.8	<i>Pronòstic</i>	55
1.3.3	INDUIR APOPTOSI MITJANÇANT EL TRACTAMENT	55
<b><u>2</u></b>	<b><u>HIPÒTESI I OBJECTIUS</u></b>	<b>57</b>
2.1	HIPÒTESI DE TREBALL	59
2.2	OBJECTIUS	61
2.2.1	OBJECTIU PRINCIPAL	61
2.2.2	OBJECTIUS ESPECÍFICS	61
<b><u>3</u></b>	<b><u>MATERIAL I MÈTODES</u></b>	<b>63</b>
3.1	TIPUS D'ESTUDI	65
3.2	SEL·LECCIÓ DE LA MOSTRA	65
3.3	ESTUDI CLÍNIC	66
3.4	CARACTERÍSTIQUES HISTOPATOLÒGIQUES	66
3.4.1	TIPUS HISTOLÒGIC	67
3.4.2	GRAU HISTOLÒGIC	67
3.4.3	NECROSI TUMORAL	67
3.4.4	METÀSTASI A GANGLIS LIMFÀTICS	67
3.5	DETERMINACIONS IMMUNOHISTOQUÍMIQUES	68
3.5.1	ÍNDEX APOPTÒTIC (IA)	69
3.5.1.1	<i>AVALUACIÓ DE L'ÍNDEX APOPTÒTIC</i>	69
3.5.2	ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC PER CASPASES	70
3.5.2.1	<i>AVALUACIÓ DE LES CASPASES</i>	72

---

3.5.3	ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC PER A L'ÍNDEX DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR KI-67	72
3.5.3.1	AVALUACIÓ DEL Ki-67	73
<b>3.6</b>	<b>ANÀLISI ESTADÍSTICA</b>	<b>73</b>
3.6.1	ANÀLISI DESCRIPTIVA	73
3.6.2	COEFICIENT DE SPEARMAN (r de Spearman)	73
3.6.3	ANÀLISI DE SUPERVIVÈNCIA	74
3.6.4	ANÀLISI DEL FACTOR PREDICTIU	74
<b>4</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>ANÀLISI DESCRIPTIU</b>	<b>77</b>
4.1.1	EDAT	79
4.1.2	MIDA TUMORAL	80
4.1.3	GRAU HISTOLÒGIC	81
4.1.3.1	FORMACIÓ DE TÚBULS	82
4.1.3.2	ATÍPIA CEL·LUAR	82
4.1.3.3	MITOSIS	83
4.1.4	GANGLIS LIMFÀTICS	83
4.1.5	PRESÈNCIA I/O ABSCÈNCIA DE NECROSI TUMORAL	85
4.1.6	PERMEACIÓ LIMFÀTICA	86
4.1.7	ÍNDEX APOPTÒTIC	87
4.1.8	ÍNDEX DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR (KI-67)	91
4.1.9	CASPASA 3	95
4.1.10	CASPASA 6	99
4.1.11	SEGUIMENT DE LES PACIENTS	100



---

<b>4.2</b>	<b>ANÀLISI COMPARATIU</b>	<b>103</b>
4.2.1	ANÀLISI UNIVARIAT DEL RISC PROPORCIONAL DE COX PER A MORTALITAT I RECIDIVA	104
4.2.2	ANÀLISI MULTIVARIAT DEL RISC PROPORCIONAL DE COX PER A MORTALITAT I RECIDIVA	106
4.2.3	CORVES DE SUPERVIVÈNCIA I RECIDIVA	108
<b><u>5</u></b>	<b><u>DISCUSSIÓ</u></b>	<b><u>111</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>CONCLUSIONS</u></b>	<b><u>129</u></b>
6.1	CONCLUSIONS DESGLOSSEDES	131
6.2	CONCLUSIÓ GLOBAL	133
<b><u>7</u></b>	<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b><u>135</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>ANNEXES</u></b>	<b><u>157</u></b>



**ÍNDIX DE TAULES**

<b>Taula 1.</b> Classificació histològica de la OMS de 2003 <sup>46</sup> dels tumors epitelials malignes de mama	10
<b>Taula 2.</b> Mètode de gradació histològica dels carcinomes de mama	17
<b>Taula 3.</b> Gens promotors i inhibidors de l'apoptosi	28
<b>Taula 4.</b> Anàlisi descriptiva de les dades clínic-patològiques de les 210 pacients	78
<b>Taula 5.</b> Estadística descriptiva de la presència de túbuls	82
<b>Taula 6.</b> Estadística descriptiva de l'atípia cel·lular	82
<b>Taula 7.</b> Estadística descriptiva del valor mitòsic	83
<b>Taula 8.</b> Estadística descriptiva de les metàstasis dels ganglis limfàtics	83
<b>Taula 9.</b> Estadística descriptiva de la presència de necrosi	85
<b>Taula 10.</b> Estadística descriptiva de la presència d'invasió limfàtica	86
<b>Taula 11.</b> Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics mitjançant la tècnica de TUNEL de l'Índex Apoptòtic	87
<b>Taula 12.</b> Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics per a l'índex de proliferació cel·lular.	91
<b>Taula 13.</b> Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics per la caspasa 3.	95
<b>Taula 14.</b> Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics per a la caspasa 6	99
<b>Taula 15.</b> Correlació entre les diferents variables (r de Spearman)	103
<b>Taula 16.</b> Anàlisi univariat dels riscos proporcionals de cox per a MORTALITAT.	104
<b>Taula 17.</b> Anàlisi univariat dels riscos proporcionals de cox per a RECIDIVA.	105
<b>Taula 18.</b> Anàlisi multivariat del risc proporcional de cox per a MORTALITAT	106
<b>Taula 19.</b> Anàlisi multivariat del risc proporcional de cox per a RECIDIVA	107



**ÍNDIX DE FIGURES**

<b>Figura 1.</b> Carcinoma ductal infiltrant. Formació de gran quantitat de túbuls, puntuació:1 (H&E x100)	13
<b>Figura 2.</b> Carcinoma ductal infiltrant, puntuació del pleomorfisme cel·lular: 2 (H&E x400)	13
<b>Figura 3.</b> Carcinoma ductal infiltrant; mitosis:3 (H&E x400)	15
<b>Figura 4.</b> Diferències entre la mort cel·lular per necrosi i per apoptosi.	25
<b>Figura 5a.</b> Mecanisme apoptòtic. Model de senyalització via TNF.	31
<b>Figura 5b.</b> Mecanisme apoptòtic. Model de senyalització via Fas	31
<b>Figura 6.</b> Esquema dels aconteixements apoptòtics.	34
<b>Figura 7.</b> Esquema d'activació de la cascada de les caspases	41
<b>Figura 8.</b> Tissue arrays	68
<b>Figura 9.</b> Histograma de la distribució d'edats dels casos de l'estudi	79
<b>Figura 10.</b> Histograma representatiu de la mida tumoral	80
<b>Figura 11.</b> Distribució percentual segons el grau histològic.	81
<b>Figura 12.</b> Distribució percentual de les metàstasis ganglionars.	84
<b>Figura 13.</b> Distribució percentual de la presència i/o absència de necrosi	85
<b>Figura 14.</b> Distribució percentual de la presència d'invasió limfàtica	86
<b>Figura 15.</b> Distribució percentual de l'índex apoptòtic	87
<b>Figura 16.</b> Cèl·lules i/o cossos apoptòtics. Cas amb alt índex apoptòtic (TUNEL x400)	89
<b>Figura 17.</b> Cèl·lules i/o cossos apoptòtics. Cas amb baix índex apoptòtic (TUNEL x400)	89
<b>Figura 18.</b> Distribució percentual del Ki 67	92
<b>Figura 19.</b> Determinació immunohistoquímica per Ki-67. Cas amb un alt índex de proliferació cel·lular (Ki-67 x400)	93

## **ÍNDEX**

---

<b>Figura 20.</b> Determinació immunohistoquímica per Ki-67. Cas amb un baix índex de proliferació cel·lular (Ki-67 x250)	93
<b>Figura 21.</b> Distribució percentual de la caspasa 3	95
<b>Figura 22.</b> Caspasa 3. Cas positiu (x250)	97
<b>Figura 23.</b> Caspasa 3. Cas negatiu (x250)	97
<b>Figura 24.</b> Distribució percentual de la caspasa 6	99
<b>Figura 25.</b> Caspasa 6. Cas positiu (x400)	101
<b>Figura 26.</b> Caspasa 6. Cas negatiu (x250)	101
<b>Figura 27.</b> Corba de supervivència de Kaplan – Meier	108
<b>Figura 28.</b> Corba de Kaplan – Meier per a temps lliure de malaltia	109

# **1 INTRODUCCIÓ**





## 1.1 CÀNCER DE MAMA

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

El càncer de mama és, actualment, el tumor més freqüent en dones. La incidència mundial del càncer de mama és de 1000000 casos/any en el món. La incidència és superior en el nord d'Amèrica i Europa on es donen 91.4 nous casos x 100000 dones/anys, intermitjana en el sud d'Europa i països llatinoamericans i més baixa en Àsia i Àfrica.

En percentatges, correspon al 22% dels càncers que es produeixen en dones i en les àrees on la incidència és major, el 6% de les dones desenvoluparan un carcinoma de mama invasiu abans dels 75 anys. En les àrees menys desenvolupades on la incidència és més baixa, el risc de desenvolupar un càncer de mama abans dels 75 anys és una tercera part del que es té en les àrees industrialitzades<sup>1</sup>.

En el nostre país, el 28% de totes les neoplàsies malignes en les dones són de mama i això representa 66 casos nous per cada 100.000 dones/any<sup>2</sup>. Cada any es diagnostiquen a Espanya 14000 casos nous<sup>3</sup> i es calcula que aproximadament, 1 de cada 9<sup>4</sup> dones serà diagnosticada de càncer en el decurs de la seva vida.

En les comarques de Tarragona, es diagnostiquen 280 casos nous amb unes taxes d'increment anual del 2,2%. La supervivència als 5 anys del càncer de mama ha experimentat un increment estadísticament significatiu, si fem referència a la mortalitat, a Catalunya moren 15 dones diàriament per càncer de les quals el 19,0% ho són per càncer de mama. El càncer de mama ha estat la principal causa de mort per càncer en dones en les últimes dècades amb un increment fins 1991-1992 que s'inicia una davallada que continua actualment amb una disminució del 2% anual de la taxa de la mortalitat<sup>4</sup>. Aquest descens de la mortalitat es deu sobretot a la introducció dels mètodes de *screening* així com també als avenços en el tractament del tumor<sup>5</sup>. Tot i que la mortalitat ha començat a disminuir, això no ha succeït en tot els països per

## **INTRODUCCIÓ**

---

igual, així que en països com el Japó, o Costa Rica o ciutats com Singapur la mortalitat entre les dones per càncer de mama encara es manté elevada<sup>6</sup>.

La incidència del càncer de mama augmenta amb l'edat, a més a més, estudis realitzats sobre els moviments migratoris territorials mostren que la població que migra de zones de baixa incidència cap a zones d'alta incidència adopten el risc de la població de destí en una o dues generacions i tot això junt amb les variacions geogràfiques d'incidència del càncer de mama, i els diferents cursos evolutius segons les poblacions de risc, posen de manifest la importància dels factors ambientals en l'etiologia del càncer de mama.

Tot i els múltiples estudis epidemiològics que s'han anat fent, és avui dia impossible preveure quines dones desenvoluparan un càncer de mama i quines no.

### **1.1.2 FACTORS DE RISC**

Existeixen diversos factors de risc que s'han associat al càncer de mama. Aquest càncer és de 100 a 200 vegades més freqüent en la dona que en l'home i l'edat mitjana del diagnòstic està al voltant dels 60 anys tot i que actualment s'està observant una disminució en l'edat de diagnòstic i apareixen càncer en dones cada cop més joves i una major incidència en les de classe social mitjana - alta.

De tots els factors de risc, els més importants seria l'existència de lesions prèvies de la mama. El col·legi Americà de Patòlegs, l'any 1986<sup>7</sup> publica una classificació en la que agrupa les diferents lesions benignes de mama en referència al risc que comporten de desenvolupar posteriorment un carcinoma infiltrant de mama.

Així recomanen agrupar les pacients amb alteracions del parènquima mamari catalogades com a “malaltia fibroquística” en tres grups diferents:

- ✘ Absència de hiperplàsia epitelial o hiperplàsia lleu: en aquest grup no es produeix un augment de risc de carcinoma posterior.

✘ Hiperplàsia epitelial moderada o hiperplàsia florida: el risc de desenvolupar un carcinoma en aquest grup és de 1.5 a 2 vegades superior.

✘ Hiperplàsia ductal / lobel·lar atípica: on el risc de desenvolupar el posterior carcinoma és 5 vegades superior.

Posteriorment, Page DL 1986<sup>8</sup> afegeix una altra categoria a aquest grup:

✘ Carcinoma ductal / lobel·lar *in situ*: on el risc de desenvolupar un posterior carcinoma infiltrant de mama és de 8 a 10 vegades superior.

La última revisió d'aquesta classificació es va dur a terme l'any 1998<sup>9</sup>.

Les lesions de mama benignes ja catalogades com a proliferatives o no proliferatives, amb o sense atípia, presenten doncs risc relatiu (RR) diferent a l'hora de desenvolupar un carcinoma invasiu de mama.

Diversos articles publicats a partir de les publicacions del col·legi americà de patòlegs, relacionen el grau de risc de càncer de mama amb la presència o no d'atípia en la lesió benigna i tots ells presenten valors de RR similars amb algunes matitzacions<sup>10-14</sup>. Les lesions proliferatives sense atípia tenen un risc relatiu de 1.5<sup>15</sup>. Dins de les lesions proliferatives sense atípies, la cicatriu radial s'ha observat que mostra un risc més elevat de desenvolupar carcinoma i, fins i tot, alguns autors la consideren un estadi inicial del càncer<sup>16-17</sup>. El risc relatiu de les lesions proliferatives amb atípia es de 5<sup>15</sup>, i aquest risc augmenta si s'afegeixen d'altres factors com l'edat, antecedents familiars de càncer de mama i la menopausa<sup>18-20</sup>.

Entre els antecedents familiars, es considera factor de risc tenir familiars de primer ordre amb aquest tipus de càncer i d'entre la població general, entre un 4 - 9% de la població tenen un càncer hereditari de mama. Tenir un familiar de primer ordre amb carcinoma de mama augmenta el risc de 2 a 3 vegades per sobre del de la població general i aquest risc encara augmenta més si el parent ha tingut el tumor en edat jove o si aquest ha estat bilateral<sup>21</sup>.

## **INTRODUCCIÓ**

---

En els casos de càncers familiars s'han objectivat mutacions en dos gens com són el gen BRCA1, localitzat en el cromosoma 17q, i el BRCA2, localitzat en el cromosoma 13q12-13<sup>22</sup>. El BRCA1 també predisposa pel carcinoma d'ovari<sup>23</sup>. La prevalença de mutacions del BRCA1 en famílies d'alt risc es dona entre el 20 i el 80%. S'ha observat que els carcinomes de mama que es desenvolupen amb mutacions del gen BRCA1 s'han associat a una pitjor supervivència si no han rebut tractament adjuvant<sup>24</sup> i s'ha estimat, en una determinada població, que el risc de carcinoma de mama en les pacients portadores de la mutació en aquest gen és al voltant del 56% als 70 anys<sup>25</sup>. El gen BRCA2 és més específic per al càncer de mama i es considera responsable del 30 % dels carcinomes de mama hereditaris, tot i que amb menor mesura s'ha associat al càncer d'ovari<sup>25</sup>.

D'altres mutacions genètiques implicades en el càncer de mama són la localitzada en el gen TP53 del braç curt del cromosoma 17 que produeix càncer de mama en dones premenopàusiques formant part de la Síndrome de Li-Fraumeni<sup>26</sup>. El gen de l'atàxia telangiectàsia - AT – situat en el braç llarg del cromosoma 11 s'ha associat a un augment del 8% del risc de desenvolupar càncer de mama ja que produeix un augment de la sensibilitat a les radiacions<sup>27</sup>. El gen HRAS1 sembla estar associat amb el càncer de mama i també amb el d'ovari<sup>28</sup>. I un dels últims gens que s'ha relacionat amb el càncer de mama és el PTEN/MMAC que es localitza en el braç llarg del cromosoma 10 i és responsable de la malaltia de Crowden; la mutació d'aquest gen es troba present en un 4% dels carcinomes mamaris d'origen hereditari<sup>29</sup>.

És ben coneguda també l'associació entre aquest carcinoma i les hormones tant endògenes com exògenes. El càncer de mama és més freqüent en dones que han tingut una menarquia precoç, en nul·lípares o en les que han tingut fills en edats avançades així com una menopausa tardana<sup>30</sup>. Les hormones exògenes fan referència tant als anticonceptius orals com al tractament hormonal substitutiu en la menopausa. Existeixen múltiples articles publicats en la literatura sobre la relació entre els

anticonceptius hormonals i el carcinoma de mama<sup>31-33</sup>. Un estudi relativament recent<sup>34</sup> suggereix un petit increment en el risc relatiu associat a l'ús d'anticonceptius orals combinats, sobretot entre les usuàries habituals i les recents, que no està relacionat ni amb la duració ni amb el tipus ni la dosi de la preparació sinó més aviat amb una certa predisposició. També s'ha suggerit un petit increment del risc relatiu en pacients post-menopàusiques amb tractament hormonal substitutiu (estrògens i progestàgens) de llarga durada sobretot en usuàries habituals i recents i que aquest risc es molt similar al que presenten les dones que només prenen estrògens<sup>34-37</sup>.

El consum augmentat d'alcohol en dones post-menopàusiques també s'ha associat a un increment del risc de càncer de mama degut a un augment total dels nivells d'estrògens<sup>38</sup>.

D'altres factors de risc són la dieta on s'ha vist que una dieta amb un alt contingut en àcids grassos poliinsaturats tenen un efecte protector i podria disminuir-ne el risc o que el consum de soja que té un efecte protector contra el càncer de mama<sup>39</sup>.

El consum de tabac mostra resultats contradictoris, alguns estudis no mostren un augment de la incidència de càncer de mama en les fumadores<sup>40a</sup>, d'altres mostren un risc directament proporcional al nombre de cigarretes i que és major en dones premenopàusiques<sup>40b</sup>.

Estils de vida com la pràctica d'exercici també produeixen una disminució del càncer de mama tot i que depèn de la intensitat i la durada de l'activitat<sup>41</sup>.

### 1.1.3 CLÍNICA I RADIOLOGIA

El carcinoma de mama es dona amb més freqüència en la mama esquerra que en la dreta, algun article publica que el carcinoma de mama és un 13% més freqüent en la mama esquerra que en la dreta<sup>42</sup>.

A més a més, en més d'un 4% dels casos són bilaterals.

La localització en el parènquima mamari del carcinoma infiltrant presenta una distribució desigual, així, segons els quadrants de la divisió mamaria trobem que:

- El 50% dels carcinomes es localitzen en el quadrant superior extern
- El 15% en el quadrant superior intern
- El 10% en el quadrant inferior extern
- El 5% en el quadrant inferior intern
- El 17% en la regió central (areolar)
- I el 3% són difusos

La distribució percentual del carcinoma en cada quadrant pot semblar sorprenent però en realitat fa referència a la quantitat de parènquima mamari que existeix en cada quadrant (per exemple, en el quadrant superior extern existeix més parènquima mamari que en el quadrant inferior intern i per tant té més probabilitat de desenvolupar un carcinoma).

En general no produeix cap tipus de símptoma ni signes específics que el puguin diferenciar de patologies benignes de la mama.

La clínica més freqüent és la presència d'un nòdul mamari associat o no a dolor i/o anomalies del mugró com retraccions o eccema o secrecions. Les característiques clíniques que ens han d'alertar davant un possible carcinoma seria per una banda, relacionades amb l'aparició de masses com: l'aparició d'una massa no existent prèviament, l'aparició d'una massa en un nòdul preexistent, nodularitat asimètrica que persisteix després de la menstruació, abscess o inflamació de la mama que no

desapareix amb el tractament antibiòtic adequat, presència de quists persistents o recurrents; també estarien relacionats amb la presència de dolor associat a una massa que no millorar o respon al tractament analgèsic o la presència de dolor mamari en una dona post-menopàusica; relacionats també amb la presència de secrecions pel mugró, sobretot en dones de més de 50 anys o en dones de menys edat però quan la secreció és bilateral o és hemàtica (uni o bilateral) o és persistent; també estarien relacionades amb alteracions del mugró, distorsió o eccemes, alteracions del contorn de la mama o la presència d'antecedents de familiars directes amb carcinoma de mama.

Des del punt de vista mamogràfic, el carcinoma de mama pot tenir diferents imatges radiològiques, des de masses aparentment ben delimitades a masses mal delimitades i espiculades o deformitats del parènquima amb presència de calcificacions. De totes elles, la imatge radiològica més freqüent del càncer de mama és la d'una massa mal definida i espiculada sense calcificacions<sup>43-45</sup>.

### 1.1.4 CLASSIFICACIÓ HISTOLÒGICA DE LES LESIONS EPITELIALS MALIGNES DE MAMA

Segons la classificació de la OMS de 2003<sup>46</sup>, els tumors epitelials malignes de mama es classifiquen en els següents tipus (taula 1):

**Taula 1.** *Classificació histològica de la OMS de 2003<sup>46</sup> dels tumors epitelials malignes de mama*

#### **TUMORS EPITELIALS**

- *Carcinoma ductal infiltrant (NOS)*
  - Carcinoma de tipus mixta
  - Carcinoma pleomòrfic
  - Carcinoma amb cèl·lules gegants osteoclàstiques
  - Carcinoma amb característiques coriocarcinomatoses
  - Carcinoma amb característiques melanocítiques
- *Carcinoma lobel·lar infiltrant*
- *Carcinoma tubular*
- *Carcinoma cribiform infiltrant*
- *Carcinoma medul·lar*
- *Carcinoma mucinós i d'altres amb abundant producció de mucina*
  - Carcinoma mucinós
  - Cistadenocarcinoma i carcinoma mucinós de cèl·lules columnars
  - Carcinoma de cèl·lules en anell de segell
- *Tumors neuroendocrins*
  - Carcinoma neuroendocrí sòlid
  - Tumor carcinoid atípic
  - Carcinoma neuroendocrí de cèl·lula petita
  - Carcinoma neuroendocrí de cèl·lula gran
- *Carcinoma papil·lar infiltrant*
- *Carcinoma micropapil·lar infiltrant*
- *Carcinoma apocrí*
- *Carcinoma metaplàsic*
  - Carcinomes metaplàsics purs epitelials
    - Carcinoma escamós
    - Adenocarcinoma amb metaplàsia de cèl·lules fusiformes
    - Carcinoma adenoescamós
    - Carcinoma mucoepidermoid
  - Carcinomes metaplàsics mixtes, epitelials i mesenquimals
- *Carcinoma ric en lípids*



- *Carcinoma secretor*
- *Carcinoma oncocític*
- *Carcinoma adenoid-quístic*
- *Carcinoma de cèl·lules acinars*
- *Carcinoma de cèl·lules clares ric en glucogen*
- *Carcinoma sebaci*
- *Carcinoma inflamatori*
- *Neoplàsia lobel·lar*
  - Carcinoma Lobel·lar in situ
- *Lesions proliferatives intraductals*
  - Hiperplàsia ductal usual
  - Atípia epitelial plana
  - Hiperplàsia ductal atípica
  - Carcinoma ductal in situ
- *Carcinoma microinvasiu*
- *Neoplàsia papil·lar intraductal*
  - Papiloma central
  - Papiloma perifèric
  - Papiloma atípic
  - Carcinoma papil·lar intraductal
  - Carcinoma papil·lar intraquístic

### 1.1.5 CARCINOMA DUCTAL INFILTRANT

És el tipus histològic més freqüent, i compren entre el 40 i el 75% dels carcinomes de mama, segons les sèries<sup>47</sup>.

Macroscòpicament són tumors que varien en quan a mida (des de 0,2 cm fins a diversos centímetres de diàmetre) i actualment degut als mètodes de *screening* els carcinomes que actualment es diagnostiquen són de mida petita. Poden ésser nòduls més o menys rodons o àrees irregulars i espiculades, de coloració grisosa i amb una consistència augmentada respecte la resta del parènquima mamari.

Des del punt de vista histològic les cèl·lules que constitueixen aquest tumor s'agrupen en cordons, nius o trabècules, fins i tot formant àries sòlides amb patró de creixement infiltratiu i poc estroma acompanyant (figura 1).

## INTRODUCCIÓ

---

Les cèl·lules tenen un citoplasma abundant i eosinòfil amb un nucli que pot ser des de regular i uniforme a molt pleomòrfic i presentar un nucleol molt evident i sovint múltiple i una activitat mitòtica que és molt variable.

El 80% dels carcinomes ductals infiltrants presenten focus associats de carcinoma ductal *in situ* que amb alta incidència sol ésser d'alt grau.

El component estromal que acompanya a aquestes tumoracions és molt variable, des d'una proliferació fibroblàstica altament cel·lular a escàs teixit connectiu amb molt poca cel·lularitat i amb marcada hialinització.

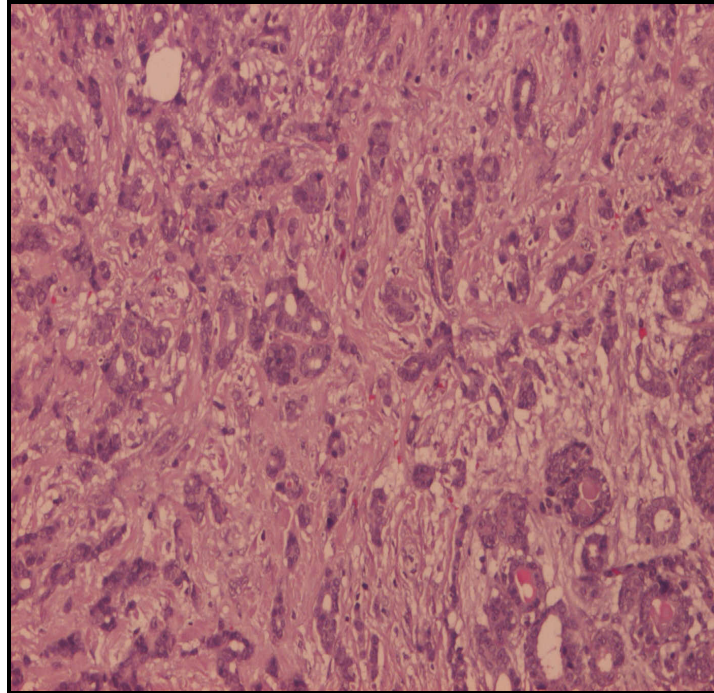
Les tumoracions poden presentar necrosi focal o ocasionalment extensa, algunes àrees d'hemorràgia i component inflamatori constituït, principalment, per limfòcits i cèl·lules plasmàtiques.

El grau histològic també és un marcador pronòstic i es determina mitjançant tres paràmetres histològics com són la formació d'estructures tubulars (glàndules), el pleomorfisme nuclear (figura 2) i el nombre de mitosis (figura 3). Cada criteri es divideix en tres categories que es puntuen de l'1 al 3 (taula 2).

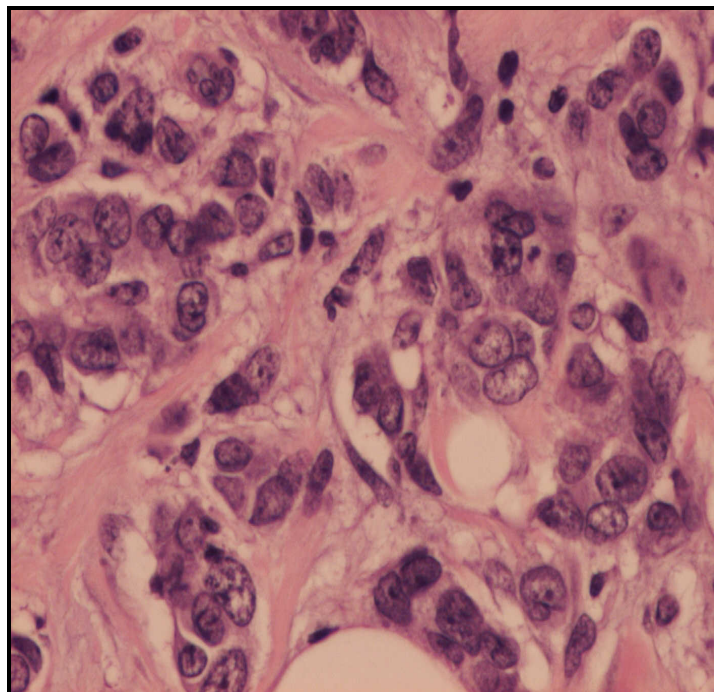
Amb la suma final s'obté un valor que va de 3 a 9 punts el qual se li assigna un grau de diferenciació de la següent manera:

Grau 1 (ben diferenciat): 3 - 5 punts
Grau 2 (moderadament diferenciat): 6 - 7 punts
Grau 3 (poc diferenciat): 8 - 9 punts

Com més ben diferenciat és el tumor, millor pronòstic se li atribueix.

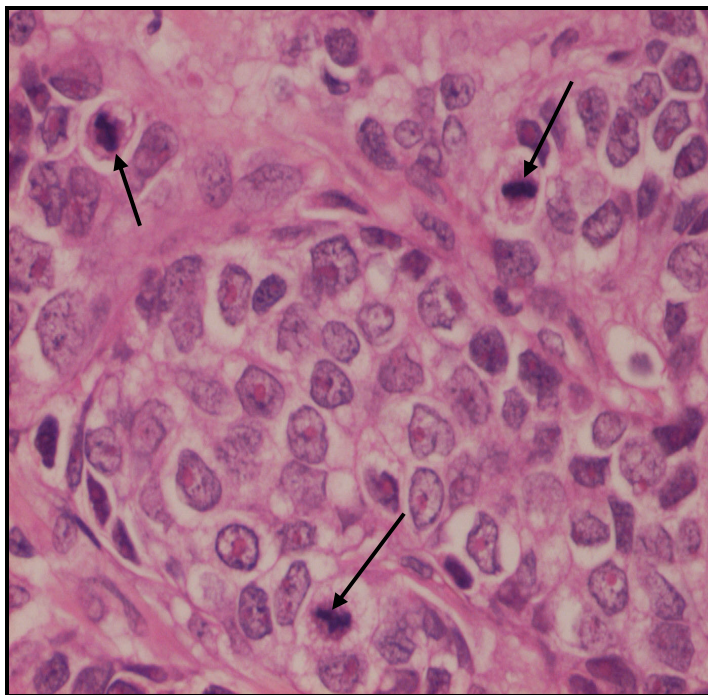


**Figura 1.** Carcinoma ductal infiltrant. Formació de gran quantitat de túbuls, puntuació:1 (H&E x100)



**Figura 2.** Carcinoma ductal infiltrant, puntuació del pleomorfisme cel·lular: 2 (H&E x400)





**Figura 3.** Carcinoma ductal infiltrant; mitosis:3 (H&E x400)



**Taula 2.** Mètode de gradació histològica dels carcinomes de mama

<b>CARACTERÍSTIQUES</b>	<b>PUNTUACIÓ</b>
<b>Formació de túbuls i glàndules</b>	
Majoria del tumor (75%)	1
Moderada quantitat (10-75%)	2
Escassa quantitat (<10%)	3
<b>Pleomorfisme nuclear</b>	
Cèl·lules petites, regulars i uniformes	1
Moderat augment de mida i variabilitat	2
Marcada variabilitat	3
<b>Nombre de mitosis</b>	
De 0 a 9 x 10cga	1
De 10 a 19 x 10cga	2
> 20 x 10cga	3

El 70 - 80% dels carcinomes ductals infiltrants són positius als receptors d'estrògens i de progesterona i al voltant d'un 15 - 30% són positius per al c-erbB-2. Aquestes característiques en determinaran el pronòstic així com l'actitud terapèutica.

### **1.1.6 FACTORS PRONÒSTICS**

Els factors pronòstics que intervenen en el càncer de mama són diversos. Alguns d'aquests factors depenen de l'hoste i per tant, és difícil actuar contra ells com per exemple l'edat, el sexe, l'estat nutricional i l'estat immunitari del pacient i d'altres són dependents del tumor. Es pot resumir dient que els factors pronòstics del càncer de mama inclouen tant factors clínics com morfològics com moleculars.

#### **1.1.6.1 FACTORS CLÍNICS:**

- *EDAT*: el significat pronòstic de l'edat així com la menopausa és controvertit. Existeixen diferències entre els articles en funció de la selecció de mostra per l'estudi i d'altres factors que també actuen com a factors pronòstics.
- *EMBARÀS*: el carcinoma de mama que es desenvolupa durant l'embaràs és considerat, en general, com a mal pronòstic. Per altra banda, la situació inversa, és a dir un embaràs en una dona que ha tingut en un passat més o menys recent, un càncer de mama no implica pitjor pronòstic.

#### **1.1.6.2 FACTORS MORFOLÒGICS:**

- *ESTAT DELS GANGLIS LIMFÀTICS*: és el factor pronòstic més important en les pacients amb carcinoma de mama. Són múltiples els estudis que han demostrat una disminució del temps lliure de malaltia i de la supervivència global en funció del nombre de ganglis limfàtics positius (tant per micro com per macrometàstasis)<sup>48-51</sup>.
- *MIDA TUMORAL*: la mida tumoral és també un factor pronòstic important tant per la supervivència com per l'estat dels ganglis limfàtics axil·lars. De tota la mida del tumor, el més important és mesurar el component infiltrant ja que és



aquest qui determina el TNM i per tant intervé en el pronòstic<sup>52</sup>. Diversos estudis publicats en la literatura han demostrat que la mida tumoral és el factor pronòstic més important per a la supervivència i que no sols ho és en els casos de tumors amb ganglis limfàtics negatius<sup>53</sup>, sinó que també s'ha vist que té valor pronòstic en els tumors amb ganglis limfàtics positius<sup>54</sup>. Tot i que alguns tumors de mida inferior a 1cm poden presentar ganglis limfàtics positius, la simplicitat de la mesura de la mida tumoral i l'existència de nombrosos estudis que correlacionen la mida amb l'estat dels ganglis limfàtics fa que tingui un valor pronòstic important.

- *TIPUS HISTOLÒGIC*: alguns tipus histològics estan associats a un millor pronòstic com són el carcinoma tubular, el cribiform, el mucinós i l'adenoid-quístic<sup>55</sup>. El significat pronòstic del carcinoma medul·lar no està del tot clar que s'associï a un millor pronòstic.

- *GRAU HISTOLÒGIC*: la gradació s'ha de realitzar en tots els carcinomes infiltrants de mama independentment del tipus histològic que siguin. Dels tres factors que determinen el grau histològic, les mitosis i l'atipia nuclear comporten un pitjor pronòstic com més augmentat ho estan i per contra el tercer factor que correspon a la formació de túbuls, com més presència de túbuls millor pronòstic. Alguns autors consideren que l'índex de proliferació cel·lular és el component de major valor pronòstic entre els paràmetres histològics ja que en determina la velocitat de creixement tumoral<sup>56,57</sup> i d'altra banda, diverses publicacions relacionen el nombre de mitosis amb el pronòstic del tumor<sup>58-60</sup>. El carcinomes d'alt grau (poc diferenciats) presenten amb més freqüència metàstasis a distància, independentment de la mida tumoral i l'estat dels ganglis limfàtics. De la mateixa manera, algun estudi<sup>61</sup> ha relacionat els carcinomes d'alt grau amb una millor resposta al tractament quimioteràpic. La

subjectivitat que comporta aquest factor fa que no tots els estudis publicats mostrin els mateixos resultats.

- *PROLIFERACIÓ CEL·LULAR TUMORAL*: Ki67 és una proteïna nuclear que es detecta des de la fase G1 a la fase M del cicle cel·lular i és un bon indicador del creixement tumoral. El percentatge de cèl·lules que expressen el marcador de proliferació cel·lular, *Ki-67*, separa les pacients en dos grups en funció de l'índex de proliferació cel·lular sigui alt o baix i això ens permet establir una correlació amb el pronòstic. D'altra banda, la mesura de la fracció de la fase S mitjançant citometria de flux ens indica que pacients amb alts nivells de la fracció de la fase S tenen un pitjor pronòstic. Alguns articles publicats en la literatura<sup>62,63</sup> han objectivat una relació entre l'índex de proliferació cel·lular i d'altres factors com ara els receptors hormonals, la p53, la sobreexpressió de c-erbB2 i el grau histològic.

- *INVASIÓ VASCULAR*: invasió dels vasos sanguinis produeix un efecte advers en l'evolució clínica. El nombre de metàstasis a distància i de recidives locals augmenta considerablement en aquelles pacients que presenten èmbols tumorals en els vasos propers a la tumoració.

- *INVASIÓ PERINEURAL*: aquesta característica s'observa ocasionalment en els tumors de mama invasius però no s'ha relacionat amb el pronòstic.

- *NECROSI TUMORAL*: la majoria d'estudis associen la presència de necrosi a un pitjor pronòstic però en algun cas<sup>64</sup> només s'ha associat a un pitjor pronòstic durant els dos primers anys després del diagnòstic.

- *INFILTRAT INFLAMATORI*: la presència de component inflamatori mononuclear s'ha associat a carcinomes d'alt grau histològic<sup>65</sup> però aquesta

trobada presenta resultats contradictoris quan es correlaciona amb el pronòstic d'aquests tumors.

- *CARCINOMA DUCTAL IN SITU*: la presència de component intraductal extens és un factor pronòstic per a la recidiva local d'aquestes tumoracions en aquelles pacients que es tracten amb tractament conservador i radioteràpia<sup>66</sup>. No està del tot clar que tinguin relació amb la disseminació metastàsica i la supervivència global de la pacient.

- *ESTROMA TUMORAL*: la presència de focus de fibrosi en el centre d'un carcinoma invasiu es considera com a factor pronòstic advers<sup>67</sup>. També s'ha observat que els carcinomes infiltrants que presenten reacció inflamatòria peritumoral tenen menys metàstasis en els ganglis limfàtics i presumiblement un millor pronòstic<sup>68</sup>. La presència d'elastosi estromal, actualment no es considera que tingui paper pronòstic. Anys enrera s'havia associat tant a un pitjor com a un millor pronòstic.

#### 1.1.6.3 FACTORS MOLECULARS I GENÈTICS:

- *RECEPTORS HORMONALS*: la presència de receptors hormonals en el teixit tumoral es correlaciona amb la resposta al tractament hormonal i quimioteràpic<sup>69</sup>. El 60% dels carcinomes de mama expressen receptors d'estrògens, tot i que la presència de receptors hormonals no sempre es correlaciona amb el tipus histològic de càncer de mama tal i com es comenta en un article publicat recentment<sup>70a</sup>. El 90% de les dones amb càncer de mama amb receptors d'estrògens negatius no responen al tractament hormonal tot i que entre un 40-50% de les que tenen receptors positius tampoc ho fa<sup>70b</sup>. En general, les concentracions dels receptors d'estrògens són més baixes i les de progesterona més altes en els carcinomes de mama que es

donen en dones premenopàusiques comparats amb els que es donen en postmenopàusiques<sup>71</sup>. El nivell dels receptors d'estrògens és molt útil per valorar la resposta al tractament adjuvant amb Tamoxifè<sup>72,73</sup>. Els tumors que tenen positivitat per ambdós receptors hormonals tenen una resposta del 60-70% en el tractament quimioteràpic, els tumors amb receptors negatius la seva resposta és del 10% i els que tenen receptors estrogènics positius i la progesterona negativa, tenen una resposta d'aproximadament el 40%<sup>74</sup>. S'ha observat que la positivitat dels receptors hormonals es correlaciona amb la immunoreactivitat del bcl-2 i absència de mutació de la p53<sup>75</sup> i es correlaciona inversament amb la presència de receptors del factor epidèrmic de creixement<sup>76</sup>. D'altra banda, alguns tumors de mama presenten receptors d'androgens i aquests també s'han implicat en el pronòstic i la resposta al tractament. Fins a un 80% dels càncers de mama tenen receptors d'andrògens, fins i tot en absència de receptors d'estrògens i de progesterona<sup>77</sup>. De fet, aquesta peculiaritat s'ha vist que és més freqüent en tumors amb receptors d'estrògen i progesterona negatius<sup>78</sup>.

- *ONCOGEN HER2 I D'ALTRES GENS AMPLIFICATS*: el HER2/neu (c-erbB-2) és un oncogen localitzat en el cromosoma 17 que codifica una glicoproteïna transmembrana amb activitat tirosin quinasa de 185 kDa coneguda com a p185, la qual pertany a la família dels receptors dels factors de creixement epidèrmic<sup>79</sup>. La sobreexpressió del HER2/neu sembla correlacionar-se amb el tipus de tumor i es dona en quasi tots els casos de carcinoma ductal *in situ* d'alt grau (aproximadament entre un 80 – 90%), entre un 20 – 30% dels carcinomes ductals infiltrants i en un percentatge molt petit dels carcinomes lobulars<sup>80,81</sup>; en el parènquima mamari normal o en patologia mamària benigna no es troba amplificat. La importància d'aquest oncogen és que representa una diana de cara a diverses estratègies terapèutiques com la

utilització d'anticossos específics contra HER2/neu, inhibidors de la tirosinquinasa, immunoteràpia i molècules que indueixen la degradació dels receptors de la tirosinquinasa<sup>82a</sup>. Una revisió recent<sup>82b</sup> conclou que el HER2 sembla ser un factor predictiu negatiu potent per a la resposta als agents alquilants i un factor predictiu positiu moderat per a la resposta a les antraciclins. A més a més identifica un grup de pacients amb mal pronòstic independentment de l'estat dels ganglis limfàtics<sup>83</sup> i també s'ha observat que es correlaciona estretament amb el grau histològic del tumor<sup>84</sup>. El gen MYC en el cromosoma 8q24 codifica una proteïna nuclear amb una seqüència amb activitat lligadors de l'ADN i es troba amplificat en aproximadament en el 20% dels carcinomes de mama. La seva amplifcació s'ha associat a negativitat en l'expressió dels receptors estrogènics, malaltia localment avançada, una pobre resposta al tractament quimioteràpic<sup>85</sup>. Tot això fa que els carcinomes de mama amb amplifcació del gen MYC tenen un pitjor pronòstic i una supervivència més curta<sup>85</sup>. L'amplifcació del gen FGFR1 (codifiquen per a receptors de factors de creixement fibroblàstic) en el cromosoma 8p12 s'ha relacionat amb una disminució de la supervivència, sobretot si també es troba amplificat, conjuntament, el gen de ciclina D1 (CCND1 en 11q13)<sup>82,85</sup>. La positivitat per a receptors hormonals es correlaciona amb la immunoreactivitat per a bcl-2<sup>86</sup> i a absència de mutacions de la p53<sup>87</sup> i es correlaciona de manera inversa amb la presència de receptors del factors de creixement epidèrmics<sup>88</sup>.

- *P53*: el gen p53 es localitza en el braç curt del cromosoma 17 i codifica una fosfoproteïna - p53 - que intervé en el control de la proliferació cel·lular mitjançant la inhibició dels complexos de la ciclina i les quinases que en depenen. La mutació de la p53 és una anomalia genètica observada amb certa freqüència en les neoplàsies malignes. Aproximadament el 25% dels carcinomes de mama tenen mutacions del gen supressor de tumors p53. S'ha

## **INTRODUCCIÓ**

---

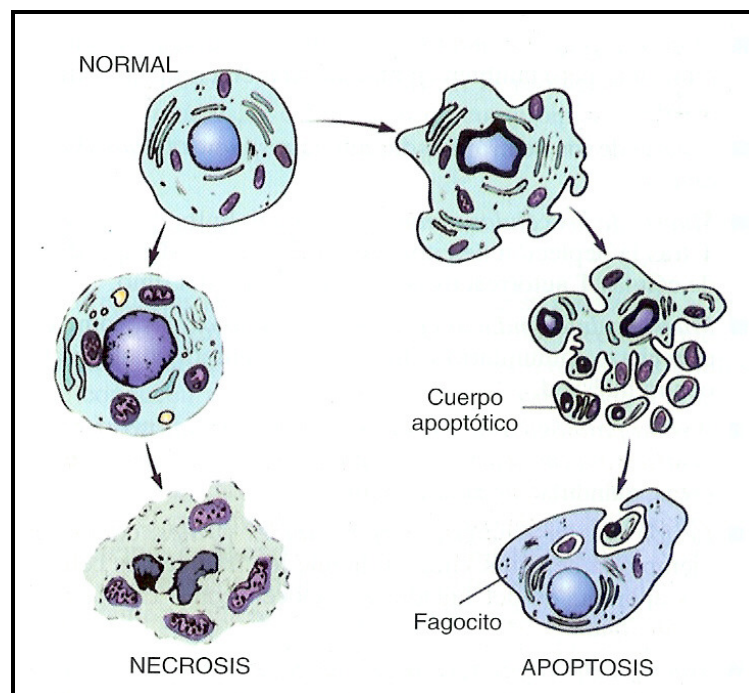
observat que determinades mutacions determinen un pitjor pronòstic, així, mutacions que afecten al domini L2/L3 de la p53, el qual és important per a la unió de l'ADN, comporten una menor supervivència<sup>89a</sup>. S'ha observat que la presència d'aquesta mutació s'associa a d'altres factors de mal pronòstic com afectació ganglionar, mida tumoral gran, grau histològic alt, receptors negatius i sobreexpressió de HER2<sup>89b</sup>.

- *PÈRDUA D'HETEROZIGOCITAT*: a banda de les comentades en la p53, altres regions amb pèrdua d'heterozigocitat s'han relacionat amb una supervivència més curta com deleccions en els cromosomes 9q13 o 11q23<sup>90</sup>.

## 1.2 APOPTOSI

La mort de la cèl·lula es pot produir per dues vies amb diferents mecanismes que produeixen respostes diferents del medi en el qual es troba la cèl·lula que ho pateix. Aquests dos tipus de mort cel·lular s'anomenen: necrosi i apoptosi<sup>91,92</sup> (figura 4).

La necrosi és la mort cel·lular passiva. Es produeix com a conseqüència d'una agressió que lesiona severament les membranes cel·lulars alterant la capacitat de mantenir l'homeostasi. En trencar-se la barrera, l'aigua i els ions extracel·lulars passen de l'espai extracel·lular cap a l'interior de la cèl·lula produint un augment considerable del seu volum fins que la cèl·lula es trenca i allibera enzims a l'espai extracel·lular que afectaran les cèl·lules del voltant produint una resposta inflamatòria.



**Figura 4.** Diferències entre la mort cel·lular per necrosi i per apoptosi.

(Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. Patología estructural y funcional. Sexta Edición.

Madrid, McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, 2000 pág 19<sup>93</sup>)

## **INTRODUCCIÓ**

---

L'apoptosi és la mort cel·lular activa o programada, donat que el mecanisme pel qual es produeix està controlat genèticament. L'any 1951, Glucksmann descriu la mort cel·lular durant el desenvolupament normal dels animals i vint anys més tard, Kerr descriu el procés a nivell ultraestructural anomenant-lo apoptosi. Aquest procés permet la renovació de les cèl·lules que ja no són necessàries o que han estat lesionades mitjançant l'activació de manera coordinada d'una sèrie de productes gènics. El procés produeix la fragmentació de la cèl·lula en diversos fragments de nucli, de citoplasma o d'ambdós, anomenats cossos apoptòtics que inclouen fins a 200 parells de bases<sup>92,94</sup>. Aquests cossos apoptòtics són fagocitats per les cèl·lules del voltant sense produir resposta inflamatòria<sup>95</sup>.

La separació entre l'apoptosis i la necrosi no es estricta ja que en alguns casos determinats, la mort de la cèl·lula es pot expressar com apoptosi o com a necrosi en funció de la intensitat i la durada de l'estímul, la rapidesa del procés de mort cel·lular i la intensitat de la deplecció de l'ATP que pateix la cèl·lula.

L'apoptosi es produeix tant en el desenvolupament normal dels teixits o en resposta a determinats estímuls, ja siguin fisiològics o patològics<sup>92,94</sup>. Així podem trobar que l'apoptosi participa en múltiples processos com en la morfogènesi durant l'embriogènesi, per exemple, en un embrió de sexe masculí els conductes de Müller – que en l'embrió femení formen l'úter i les trompes- es moren per apoptosi en el moment de la diferenciació sexual; participa en el creixement fent el moldejament tissular, en la renovació cel·lular normal i en la resposta terapèutica de les neoplàsies primàries i secundàries. També participa en la regulació hormonal de les respostes cel·lulars com en l'atrofia endocrí-induïda (la destrucció de les cèl·lules endometrials durant el cicle menstrual) i en la mesura de les respostes immunològiques, per exemple el limfòcits T citotòxics i les cèl·lules Natural Killer (NK) indueixen apoptosi en les cèl·lules diana. L'apoptosi és la responsable de mantenir l'equilibri entre la proliferació cel·lular, la involució, l'atròfia i la destrucció cel·lular. Intervé també, en la

26



regulació del nombre de cèl·lules, eliminant aquelles que han patit agressions en el seu material genètic o mutacions per evitar la transmissió d'errors.

Tot i això, l'apoptosi no sempre produeix efectes beneficiosos o sense cap implicació patològica ja que, una alteració en la regulació de l'apoptosi pot ser la base de la patogènia de malalties autoimmunes<sup>96</sup>.

La lesió o alteració de l'ADN nuclear és el principal activador del procés apoptòtic. Aquesta activació es dona per diferents estímuls, entre ells l'absència de factors de creixement, l'exposició a agents biològics, físics, químics i el reconeixement de modificacions genètiques<sup>97-106</sup>. Quan els gens que controlen el procés de l'apoptosi muten, es sobreexpressen o s'infrarepressen, aleshores l'apoptosi és la causant de diverses patologies, ja que el creixement tumoral ve determinat pel resultat net entre les cèl·lules que es troben en proliferació i les cèl·lules que moren.

### **1.2.1 PROCÉS APOPTÒTIC**

Com ja s'ha comentat, l'apoptosi és el mecanisme de mort cel·lular que està controlat genèticament. En aquest mecanisme s'han identificat diversos gens que hi intervenen i que actuen com a promotors o com a inhibidors de l'apoptosi (taula 3) i, del balanç entre els dos tipus es pot produir l'apoptosi o bé la necrosi<sup>92,94</sup>. Una alteració en la regulació genètica de l'apoptosi pot provocar la immortalitat cel·lular i produir un creixement neoplàsic.

**Taula 3.** Gens promotors i inhibidors de l'apoptosi

<b>PROMOTORS</b>	<b>INHIBIDORS</b>
bcl-xS	bcl-2
bak	bcl-xL
bcl-x5	bcl-x1
bax	bcl-w
bad	bfl-1
bid	brag-1
bik	mcl-1
urk	A1
p53 (salvatge)	p53 (mutada)

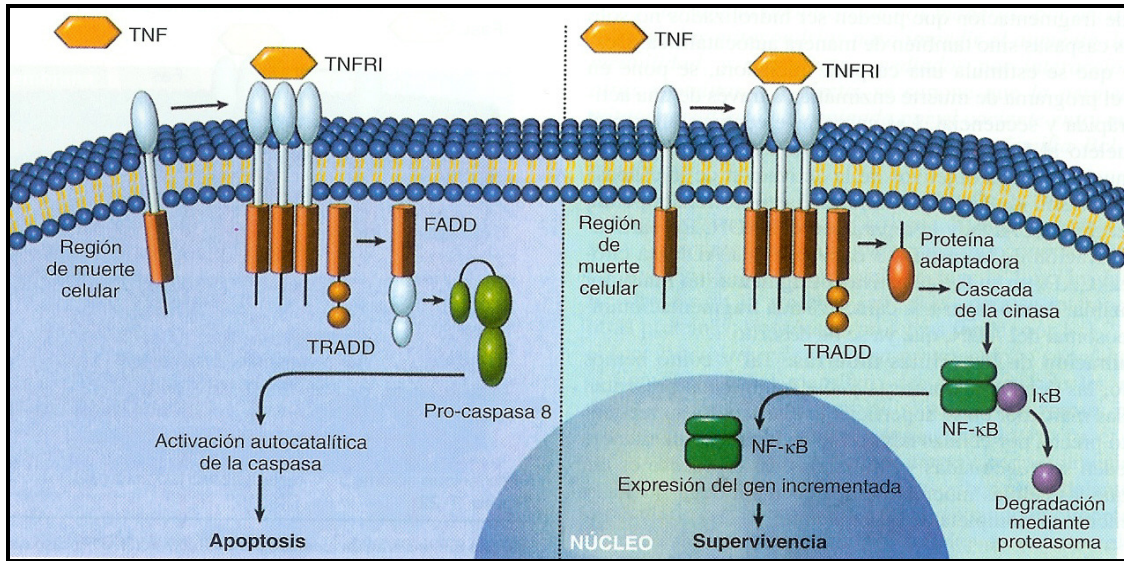
Quan l'activació dels gens condueix a l'apoptosi, aleshores s'inicia tot un procés que consta de quatre fases:

- a) Fase d'Inducció: és la fase en la qual es produeixen els estímuls i senyals que donaran lloc a l'apoptosi. Aquests estímuls poden ésser transmembrana o intracel·lulars. Les senyals transmembrana poden ser determinants negatius o positius de l'apoptosi i en aquest grup trobaríem algunes hormones, factors de creixement i citoquines que la seva activació no desencadenaria l'apoptosi mentre que la seva absència provoca el fracàs en la supressió dels programes de mort cel·lular i desencadena l'apoptosi. Les senyals intracel·lulars que poden desencadenar l'apoptosi poden ser agents físico-químics com el calor, les radiacions, la hipòxia; les infeccions víriques o la unió de glucocorticoids als receptors nuclears.

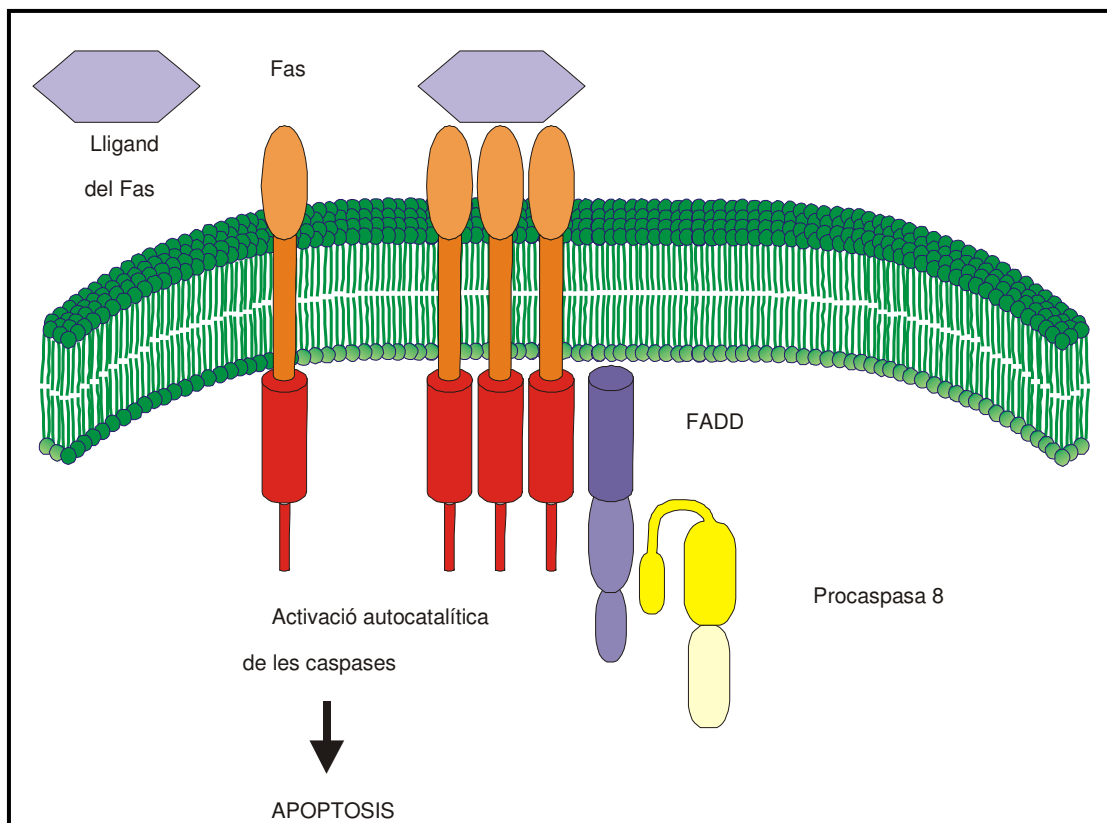
b) Fase de control i d'integració: el control es pot donar a través de dues vies que regulen positiva o negativament el procés apoptòtic i que l'activació d'una o l'altre dependrà de si l'origen de l'estímul és intern o extern. Si l'estímul és extern es poden activar dos tipus de vies diferents que ambdues depenen de receptors de membrana. Si l'estímul és intern el mecanisme s'activa a través de l'activació mitocondrial. D'aquesta manera tenim que determinades senyals extracel·lulars són lligants del receptor del factor de necrosi tumoral (TNFR) com per exemple el Fas (CD95) / Fas-L (CD95L) o el factor de necrosi tumoral (TNF), la unió d'aquests als seus receptors respectius fa que s'hi uneixin les proteïnes adaptadores denominades FADD les quals, a la seva vegada, s'uneixen a una pro-caspasa que s'activarà a caspasa (figura 5a). D'altra banda, quan l'estímul és intracel·lular es produeixen una sèrie d'alteracions mitocondrials que provoquen l'alliberació del citocrom c que activa les pro-caspases i desencadena l'apoptosi. Tant si l'estímul és intern com extern, les dues vies provoquen l'activació en cascada de les caspases. La proteïna bcl-2 de la membrana mitocondrial inhibeix l'apoptosi ja que impedeix la sortida del citocrom c i inactiva el factor Apaf-1 que és un activador de pro-caspases, per tant el bcl-2 és un important regulador de l'apoptosi en aquestes vies (figura 5b). Arribat a aquest punt, la cèl·lula es deshidrata produint una disminució del volum citoplasmàtic, es condensen les proteïnes i es desconnecta de les cèl·lules veïnes. En aquesta fase, la majoria de les organel·les permaneixen intactes.

- c) Fase d'execució: és la fase en la qual es produeix la mort real de la cèl·lula. En aquesta fase intervenen uns enzims proteolítics coneguts com a caspases, dels quals s'han descrit més de deu membres que formen part d'aquesta família de proteases de la cisteïna. De caspases se'n coneixen d'iniciadores i d'executores, aquestes últimes són les que produeixen la fragmentació de les proteïnes del citoesquelet i de la matriu nuclear, sobretot d'aquelles que estan implicades en la transcripció, la replicació i la reparació de l'ADN. En aquest moment, es dona la fragmentació cel·lular, l'ADN es trenca en fragments de 180 a 200 parells de bases i es produeix la formació dels cossos apoptòtics. La fragmentació de l'estructura nuclear i de les proteïnes del citoesquelet per les caspases, donen l'aparença morfològica característica de les cèl·lules apoptòtiques. Existeix una altra família de proteïnes denominades proteïnes inhibidores de l'apoptosi, que poden bloquejar el procés de mort cel·lular programada, unint-se i inhibint les caspases<sup>107</sup>.
- d) Fase d'eliminació: en aquesta fase els cossos apoptòtics originats en el procés són reconeguts per les cèl·lules macrofàgiques degut a l'expressió en la seva superfície de fosfatidilserina i tronbospondina. Un cop reconeguts, són fagocitats sense produir resposta inflammatòria.

Tot el procés és bastant ràpid, es dona en poques hores i es produeix sense pèrdua del material intracel·lular, danys secundaris a les cèl·lules adjacents o resposta inflammatòria.



**Figura 5a.** Mecanisme apoptòtic. Model de senyalització via TNF.



**Figura 5b.** Mecanisme apoptòtic. Model de senyalització via Fas

(de: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. Patología estructural y funcional. Sexta Edición. Madrid, McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, 2000 pág 25)<sup>93</sup>



### 1.2.2 PAPER DE LES CASPASES EN L' APOPTOSI

Les caspases tenen un paper essencial en l'execució de l'apoptosi. Formen part d'una família de proteases citoplasmàtiques de la cisteïna de la qual se'n coneixen més de 10 membres, que es caracteritzen per tenir un residu de cisteïna en el locus actiu i per reconèixer un residu d'àcid aspàrtic (Asp) en el lloc diana. Aquestes proteases s'emmagatzemen en les cèl·lules com a zimògens (pro-caspases) fins que són activades per una determinada senyal. La majoria de les caspases són sintetitzades com a precursors de baixa o nul·la activitat catalítica. En general, el precursor passa a ser actiu mitjançant un procés proteolític produït per una proteasa o per autocatàlisi quan s'uneix a un cofactor o per l'actuació d'un inhibidor. El precursor es pot acumular en grans quantitats i activar-se en funció de la demanda.

La seva implicació en el procés de l'apoptosi es va produir arrel del descobriment que el producte gènic CED-3, que es requeria per a la mort cel·lular en el nematode *Caenorhabditis elegans*, estava relacionat amb l'Enzim Convertidora de la Interleuquina-1 $\beta$  de mamífers (*ICE-1* o caspasa 1). Tot i que la caspasa 1 no té un paper clar en la mort cel·lular, fou la primera d'una gran família de proteases que es va relacionar amb la inflamació i l'apoptosi.

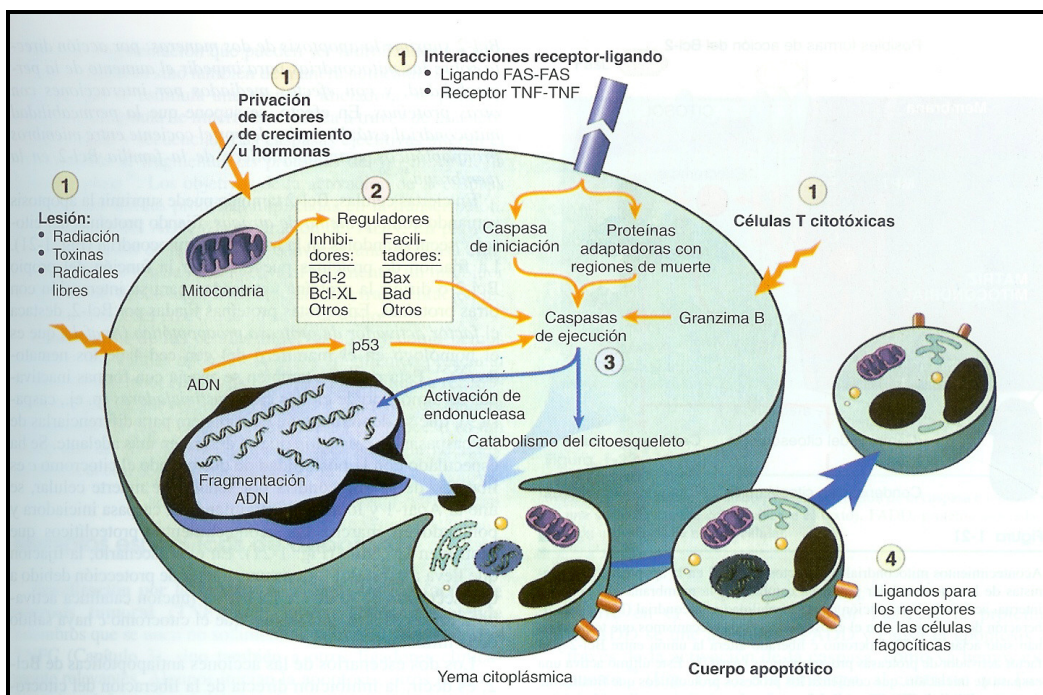
Tots els membres de la família comparteixen seqüències d'aminoàcids, estructura i especificitat pel substracte. Són expressats com a proenzims de 30 a 50 kDa, que comprenen tres dominis: el terminal-NH<sub>2</sub>, una subunitat gran que conté el lloc actiu (d'uns 20 kDa) i una subunitat més petita que té gran importància en l'activitat enzimàtica (d'uns 10 kDa).

Un cop les primeres caspases han estat processades i activades, desencadenen un senyal en cascada produint l'activació d'altres caspases. Depenent de la posició en la cascada d'activació, se'n coneixen de caspases iniciadores i de executores. L'activació d'aquesta cascada d'amplificació té com a conseqüència la inactivació d'un gran nombre de proteïnes estructurals de senyalització, de regulació de la transcripció i del

## INTRODUCCIÓ

metabolisme dels àcids nucleics que desencadena la mort cel·lular. Produïxen la proteolisi, per exemple, d'una proteïna nuclear amb activitat de reparació de l'ADN (PARP o poli [ADN-ribosoma] polimerasa) i un factor de transcripció (SREBP) (figura 6).

El balanç entre els mecanismes d'activació i d'inhibició de les caspases està directament relacionat amb el control de la mort cel·lular per apoptosi, de tal manera que les alteracions en aquest equilibri podrien tenir un paper important en l'evolució dels tumors.



**Figura 6.** Esquema dels aconeximents apoptòtics.

(de: Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. Patología estructural y funcional. Sexta Edición.

Madrid, McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, 2000 pág 23)<sup>93</sup>



### 1.2.3 TIPUS DE CASPASES

Les caspases es divideixen en tres grans grups o subfamílies depenen de la seva especificitat pel substrat :

- A) subfamília ICE: que inclou les caspases 1, 4 i 5
- B) subfamília CED-3: que inclou les caspases 3, 6, 7, 8 i 9
- C) subfamília ICH-1/Nedd2 (Ice i CED-3 homòleg): que inclou la caspasa 2

#### 1.2.3.1 CASPASA 1 (ICE-1)

La forma inactiva és una proteïna de 45 kDa. La forma activa s'obté a partir de l'eliminació d'un pèptid N-terminal de 11 kDa i un pèptid d'unió de 2 kDa de la forma inactiva mitjançant autoproteolisi i és un tetràmer constituït per dues subunitat de 20 kDa que es disposen rodejant dues subunitats de 10kDa.

Aquesta caspasa es localitza en el citoplasma de les cèl·lules en forma de pro-caspasa, tot i que també se'n troba en la superfície externa de la membrana cel·lular, en menor quantitat, on allí produeix la maduració de la Interleuquina-1 $\beta$ .

Tot i que va ser una de les primeres caspases en descriure's, els estudis bioquímics realitzats amb aquesta caspasa indiquen que no té un paper massa protagonista en l'apoptosi<sup>108</sup>, però si que pot ésser important en d'altres tipus de mort fisiològica com per exemple l'apoptosi induïda per Fas, en l'apoptosi dels macròfags infectats per bacteris o en l'apoptosi dels limfòcits T induïda pel factor de creixement tumoral (TGF- $\beta$ )<sup>109</sup>.

### 1.2.3.2 CASPASA 2 (ICH-1/Nedd2)

Aquesta caspasa codifica proteïnes similars a la caspasa 1 i tenen seqüències molt similars.

L'ARNm de ICH-1, alternativament dona lloc a dues seqüències diferents, una d'elles de 435 aminoàcids anomenada ICH-1<sub>i</sub> i l'altra de 312 aminoàcids anomenada ICH-1<sub>s</sub>. S'ha observat que una sobreexpressió de ICH-1<sub>i</sub> en determinats tipus cel·lulars condueix cap a l'apoptosi, mentre que una sobreexpressió de ICH-1<sub>s</sub> actua com a supressor de l'apoptosi; és a dir, la caspasa 2 o ICH-1 té un paper tant en la regulació positiva com negativa de l'apoptosi.

Estudis *in vitro* han mostrat que la caspasa 2 tant pot ésser activada per la caspasa 1 com per la caspasa 3 com pel granzim B.

### 1.2.3.3 CASPASA 3 (CPP32)

La caspasa 3 també anomenada CPP32 (*cistein proteasa de 32kDa*), YAMA (nom Hindú del Déu de la mort) o apopain, és la caspasa que millor s'ha relacionat amb l'apoptosi. És membre de la subfamília CED-3 i es troba àmpliament distribuïda, amb una alta expressió en les línies cel·lulars d'origen limfocític la qual cosa suggereix que pot ésser un important mediador de l'apoptosi en sistema immunitari. Estudis realitzats en ratolins han observat que en absència de la caspasa 3 es produeix una disminució de l'apoptosi, indicant, per tant, la importància d'aquesta caspasa en l'apoptosi.

De la forma inactiva de 32 kDa de pes molecular, mitjançant proteolisi, s'obtenen dues subunitats actives de 17 a 20kDa una i de 10 a 12kDa la segona que s'uneixen per formar un heterotetràmer actiu en el què cada subunitat per sí sola no és efectiva<sup>110</sup>.

Aquesta activació de la caspasa 3 es duu a terme pel granzim B que actua directament sobre la pro-caspasa 3 o bé activant una altra pro-caspasa que a la vegada activarà la caspasa 3.

#### 1.2.3.4 CASPASA 4 (ICH-2/TX/ICE<sub>rel</sub>II)

És membre de la mateixa família que la caspasa 1 però té una especificitat diferent pel substrat i és menys eficaç en l'activació de la pro IL-1 $\beta$  que la caspasa 1. Té una distribució tissular similar a la de la caspasa 1 però amb una menor expressió; s'ha trobat en molts teixits a excepció del cervell.

Nivells apreciables de caspasa 4 s'han localitzat en fetge, pulmó, ovari i placenta; òrgans on no es sol trobar la caspasa 1.

Aquesta caspasa sembla estar involucrada en l'activació de la pro-caspasa 1, que es dona pel tall després d'un residu d'Asp en les posicions 119, 297 i 316.

Una sobreexpressió d'aquesta caspasa condueix a l'apoptosi.

#### 1.2.3.5 CASPASA 5 (ICE<sub>rel</sub>III/TY)

A l'igual que la caspasa 4, forma part de la mateixa família que la caspasa 1, té una distribució i acció similar a la caspasa 4 però la seva activitat és molt menor i es troba en els teixits en quantitats més baixes que la caspasa 4<sup>111</sup>.

Una sobreexpressió d'aquesta caspasa també condueix a l'apoptosi.

#### 1.2.3.6 CASPASA 6 (Mch2)

És un membre de la família CED-3 a l'igual que la caspasa 3 amb la qual comparteix moltes similituds.

Codifica una proteïna de 293 aminoàcids amb un pes molecular aproximat de 34 kDa. Se'n coneixen dues isoformes, una d'elles de 34 kDa anomenada Mch2 $\alpha$  i l'altra que conté una delecció corresponent als nucleòtids 119-385 de la seqüència de Mch2 $\alpha$ , que codifica una proteïna de 204 aminoàcids i un pes molecular aproximat de 23 kDa anomenada Mch2 $\beta$ . Aquesta última, sols conté la meitat de la subunitat p20 i probablement és catalíticament inactiva.

## **INTRODUCCIÓ**

---

Estudis realitzats en cèl·lules d'insectes, s'ha observat que l'expressió de Mch2 $\alpha$  i la no expressió de Mch2 $\beta$  activa l'apoptosi<sup>112</sup>.

És la caspasa 3 qui activa la pro-caspasa 6 tallant en tres llocs de residus d'Asp (Asp23, Asp179 i Asp193) donant lloc a la formació d'una subunitat gran (p18) i una subunitat petita (p11) que formen la caspasa 6. Però alguns estudis realitzats en ratolins també han demostrat que pot ésser la caspasa 6 qui activi la pro-caspasa 3<sup>113</sup>.

### **1.2.3.7 CASPASA 7 (Mch3/ICE-LAP3/CMH-1)**

També se l'anomena Mch3/JCE-LAP3/CMH-1 i forma part de la família CED-3. És una proteïna de 303 aminoàcids que mostra moltes similituds amb la caspasa 3.

S'expressa en molts teixits fetals i també adults amb una expressió més baixa en el cervell. La seva forma activa està formada per dues subunitats similars a la d'altres caspases de la seva família.

A l'igual que la caspasa 3, la caspasa 7 té una funcionalitat similar i mostra especificitat per substractes similars. Ambdues tallen la PARP (polimerasa ADR-ribosomal) durant l'apoptosi i aquesta acció es pot donar per una combinació de funcions entre ambdues caspases.

S'ha descrit una isoforma de la caspasa 7 que pot actuar com a regulador negatiu de l'apoptosi<sup>114</sup>.

### **1.2.3.8 CASPASA 8 (MACH/FLICE/Mch5)**

Coneguda també amb el nom de MACH/FLICE, pertany a la subfamília ICH-1/Nedd2 junt amb les caspases 6, 9 i 10.

Aquesta es dona en moltes isoformes, probablement produïda per unions alternatives, algunes de les quals contenen una regió comú a les caspases.

Anàlisis realitzats amb Northern Blot revelen una heterogeneïtat de transcripcions de caspasa 8 que varien en quantitat i mida en diferents teixits humans.

La caspasa 8 és activada pel granzim B. una sobreexpressió de caspasa 8 produeix apoptosi mentre que mutacions en el residu catalític de cisteïna aboleixen el seu potencial apoptòtic.

Aquesta marcada heterogeneïtat de isoformes de caspasa 8 comparada amb d'altres caspases, podria ser un mecanisme per alguns teixits o cèl·lules per a protegir-se contra l'acció de CD95 o TNF.

La caspasa 8 recombinant és capaç de processar i/o activar totes les caspases conegudes incloent des de la caspasa 1 a la 7 i la 9 i la 10. Per tant, la caspasa 8 activa la cascada de les proteases i aquesta s'activaria per determinats estímuls com ara el CD95 o el TNF.

El mecanisme pel que s'activa la caspasa es produeix quan aquesta caspasa s'uneix al domini efector de mort de FADD a través d'un anàleg d'aquest domini present e la pro-caspasa 8 (forma inactiva). El reclutament de la caspasa 8 pel receptor FAS provoca la oligomerització de la caspasa 8 i la seva autoactivació iniciant així la cascada.

#### 1.2.3.9 CASPASA 9 (ICE-LAP6/Mch6)

També se l'anomena ICE-LAP6/Mch 6. Estudis per determinar els gens relacionats amb la caspasa 7 varen obtenir un ADN que codificava una nova proteïna de 416 aminoàcids amb un pes molecular de 46 kDa que es va identificar com la caspasa 9. Aquesta caspasa forma part de la subfamília CED-3 i dins d'aquest grup mostra una alta similitud amb la caspasa 3. La principal diferència entre aquesta caspasa i la resta de membres de la subfamília és que en el lloc actiu hi té un residu de Gly en lloc de Arg.

Determinacions elevades d'aquesta caspasa s'han localitzat en el cor, testicle i ovari.

La pro-caspasa 9 conté dos llocs de processament situats entre les subunitats llarga i curta. Un d'aquests llocs és activat per la pro-caspasa 3 i l'altra pel granzim B.

## **INTRODUCCIÓ**

---

Estudis realitzats *in vitro* han demostrat que tant la caspasa 3 com el granzim B activen la pro-caspasa 9 tot i que segons quin d'ells ho fa el producte té mides diferents, de manera que si és activada per la caspasa 3, el producte generat està format per unes subunitats de 37 i 10 kDa, mentre que el generat pel granzim B té un pes global de 85 kDa.

L'habilitat de la caspasa 3 per activar la pro-caspasa 9 suggereix que aquesta última es troba situada en la cascada de les proteases en un nivell per sota del que ho està la caspasa 3 i que n'és, en part, la responsable dels posteriors canvis observats en la cèl·lula sotmesa a apoptosi.

### **1.2.3.10 CASPASA 10 (Mch4)**

Forma part de la mateixa subfamília que la caspasa 9, la subfamília CED-3, i està molt més relacionada amb la caspasa 8 que no pas amb la resta de membres de la subfamília.

A l'igual que la caspasa 8, té un pentapèptid en el lloc actiu i dues zones similars a FADD en el domini *N-terminal* suggerint un possible paper del CD95 o del TNF en la seva activació.

La caspasa 10 activa s'obté del tall produït en el residu Asp 372 en la cadena polipeptídica simple que forma el pro-enzim o pro-caspasa.

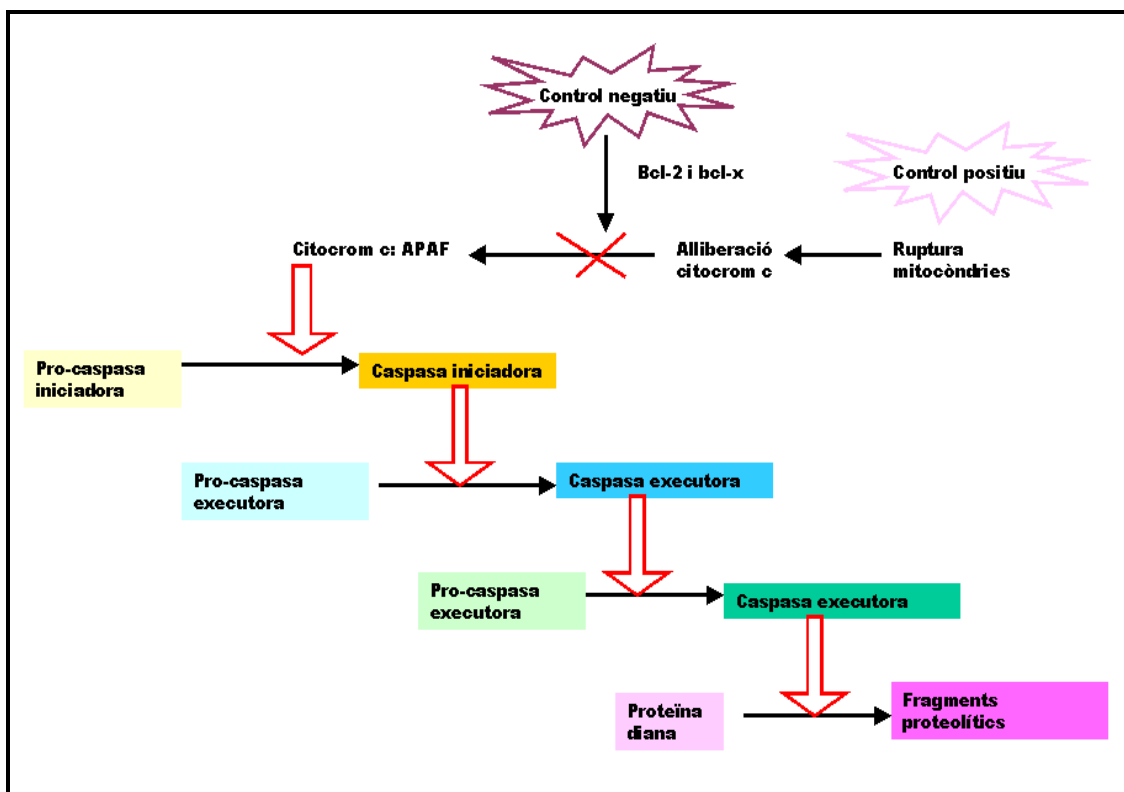
Els anàlisis realitzats mitjançant Northern Blot mostren que el ARNm de la caspasa 10 és present en molts teixits, amb major expressió en cor, fetge i melsa i menor expressió en cervell, ronyó, pròstata, testicle i colon.

La caspasa 10 recombinant purificada processa totes les altres caspases, incloses la 3, la 7 i la 10, mentre que ni la caspasa 3 ni la 7 poden activar la pro-caspasa 10, això ens demostra que la caspasa 10 es troba situada en l'àpex de la cascada d'activació de les caspases.

Un estudi recent suggereix que mutacions en la caspasa 10 poden estar involucrades en la Síndrome Limfoproliferativa Autoimmune tipus II<sup>115</sup>.

### 1.2.4 MECANISMES D'ACTIVACIÓ DE LES CASPASES (Cascada de Proteases)

La cascada de les proteases és un sistema d'amplificació. Un estímul inicial activa un zimogen afavorint la maduració d'un enzim actiu. El primer grup d'enzims activa un segon grup de zimògens i així successivament, produint l'amplificació de l'estímul. Un sistema similar al de les caspases és el sistema d'activació del complement que dóna lloc a la coagulació (figura 7).



**Figura 7.** Esquema d'activació de la cascada de les caspases

(de: Luque J, Heráez A. *Biología molecular e ingeniería genética*. Harcourt 2001, pág 432)<sup>116</sup>

De totes les caspases conegudes en les cèl·lules de mamífers, en funció del seu moment d'activació es poden classificar en caspases iniciadores, com ho serien les caspases 2, 8, 9 i 10, i les caspases executores, com ho serien les caspases 3, 6 i 7<sup>117</sup>.

## INTRODUCCIÓ

---

Tal i com el seu nom indica, les caspases iniciadores són les situades en l'inici de la cascada d'activació mentre que les executores es situen en les fase finals de la cascada i són les responsables dels canvis que es produeixen en la cèl·lula. La seva activació es dona de manera seqüencial.

Com ja s'han comentat, l'activació de la cascada de les caspases es pot donar per diferents vies:

- Activació de les caspases cascada amunt: ja sigui produïda per les pròpies caspases o bé per l'enzim granzim B, l'única proteasa de mamífer capaç de processar pro-caspases de forma específica. Aquest enzim és produït pels limfòcits T citotòxics i explica, en part, l'efectivitat citotòxica d'aquestes cèl·lules.
- Activació de la cascada a través d'apoptosi induïda pel receptor: succeeix en estimular receptors de la família dels receptors de citoquines similars al TNF, com Fas/CD95/Apo1, el receptor de TNF p55, el DR3/TRAMP/wsl-1/Apo3/LARD/AIR o el DR4/TRAIL-R1/Apo2<sup>118-120</sup>.

Aquests receptors tenen dominis d'interacció proteïna-proteïna, denominats dominis de mort en la seva regió intracel·lular, els quals acoblen a pro-caspases mitjançant molècules adaptadores. Les primeres caspases que s'activen en resposta a estímuls extracel·lulars apoptòtics com el TNF o el lligant Fas (Fas-L o CD95L) són la caspasa 8 i la 10 i aquestes poden activar a zimògens de les caspases 1 i 3.

De tots ells, el sistema que millor s'ha descrit és el del receptor Fas on l'activació dels dominis de mort produeix el reclutament de la pro-caspasa 8. Quan aquesta pro-caspasa s'uneix al domini de mort de la proteïna FADD que, a la vegada, es troba acoblada al receptor, la caspasa 8 és activada, probablement per autoprocessament.



- Activació mitjançant la translocació del citocrom c de les mitocòndries cap al citoplasma: es pot donar com a resposta a un augment de la producció de radicals lliures (estrès oxidatiu), a un augment de la concentració de calci citoplasmàtic o a una expressió de proteïnes pro-apoptòtiques com bax<sup>113,121-123</sup>. Un cop en el citosol, el citocrom c interactua amb factors activadors de l'apoptosi (Apaf). El complex format inclou la pro-caspasa 9 que passa a forma activa per autocatàlisi. La funció de la caspasa 9 seria l'activació de la caspasa 3 que és considerada la caspasa central de la fase d'execució.

L'activació de l'apoptosi induïda pel CD95 fa que entre l'activació de les caspases iniciadores i les executores passin entre 60-120 minuts i és durant aquest temps que es produeix una alteració de la membrana mitocondrial<sup>124</sup>. Aquest fet suggereix que les caspases iniciadores han d'actuar primer sobre la mitocondria, ja sigui directa o indirectament, per alliberar les proteïnes intermembrana i produir l'activació de les caspases executores.

Les caspases poden ser considerades com enzims de restricció ja que catalitzen la hidròlisi d'un enllaç peptídic sols quan es troba a prop un residu d'àcid aspàrtic dins d'una seqüència específica. Aquests enzims tenen un locus que reconeix la seqüència diana i un locus actiu on el centre catalític es troba amb el residu de cisteïna i un residu d'histidina<sup>117</sup>. El locus que reconeix el residu d'àcid aspàrtic és el que confereix especificitat a l'enzim i permet que s'uneixi al pèptid de tal manera que l'enllaç peptídic que serà hidrolitzat quedi en línia amb el locus actiu.

L'activació de les caspases s'ha relacionat amb la ruptura de múltiples proteïnes citoplasmàtiques i nuclears que s'agrupen en proteïnes estructurals, proteïnes reguladores de transcripció, proteïnes de senyalització i proteïnes involucrades en el metabolisme del ADN/ARN<sup>125</sup>.

## **INTRODUCCIÓ**

---

La caspasa 8 es troba en la punta de la cascada apoptòtica i és la primera en activar-se quan les cèl·lules són estimulades amb Fas o TNF. La caspasa 8 és molt sensible a ser inhibida per CrmA (Modificador de l'activitat de la citoquina tipus A), mentre que d'altres caspases ho són menys (la caspasa 10 necessita 1000 cops més CrmA per a produir el mateix efecte).

El bcl-2 és un potent inhibidor de l'apoptosi, fet que indueix a pensar que intervé en algun punt abans de l'activació de les caspases executores de la mort cel·lular (caspasa 3 i 7). S'ha evidenciat que membres de la família del bcl-2 (per exemple bcl-xL) tenen efecte antiapoptòtic ja que, eviten la translocació del citocrom c (Apaf-2) de la mitocòndria al citoplasma<sup>126</sup>, ja que estableix la membrana mitocondrial<sup>113</sup>. Es produeix una activitat competitiva i de segrest del complex citosòlic format per Apaf-1 i Apaf-3 (pro-caspasa 9), evitant l'activació de la caspasa 9 i, indirectament, de la caspasa 3 i la 7, produint-se el bloqueig de la fase d'execució de l'apoptosi.

### 1.2.5 DETECCIÓ I MESURA DE LES CÈL·LULES APOPTÒTIQUES

El procés apoptòtic, a diferència de la necrosi, es dona en cèl·lules aïllades, en un nombre escàs i la seva detecció es fa difícil si, a més a més, hi afegim que el procés té una curta durada. Els mètodes existents es basen en la detecció de canvis morfològics, de la fragmentació de l'ADN, de canvis citoplasmàtics o d'alteració de la membrana cel·lular.

### 1.2.6 DETECCIÓ DE CANVIS MORFOLÒGICS

#### 1.2.6.1 Índex Apoptòtic

Nombre de cèl·lules apoptòtiques per mm<sup>2</sup> de teixit tumoral<sup>127-129</sup> o percentatge de cèl·lules que es troben en apoptosi<sup>130-133</sup>. Es conten les cèl·lules en seccions tenyides amb hematoxilina-eosina i mirades al microscòpic òptic. La variació metodològica que dona aquesta tècnica no permet fer comparacions entre diferents estudis, però tot i aquestes premisses, és el mètode morfològic més utilitzat.

#### 1.2.6.2 Microscopia electrònica

Aquest mètode s'utilitza per poder estudiar els canvis ultraestructurals d'una cèl·lula apoptòtica individualment i obtenir informació qualitativa.

#### 1.2.6.3 Citometria de flux

Permet una valoració quantitativa de cèl·lules apoptòtiques basada en una disminució de la llum reflectida a causa de la compactació de l'ADN.

### **1.2.7 DETECCIÓ DE LA FRAGMENTACIÓ DE L'ADN**

#### **1.2.7.1 Mesurar l'activitat de l'endonucleasa**

Degut a la fragmentació de l'ADN en fragments de 180 a 200 parells de bases per les endonucleases, l'electroforesi de l'ADN en gel d'agarosa mostra un patró típic en escala.

#### **1.2.7.2 Mesurar la quantitat d'ADN per citometria de flux**

A diferència de les cèl·lules necròtiques que no presenten disminució de la quantitat d'ADN, les cèl·lules apoptòtiques sí, i això permet diferenciar-les.

#### **1.2.7.3 Mètode TUNEL i mètode ISEL**

Ambdós mètodes es basen en la detecció dels fragments d'ADN per determinar el nombre de cèl·lules apoptòtiques<sup>134</sup>. Aquests fragments són detectats ja que en l'extrem 3'hidroxil-terminal s'hi uneixen nucleòtids modificats. L'ADN queda marcat i es pot visualitzar per tècniques immunohistoquímiques.

Aquesta tècnica requereix especial compte ja que les cadenes d'ADN de cèl·lules mortes per necrosi poden donar resultats falsos positius, per tant, s'ha de separar les àrees on s'observa necrosi. També s'ha de tenir en compte en l'excés de digestió proteica durant la realització de la tècnica.

### **1.2.8 DETECCIÓ DE CANVIS CITOPLASMÀTICS**

#### **1.2.8.1 Activitat enzimàtica intracel·lular**

Tal i com s'ha comentat prèviament, les caspases tenen un paper important en l'apoptosi, en concret en la fase d'execució i aquestes es poden detectar mitjançant fluorescència<sup>135</sup>.

També es pot detectar l'activació de la transglutaminasa tissular (tTG) que intervé en el procés mitjançant determinats anticossos que la detecten immunohistoquímicament.

#### 1.2.8.2 Canvis en el calci citoplasmàtic

Durant l'apoptosi es produeix una elevació constant del calci citoplasmàtic ja que disminueix la producció d'energia durant el procés. Les determinacions del calci poden utilitzar-se per identificar l'apoptosi cel·lular<sup>136,137</sup>.

#### 1.2.8.3 Alteració de la funció mitocondrial

En les fases inicials de l'apoptosi es produeix una alteració del potencial de membrana mitocondrial. Les cèl·lules sanes a diferència de les apoptòtiques, poden emmagatzemar alguns fluorocroms gràcies a aquest potencial de membrana. Quan aquesta capacitat es perd és un indicador de la cèl·lula apoptòtica<sup>138,139</sup>.

S'ha observat que les cèl·lules en les fases inicials de l'apoptosi expressen una proteïna de 38 kDa en la membrana mitocondrial<sup>140</sup>, aquesta es pot detectar mitjançant anticossos marcats, però no és específica ja que també apareix en les cèl·lules necròtiques<sup>141</sup>.

### **1.2.9 DETECCIÓ DE CANVIS EN LA MEMBRANA CEL·LULAR**

#### 1.2.9.1 Capacitat d'eliminar colorants

Les cèl·lules apoptòtiques tenen alterada l'arquitectura de la membrana cel·lular però no la seva integritat ni les seves funcions bàsiques, característica que no es dona en les cèl·lules necròtiques. Les cèl·lules en apoptosi no acumulen en el seu interior determinats colorants com el "Trypan blau" o el "Propidium Iodide" mentre que les cèl·lules necròtiques sí que els acumulen i per tant queden tenyides<sup>142-144</sup>.

### **1.2.9.2 Distribució de fosfolípids**

S'ha observat que en les cèl·lules apoptòtiques independentment de quin hagi estat l'estímul inductor, es produeix una redistribució dels fosfolípids de la membrana cel·lular, així, la fosfatidilserina, que normalment s'expressa en la capa interna de la membrana cel·lular, en aquestes cèl·lules ho fa en la capa externa<sup>145,146</sup>. Aquest canvi es pot detectar mitjançant microscopi de fluorescència, citometria de flux o radiacions gamma, utilitzant en aquest cas una proteïna humana (Annexin V) marcada amb tecneci 99m<sup>147</sup>.

## 1.3 APOPTOSI I CÀNCER DE MAMA

### 1.3.1 RELACIÓ ENTRE ELS GENS REGULADORS DE L'APOPTOSI I EL CÀNCER DE MAMA

Una alteració en els gens que regulen l'apoptosi pot desencadenar un càncer. L'apoptosi és bloquejada pel gen bcl-2. El paper de bcl-2 fou el primer en descriure's essent el resultat d'una translocació cromosòmica, t(14;18), en limfomes de cèl·lula B i ha estat reconegut com a factor de supervivència per a molts tipus de cèl·lules<sup>148-149</sup>. Degut al seu efecte antiapoptòtic s'ha considerat resistent a múltiples fàrmacs citotòxics.

Quan l'expressió de bcl-2 i les proteïnes relacionades amb bcl-x estan augmentades, poden actuar com a potents inhibidors de l'apoptosi. El bcl-2, bcl-x, bak i bax s'expressen en l'epiteli ductal de la mama normal i en part dels carcinomes de mama<sup>150-156</sup>. L'expressió de gens inhibidors de l'apoptosi com bcl-2 i bcl-x en els tumors de mama varia des d'un 57 a 63.75% mentre que l'expressió de gens afavoridors d'apoptosi com bax i bak és del 50% en tumors amb bcl-2 negatiu.

S'ha observat l'existència d'una relació entre l'expressió de bcl-2 i tumors petits (< 2 cm), amb receptors estrogènics positius i escassa proliferació cel·lular. També s'ha descrit relació entre bcl-2 i grau histològic I, falta de necrosi tumoral, expressió baixa de catepsina D i fracció baixa de fase S.

L'expressió de bcl-2 és un indicador de poques recidives i metàstasis a distància mentre que l'expressió de bcl-x s'associa a un augment de metàstasis en els ganglis de l'aixella, està relacionat amb tumors d'alt grau<sup>157</sup> i no s'ha observat relació amb la positivitat dels receptors hormonals ni amb l'expressió de la p53. En un treball realitzat prèviament a aquesta tesi en la que es valorava l'expressió immunohistoquímica de diversos gens com ara el bcl-2, bax, bag, p53 i la tècnica de TUNEL com a mètode de

## **INTRODUCCIÓ**

---

valoració de l'apoptosi, els resultats que s'obtingueren en l'anàlisi multivariat mostraren que el bcl-2 actua com a factor protector tant per la recidiva com per a la mort de la pacient<sup>158</sup>.

Les proteïnes relacionades amb els gens bcl-2 i bax aporten informació sobre el pronòstic del carcinoma de mama amb ganglis limfàtics negatius. El bcl-2 prediu la supervivència, però el seu significat pronòstic depèn de l'expressió de p53<sup>159,160</sup> i l'expressió de bax sembla tenir valor predictiu positiu per la resposta a la quimioteràpia en pacients pre-menopàusiques amb carcinoma de mama i ganglis negatius<sup>161</sup>.

Dels gens promotors de l'apoptosi destaca el gen supressor de tumors p53<sup>94,128</sup>. Aquest gen origina apoptosi o detecció del creixement i té un paper important en la quimioteràpia antineoplàstica ja que està sotmès a freqüents mutacions que poden donar lloc a resistències als tractaments<sup>162</sup>. La p53 salvatge, pot aturar el cicle cel·lular en la fase G1 quan s'ha de reparar qualsevol mutació que s'hagi produït. Quan els mecanismes de reparació de l'ADN fracassen, aleshores, la p53 pot induir apoptosi. Els carcinomes infiltrants de mama que expressen la p53 mutada presenten pitjor pronòstic i responen pitjor al tractament quimioteràpic<sup>163,164</sup>.

Múltiples estudis intenten buscar l'existència d'una relació entre l'expressió dels diferents gens que regulen l'apoptosi i el pronòstic de les pacients així com establir la supervivència i resposta al tractament adjuvant.



### 1.3.2 RELACIÓ ENTRE L'ÍNDEX APOPTÒTIC I D'ALTRES PARÀMETRES

#### 1.3.2.1 Mida tumoral

Alguns estudis han trobat relació entre un índex apoptòtic alt i una mida tumoral gran<sup>165,166</sup>, mentre que d'altres estudis no ha observat aquesta relació<sup>127,167</sup>. En un estudi realitzat prèviament per Sirvent i col·laboradors<sup>158</sup> l'anàlisi multivariat mostrà que la mida tumoral és valor pronòstic independent per la recidiva del tumor.

#### 1.3.2.2 Mitosis i Índex de proliferació cel·lular (Ki-67)

El nombre de cèl·lules apoptòtiques està en estreta relació amb el nombre de mitosis<sup>127,165,167-169</sup>.

També s'ha observat una relació entre un Ki-67 elevat amb un índex apoptòtic alt<sup>131,170,171</sup>. L'existència d'aquesta relació suggereix mecanismes reguladors genètics comuns. L'oncogen c-myc, entre d'altres, pot ésser un dels responsables ja que promou la proliferació cel·lular en presència de factors de creixement. Quan el c-myc està activat s'indueix la proliferació cel·lular i l'apoptosi<sup>172</sup>. L'amplificació del c-myc està associat a un índex de proliferació cel·lular elevat i un pitjor pronòstic en el càncer de mama<sup>173,174</sup>.

D'altra banda, s'ha observat que el nombre de mitosis es correlaciona amb el valor de l'índex apoptòtic. Aquest fet podria suggerir l'existència de mecanismes que interactuessin entre la proliferació tumoral i l'apoptosi, els quals podrien ésser associats a pitjor pronòstic<sup>127,129,165,167-169</sup>. Així, alguns autors han descrit l'existència d'una associació entre un alt IA, un increment de la proliferació cel·lular, una positivitats de la p53<sup>127,130,165-167,175</sup> i la presència de necrosi tumoral<sup>176</sup>.

S'ha descrit una relació entre l'índex de proliferació cel·lular, els receptors hormonals i la sobreexpressió de c-erbB2, de manera que la presència d'un alt índex de proliferació cel·lular juntament amb una amplificació de l'expressió de c-erbB2 i receptors hormonals negatius indicava un alt risc de recidiva tumoral<sup>61</sup>.

## ***INTRODUCCIÓ***

---

Quan la relació s'establia amb la p53, una sobreexpressió de p53 juntament amb receptors negatius i un alt índex de proliferació cel·lular indicava un tumor amb molta agressivitat i un alt risc de recidiva<sup>62</sup>.

### ***1.3.2.3 Grau histològic***

L'índex apoptòtic en el grau III pot ésser el doble que en el grau I, mentre que el grau II tindria un valor intermedi<sup>127,128,130,132,165</sup>. Això indica que tumors poc diferenciats amb una proliferació cel·lular alta, tenen un índex apoptòtic alt.

### ***1.3.2.4 Ploidia de l'ADN i fracció de la fase S***

S'ha observat una relació positiva entre apoptosi i aneuploidia<sup>127,167</sup>. L'índex apoptòtic és, al voltant, d'un 30% més elevat en els tumors aneuploides que en els diploides<sup>127</sup>.

Un fet similar es produeix amb la fracció de la fase S que mostra una relació positiva amb l'índex apoptòtic<sup>127,167</sup>.

En el carcinoma ductal in situ s'observa una associació amb els receptors hormonals positius, bcl-2 positiu, ADN diploide i baix índex proliferatiu<sup>3</sup>.

### ***1.3.2.5 Receptors d'estrògens i progesterona***

Dos estudis que inclouen més de 1000 casos de carcinoma de mama<sup>127,167</sup> mostren una relació entre receptors hormonals negatius i un índex apoptòtic elevat. Els tumors amb receptors estrogènics positius acostumen a tenir un índex apoptòtic menor que els tumors amb receptors estrogènics negatius. Uns resultats similars s'observen amb els receptors de progesterona.

Altres treballs amb sèries menors no obtenen els mateixos resultats<sup>165,177</sup>.

Tot i això, en general, es pot concloure que existeix una relació inversa entre els receptors i l'índex apoptòtic.

### 1.3.2.6 p53

El paper que té la p53 en la proliferació cel·lular i en l'apoptosi encara no està aclarida del tot. Tal i com hem comentat, la p53 salvatge pot aturar el cicle cel·lular en la fase G1 inhibint la proliferació cel·lular. D'altra banda també pot regular una major expressió de bax i disminució del bcl-2 afavorint l'apoptosi<sup>178</sup>, per tant, mutacions en el gen de la p53, que afavoreixen la sobreexpressió de formes mutants de la proteïna, s'han associat a una menor supervivència<sup>179-184</sup>.

En els carcinomes infiltrants de mama, sovint presenten una marcada positivitats immunohistoquímica per a p53, que sol ésser mutada amb una vida mitjana més llarga que la p53 salvatge que és incapaç de provocar l'expressió de bax i per tant perdria la capacitat d'induir apoptosi<sup>166</sup>.

El percentatge de casos p53 positius publicats en la literatura oscil·la entre 11 i 58%<sup>165,185-192</sup>. El percentatge de casos positius que es van observar en l'estudi previ<sup>158</sup> fou del 19.4%, resultat sensiblement inferior a l'obtingut en treballs publicats prèviament (45.3%)<sup>162</sup>, però similar a d'altres treballs<sup>193,194</sup>.

Els tumors que expressen p53 tenen també un alt índex proliferatiu<sup>174</sup> i també un alt índex apoptòtic<sup>127,130,165,167</sup>. També s'ha associat a un pitjor pronòstic<sup>182</sup>.

Alguns treballs han trobat una correlació entre un cúmul de p53, negativitat per als receptors d'estrògens, tumors d'alt grau, afectació de ganglis limfàtics, índex mitòtic elevat i augment de la proliferació cel·lular<sup>171</sup>. D'altres han relacionat la p53 amb apoptosi i necrosi<sup>175</sup>.

Se sap que la mutació de la p53 promou la progressió tumoral reduint l'apoptosi, però els efectes de la inactivació de la p53 no estan clars. Es creu que podrien produir una pèrdua del control del cicle cel·lular, augment de la proliferació cel·lular i més apoptosi<sup>177</sup>.

### 1.3.2.7 Bcl-2

Aquest, s'expressa en el carcinoma ben diferenciat de mama amb receptors hormonals positius<sup>194</sup>. El bcl-2 és un inhibidor de l'apoptosi<sup>195</sup> i les troballes observades en el càncer de mama així ho demostren<sup>130-132,167,194</sup>.

L'índex apoptòtic és un 30% més petit en els tumors bcl-2 positius que en els bcl-2 negatius<sup>127</sup> i l'expressió immunohistoquímica és inversament proporcional a l'índex apoptòtic<sup>194</sup>. Existeix una relació entre la presència de bcl-2 i la resposta a la teràpia endocrina, fins hi tot major que en el cas dels receptors hormonals<sup>195</sup>. El bcl-2 està associat a tumors de mida petita, receptors hormonals positius, baix grau histològic, estadi inicial i MIB-1 baix<sup>196-200</sup>. Aquesta relació també s'observa en el carcinoma ductal "in situ"<sup>3</sup>.

Tal i com s'ha comentat, en l'estudi realitzat previ a la tesi, els resultats mostraren que el bcl-2 actua com a factor protector tant per la recidiva tumoral com per la mort de la pacient a l'igual que d'altres sèries<sup>132,155,201-206</sup>, tot i que alguna publicada mostra resultats diferents<sup>207</sup>. El percentatge de casos bcl-2 positius en aquest estudi fou del 71.5%, resultat similar al publicat per d'altres sèries<sup>200-203,205,207-209</sup> o sensiblement superior a d'altres realitzats amb tècniques similars<sup>175,210,211</sup>.

Estudis recents mostren que la positivitat del bcl-2 actua com a factor pronòstic favorable per aquells casos de càncer de mama que rebin tractament quimioteràpic o hormonal<sup>212</sup>. Aquestes troballes no són compartides per tots els autors ja que, alguns determinen que l'efecte del bcl-2 en la sensibilitat antineoplàsica depèn del tractament anticancerigen que s'utilitzi<sup>213</sup>.

### 1.3.2.8 Pronòstic

L'índex apoptòtic pot tenir un gran valor pronòstic. Pacients amb alt índex apoptòtic presenten una supervivència més curta que aquelles que tenen un índex apoptòtic baix<sup>127,166,214</sup>. Tot i això, alguns autors, utilitzant la tècnica de TUNEL, no obtenen els mateixos resultats<sup>167</sup>, pot ésser degut a una falta d'uniformització en la metodologia i a una falta d'especificitat ja que la tècnica tenyeix també cèl·lules necròtiques i cèl·lules inflamatòries. En el nostre estudi, l'índex apoptòtic no va mostra significació pronòstica, en l'estudi multivariat, ni per la recidiva tumoral ni per la supervivència global<sup>158</sup> i aquests resultats són similars a d'altres publicats en la literatura<sup>127,129,166,169,175,212,215,216</sup>. El que sí es va observar fou una associació positiva entre l'índex apoptòtic i els factors clinicopatològics clàssics de mal pronòstic (mida tumoral gran, presència de necrosi, alt grau histològic i ganglis limfàtics positius)<sup>165,217</sup> tant per la recidiva com per la mortalitat.

### 1.3.3 **INDUIR APOPTOSI MITJANÇANT EL TRACTAMENT**

Molts agents anticancerígens maten les cèl·lules induint apoptosi. Les mitocondries i el receptor de superfície Fas són els principals mecanismes que condueixen a l'apoptosi<sup>218</sup>.

La via mitocondrial es creu que és la més important en la resposta al tractament del càncer i està regulada per la família de proteïnes del bcl-2. Una relació positiva entre els membres de la família bcl-2 proapoptòtics i els antiapoptòtics produeix la sortida del citocrom c de la mitocondria i desencadena la mort cel·lular mitjançant la cascada de les caspases.

El bcl-2 i bcl-xL són proteïnes antiapoptòtiques mentre que el bax és proapoptòtica i el bag-1 és una proteïna multifuncional que bloqueja l'apoptosi i interactua amb diversos tipus de proteïnes, inclosa la família del bcl-2<sup>219</sup>.

L'altre via que hem anomenat és la del receptor de superfície. El receptor Fas prové de la família de receptors de mort cel·lular dels factors relacionats amb la mort tumoral. La unió de Fas al seu lligant (FasL) activa l'apoptosi. La disminució de Fas s'ha observat en alguns tumors, entre ells, el de mama<sup>220</sup>, mentre que FasL es sobreexpressa, algunes vegades, en molts tumors, inclòs el de mama<sup>221,222</sup>. Alguns estudis han demostrat que determinats agents anticancerigens requereixen la mort del receptor fas i el seu lligant per induir mort cel·lular<sup>223,224</sup>.

Avui en dia no existeix cap marcador biològic que es pugui utilitzar, des del punt de vista clínic, per preveure la resposta del carcinoma a la quimioteràpia; mentre que, els receptors hormonals sí que permeten predir la resposta al tractament hormonal. Tot i que els factors estudiats no poden preveure la resposta al tractament, sí que s'ha vist que fasL i bcl-2 són clars factors pronòstics: pacients amb valors alt de fasL i bcl-2 baix tenen una menor supervivència.

Dos terços dels carcinomes de mama són receptors hormonals positius. Aquesta propietat es fa servir per retardar la proliferació cel·lular amb el tractament antiestrogènic i amb inhibidors de l'aromatasa. Estudis *in vitro* mostren un augment de l'apoptosi en el tractament antiestrogènic.

La quimioteràpia peroperatòria redueix l'apoptosi i la proliferació cel·lular i produeix un augment de bcl-2 en el càncer de mama residual<sup>225</sup>. Estudis experimentals *in vivo* o *in vitro*, mostren que l'activitat mitòtica disminueix i l'índex apoptòtic augmenta en les cèl·lules tumorals després de l'administració d'antiestrògens com ara el Tamoxifè<sup>226</sup>.

## **2 HIPÒTESI I OBJECTIUS**





## 2.1 HIPÒTESI DE TREBALL

El carcinoma de mama, tal i com s'ha comentat en la introducció té una alta prevalença avui en dia, sobretot en els països industrialitzats. Tot i els diversos tractaments que existeixen encara no són suficients per poder combatre'l i evitar la mortalitat per aquesta patologia.

El *screening* per a la detecció precoç del càncer de mama és la millor arma de la que es disposa per previndre'n la seva aparició i per què en cas de que es desenvolupi el càncer, l'estadi en el que es trobi serà molt inicial i més resposta tindrà al posterior tractament.

Un cop s'ha desenvolupat el càncer, el pronòstic dependrà de diversos factors que faran que aquest respongui més o menys al tractament.

Fins ara els factors pronòstics que més importància tenen són els que fan referència a característiques clínic-patològiques inherents del propi tumor, coneguts com els factors pronòstics clàssics, com són la mida tumoral, el grau histològic i la presència de metàstasis ganglionars. S'han estudiat d'altres paràmetres per veure si també tenien influència en el pronòstic i en el tractament d'aquest tipus de tumor, com per exemple l'expressió dels receptors hormonals en les cèl·lules tumorals, l'índex apoptòtic, l'índex de proliferació cel·lular i la sobreexpressió de determinats gens (bcl-2, bax, bag-1) entre d'altres, amb resultats que no són del tot uniformes en els diferents articles publicats en la literatura o que la seva rellevança no s'ha pogut equiparar amb la dels factors pronòstics clàssics.

D'altres articles fan referència a què determinats tumors tenen un índex apoptòtic més elevat tot i que després això no ha implicat un pitjor pronòstic. En el tema de l'apoptosi s'ha vist que hi intervenen diversos factors per a què la cèl·lula entri en el procés de mort programada, un camí sense retorn. Un dels elements més importants que fins ara

## ***HIPÒTESI I OBJECTIUS***

---

s'han descobert són las caspases, una cadena de proteases que per activació en cascada desencadenen la mort de la cèl·lula.

La hipòtesi que se'ns planteja a l'hora de realitzar la tesi és, per una banda veure si l'índex apoptòtic, l'índex de proliferació cel·lular i l'expressió immunohistoquímica de determinades caspases, en concret dues caspases executores com són la caspasa 3 i la caspasa 6, tenen alguna relació entre sí o amb d'altres paràmetres estudiats o bé, si algun d'ells presenten relació amb el pronòstic de la pacient o si més no, tenen alguna relació estadísticament significativa amb d'altres factors pronòstics ja coneguts.

## **2.2 OBJECTIUS**

### **2.2.1 OBJECTIU PRINCIPAL**

A partir de les dades clíniques que obtenim de cada pacient en el moment del diagnòstic i de les que hem anant recollint en el posterior seguiment, així com les dades anatomopatològiques, es realitza una descripció de les característiques de les pacients incloses en la sèrie amb el diagnòstic de carcinoma ductal infiltrant intervingudes quirúrgicament en l'Hospital Universitari Joan XXIII des de l'any 1988 fins a l'any 2001. S'analitzaran descriptiva i comparativament totes les dades com ara i es donarà especial importància a aquelles característiques clíniques (edat), histopatològiques (mida tumoral, estat dels ganglis limfàtics, grau histològic, necrosi...) i immunohistoquímiques (tunel, Ki-67, caspases) que tinguin especial interès en el pronòstic de la pacient.

### **2.2.2 OBJECTIUS ESPECÍFICS**

- a) Revisar histològicament tots els casos de carcinoma ductal infiltrant per tal de poder unificar els criteris histològics en el moment de gradar-los i evitar les diferències de subjectivitat.
- b) Recollir totes les dades clinico-patològiques necessàries per a la realització del posterior estudi estadístic, ja sigui a partir dels informes emesos en el servei d'anatomia patològica com de les dades que consten en les històries clíniques de cada pacient.
- c) Valorar les possibles diferències existents entre l'expressió immunohistoquímica de l'Índex apoptòtic i les característiques histològiques del tumor.
- d) Valorar les possibles diferències existents entre l'expressió immunohistoquímica de l'Índex de proliferació cel·lular i les característiques histològiques del tumor.

## **HIPÒTESI I OBJECTIUS**

---

- e) Valorar les possibles diferències existents entre l'expressió immunohistoquímica de les caspases i les característiques histològiques del tumor.
  
- f) Valorar si entre els diferents paràmetres estudiats existeixen relacions estadísticament significatives entre ells.
  
- g) Veure si l'expressió de tots aquests marcadors (caspases, Ki67 i apoptosi) tenen implicació pronòstica tant per a la supervivència com per a la mort de la pacient.

## **3 MATERIAL I MÈTODES**



### **3.1 TIPUS D'ESTUDI**

Estudi de cohorts retrospectiu i descriptiu

### **3.2 SEL·LECCIÓ DE LA MOSTRA**

Aquest estudi inclou 210 pacients consecutives diagnosticades de carcinoma ductal infiltrant (CDI) NOS de mama, varietat histològica més freqüent d'aquest carcinoma, en el servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, des de l'any 1988 fins a l'any 2001.

Les pacients incloses en l'estudi complien els següents criteris d'inclusió:

1. Diagnòstic de carcinoma ductal infiltrant NOS (no altres tipus histològics ni varietats del carcinoma ductal)
2. Estadis operables en el moment del diagnòstic, (pT1-pT2) de la classificació del TNM. Aquesta classificació inclou:
  - pT1: tumors de  $\leq 20$  mm
  - pT2: tumors de  $> 20$  mm i  $\leq 50$  mm.
3. No haver rebut tractaments previs per al carcinoma com ara quimioteràpia, radioteràpia o hormonoteràpia.

### **3.3 ESTUDI CLÍNIC**

De cada pacient es van obtenir les següents dades: edat en el moment del diagnòstic, tractament rebut en el moment del diagnòstic (tipus de cirurgia), tractament complementari posterior, presència de metàstasi (local o a distància), si es produïren recidives posteriors, els mesos de seguiment i en cas de mort de la pacient, si aquesta era deguda al carcinoma o a d'altres causes.

Aquesta informació necessària es va obtenir de les històries clíniques de cada pacient procedents de l'arxiu de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona o del centre oncològic de referència de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

### **3.4 CARACTERÍSTIQUES HISTOPATOLÒGIQUES**

L'estudi histològic es va realitzar sobre mostres incloses en parafina i posteriors seccions tenyides amb H&E.

Les peces eren rebudes en fresc en el servei d'anatomia patològica, es marcaven amb tinta xinesa per poder valorar la proximitat del tumor als marges quirúrgics i es realitzaven seccions d'aproximadament 1-2 mm que incloïen la tumoració i d'altres àrees sospitoses, així com també els marges i seccions representatives de la resta de la peça remesa. Aquestes seccions eren incloses en parafina i després es realitzaven seccions d'unes 3 µm i es tenyien amb hematoxilina - eosina.

De cada una d'elles es va determinar el tipus histològic, seleccionant només els CDI per tal d'evitar la dispersió dels valors entre els diferents tipus histològics, la mida tumoral expressada en mil·límetres, el nombre total de ganglis limfàtics presents en el buidament de l'aixella i el nombre de ganglis metastàtics, el grau histològic (GDH-SBR) i la presència o no de necrosi.



### **3.4.1 TIPUS HISTOLÒGIC**

Tots els tumors inclosos en l'estudi corresponen a CDI NOS. El tipus histològic es va determinar seguint els criteris establerts en la classificació de la WHO<sup>42</sup>.

### **3.4.2 GRAU HISTOLÒGIC**

El GDH s'ha determinat segons el mètode de Scarff-Bloom-Richardson (GDH-SBR)<sup>227,228</sup> amb la modificació establerta per Elston i Ellis<sup>229</sup>. Aquest mètode, tal i com ja s'ha comentat en la introducció, permet donar el grau de diferenciació en funció dels següents paràmetres: atípia nuclear (1.lleu, 2.moderada o 3.severa), nombre de mitosis (1.<5x10cga, 2. >5 i <10x10cga, 3. >10x10cga; sempre contades a 400X) i la presència de diferenciació tubular (1. >75% de túbuls en la mostra, 2. entre 10 i 75% de túbuls en la mostra, 3. <10% de túbuls o absència dels mateixos).

Amb la suma de la puntuació obtinguda per cada un dels paràmetres s'obté els diferents graus de diferenciació:

- Grau I: 3-5 punts
- Grau II: 6-7 punts
- Grau III: 8-9 punts

### **3.4.3 NECROSI TUMORAL**

S'ha valorat com a presència de necrosi si aquesta es donava en >10% de les seccions revisades del component infiltrant del tumor.

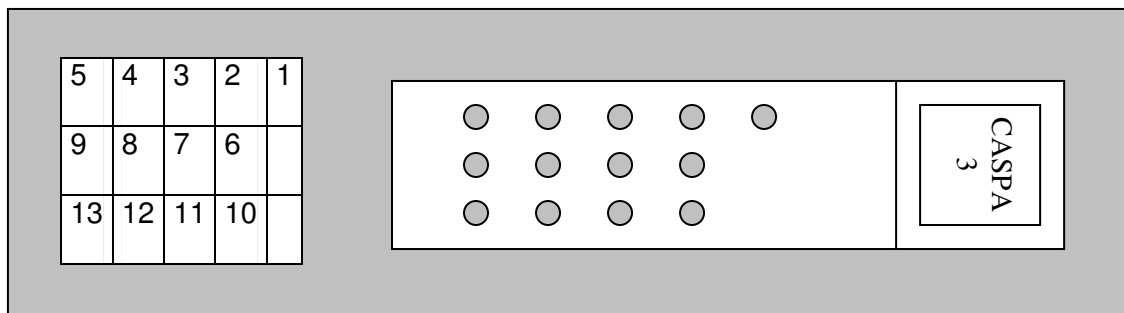
### **3.4.4 METÀSTASI A GANGLIS LIMFÀTICS**

En cas d'haver buidament ganglionar axil·lar, s'ha valorat el nombre total de ganglis limfàtics aïllats i el nombre total de ganglis que presentaven metàstasis pel tumor.

### 3.5 DETERMINACIONS IMMUNOHISTOQUÍMIQUES

Les determinacions immunohistoquímiques fetes per avaluar l'índex apoptòtic, l'índex de proliferació cel·lular i les caspases s'han realitzat sobre *tissue arrays*. De cada un dels 210 tumor s'ha seleccionat el bloc de parafina que contenia el fragment més representatiu del tumor i d'aquest bloc s'ha seleccionat la zona amb més parènquima tumoral per a fer la secció mitjançant un punx de 5 mm de diàmetre màxim. Cada un d'aquests *tissue arrays* s'han col·locat ordenadament en un nou bloc de parafina, de manera que cada *tissue array* es podia identificar segons la seva posició amb el cas al qual corresponia. Cada lamineta tenia una taula adjunta en la què constava a quin cas s'estava valorant (figura 8).

D'aquesta manera s'ha economitzat la quantitat de material de cada tumor, la quantitat de reactiu que s'ha d'utilitzar i el temps a l'hora de valorar cada cas.



**Figura 8.** *Tissue arrays*

### 3.5.1 ÍNDEX APOPTÒTIC (IA)

La identificació de les cèl·lules apoptòtiques s'ha realitzat amb el mètode TUNEL, seguint els procediments inclosos en *Apop Tag Plus In Situ Apoptosis Detection System®* (S7101 KIT, Oncor, Gaithersburg, MD).

Els passos que inclou aquest mètode són els següents:

- es desparafinen les preparacions amb xilol i es rehidraten amb alcohols decreixents durant un total de 18 minuts i s'esbandeixen amb PBS durant 5 minuts.
- A continuació, els teixits són digerits amb proteinasa K durant 15 minuts i després rentats en aigua destilada i amb PBS.
- Tot seguit es realitza la incubació de les seccions en una reacció que conté transferasa terminal i digoxigenina dUTP a 37°C durant 1 hora (55λ per cada preparació a partir d'una solució de treball de 77λ de reacció *buffer* i 33λ de TdT enzim, obtenint un total de 110λ útils per a dues preparacions – aquesta solució s'ha de guardar en nevera o en gel i consumir-la abans de 6 hores).
- Posteriorment es renten amb PBS, se'ls afegeix anticòs antidigoxigenina (65λ per preparació) aparellat amb peroxidasa de *Cochlearia armolacea* (75λ per preparació) i es fa una incubació durant 30 minuts a temperatura ambient.
- S'esbandeixen amb PBS, se'ls afegeix 3,3'-tetraclorat de diaminobenzidina durant 10 minuts i es contratenyeixen amb hematoxilina.

#### 3.5.1.1 AVALUACIÓ DE L'ÍNDEX APOPTÒTIC

L'IA ha estat definit com el nombre de cossos apoptòtics i cèl·lules que mostraren immunorreactivitat (nuclis o fragments de nuclis tenyits de color marró), contades en 5 camps de gran augment (Leica, objectiu de 40 augments, camp de 0.152mm<sup>2</sup>) i expressats en percentatge.

### **3.5.2 ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC PER CASPASES**

L'estudi immunohistoquímic per la determinació de les caspases s'ha realitzat amb els següents anticossos: Anticòs monoclonal Caspase 3 (CPP32) Ab-3 (Clona 3CSP03, NeoMarkers), que detecta tant la forma inactiva de 32 kDa com la forma activa com la inactiva de la caspasa 3 i Anticòs monoclonal Caspase 6 (Mch 2) Ab-3 (Clona 6CSP03, NeoMarkers) que també detecta la forma activa com la inactiva de la caspasa 6.

S'han seleccionat aquestes caspases pels següents motius:

- ⊗ S'han seleccionat anticossos monoclonals més específics per intentar obtenir uns resultats més acurats.
- ⊗ La caspasa 3 és una caspasa executora i la que s'ha demostrat que presenta un paper clau en l'activació en cascada de la resta de les caspases.
- ⊗ La caspasa 3 és la que presenta millor correlació en l'estudi de l'apoptosi segons la bibliografia consultada
- ⊗ La caspasa 6 és també una caspasa executora que presenta moltes similituds amb la caspasa 3 i que existeixen divergències entre sí és la caspasa 3 qui activa la caspasa 6 o a la inversa.
- ⊗ Per la facilitat respecte d'altres caspases en la realització de tot el procediment per a obtenir la tinció immunohistoquímica en el laboratori d'Anatomia Patològica.

El procediment de la tècnica immunohistoquímica d'aquestes dues caspases fou el següent:

- Les preparacions es van deixar tota la nit a l'estufa a 60°C. Posteriorment es varen desparafinar amb Xilol durant 10 minuts i es van rehidratar progressivament en alcohols (alcohol absolut 5 minuts, alcohol de 96° 5 minuts, alcohol de 50° 5 minuts i aigua destil·lada 5 minuts).
- A continuació es realitzà el desenmascarament antigènic amb microones i *buffer* citrat (ph=6) durant 5 minuts a 800 w de potència i seguidament 20 minuts a 400 w, fent polsos d'ebullició.
- Les preparacions es varen deixar reposar a temperatura ambient durant 20 minuts i després rentades amb aigua destil·lada.
- El següent pas fou incubar-les en aigua oxigenada (al 2% en PBS) durant 10 minuts.
- Tot seguit es van rentar amb aigua destil·lada i després amb PBS durant 5 minuts (ph=7.2 – 7.4).
- A continuació es realitzà la incubació amb l'anticòs primari durant 60 minuts [Anticòs monoclonal Caspase 3 (CPP32) Ab-3 (Clona 3CSP03, NeoMarkers) i Anticòs monoclonal Caspase 6 (Mch 2) Ab-3 (Clona 6CSP03, NeoMarkers)].
- Un cop passats els 60 minuts es varen rentar amb PBS durant 5 minuts.
- Es va completar la tinció immunohistoquímica amb el kit *Dako Peroxidasa – DAB* (1- incubació amb el lligant durant 30 minuts i posterior rentat amb PBS durant 5 minuts, 3- incubació amb HRP durant 30 minuts i posterior rentat amb PBS durant 5 minuts, 4- incubació amb DAB (20λ de DAB i 1 cc de *buffer* substrate) durant 5 minuts

- Posteriorment les preparacions es varen rentar amb aigua destil·lada i finalment contratenyides amb hematoxilina i un cop rentades i deshidratades, muntades amb DPX.

### **3.5.2.1 AVALUACIÓ DE LES CASPASES**

Es va avaluar el número de cèl·lules que mostraren positivitat, valorant positivitat citoplasmàtica i/o nuclear en funció de la tècnica contades en 5 camps de gran augment (Leica, objectiu de 40 augments, camp de 0.152mm<sup>2</sup>) i expressades en percentatge.

En el cas de la caspasa 3 la tinció és majoritàriament citoplasmàtica i pot presentar mínima tinció nuclear.

En el cas de la caspasa 6 la tinció és únicament citoplasmàtica.

### **3.5.3 ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC PER A L'ÍNDEX DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR KI-67**

L'estudi immunohistoquímic per a l'índex de proliferació cel·lular Ki-67 s'ha realitzat amb l'anticòs DAKO A047.

El procediment fou el següent:

- Les seccions varen ser desparafinades, rehidratades amb alcohols decreixents i tractades amb microones durant 5 minuts.
- Tot seguit es va realitzar la incubació amb aigua oxigenada al 3% durant 10 minuts.
- A continuació es varen rentar amb aigua destil·lada i posades en PBS.
- Posteriorment es va realitzar la incubació amb sèrum (kit universal *rabbit*) i seguidament incubació amb l'anticòs primari durant 30 minuts (a una dilució 1:50 (40λ anticòs: 2cc de PBS)).

- A continuació es rentaren amb PBS durant 5 minuts, incubades amb l'anticòs secundari durant 30 minuts i tornades a rentar amb PBS durant 5 minuts més.
- Els següents passos, un cop realitzada la incubació amb l'anticòs primari, foren els mateixos que en la tinció de les caspases.

### **3.5.3.1 AVALUACIÓ DEL Ki-67**

Es va avaluar el nombre de cèl·lules positives (tinció nuclear), contades en cinc camps de gran augment (Leica, objectiu de 40 augments, camp de 0.152mm<sup>2</sup>) i expressades en percentatge.

## **3.6 ANÀLISI ESTADÍSTICA**

El processament i anàlisi de les dades d'aquest estudi s'ha realitzat mitjançant el programa estadístic SPSS versió 9.0 per Windows.

### **3.6.1 ANÀLISI DESCRIPTIVA**

S'ha realitzat una anàlisi descriptiva de tots els paràmetres valorats en l'estudi, dels quals, la mitjana, la desviació estàndard (DS) i el valor màxim i mínim de l'interval s'han utilitzat com a variables quantitatives.

Les variables categòriques s'han descrit en termes absoluts i de freqüència relativa.

### **3.6.2 COEFICIENT DE SPEARMAN (r de Spearman)**

És una prova no paramètrica que s'ha utilitzat per valorar les relacions existents entre les variables numèriques o quantitatives.

Es considera que les variables estan relacionades entre sí, quan el coeficient es troba proper a 1 o -1 ( $p < 0.05$ ).

### **3.6.3 ANÀLISI DE SUPERVIVÈNCIA**

Les corbes de supervivència s'han calculat per a recidiva i supervivència de la pacient, utilitzant el mètode de Kaplan-Meier.

### **3.6.4 ANÀLISI DEL FACTOR PREDICTIU**

La recidiva i la mort de la pacient s'han utilitzat com a variables independents.

L'anàlisi univariada s'ha realitzat utilitzant el risc proporcional de la Cox per a calcular el risc relatiu (RR) de les diferents variables predictives. Per a cada RR s'ha calculat un interval de confiança del 95% (95% IC)

L'anàlisi multivariada s'ha realitzat utilitzant el risc proporcional de la Cox per avaluar les variables predictives independents després de ser ajustades. Els resultats es donen com a RR amb un IC del 95%. En el model final s'han inclòs aquelles variables que aportaven predicció de forma significativa des del punt de vista biològic i/o estadístic, escollides després de realitzar models multivariats parcials.



## **4 RESULTATS**



## **4.1 ANÀLISI DESCRIPTIU**

L'anàlisi descriptiu s'ha realitzat, per una banda, amb les variables clíniques i anatomopatològiques dels 210 casos inclosos en l'estudi com són:

- a. Distribució per edats
- b. Mida tumoral
- c. Grau histològic
- d. Nombre de ganglis amb metàstasis
- e. Presència i/o absència de necrosi
- f. Presència i/o absència d'invasió limfàtica
- g. Seguiment de les pacients (expressat en mesos)

I per altra banda s'ha realitzat l'anàlisi descriptiu amb les dades obtingudes de l'estudi immunohistoquímic com són:

- a. Índex Apoptòtic (IA)
- b. Índex de proliferació cel·lular
- c. Caspasa 3
- d. Caspasa 6

Els resultats d'aquest anàlisi descriptiu s'exposen a continuació separats en apartats.

Un resum dels resultats obtinguts en algunes d'aquestes dades es poden veure en la taula 4.

## RESULTATS

**Taula 4.** Anàlisi descriptiva de les dades clínico-patològiques de les 210 pacients

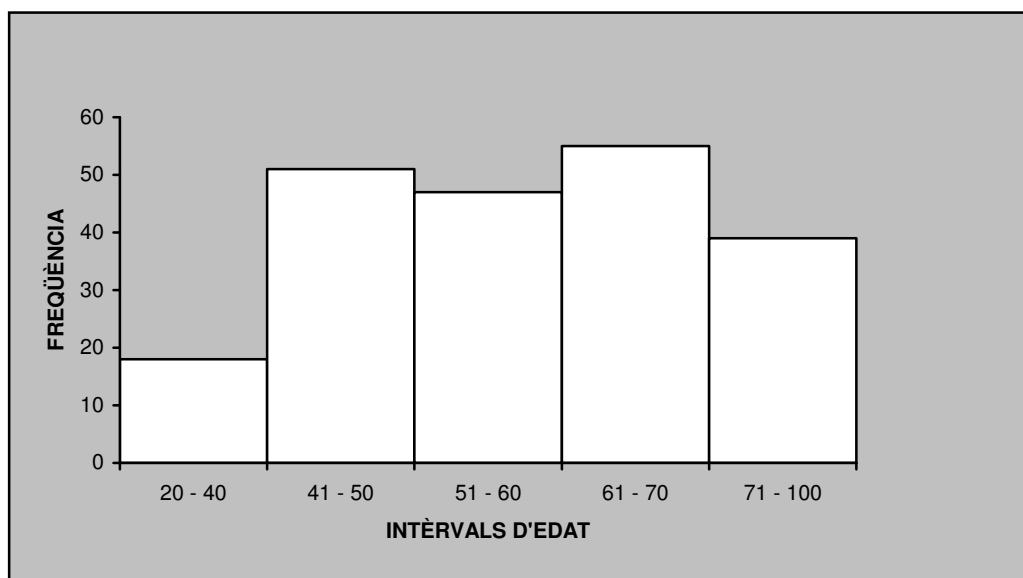
VARIABLES	N (%)
<b>MIDA TUMORAL</b>	
≤ 20	107 (51.0)
> 20 i ≤ 50	103 (49.0)
<b>GRAU HISTOLÒGIC</b>	
I	63 (30.0)
II	77 (36.7)
III	70 (33.3)
<b>NECROSI</b>	
si	82 (39.0)
no	128 (61.0)
<b>INVASIÓ LIMFÀTICA</b>	
si	69 (32.9)
no	141 (67.1)
<b>METÀSTASI A GANGLIS</b>	
No	126 (60.0)
1 - 3 ganglis	50 (23.8)
> 3 ganglis	34 (16.2)
<b>RECIDIVA</b>	
si	43 (20.5)
no	167 (79.5)

En la taula es mostren algunes de les variables clíniques amb el nombre total de casos per a cada una d'elles i el percentatge equivalent situat entre parèntesi.

#### 4.1.1 EDAT

La mitjanana d'edat del grup estudiat és de 58.45 amb un interval de 31 – 91 anys i una desviació Standard de 13.34

La distribució de les pacients per edat es mostra en la següent gràfica (figura 9):



**Figura 9.** *Histograma de la distribució d'edats dels casos de l'estudi*

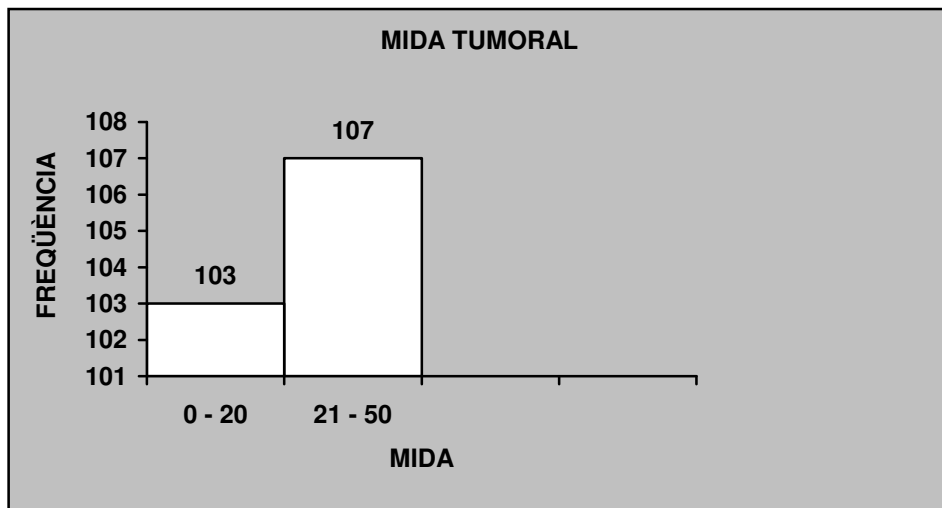
Tal i com mostra la gràfica, la majoria de les pacients de la sèrie es troben en edats compreses entre els 41 anys i els 70.

Els percentatges en cada interval són:

- De menys de 40 anys: 8.6%
- 41 a 50 anys: 24.3%
- 51 a 60 anys: 22.4%
- 61 a 70 anys: 26.2%
- de més de 71 anys: 18.6%

#### 4.1.2 MIDA TUMORAL

La mida del tumor agrupada en dos grups, segons la classificació del TNM, es mostra en la següent gràfica (figura 10):



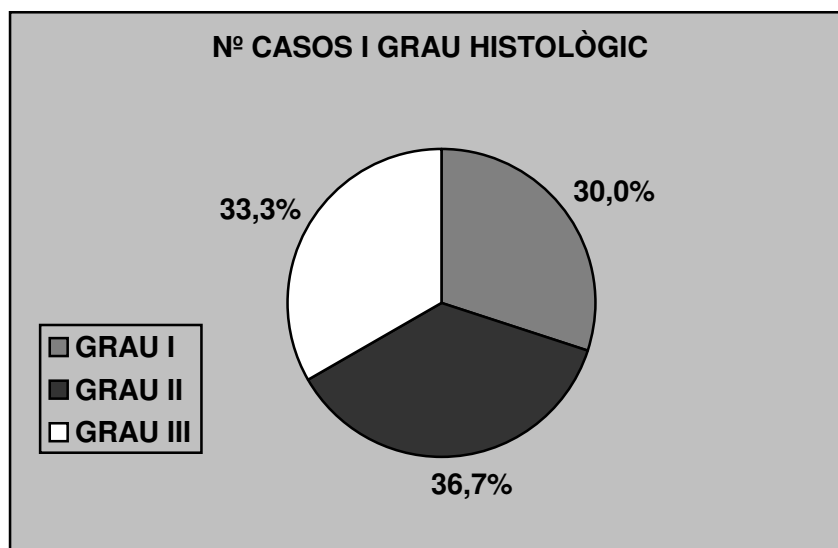
*Figura 10. Histograma representatiu de la mida tumoral*

De les 210 pacients incloses en l'estudi, 107 (51.0%) presentaven un tumor de mida inferior o igual a 20 mm i 103 (49.0%) casos presentaven un tumor de mida situada entre 21 i 50 mm.

La mida tumoral mitjana és de 20.87 amb un interval de 1 – 50 i una desviació Standard de 9.12.

#### 4.1.3 GRAU HISTOLÒGIC

La distribució del nombre de casos en funció del grau histològic del tumor es bastant homogènia amb uns percentatges per a cada grup molt similars, tal i com es mostra en la gràfica (figura 11).



**Figura 11.** Distribució percentual segons el grau histològic.

El 30 % dels casos presentaven un grau histològic I que corresponien a un total de 63 casos, el 36.7 % presentaven un grau II que corresponien a un total de 77 casos i el 33.3 % presentaven un grau III que corresponien als 70 casos restants.

La distribució dels casos en funció dels tres paràmetres que formen el grau histològic es pot veure en les següents taules (taula 5), (taula 6), (taula 7).

**4.1.3.1 FORMACIÓ DE TÚBULS****Taula 5.** Estadística descriptiva de la presència de túbuls

TÚBULS	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
1	21	10.0	10.0
2	85	40.5	50.5
3	104	49.5	100.0

El valor 1 fa referència a l'existència de túbuls en >75% del tumor, el valor 2 a l'existència de túbuls entre 10 – 75% i el valor 3 < 10% de túbuls. Tal i com es mostra en la taula quasi el 50% dels tumors inclosos en la sèrie presentaven poca diferenciació histològica.

**4.1.3.2 ATÍPIA CEL·LUAR****Taula 6.** Estadística descriptiva de l'atípi cel·lular

ATÍPIA	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
1	29	13.8	13.8
2	112	53.3	67.1
3	69	32.9	100.0

Els valors en l'atípi fan referència al pleomorfisme cel·lular tal i com s'ha exposat en la introducció i van de menys a més pleomorfisme. Els casos inclosos en la sèrie presenten en més d'un 50% un pleomorfisme intermedi.



4.1.3.3 MITOSIS

**Taula 7.** Estadística descriptiva del valor mitòsic

MITOSIS	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
1	99	47.1	47.4
2	45	21.4	68.9
3	65	31.0	100.0
PERDUTS	1	PERDUT	

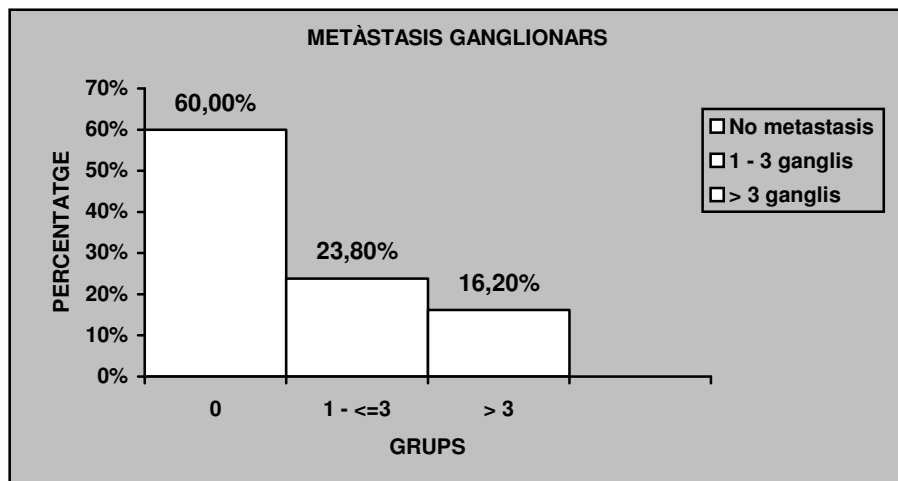
El valor 1 fa referència a l'existència de 0 a 9 mitosis per 10 camps de gran augment, el valor 2 de 10 a 19 i el valor 3 a > 20 mitosis / 10 cga. Així veiem que l'índex mitosis dels casos de la sèrie és baix quasi en un 50%.

**4.1.4 GANGLIS LIMFÀTICS**

Dels 210 casos inclosos en la sèrie, la majoria no tenien ganglis amb metàstasis tal i com es mostra en la següent taula (taula 8), (figura 12).

**Taula 8.** Estadística descriptiva de les metàstasis dels ganglis limfàtics

GANGLIS	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
NO METASTASIS	126	60.0	60.0
1 – 3 GANGLIS	50	23.8	83.8
> 3 GANGLIS	34	16.2	100.0



*Figura 12. Distribució percentual de les metàstasis ganglionars.*

#### 4.1.5 PRESENCIA I/O ABSCÈNCIA DE NECROSI TUMORAL

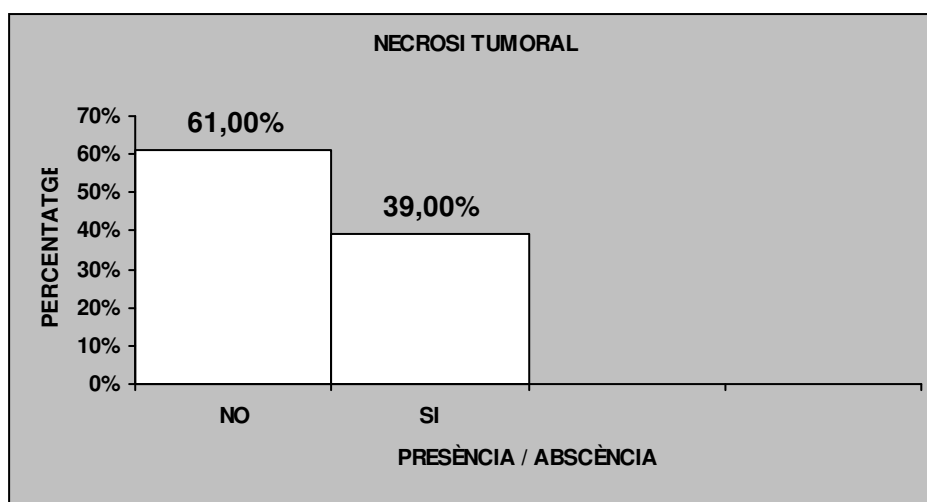
Els resultats de la valoració de la presència o no de necrosi en el si del tumor es mostren en la següent taula (taula 9).

**Taula 9.** Estadística descriptiva de la presència de necrosi

NECROSI	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
NO	128	61.0	61.0
SI	82	39.0	100.0

Tal i com es pot observar en la taula, més del 50% dels casos inclosos en la sèrie no presentaven necrosi tumoral.

La representació gràfica d'aquestes dades es pot observar en la gràfica següent (figura 13).



**Figura 13.** Distribució percentual de la presència i/o absència de necrosi

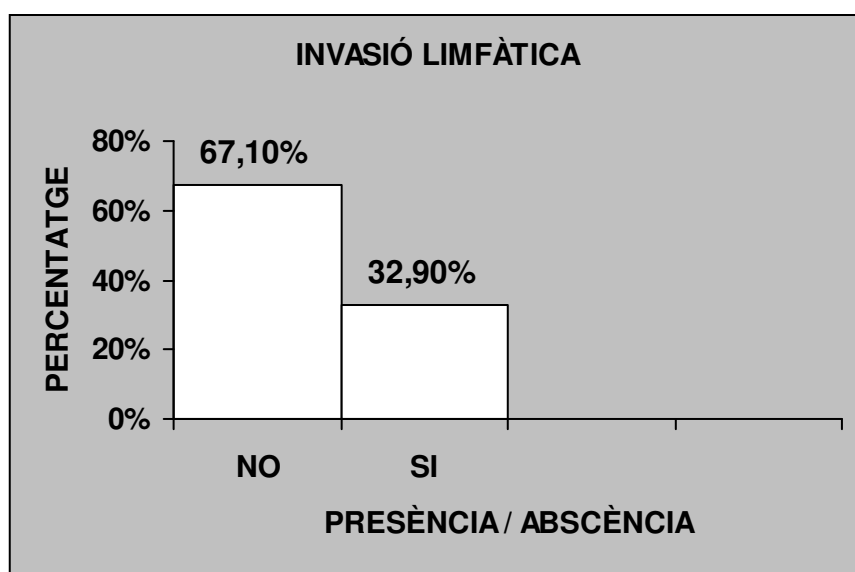
**4.1.6 PERMEACIÓ LIMFÀTICA**

En la següent taula es poden veure el nombre de casos amb permeació vascular i el percentatge equivalent (taula 10).

**Taula 10.** Estadística descriptiva de la presència d'invasió limfàtica

INVASIÓ LIMFÀTICA	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
NO	141	67.1	67.1
SI	69	32.9	100.0

La majoria de casos (67.1%) de la nostra sèrie no presenten permeació limfàtica. Són tumors que per la seva mida i el seu TNM es poden operar i acostumen a tenir millor pronòstic (figura 14).



**Figura 14.** Distribució percentual de la presència d'invasió limfàtica

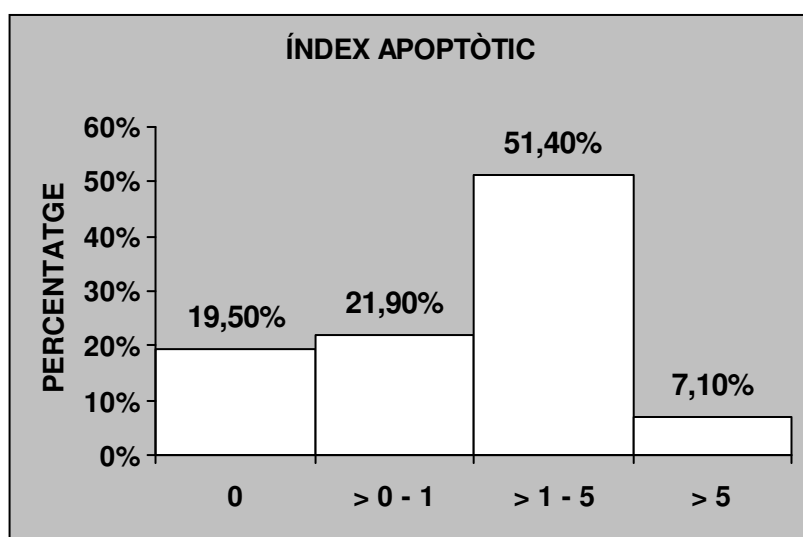
#### 4.1.7 ÍNDEX APOPTÒTIC

L'índex apoptòtic realitzat mitjançant la tècnica de TUNEL es ha donat els resultats que es mostren en la següent taula (taula 11).

**Taula 11.** Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics mitjançant la tècnica de TUNEL de l'Índex Apoptòtic

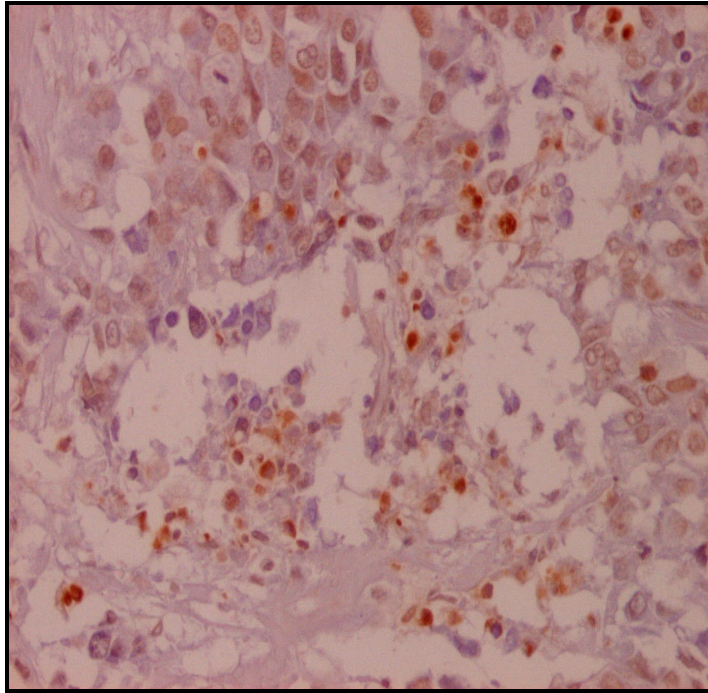
CÉL. POSITIVES (%)	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
0 %	41	19.5	19.5
> 0 – 1%	46	21.9	41.4
> 1 – 5 %	108	51.4	92.9
> 5 %	15	7.1	100.0

Tal i com es mostra en la taula, més del 50% dels casos tenien entre 1 – 5% de cèl·lules i/o cossos apoptòtics mentre quasi un 20 % no en tenien (figura 15), (figura 16), (figura 17).

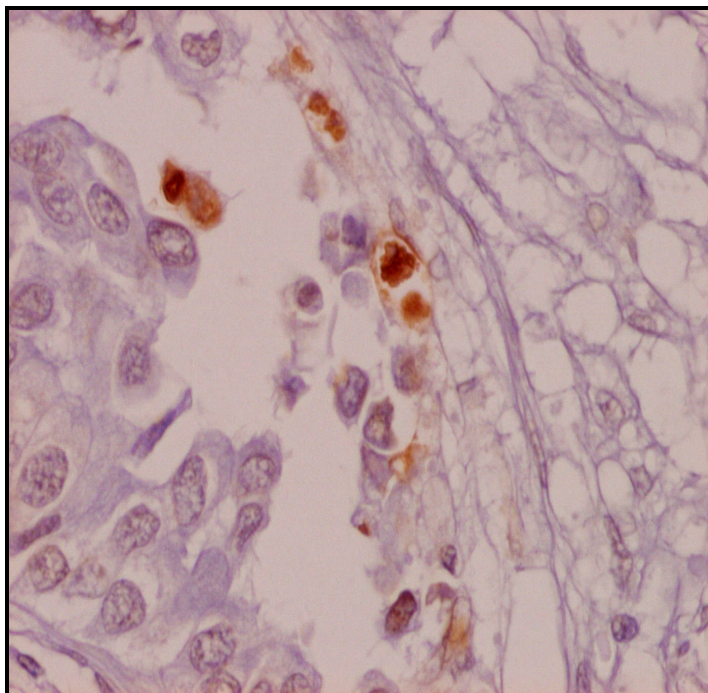


**Figura 15.** Distribució percentual de l'índex apoptòtic





**Figura 16.** Cèl·lules i/o cossos apoptòtics. Cas amb alt índex apoptòtic (TUNEL x400)



**Figura 17.** Cèl·lules i/o cossos apoptòtics. Cas amb baix índex apoptòtic (TUNEL x400)





#### 4.1.8 ÍNDEX DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR (KI-67)

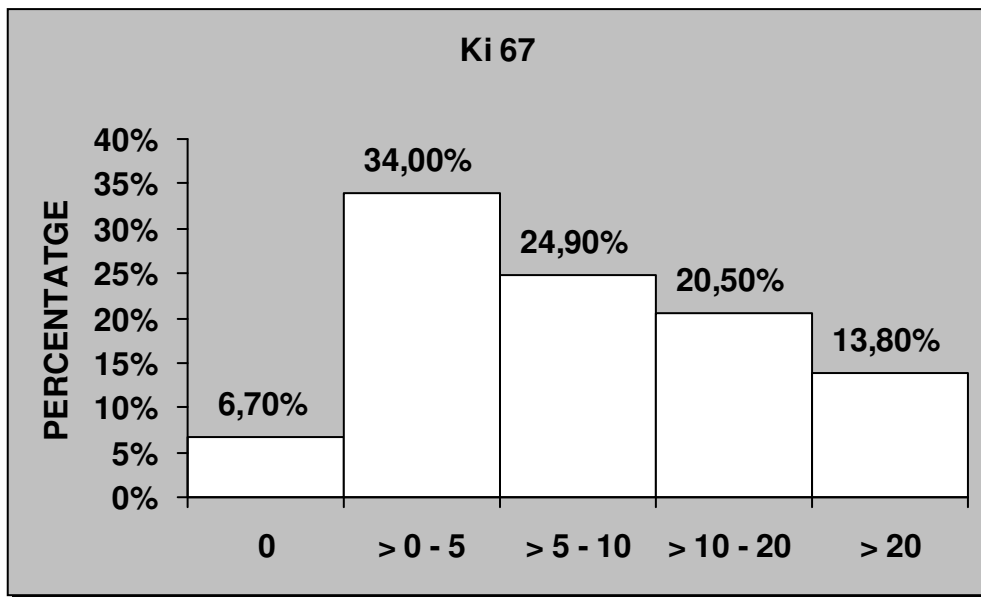
Els resultats obtinguts del Ki-67 s'han agrupat en diferents intervals. Tan sols en 1 dels 210 casos no s'ha obtingut cap resultat degut a pèrdua del material del cas en qüestió durant el procediment immunohistoquímic per a la determinació de l'índex de proliferació cel·lular.

Els resultats obtinguts es mostren en la següent taula (taula 12).

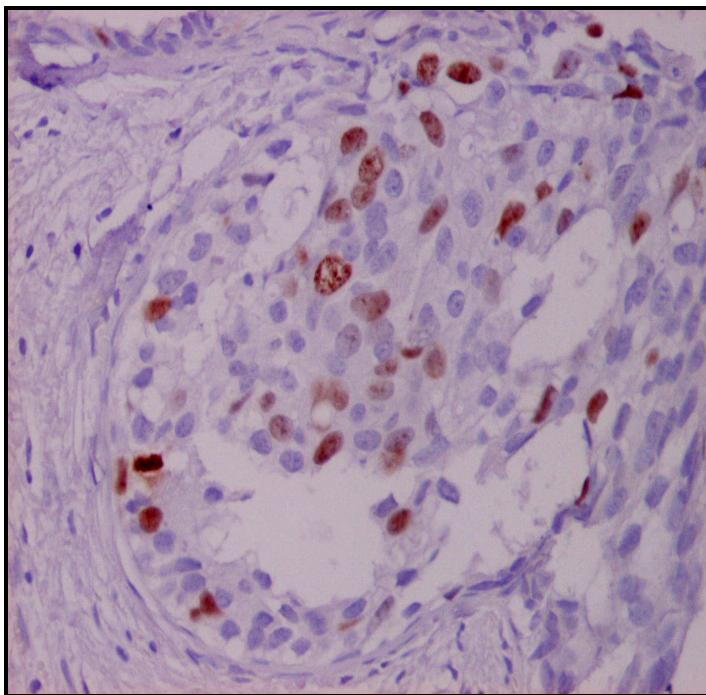
**Taula 12.** Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics per a l'índex de proliferació cel·lular.

VALOR KI 67	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	%ACUMULAT
0	14	6.7	6.7
> 0 – 5	71	34.0	40.7
> 5 – 10	52	24.9	65.6
> 10 – 20	43	20.5	86.1
> 20	29	13.8	100.0
PERDUTS	1	PERDUT	

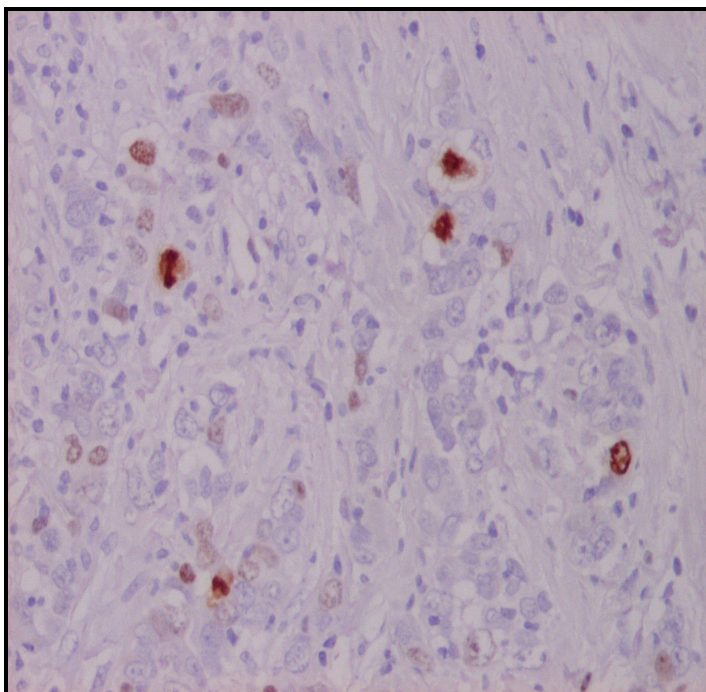
Com mostra la taula, només 14 casos (6.7%) no van tenir expressió immunohistoquímica de Ki67, la resta de casos en percentatges similars en cada grup, expressaven el marcador immunohistoquímic (figura 18), (figura 19), (figura 20).



*Figura 18. Distribució percentual del Ki 67*



**Figura 19.** Determinació immunohistoquímica per Ki-67. Cas amb un alt índex de proliferació cel·lular (Ki-67 x400)



**Figura 20.** Determinació immunohistoquímica per Ki-67. Cas amb un baix índex de proliferació cel·lular (Ki-67 x250)



#### 4.1.9 CASPASA 3

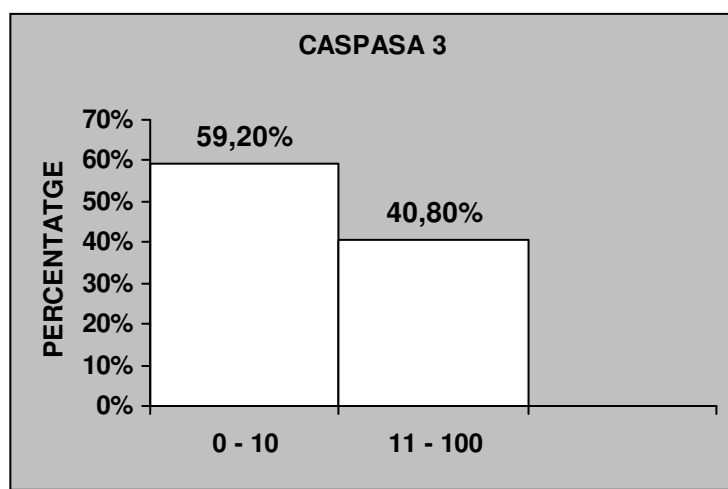
Els resultats de l'estudi immunohistquímic de les caspases també s'han agrupat en grups per tal de facilitar l'estudi estadístic. Dels 210 casos inclosos en la sèrie, en 4 casos no s'ha obtingut cap resultat degut a què el material disponible s'ha agotat i / o malmès durant el procediment immunohistoquímic per a la determinació de la caspasa 3 i no s'han pogut recuperar.

En funció de la distribució dels resultats de la determinació immunohistoquímica de les caspases el *cut off* s'ha establert en el 10%. Els resultats d'aquesta tècnica es mostren en la següent taula (taula 13).

**Taula 13.** Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics per la caspasa 3.

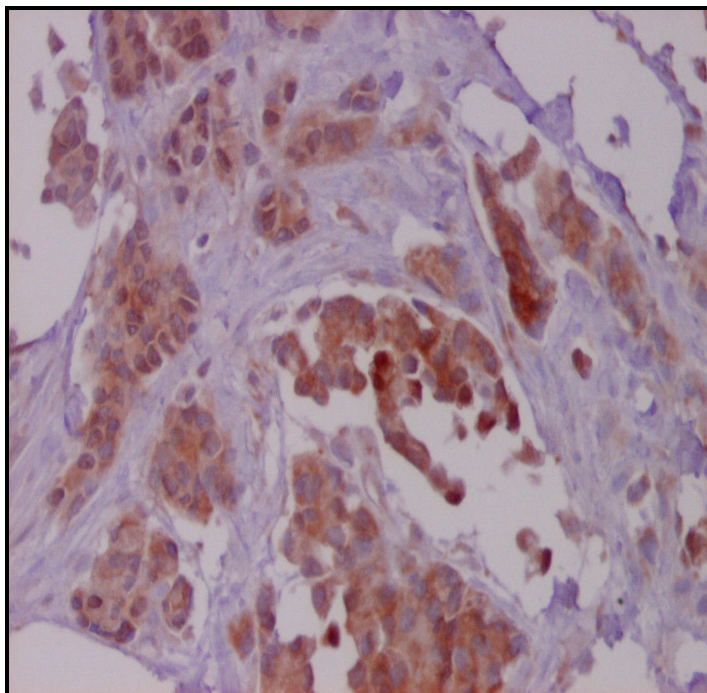
VALOR CASPASA 3	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
0 – 10	122	59.2	59.2
11 – 100	84	40.8	100
PERDUTS	4	PERDUTS	

El percentatge de casos positius es situa al voltant del 60 % (figura 21), (figura 22), Figura 23).

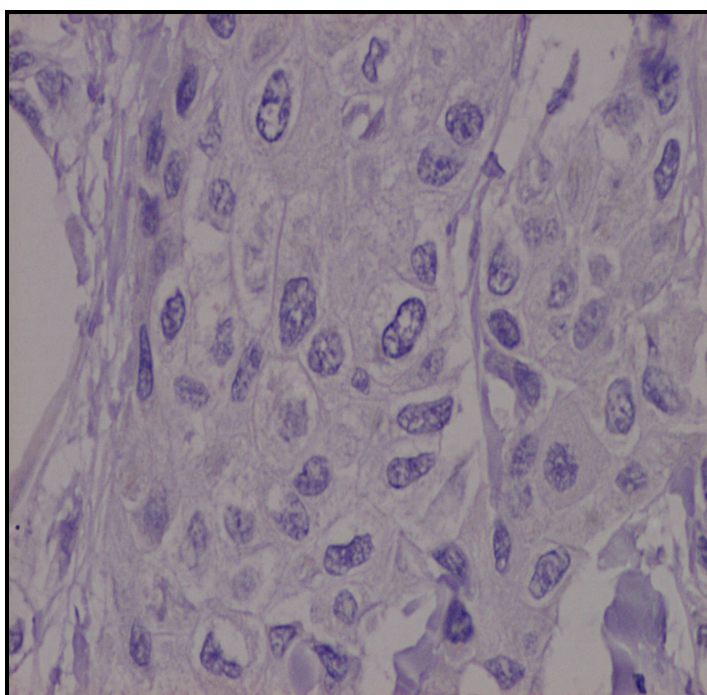


**Figura 21.** Distribució percentual de la caspasa 3





**Figura 22.** Caspasa 3. Cas positiu (x250)



**Figura 23.** Caspasa 3. Cas negatiu (x250)





#### 4.1.10 CASPASA 6

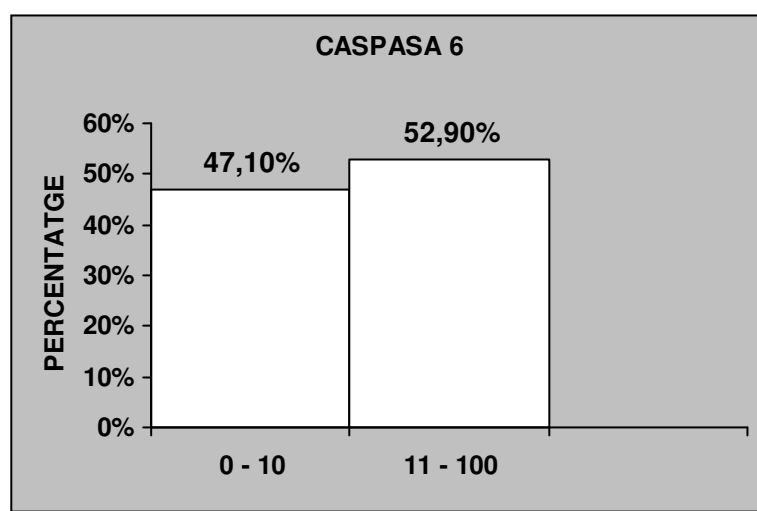
La caspasa 6 també presenta un *cut off* del 10% igual que la caspasa 3. En aquest cas la distribució dels casos també s'ha fet en dos grups tal i com mostra la següent taula (taula 14).

**Taula 14.** Estadística descriptiva dels resultats immunohistoquímics per a la caspasa 6

VALOR CASPASA 6	FREQÜÈNCIA	PERCENTATGE	% ACUMULAT
0 – 10	98	47.1	47.1
11 – 100	110	52.9	100.0
PERDUTS	2	PERDUTS	

En aquest cas podem veure com els casos inclosos en la sèrie presenten una distribució similar en cada un dels grups.

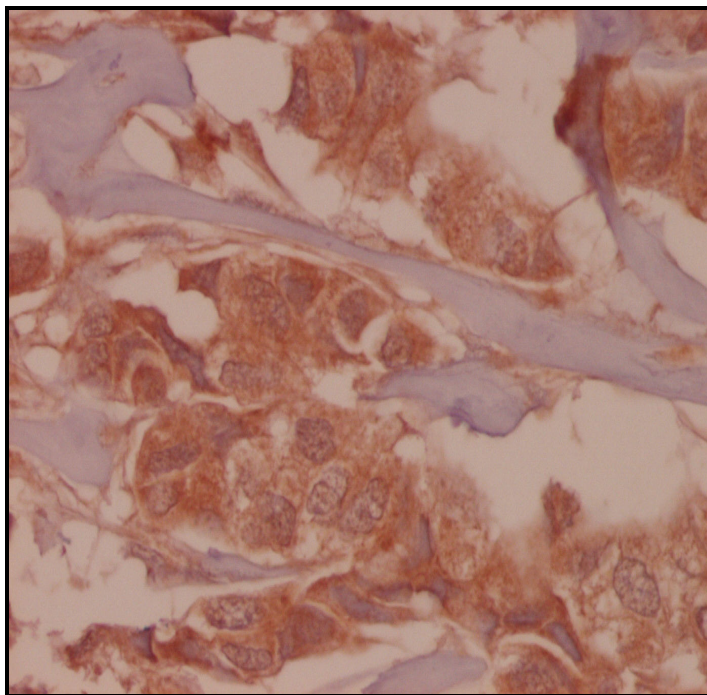
La representació d'aquesta taula es pot veure en la següent gràfica (figura 24), (figura 25), (figura 26).



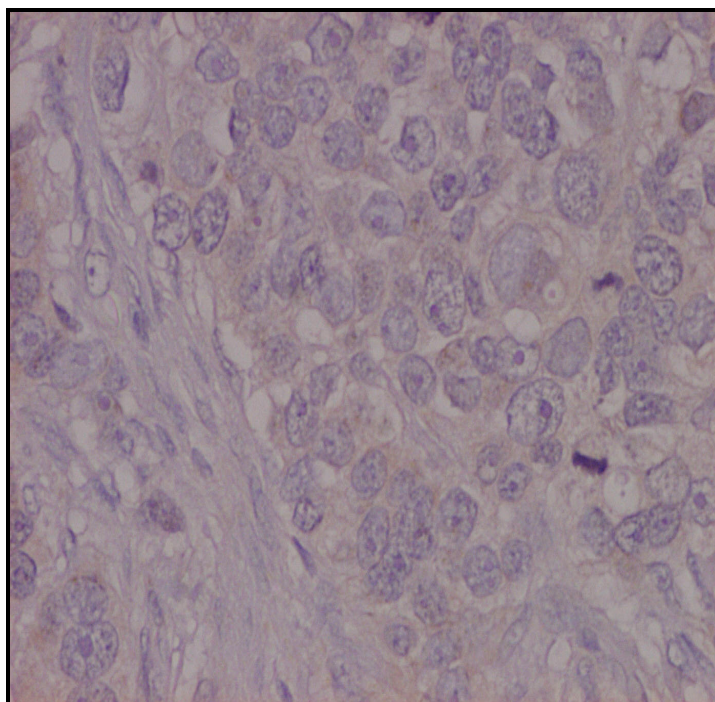
**Figura 24.** Distribució percentual de la caspasa 6

### **4.1.11 SEGUIMENT DE LES PACIENTS**

La mitjana del seguiment de les pacients ha estat 70.86 mesos amb una desviació Standard de 38.05 (interval 1.02 – 201.32). Sols un cas té un seguiment de tan sols 1 mes, correspon a una pacient de 55 anys que fou èxitus per causes no relacionades amb la patologia d'estudi. La pacient amb el seguiment més llarg correspon a una dona de 63 anys en el moment del diagnòstic (1988) i que actualment està viva sense patologia.



**Figura 25.** Caspasa 6. Cas positiu (x400)



**Figura 26.** Caspasa 6. Cas negatiu (x250)



## 4.2 ANÀLISI COMPARATIU

La relació existent entre les diferents variables es pot observar en la següent taula (taula 15).

**Taula 15.** Correlació entre les diferents variables (*r* de Spearman)<sup>1</sup>

<i>GANGL +</i>	-0.08																					
	p 0.24																					
<i>MIDA TM</i>	0.0184	<b>0.2918</b>																				
	p 0.79	<b>p 0.000</b>																				
<i>NECROSI</i>	0.0625	<b>0.2997</b>	<b>0.3489</b>																			
	p 0.36	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.00</b>																			
<i>INVASIO</i>	0.0118	<b>0.4168</b>	<b>0.2761</b>	<b>0.2506</b>																		
<i>LIM</i>	p 0.86	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>																		
<i>GRAU</i>	-0.088	<b>0.1873</b>	<b>0.3123</b>	<b>0.3711</b>	<b>0.2903</b>																	
<i>HISTOL</i>	p 0.20	<b>p 0.006</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.000</b>																	
<i>TÚBULS</i>	-0.064	<b>0.1552</b>	<b>0.2798</b>	<b>0.3525</b>	<b>0.1407</b>	<b>0.6423</b>																
	p 0.35	<b>p 0.025</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.042</b>	<b>p 0.00</b>																
<i>ATIPIA</i>	-0.031	0.1004	<b>0.2555</b>	<b>0.3128</b>	<b>0.2162</b>	<b>0.6897</b>	<b>0.3443</b>															
	p 0.65	p 0.147	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.002</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>															
<i>TUNEL</i>	0.0043	<b>0.1995</b>	<b>0.3287</b>	<b>0.4022</b>	<b>0.2597</b>	<b>0.4711</b>	<b>0.3782</b>	<b>0.3307</b>														
	p 0.95	<b>p 0.004</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.00</b>														
<i>CASP 3</i>	-0.065	0.0412	0.0056	0.0159	0.0243	0.1099	-0.0324	0.0848	0.0703													
	p 0.35	p 0.556	p 0.93	p 0.821	p 0.729	p 0.11	p 0.644	p 0.22	p 0.31													
<i>CASP 6</i>	-0.085	-0.1350	-0.105	<b>-0.1649</b>	-0.0509	-0.080	-0.1161	-0.061	-0.032	<b>0.3793</b>												
	p 0.22	p 0.052	p 0.13	<b>p 0.017</b>	p 0.465	p 0.25	p 0.095	p 0.38	p 0.64	<b>p 0.00</b>												
<i>Ki67</i>	-0.008	<b>0.1592</b>	<b>0.2118</b>	<b>0.2085</b>	<b>0.1449</b>	<b>0.4782</b>	<b>0.2419</b>	<b>0.4084</b>	<b>0.2818</b>	0.0102	<b>-0.18</b>											
	p 0.89	<b>p 0.021</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.002</b>	<b>p 0.036</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.00</b>	p 0.88	<b>p 0.00</b>											
<i>MITOSIS</i>	-0.059	<b>0.1874</b>	<b>0.3039</b>	<b>0.3437</b>	<b>0.2887</b>	<b>0.8528</b>	<b>0.4166</b>	<b>0.4882</b>	<b>0.4353</b>	0.1210	-0.09	<b>0.45</b>										
	p 0.39	<b>p 0.007</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.000</b>	<b>p 0.00</b>	<b>p 0.00</b>	p 0.08	p 0.16	<b>p 0.00</b>										
EDAT	<i>GANGL+</i>	<i>MIDA</i>	<i>NECROSI</i>	<i>INVASIO</i>	<i>GRAU</i>	<i>TÚBULS</i>	<i>ATIPIA</i>	<i>TUNEL</i>	<i>CAS-3</i>	<i>CAS-6</i>	<i>Ki-67</i>											
		TM		LM/VAS	HISTO																	

<sup>1</sup> Els valors en negreta són estadísticament significatius amb una  $p < 0.05$ .

## RESULTATS

Tal i com es mostra en la taula, totes les variables es correlacionen entre sí a excepció de la caspasa 3 que no té cap tipus de correlació amb la resta de variables, mentre que la caspasa 6 mostra una correlació negativa o inversa amb la necrosi i amb el Ki-67 i una correlació positiva amb la caspasa 3 però no existeix cap altre correlació amb la resta de variables. Entre les variables clíniques, l'edat tampoc mostra cap correlació amb la resta de variables.

### 4.2.1 ANÀLISI UNIVARIAT DEL RISC PROPORCIONAL DE COX PER A MORTALITAT I RECIDIVA

L'anàlisi univariat per a factors pronòstics (risks proporcionals de cox) s'ha realitzat tant per a mortalitat com per a la recidiva.

Els resultats es mostren en les següents taules (taula 16), (taula 17).

**Taula 16.** Anàlisi univariat dels riscos proporcionals de cox per a MORTALITAT.

VARIABLES	RR	IC 95%
EDAT	1.0315	0,80 – 1,32
<b>MIDA TUMOR</b>	<b>2.2882</b>	<b>1,16 – 4,50</b>
<b>GANGLIS +</b>	<b>2.9320</b>	<b>1,53 – 5,60</b>
<b>GRAU HISTOL</b>	<b>1.5316</b>	<b>1,02 – 2,28</b>
<b>TÚBULS</b>	<b>2.0014</b>	<b>1,14 – 3,49</b>
<b>ATÍPIA</b>	<b>1.8697</b>	<b>1,13 – 3,10</b>
CASPASA 3	0.8350	0,63 – 1,10
CASPASA 6	0.7123	0,38 – 1,33
<b>Ki-67</b>	<b>1.3712</b>	<b>1,05 – 1,77</b>
MITOSIS	1.2288	0,86 – 1,73
<b>NECROSI</b>	<b>2.0527</b>	<b>1,09 – 3,87</b>
INVASIO LIMF / VASC	1.3247	0,70 – 2,50
TUNEL	1.3158	0,89 – 1,93

En aquesta taula veiem com són els factors pronòstics clàssics els que estadísticament són significatius mentre que les caspases i l'índex apoptòtic no tenen significació pronòstica en l'anàlisi univariat.

En l'anàlisi univariat per a la recidiva són les mateixes variables clàssiques que en el cas de la mortalitat les que són estadísticament significatives, és a dir, els factors pronòstics ja coneguts com són la mida tumoral, el grau histològic i l'estat dels ganglis limfàtics. A més a més en l'estudi univariat trobem que tant l'índex de proliferació cel·lular com la necrosi són estadísticament significatius per la mortalitat mentre que en el cas de la recidiva només ho és la necrosi i no així l'índex de proliferació cel·lular.

**Taula 17.** Anàlisi univariat dels riscos proporcionals de cox per a **RECIDIVA**.

<b>VARIABLES</b>	<b>RR</b>	<b>IC 95%</b>
EDAT	0.8897	0,70 – 1,12
<b>MIDA TUMOR</b>	<b>1.8849</b>	<b>1,01 – 3,53</b>
<b>GANGLIS +</b>	<b>2.4696</b>	<b>1,34 – 4,55</b>
GRAU HISTOL	1.3982	0,96 – 2,04
<b>TÚBULS</b>	<b>1.8753</b>	<b>1,11 – 3,15</b>
<b>ATÍPIA</b>	<b>1.8278</b>	<b>1,23 – 2,96</b>
CASPASA 3	0.9032	0,69 – 1,17
CASPASA 6	0.8987	0,49 – 1,65
Ki67	1.1374	0,88 – 1,47
MITOSIS	1.1674	0,83 – 1,63
<b>NECROSI</b>	<b>1.8595</b>	<b>1,01 – 3,39</b>
INVASIO LIMF / VASC	1.1895	0,64 – 2,21
TUNEL	1.1701	0,81 – 1,67

**4.2.2 ANÀLISI MULTIVARIAT DEL RISC PROPORCIONAL DE COX PER A MORTALITAT I RECIDIVA**

L'anàlisi multivariat per a la mortalitat (després de realitzar múltiples models multivariats parcials) ha mostrat únicament com a factors pronòstics estadísticament significatius la presència de metàstasis ganglionars i l'atipia citològica tal i com es pot observar en la taula 18.

**Taula 18.** Anàlisi multivariat del risc proporcional de cox per a MORTALITAT

<b><u>VARIABLES</u></b>	<b><u>RR</u></b>	<b><u>IC 95%</u></b>
EDAT	1.1095	0.8 – 1.5
<b>GANGLIS +</b>	<b>3.5960</b>	<b>1.6 – 7.8</b>
MIDA TUMORAL	1.0338	0.9 – 1.1
NECROSI	1.0865	0.5 – 2.3
INVASIO LIMF / VASC	0.5163	0.2 – 1.1
GRAU HISTOL	0.8997	0.2 – 3.5
TÚBULS	1.4673	0.6 – 3.6
<b>ATIPIA</b>	<b>2.1095</b>	<b>1.23 – 3.62</b>
TUNEL	0.9843	0.9 – 1.0
CASPASA 3	0.55	0.48 – 1.16
KI 67	0.9856	0.9 – 1.0
MITOSIS	1.0126	0.5 – 2.3

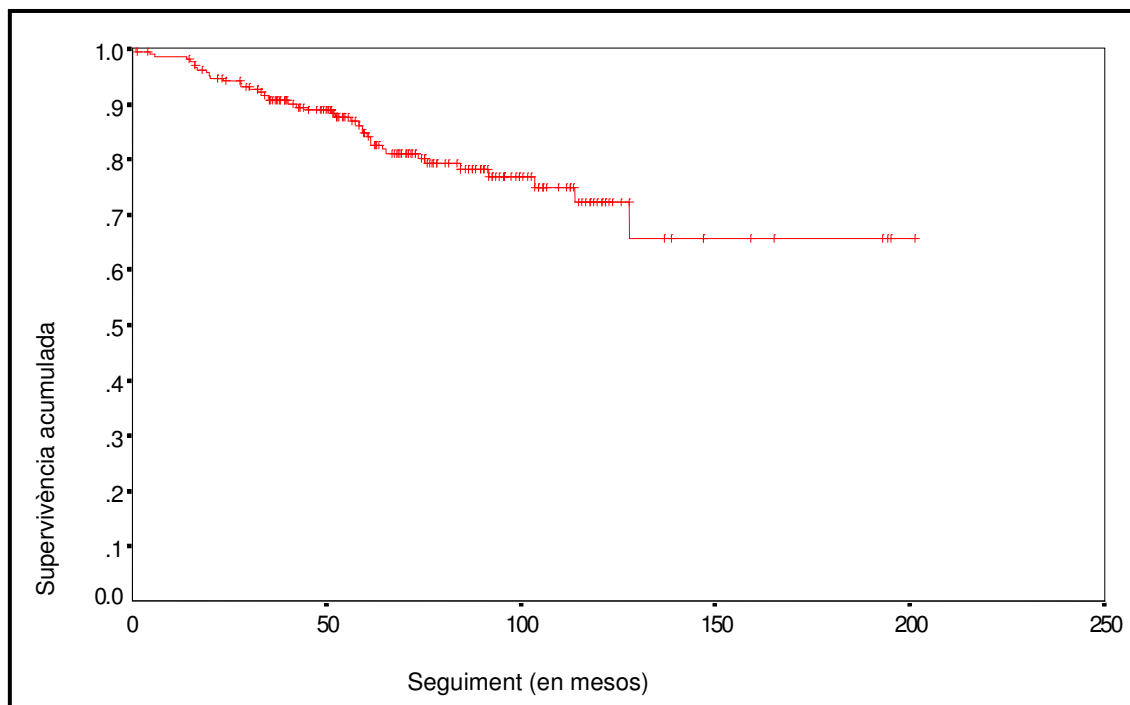
En el cas de l'anàlisi multivariat per a la recidiva han estat tres els factors pronòstics estadísticament significatius (taula 19). Aquests factors han estat a l'igual que en el cas de la mortalitat, la presència o absència de metàstasis ganglionars i l'atipia cel·lular però a més a més en el cas de la recidiva també la mida tumoral.



**Taula 19.** Anàlisi multivariat del risc proporcional de cox per a RECIDIVA

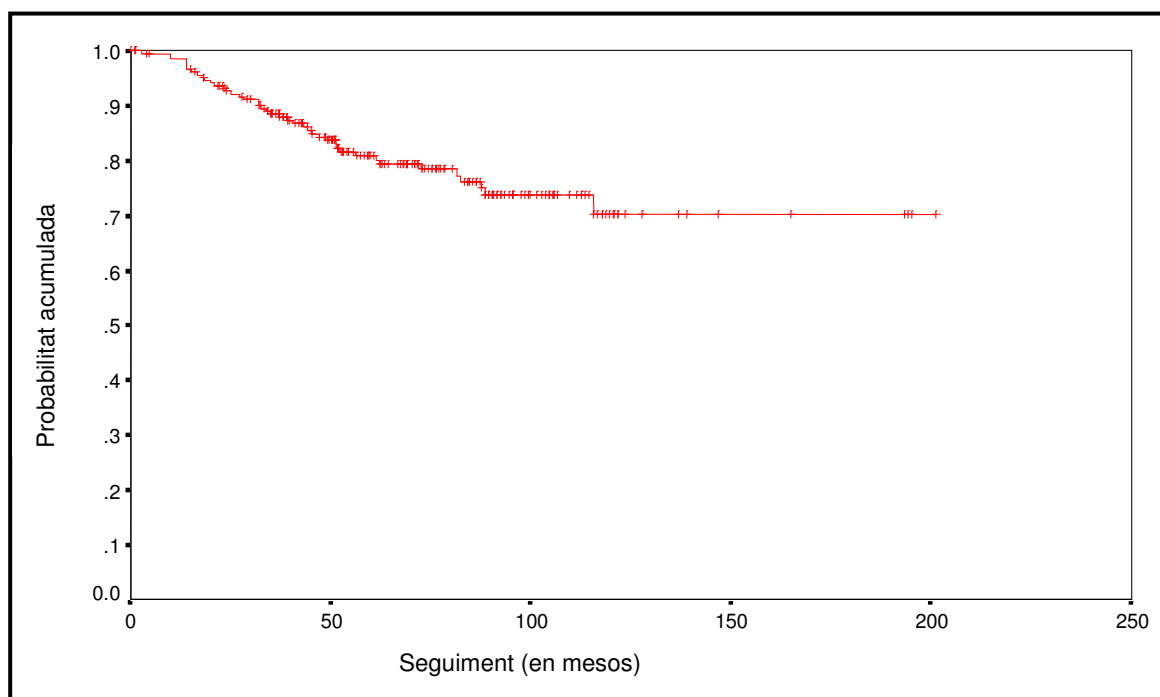
<u>VARIABLES</u>	<u>RR</u>	<u>IC 95%</u>
EDAT	0.9294	0.7 – 1.2
<b>GANGLIS +</b>	<b>2.8647</b>	<b>1.4 – 5.9</b>
<b>MIDA TUMORAL</b>	<b>1.0392</b>	<b>1.01 – 1.1</b>
NECROSI	1.2501	0.6 – 2.6
INVASIO LIMF / VASC	0.5580	0.2 – 1.2
GRAU HISTOL	0.5578	0.1 – 2.1
TÚBULS	1.5765	0.6 – 3.7
<b>ATIPIA</b>	<b>1.8545</b>	<b>1,08 – 3,17</b>
TUNEL	0.9661	0.9 – 1.1
CASPASA 3	0.59	0.3 – 1.2
KI 67	0.9833	0.9 – 1.0
MITOSIS	1.2853	0.6 – 2.8

4.2.3 CORVES DE SUPERVIVÈNCIA I RECIDIVA



**Figura 27.** Corba de supervivència de Kaplan – Meier

La supervivència durant el primer any de seguiment és del 95.5% (IC 95%: 96.8 –100), als dos anys la supervivència és del 92.6% (IC 95%: 89 – 96.\$%), als cinc anys aquesta supervivència es del 80.9% (IC 95%: 73.5 – 88.5) i als 10 anys aquesta supervivència és del 70% (IC 95%: 46 – 94). És a dir que als 10 anys al voltant dels 70% de pacients diagnosticades de carcinoma ductal infiltrant pT1 – pT2 estaran vives.



**Figura 28.** Corba de Kaplan – Meier per a temps lliure de malaltia

Fent referència al temps lliure de malaltia, al primer any, el 98.5% (IC 95%: 96.8 – 100) no hauran presentat recidiva tumoral, és a dir, pràcticament tots els casos de la sèrie no han presentat recidiva tumoral durant els primers 12 mesos. Als 2 anys el 94% (IC 95%: 90.6 – 97.4), als cinc anys, el 85% (IC 95%: 78.6 – 91.4) de les pacients no presenten recidiva de la malaltia i als deu anys, el 72% (IC 95%: 56 – 88.3). Pràcticament tres quartes parts de les pacients incloses en la sèrie no presenten recidiva durant els deu anys següents al diagnòstic.



## **5 DISCUSSIÓ**



---

Tal i com hem anant descrivint al llarg de la tesi, el carcinoma de mama és molt freqüent avui en dia, en el nostre país, de totes les neoplàsies malignes en dones el 28% són de mama<sup>2</sup>. La seva incidència ha anant augmentat<sup>3,4</sup> i l'edat d'aparició també s'ha modificat al llarg del temps. Cada cop tenen més rellevança els mètodes de *screening* per a la detecció precoç per tal de poder detectar carcinomes quan les seves dimensions encara permetin fer un tractament quirúrgic conservador, així com la valoració de possibles factors pronòstics que ens permetin aplicar noves tècniques terapèutiques més eficaces i disminuir-ne considerablement la seva mortalitat<sup>50-56</sup>.

Els avenços que s'han produït al llarg dels anys en aquest camp, engloben diversos camps, des de modificacions en el mètode diagnòstic fins a variacions en el tractament. En aquest aspecte, la millora produïda en els mètodes de detecció del càncer de mama i la implantació del *screening* han permès detectar carcinomes quan les seves mides són suficientment petites com per aplicar un tractament quirúrgic menys agressiu i junt amb la detecció precoç, augmentar-ne la supervivència de la pacient<sup>230</sup>. També s'han produït modificacions en el tipus de tractament quirúrgic, de manera que ha anat disminuint l'agressivitat de la intervenció, extirpant menys parènquima mamari i ha augmentat l'ús del tractament conservador. I no cal dir que en el camp dels tractaments complementaris (tractaments hormonals, quimioteràpics o radioteràpics) és on s'estan produint els avenços més importants a mesura que es van descobrint diferents gens implicats en aquest tipus de càncer.

La detecció d'aquests gens i l'expressió de les seves proteïnes han generat múltiples estudis per a determinar-ne la seva implicació en el pronòstic i la resposta al tractament.

Múltiples estudis publicats<sup>52-60</sup> en la literatura han comprovat que la resposta a aquests tractaments depèn d'una sèrie de factors, alguns inherents al propi tumor i d'altres referents a l'estat de la pacient, que en determinaran quina en serà l'evolució i la resposta del tumor al tractament. Aquests factors són els que coneixem com a factors pronòstics. De tots els que se'n coneixen, els que fins ara s'han consolidat amb un paper més important en el pronòstic són els anomenats factors pronòstics clàssics i que fan referència a característiques pròpies i no modificables del tumor com són la mida tumoral<sup>52-54</sup>, el grau histològic<sup>56-61</sup> i l'existència de metàstasis ganglionars en el moment del diagnòstic<sup>48-51</sup>.

Com s'ha comentat en l'apartat de hipòtesi i objectius d'aquest treball, la finalitat de l'estudi és avaluar la possibilitat de nous marcadors pronòstics en el càncer de mama que permetin establir una nova línia d'investigació i evolució en el tractament d'aquesta patologia.

Els resultats obtinguts en aquest treball mostren que existeix una relació entre la majoria dels factors estudiats. D'aquesta manera s'ha observat que la mida tumoral, l'estat dels ganglis limfàtics, el grau histològic, l'índex de proliferació cel·lular, l'apoptosis mesurada amb la tècnica de TUNEL i l'existència de necrosi, mostren una correlació entre sí. On no s'ha observat correlació ha estat entre aquests factors i les caspases i l'edat de les pacients.

En concret els resultats obtinguts en relació amb els factors pronòstics clàssics o a la determinació de l'índex apoptòtic són similars als resultats que es mostren en els articles publicats recentment<sup>158,160,164,165</sup>. En quant als resultats de la determinació immunohistoquímica de les caspases, són molt pocs articles publicats en la literatura que hagin utilitzat aquesta metodologia ja que la majoria que fan referència a aquests marcadors han utilitzat la citometria de flux o la PCR per a la seva determinació<sup>231-233</sup>, i encara n'existeixen menys que l'hagin aplicat al càncer de mama<sup>234,235</sup>. Moltes de les



hipòtesis sobre les funcions i activacions de les caspases s'han realitzat estudiant proliferacions limfocitàries<sup>236</sup>, on l'estudi de l'apoptosi té una àmplia aplicació en el posterior tractament. Per tant, es necessitaran posteriors estudis en el camp de les caspases i el càncer de mama per poder concloure'n la seva implicació en el pronòstic.

Com s'ha mencionat anteriorment, els resultats obtinguts en aquesta sèrie han mostrat l'existència d'una correlació entre tots els factors clínico-patològics estudiats a excepció de l'edat de les pacients així com l'expressió de les caspases.

En l'anàlisi multivariat de la nostra sèrie, per a la recidiva els factors que han obtingut significació pronòstica han estat la mida tumoral, l'estat dels ganglis limfàtics i l'atipia cel·lular. Mentre que en l'anàlisi multivariat per a mortalitat són l'estat dels ganglis limfàtics i l'atipia cel·lular els que han presentat valor pronòstic independent.

Aquests resultats són similars als que han obtingut d'altres autors<sup>158,161,181,237</sup> i publicats en la literatura. En un article publicat prèviament<sup>158</sup>, en el qual s'analitzava la possible relació entre els factors pronòstics clàssics, l'índex apoptòtic i l'expressió immunohistoquímica de determinats gens així com la seva implicació pronòstica, els resultats que es varen obtenir en l'anàlisi multivariat van objectivar que la mida tumoral era factor pronòstic però només per la recidiva. D'aquesta manera podem comprovar com en diferents sèries els resultats es confirmen i per tant la importància de les troballes es reafirma i adquireix més validesa.

La mida tumoral s'ha establert com el factor pronòstic més important per a la recidiva de la pacient en els casos de carcinomes infiltrants de mama amb ganglis negatius<sup>238</sup>, però també s'ha vist que és factor pronòstic en els casos de carcinomes amb ganglis limfàtics positius<sup>239</sup>. En el cas de carcinomes que tenen un component intraductal extens que fins i tot sobrepassi en mida al component infiltrant, sempre és la mida del component infiltrant la que en determinarà el pronòstic<sup>240</sup>.

Un estudi publicat recentment<sup>230</sup>, avalua l'evolució en el temps dels carcinomes ductals infiltrants en relació a determinats paràmetres i els mètodes de *screening*. En l'estudi estableixen dos grups de seguiment, des de 1995 a 1997 i des de 1999 a 2001, i comproven que en el primer període, aproximadament un 37% de casos presentaven un únic gangli metastàtic en el buidament de l'aixella mentre que el percentatge del segon període augmenta a un 43.8% ja que en aquest segon període disminueixen els percentatges de pacients amb dos o més ganglis que en el primer període eren més elevats. Així conclouen que un estadi inicial, una mida tumoral petita i una disminució del nombre de ganglis metastàsics produeix una disminució de la mortalitat. D'aquesta manera podem observar que existeix una relació entre els anomenats factors de mal pronòstic (mida tumoral gran, grau histològic elevat, ganglis limfàtics positius i presència de necrosi tumoral) i una relació entre els factors de bon pronòstic (mida tumoral petita, baix grau histològic, ganglis limfàtics negatius i absència de necrosi)<sup>158</sup>.

Tal és la importància de la mida tumoral com a factor pronòstic per a la recidiva tumoral, que actualment apareix en la literatura algun article que intenta determinar la mida del tumor abans del tractament quirúrgic, mitjançant tècniques de imatge, per a poder seleccionar els pacients cap a un tractament primari mèdic o bé cap a un tractament primari quirúrgic per tal de poder millorar el pronòstic i augmentar-n'he la supervivència<sup>241</sup>.

Altres variables estudiades com ara la presència de necrosi o la invasió vascular no han obtingut significació estadística ni en aquesta sèrie ni tampoc l'han obtinguda en d'altres estudis publicats prèviament<sup>158,230</sup>.

L'avaluació de l'índex apoptòtic mitjançant la tècnica de TUNEL no ha demostrat tenir significació pronòstica en l'anàlisi multivariat en la sèrie estudiada en aquest treball. Tal i com s'ha comentat prèviament, el valor de l'índex apoptòtic varia en funció dels mètodes utilitzats per a contar el nombre de cèl·lules i/o cossos apoptòtics, ja sigui donant el nombre d'elements apoptòtics entre 1000 o 2000 cèl·lules tumorals o bé donant el valor en percentatge d'elements apoptòtics en 5 o 10 camps de gran augment<sup>127,130-132,205,211,215</sup>, o fins i tot el nombre d'elements apoptòtics per mil·límetre quadrat de tumor<sup>128,165</sup>.

Diversos articles han avaluat la implicació de l'apoptosi en el càncer de mama com a factor pronòstic. S'ha correlacionat l'IA amb la mida tumoral, la necrosi, un grau histològic alt i la presència de ganglis limfàtics positius<sup>164,217</sup>. també s'ha associat a receptors d'estrògens negatius<sup>127,128</sup>. D'altres estudis no han mostrat que l'IA tingui significació pronòstica<sup>158,168,174</sup> ni que estigui relacionat amb la mida tumoral<sup>127,166,234</sup>. Les diferències que es mostren en tots aquests estudis poden estar relacionades amb el tipus de quantificació de l'IA o la metodologia utilitzada per determinar-lo. En relació a aquest punt, la metodologia utilitzada i el valor per expressar l'IA d'aquesta sèrie són iguals als de la sèrie publicada recentment per Sirvent i col·laboradors<sup>158</sup> i els resultats mostren que en ambdues sèries l'IA no té significació pronòstica. D'aquesta manera podem concloure que si en dos estudis diferents utilitzant la mateixa metodologia els resultats són iguals es reafirma que, efectivament, l'índex apoptòtic no és un factor pronòstic en el cas del carcinoma ductal de mama.

S'ha objectivat que en els carcinomes de mama es dona més apoptosi que en la mama normal o en els tumors benignes i que l'Índex apoptòtic és més elevat en els carcinomes invasius<sup>234</sup>.

Quan s'ha realitzat l'anàlisi de correlació entre variables, sí que s'ha observat una relació entre l'índex apoptòtic i la resta de variables. D'aquesta manera, l'IA es troba relacionat amb els factors pronòstics clàssics, en concret amb els de mal pronòstic, és a dir, a més apoptosi més grau histològic, més necrosi, més mitosis ... .

En un estudi<sup>127</sup>, s'ha objectivat que l'Índex apoptòtic està associat amb una disminució de la supervivència. En un altre estudi<sup>216</sup> s'ha vist que l'IA és un factor predictiu de la supervivència en l'anàlisi univariat que no es confirmà amb l'anàlisi multivariat. En aquest mateix estudi<sup>216</sup> s'objectiva que els tumors recidivants tenen un índex de proliferació i un índex apoptòtic molt més elevat que els que poden presentar els tumors primaris i, inevitablement això es correlaciona amb una disminució de la supervivència del pacient.

Els resultats dels articles<sup>127,216</sup> coincideixen en confirmar que l'IA és més elevat en els carcinomes que en el parènquima mamari normal, que els carcinomes presenten uns índexs de proliferació i d'apoptosi superiors indicant que aquell teixit té un *turnover* molt accelerat i que l'augment de l'apoptosi pot indicar una inestabilitat genòmica que es manifesta durant la progressió del carcinoma de mama<sup>234</sup>.

Per tant, l'IA s'ha relacionat amb la resta de factors de mal pronòstic però no ha mostrat tenir significació pronòstica *per se*.

En l'intent d'obtenir més informació sobre l'apoptosi, molts articles dels publicats recentment han intentat veure si no sols l'índex apoptòtic està o no implicat en el pronòstic sinó quin és el paper dels gens que intervenen en el procés apoptòtic. En aquesta línia d'investigació s'han estudiat per diferents autors l'expressió de la p53 i bcl-2. Sirvent i col·laboradors l'any 2001<sup>181</sup> determinen que la proteïna p53 actuava com a factor pronòstic independent tant per la recidiva com per la supervivència global però en un l'estudi publicat recentment també per Sirvent i col·laboradors<sup>158</sup> en una sèrie de 153 pacients, es van realitzar determinacions immunohistoquímiques per la

p53 i els altres gens, obtenint-se en l'estudi multivariat, que només el bcl-2 actuava com a factor protector en l'evolució de la malaltia i només es va obtenir significació estadística de la p53 per la mortalitat. En aquest aspecte, estudis recents<sup>196,197</sup> han trobat que l'expressió del bcl-2 en els càncers de mama té un valor pronòstic favorable al tractament hormonal i quimioteràpic, tot i que també es comenta que l'efecte positiu del bcl-2 depenent del tipus de fàrmac utilitzat.

Altres articles observen la relació entre d'altres gens com el bag-1 i el bax amb resultats diferents en relació a la seva significació pronòstica<sup>113,158,219</sup>. Però actualment, les noves publicacions fan referència a l'estudi de les caspases en el càncer de mama. Dels 10 membres que se'n coneixen d'aquesta família de proteases de la cisteïna, les més extensament estudiades i publicades en la literatura són la caspasa 3, i la caspasa 9 i amb menys freqüència la caspasa 6. De la resta de caspases són pocs els articles que en trobem a la literatura. Tal i com hem comentat en la introducció d'aquesta tesi, la caspasa 3 és la que té un paper més important en l'activació de la cascada de les caspases. De totes les caspases descrites en la literatura, la caspasa 3 és la que té un paper protagonista en l'activació de tot el procés que conduirà a la mort cel·lular. La importància d'aquesta caspasa ve donada per la seva localització, estratègica, en la cascada d'activació. A l'igual que la caspasa 6, ambdues es troben en els passos finals de la cascada d'activació i són les anomenades, junt amb la caspasa 7, les caspases executores, responsables dels canvis que es produeixen en la cèl·lula i que li condicionen la mort. Per una banda, el camp d'estudi en aquesta matèria és molt ampli ja que encara no es coneixen exactament tots els mecanismes implicats en la cascada d'activació de les caspases i d'altra banda els resultats que se n'obtenen no són uniformes en els escassos estudis publicats a la literatura i menys els que són referents al càncer de mama.

Determinacions immunohistoquímiques de l'expressió de les caspases no n' existeixen masses casos publicats en la literatura. Molts dels estudis que s'han fet per determinar l'expressió de les caspases en determinats teixits i tumors han estat realitzats amb tècniques de PCR i citometria de fluxe<sup>231,232</sup>. La majoria dels estudis realitzats han estat en processos limfoproliferatius<sup>110,233,236</sup> i també en d'altres tipus de tumors com els de pulmó<sup>242</sup>.

En la literatura trobem dos articles que utilitzen tècniques immunohistoquímiques per a la determinació de les caspases, en concret aquests dos articles només fan la determinació de la caspasa 3 en el càncer de mama<sup>234,235</sup>.

En el nostre estudi, la determinació immunohistoquímica de la caspasa 3 i la caspasa 6 no ha demostrat, en l'anàlisi multivariat, tenir significació pronòstica. En l'estudi de correlació realitzat entre totes les variables, la caspasa 3 no mostra correlació amb cap dels altres paràmetre estudiats i tan sols la caspasa 6 ha mostrat una correlació negativa amb la necrosi i amb l'expressió immunohistoquímica de ki-67, i una correlació positiva amb la caspasa 3. Aquestes relacions, ambdues significatives estadísticament, són aïllades. Revisant la literatura sobre la determinació de caspasa 6 en teixits tumorals, són pocs els articles publicats. No s'ha objectivat articles en la literatura que facin referència a l'expressió immunohistoquímica de la caspasa 6 i el càncer de mama, per tant es requeriran estudis posteriors per veure quina relació existeix realment entre la caspasa 6 i l'índex de proliferació cel·lular i entre la caspasa 3 en el càncer de mama per tal de comprovar si els resultats obtinguts en la nostra sèrie són reproduïbles o bé només ha estat un fet aïllat fruit de les característiques de la mostra i del tipus d'anticòs utilitzat.

Fent la comparativa entre els nostres resultats i els resultats expressats en els dos articles que utilitzen la mateixa metodologia per a determinar les caspases, en concret determinen la caspasa 3, les diferències que observen és, per una banda el diferent anticòs utilitzat. En ambdós articles es fa servir un anticòs policlonal contra la caspasa 3, mentre que l'anticòs utilitzat en el nostre estudi és un anticòs monoclonal i per tant més específic. D'altra banda, en l'article publicat per Nakopoulou L i col·laboradors<sup>235</sup>, l'anticòs detecta tant la forma activa com la inactiva de la caspasa 3 a l'igual que ho fa l'anticòs monoclonal que nosaltres hem utilitzat, mentre que l'anticòs utilitzat per Hadjiloucas I i col·laboradors<sup>234</sup> ha fet servir un anticòs policlonal però que detecta la forma activa de la caspasa 3. Aquests dos articles es basen en l'estudi de l'apoptosi, a través de l'expressió immunohistoquímica de la caspasa 3, per una banda la relació amb les característiques histopatològiques del teixit mamari (tumoral i no tumoral)<sup>234</sup> i d'altra banda per veure la relació amb l'evolució clínica de la pacient<sup>235</sup>. Determinacions de la caspasa 3 en d'altres tumors d'origen no mamari<sup>243</sup> suggereixen que els nivells d'expressió de la caspasa 3 es correlacionen amb la progressió de la tumorigènesi.

Els resultats de l'estudi estadístic realitzat per Nakopoulou L i col·laboradors<sup>235</sup> mostren, en l'anàlisi multivariat, que la immunopositivitat de la caspasa 3 té significació pronòstica ( $p=0.0294$ ) de manera que, un augment de l'expressió de la caspasa 3 en el carcinoma infiltrant de mama es correlaciona amb un pitjor pronòstic. En l'anàlisi del risc proporcional de Cox obtenen que la mida tumoral, l'estat dels ganglis limfàtics i l'estat dels receptors de progesterona són els únics que actuen com a factors pronòstics independents en la seva sèrie. La diferència d'aquests resultats respecte dels obtinguts en la nostra sèrie poden també estar relacionats amb els tipus de tumors que s'han inclòs en l'estudi, nosaltres, per tal de poder unificar criteris i evitar desviacions en els resultats només hem seleccionat els carcinomes ductals infiltrants de mama, mentre que en aquest estudi, els resultats els han obtingut estudiant

indistintament, carcinomes ductals com lobulars infiltrants i en qualsevol estadi de la classificació del TNM, a més a més, el *cut off* que han establert en aquest article esta situat en el 20%, mentre que el que hem establert nosaltres en aquest estudi es situa al 10%.

Un altre factor que pot haver influenciat en la diferencia de resultats podria ser l'anticòs que han fet servir en l'estudi realitzat per Nakopoulou L i col·laboradors<sup>235</sup>. Han utilitzat un anticòs policlonal que detectava tant la forma activa com la inactiva de la caspasa 3 i argumenten que un augment de la caspasa 3 no implica un augment directe de l'apoptosi però sí que sembla indicar la seva capacitat per a fer-ho. En la nostra sèrie, l'anticòs que hem utilitzat és monoclonal i detecta tant la forma activa com la inactiva de la caspasa 3. En relació als resultats de la nostra sèrie la caspasa 3 no ha mostrat cap relació significativa en el pronòstic, sols la mida tumoral i l'atipia han obtingut valor pronòstic independent per la recidiva i aquestos juntament amb l'estat dels ganglis limfàtics han presentat valor pronòstic independent per la mortalitat. En aquest últim aspecte, els nostres resultats no són diferents als dels obtinguts en d'altres estudis<sup>158,239</sup>.

Un article publicat per O'Donovan i col·laboradors<sup>232</sup> no objectiva cap relació significativa entre la determinació mitjançant Western-Blot de la caspasa 3, la mida tumoral, l'estat dels ganglis limfàtics o l'estat dels receptors hormonals. Tampoc s'han obtinguts resultats significatius per d'altres autors quan la determinació de la caspasa s'ha realitzat immunohistoquímicament<sup>216</sup>. En aquest aspecte doncs, els resultats obtinguts en la nostra sèrie no mostren pas diferències entre els publicats en la literatura tant si s'han determinat per mètodes immunohistoquímics com per d'altres tècniques.



---

Altres estudis han analitzat les possibles diferències d'expressió de la caspasa en els diferents lesions de la mama. La tinció immunohistoquímica de la caspasa 3 és bàsicament citoplasmàtica i granular i s'observa, amb diferents graus d'intensitat, principalment en les cèl·lules tumorals i també en el component inflamatori que hi pugui existir pel voltant. El parènquima mamari no tumoral no sol presentar immunotinció o en alguns casos aquesta és d'intensitat més dèbil que l'expressada pel tumor adjacent. Un estudi comparatiu sobre l'expressió de la caspasa 3 en carcinomes de mama, fibroadenomes i parènquima mamari normal, objectiva que els carcinomes de mama presenten nivells més elevats de caspasa 3 que la resta de teixits<sup>232</sup>.

S'ha postulat que diferents graus d'apoptosi en lesions premalignes podrien reflectir un esforç per part del teixit, per eliminar les cèl·lules genèticament lesionades<sup>231</sup>. D'altra banda, l'augment d'expressió de caspasa 3 en els tumors respecte les cèl·lules no tumorals del seu voltant indiquen que les tumorals han canviat el seu fenotip per poder expressar més caspasa 3.

Quant les determinacions de les caspases s'han realitzat comparant els diferents tipus histològics de carcinomes de mama, s'ha observat que el carcinoma ductal infiltrant de mama presenta nivells superiors de caspasa 3 que els carcinomes lobulars<sup>232</sup>, aquests resultats suggeririen que els mecanismes d'apoptosi entre els dos tipus histològics podrien ser diferents.

Però la relació entre l'expressió de les caspases i el pronòstic sembla no donar-se per igual segons el tipus de tumor estudiat. Així s'ha observat que en el cas del càncer de pulmó de cèl·lula petita, un augment de l'expressió de la caspasa 3 és correlaciona amb un millor pronòstic<sup>242</sup>.

No només s'han publicat diferències entre l'expressió de les caspases segons el tipus de tumor, sinó que, en el cas de la mama, alguns articles han comentat que l'expressió de caspasa 3 es dona tant en les lesions de mama neoplàsiques com en les preneoplàsiques<sup>216</sup>. En la sèrie de Nakopoulou L<sup>235</sup>, el 90% de la tinció immunohistoquímica s'ha observat en el carcinoma infiltrant. Els resultats en la nostra sèrie, la tinció tan per a la caspasa 3 com per a la caspasa 6 només han resultat positives les cèl·lules tumorals, mentre que els conductes no tumorals no presentaven immunoreactivitat.

Referent a la relació de la caspasa 3 amb d'altres gens, s'ha objectivat que el bcl-2 i els seu homòleg bcl-xl poden prevenir el processament i l'activació de la caspasa 3 mitjançant connexions entre les proteïnes de la família del bcl-2 i les proteases de la cisteïna<sup>244</sup>. Estudis genètics suggereixen que el bcl-2 no regula els nivells de caspasa 3 sinó que controla el processament de la proteasa cap a la seva forma activa<sup>245</sup>.

La relació que sembla existir entre la caspasa 3 i el bcl-2 no sembla estar del tot estudiada en la literatura. Mentre s'ha observat que la relació que mantenen la caspasa 3 i el bcl-2 és inversa com per exemple s'ha objectivat en els limfomes B, alguns articles descarten que aquesta correlació sigui sempre certa ja que no s'ha observat en d'altres òrgans com ara l'epidermis, el tiroides o la mama<sup>246</sup>. El que sí s'ha constatat més recentment és que el bcl-2 actua controlant l'alliberació de la caspasa 3 des de l'interior de la mitocondria cap al citosol, i no només controla la sortida de la caspasa 3 sinó també la sortida de les caspases 2 i 9<sup>247</sup>.

A l'igual que l'IA, l'índex de proliferació cel·lular ha estat un dels elements que més s'ha relacionat amb el pronòstic del càncer de mama i que s'ha estudiat per veure'n la seva implicació en la supervivència de les pacients. S'ha buscat la relació possible entre l'expressió immunohistoquímica del Ki-67 amb d'altres factors pronòstics coneguts del càncer de mama.

---

L'antigen Ki-67 és un antigen nuclear que s'expressa en totes les fases del cicle cel·lular excepte en la fase G0 i l'índex de proliferació cel·lular expressat a partir de la tinció amb Ki-67 s'ha publicat com un marcador que reproduïx fiablement l'activitat proliferativa del teixit estudiat<sup>24</sup>.

Sirvent i col·laboradors<sup>62</sup>, l'any 1995, objectiven una relació entre l'expressió de la p53 i altres factors com el grau histològic, l'estat dels ganglis limfàtics, els receptors hormonals, l'expressió de l'oncogen c-erbB2 i l'expressió de Ki-67, i determina que els tumors poc diferenciats amb expressió de p53 i un alt índex de proliferació cel·lular presenten major agressivitat i alt risc de recidiva.

També s'ha constatat una correlació positiva entre l'apoptosi i la proliferació cel·lular, suggerint que aquests dos processos que determinen el creixement tumoral estan mecànicament lligats<sup>216</sup>.

Un article publicat per Kajiwara M i col·laboradors<sup>249</sup> compara l'expressió de l'índex apoptòtic i el de proliferació cel·lular i la relació existent entre ambdós en el carcinoma medul·lar de mama *versus* la resta de carcinomes de mama i defineix que la proporció establerta entre índex apoptòtic / índex de proliferació és superior en el carcinoma medul·lar que en els altres tipus de carcinomes, indicant un alt *turnover* en aquest tipus histològic de carcinoma i a més a més presenten un alt índex apoptòtic el qual podria estar relacionat amb el pronòstic d'aquest tipus de tumors, però la supervivència comparada amb els altres tipus de carcinomes de mama (amb el mateix TNM i edat de presentació que el medul·lar) és similar.

En la nostra sèrie, l'índex proliferació cel·lular definit com el percentatge de cèl·lules immunoreactives per a la tinció del Ki-67, en l'estudi multivariat no ha mostrat significació pronòstica ni per la recidiva ni per la mortalitat de la pacient. Els resultats sobre l'associació del Ki-67 amb d'altres factors pronòstics o fins i tot en la resposta al tractament del càncer de mama no són coincidents. Alguna sèrie publicada presenta

resultats similars als del nostre treball<sup>250</sup>. En d'altres articles han relacionat l'índex de proliferació amb la resposta a diversos tractaments complementaris. En aquest aspecte, Petit T i col·laboradors<sup>251</sup> han objectivat en l'anàlisi multivariat que un índex de proliferació cel·lular  $\geq 20\%$  i una absència de receptors hormonals són predictius per una resposta clínica completa per als carcinomes de mama amb tractament neoadjuvant basat amb antraciclins.

En aquesta mateixa línia d'investigació, Koda M i col·laboradors<sup>252</sup> han estudiat l'expressió immunohistoquímica de Ki-67 i dels receptors hormonals (en concret els receptors d'estrògens, tant  $\alpha$  com  $\beta$ ) en els tumors primaris de mama i en les seves metàstasis als ganglis regionals i han observat que existeix una correlació negativa entre els receptors i el Ki-67 que es manté tant en el tumor primari com en les metàstasis als ganglis de l'aixel·la.

Un altre article publicat recentment<sup>253</sup> examina la possible associació entre l'índex de proliferació cel·lular i factors hormonals en el càncer de mama. En aquest aspecte observen una disminució significativa de l'índex de proliferació cel·lular en relació amb l'edat de la pacient i un augment de l'índex associat a un augment del pes corporal, però no troben relació entre el Ki-67 i l'estat hormonal de la pacient.

Els resultats obtinguts en la nostra sèrie sobre la determinació de l'índex de proliferació cel·lular mitjançant la tinció immunohistoquímica amb Ki-67, no difereixen doncs, d'alguns dels resultats publicats en la literatura, els quals, tot i veure que l'índex de proliferació cel·lular està relacionat amb d'altres factors pronòstics, no té *per se* la mateixa significació pronòstica ni per la mortalitat ni per la recidiva. I aquests resultats són similars tant si la determinació de l'índex de proliferació cel·lular s'ha realitzat amb la tinció immunohistoquímica Ki-67 com si s'han obtingut determinant la fracció S del cicle cel·lular o fins hi tot contant el nombre de mitosis observades al microscopi amb la tinció d'H&E<sup>253</sup>.

---

Com a resum final de la discussió cal destacar la importància dels factors pronòstics clàssics que es coneixen fins ara ja que, repetidament, han presenten significació pronòstica tal i com hem anat observant en els múltiples els articles que hem anat mencionant en aquest treball.

D'altra banda, caldrà realitzar més estudis per poder valorar el possible valor pronòstic de la determinació de les caspases en el càncer de mama i veure'n quina en pot ser la seva implicació en l'evolució del tumor i en la resposta al tractament.

En aquest treball, hem objectivat que la determinació de les caspases, realitzada per tècniques immunohistoquímiques, en el tipus histològic tumoral, triat per la seva alta freqüència, i amb els diferents criteris d'inclusió dels casos en la nostra sèrie, les caspases no han presentat significació pronòstica ni per la mortalitat ni per la recidiva, únicament la mida tumoral i l'atipia o l'estat dels ganglis limfàtics són els que han obtingut un valor pronòstic independent. Aquests resultats, com hem anat desenvolupant en la discussió no són diferents dels que apareixen publicats en la literatura tot i que, com també hem pogut observar, existeixen algunes discrepàncies que poden ser motivades per la diferent metodologia utilitzada, pels diferents tipus de tumors en els quals s'ha realitzat la determinació i per la manca d'una experiència extensa en el camp de les caspases.

No són moltes les publicacions que apareixen fent referència a la determinació immunohistoquímica de les caspases i menys quan s'apliquen en l'estudi del càncer de mama, tal i com hem pogut constatar en aquest treball. A més a més de totes les caspases descrites, és la caspasa 3, per estar situada en un punt clau en la cascada d'activació, la que s'ha estudiat amb més intensitat seguida de la caspasa 9 i la 6. Però la resta de caspases tot i no estar situades en punts claus en la cascada, estan per estudiar amb detall i veure'n si poden tenir o no implicació en el pronòstic dels tumors.

A mesura que passen els anys es van descobrint nous factors que intervenen en el mecanisme de l'apoptosi i, tot i que sembla que s'està avançant mol en el camp de l'apoptosi i els gens que hi estan implicats, encara ens queda molt camí per endavant per continuar investigant en aquesta línia i poder obtenir resultats que aportin un futur més esperançador a tots els que, d'una manera o d'una altra, aquest procés els pugui condicionar el pronòstic o la resposta a un determinat tractament.

## **6 CONCLUSIONS**





## 6.1 CONCLUSIONS DESGLOSSES

Les conclusions que s'han pogut extreure dels resultats obtinguts en aquest treball són les següents:

1. Existeix una correlació positiva entre la majoria dels factors clínico-patològics estudiats com són la mida tumoral, el grau histològic, la necrosi i l'estat dels ganglis limfàtics.
2. En l'anàlisi de correlació, l'índex apoptòtic ha mostrat tenir relació amb tots els factors clínico-patològics estudiats excepte l'edat de les pacients i les caspases 3 i 6.
3. L'índex de proliferació cel·lular ha mostrat correlació amb les variables clínico-patològiques estudiades en aquesta sèrie a excepció de l'edat de les pacients en el moment del diagnòstic i la caspasa 3.
4. L'índex de proliferació cel·lular ha presentat, en l'anàlisi de correlació, una relació negativa amb la caspasa 6.
5. En l'anàlisi de correlació, la determinació immunohistoquímica de les caspases no ha mostrat tenir relació amb la resta de paràmetres estudiats.
6. En l'anàlisi multivariat, l'estat dels ganglis limfàtics i l'atipia citològica s'han establert com a factors pronòstics independents, tan per a recidiva com per a mortalitat, en el cas de carcinomes ductals infiltrants NOS en estadi pT1 – pT2 de la classificació del TNM, inclosos en aquesta sèrie.
7. En l'anàlisi multivariat, la mida tumoral ha esdevingut factor pronòstic només per a la recidiva tumoral.

## **CONCLUSIONS**

---

8. En l'anàlisi multivariat, la mida tumoral no s'ha identificat com a valor pronòstic independent per a la mortalitat.
9. En l'anàlisi multivariat, l'índex apoptòtic (realitzat immunohistoquímicament mitjançant la tècnica de TUNEL) no ha mostrat ser un valor pronòstic independent ni per la recidiva ni per la mortalitat.
10. En l'anàlisi multivariat, l'expressió immunohistoquímica de les caspases no han presentat valor pronòstic independent ni per la recidiva ni per la mortalitat.
11. En l'anàlisi multivariat, l'índex de proliferació cel·lular no ha mostrat ser un valor pronòstic independent ni per la recidiva ni per la mortalitat.

## 6.2 CONCLUSIÓ GLOBAL

L'estudi sobre la implicació de les caspases en el pronòstic del càncer de mama no ha obtingut una significació pronòstica estadísticament significativa. Al llarg de la discussió s'han comparat els nostres resultats amb els publicats en d'altres estudis i s'han valorat les possibles diferències tant des del punt de vista de metodologia en funció de les tècniques, tincions i mètodes de valoració, com en els diferents resultats per tal d'obtenir una visió crítica de les possibles diferents conclusions.

Els resultats que hem obtingut en aquest estudi i en un estudi realitzat prèviament, mostren que segueixen sent els factors pronòstics clàssics coneguts els que continuen tenint una vital importància en el pronòstic del càncer de mama i en la supervivència de les pacients.

Serà convenient doncs, continuar en aquesta línia d'investigació per poder determinar si d'altres tipus de caspases, que no s'ha valorat en aquest estudi, o d'altres factors que intervenen en l'apoptosi poden estar involucrats en major o menor grau en el pronòstic d'aquest tipus de càncer.

Continuem tenint un ampli camp d'investigació que requerirà d'estudis posteriors amb d'altres tècniques diferents a les utilitzades en aquest estudi o valorant d'altres aspectes de la biologia i la genètica del càncer de mama per poder obtenir més resultats i anar desglossat tot el mecanisme apoptòtic per tal de no deixar cap lligam, que pogués tenir certa implicació pronòstica, sense estudiar.



## **7 BIBLIOGRAFIA**



1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153-156
2. Sanjosé S. Epidemiología del cáncer de mama. Factores de riesgo. *Clin e Inven Ginecología y Obstetrícia* 1998;2-7
3. Moreno A, Figueras A, Lloveras B, Escobedo A, Griera E, Sierra A, Fabra A. Apoptosis in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast J* 2001; 7: 245-8
4. Borràs JM, Borràs J, Bosch FX, Fernández E, Galceran J, Gispert R, González JR, Izquierdo A, Marcos R, Moreno V, Peris M, Puig X, Sánchez V, Viladiu P. Càncer Catalunya 2001. l'Hospitalet: Institut Català d'òncologia, Departament de Sanitat i Seguretat Social;2001
5. Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003;39:1718-1729.
6. Parkin Dm, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. the global picture. *Eur J Cancer* 2001;37:54-66
7. Consensus Meeting. Oct 3 to 5, 1985, New York, Cancer committee of the College of American Pathologists: Is "Fibrocystic disease" of the breast precancerous?. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:171-173
8. Page DL. Cancer risk assessment in benign breast biopsies. *Hum Pathol* 1986:871-874
9. Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RV. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. Cancer committee of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:1053-1055
10. Carter CL, Corle DK, Micozzi MS, Schatzkin A, Taylor PR. A prospective study of the development of breast cancer in 16692 women with benign breast disease. *Am J Epidemiol* 1998;128:467-477
11. Dupont WD, Parl FF, Harymann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrel JA et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 1993;71:1258-1265
12. Page DL, Dupont WD. Anatomic indicators (hystologic and cytologic) of increased breast cancer risk. *Breast Cancer Res and Treat* 1993;28:157-166
13. Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* 1990;65:518-529
14. Levshin V, Pikhut P, Ykovleva I, Lazarev I. Benign lesions and cancer of the breast. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:37-40
15. Schnitt SJ. Benign breast disease and breast cancer risk: morphology and beyond. *Am J Surg Pathol* 2003;27(6):836-841
16. Mokbel K, Price RK, carpenter R. Radial scars and breast cancer. *N Engl J Med* 1999;15:210

## BIBLIOGRAFIA

---

17. Jacobs TW, Byrne C, Colditz G, Connolly JL, Schnitt SJ. Radial scars in benign breast biopsy specimens and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1999;340:430-436
18. Ma L, Boyd NF. Atypical hyperplasia and breast cancer risk: a critique. *Cancer causes control* 1992;3:517-525
19. Marshall LM, Hunter DJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Byrne C, London SJ, Colditz GA. Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:297-301
20. Webb PM, Byrne C, Schnitt SJ, Connolly JL, Jacobs T, Peiro G, Willet W, Colditz GA. Family history of breast cancer, age and benign breast disease. *Int J Cancer* 2002;20:375-378
21. Skolnick MH, Cannon – Albright LA. Genetic predisposition to breast cancer. *Cancer* 1992;70:1747 – 1754
22. Wooster R, Neuhausen Susan L, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, Fields P, Marshall G, Narod S, Lenois GM, Lynch H, Feunteun J, Devilee P, Cornelisse CJ, Menko FH, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Pye C, Lewis CM, Cannon-Albright LA, Peto J, Ponder BAJ, Skolnick MH, Easton DF, Goldgar DE, Stratton MR. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265:2088-2090
23. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strasno A, Swensen J, Miki Y, Eddington K, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Ding W, Gholami Z, Söderkvist P, Terry L, Jhanwar S, Berchuck A, Iglehart JD, Marks J, Ballinger DG, Barrett JC, Skolnick MH, Kamb A, Wiseman R. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994;266:120-122
24. Goffin JR, Chappuis PO, Begin LE, Wong N, Brunet JS, Hamel N, Paradis AJ, Bouyrd J, Foukes WD. Impact of germline BRCA1 mutations and overexpression of p53 on prognosis and response to treatment following breast carcinoma: 10-year follow-up data. *Cancer* 2003;97:527-536
25. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997;336:1401-1408
26. Hartmann A, Blaszyk H, Kovach J, Sommer SS. The molecular epidemiology of p53 gene mutation in human breast cancer. *Trends Genet* 1997;13:27-33
27. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1991;325:1831-1836
28. Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ, Risch N. An association between the risk of cancer mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med* 1993;329:517-523



29. Steck PA, Perhouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997;15:356-362
30. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:36-47
31. Harlap S. Oral contraceptives and breast cancer. Cause an effect?. *J Reprod Med* 1991;78:161-70
32. Gabrick DM, Hartmann LC, Cerhan JR. Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with family history of breast cancer. *JAMA* 200;284:1791-1798
33. Marchbanks PA; McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spiritas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002;346:2025-2032
34. Mishell DR. Breast cancer risk with oral contraceptive and oestrogen replacement therapy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1994;34:316-320
35. Chen CL, Weiss NS, Newcomg P, Barlow W. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *JAMA* 2002;13:734-41
36. Collins JA, Schlesselman JJ. Perimenopausal use of reproductive hormones effects on breast and endometrial cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;29:511-525
37. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover. Menopausal estrogen ans estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 2000;283:485-491
38. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998;279:535-540
39. Byers T. Nutritional risk fators for breast cancer. *Cancer* 1994;74:288-295
- 40.a London SJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner BA, Speizer FE. Prospective study of smoking and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Ins* 1989;81:1625-1631
- 40.b Palmer JR, rosenberg L, Clarke EA, Stolley PD, Warshauer ME, Zauber AG, Shapiro S. Breast cancer and cigarette smoking: a hypothesis. *Am J Epidemiol* 1991;134:1-13
- 41 Dorgan JF, Brown C, Barrett M, Splansky GL, Kreger BE, D'Agostino RB, Albanes D, Schatzkin A. Physical activity and risk of breast cancer in the Framingham/heart study. *Am J Epidemiol* 1994;139:662-669

## BIBLIOGRAFIA

---

- 42 Tulinius H, Sigvaldason H, Olafsdottir G. Left and right sided breast cancer. *Pathol Res Prat* 1990;186:92-94
- 43 Park JM, Choi HK, Bae SJ, Lee MS, Ahn SH, Gong G. Clustering of breast microcalcifications: revisited. *Clin Radiol* 200;55:114-118
- 44 Warner E, Lockwood G, Trichler D, Boyd NF. The risk of breast cancer associated with mammographic parenchymal patterns: a meta.analysis of the published literature to examine the effect of methods of classification. *Cancer Detect Prev* 1992;16:67-72
- 45 Byrne C, Schairer C, Brinton LA, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Carter C, Hoover R. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2001;12:103-110
- 46 World Health Organization. Histological typing of breast tumours. 2nd. ed. International Histological Classification of Tumours. No. 2. World Health organization. 1981. Genova
- 47 Elston CW, Ellis IO. Classification of malignant breast disease. In: *The Breast. Systematic Pathology*. CW Elston and IO Ellis (Eds) 3rd ed. Churchill Livingstone: Edimburgh, pp. 239-247
- 48 Liberman I. Pathologic analysis of sentinel lymph-nodes in breast carcinoma. *Cancer* 200;88:971-977
- 49 Allred DC, Elledge RM. Caution concerning micrometastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer* 1999;86:905-907
- 50 Tavassoli FA. *Pathology of the breast*. Norwalk (Connecticut): Appleton & Lange;1992
- 51 Orbo A, Stalsber H, Kunde D. Topographic criteria in the diagnosis of tumor emboli in intramammary lymphatics. *Cancer* 1990;66:972-977
- 52 Chen YY, Schnitt SJ. Prognostic factors for patients with breast cancers 1cm and smaller. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:209-225
- 53 Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S. Natural history of node-negative breast cancer. A study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1995;13:1144-1151
- 54 Leitner SP, Swern AS, Weinberger D. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer* 1995;76:2266-2274
- 55 Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993;11:2090-2100
- 56 Palomo-González MJ, Gúezmes-Domingo A, Pérez-Requena J, Rego-González M, López-Muñoz A. Proliferación celular cuantificada mediante el índice de actividad mitótica y PCNA en relación con el estado de los receptores hormonales en el cáncer de mama. *Rev Esp Patol* 1998;31:207-215

- 57 Biesterfeld S, Noll I, Noll E, Wohltmann D, Böcking A. Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer. *Hum Pathol* 1995;26:47-52
- 58 Baak JPA, VanDop H, Kurver PHJ. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985;56:372-382
- 59 Clayton F. Pathologic correlates of survival in 378 lymph node-negative infiltrating ductal carcinomas. Mitotic counts is the best single predictor. *Cancer* 1991;68:1309-1317
- 60 Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Trihia H, Elston CW, Gelber RD, Goldhirsch A, Lindtner J, Cortes-Funes H, Simoncini E, Byrne MJ, Golouh R, Rudenstam CM, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer* 1998;83:1529-1539
- 61 Sirvent JJ, Santafe M, Salvado MT, Alvaro T, Raventos A, Palacios J. Hormonal receptors, cell proliferation fraction (Ki-67) and c-erbB2 amplification in breast cancer. Relationship between differentiation degree and axillary lymph node metastases. *Histol Histopathol* 1994;9:563-570
- 62 Sirvent JJ, Salvador MT, Santafè M, Martínez S, Brunet J, Álvaro T, Palacios J. P53 in breast cancer. Its relation to histological grade, lymph-node status, hormone receptors, cell-proliferation fraction (Ki-67) and c-erbB2. Immunohistochemical study of 153 cases. *Histol Histopathol* 1995;10:531-539
- 63 Gilchrist KW, Gray R, Fowble B, Tormey DC, Taylor SG. Tumor necrosis is a predictor for early recurrence and death in lymph-node-positive breast cancer: a 10-year follow-up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol* 1993;11:1929-1935
- 64 Nixon AJ, Schnitt SJ, Gelman R, Gage I, Bornstein B, Hetelekidis S, Recht A, Silver B, Harris JR, Connolly JL. Relationship of tumor grade to the other pathologic features and to treatment outcome of patients with early stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy. *Cancer* 1996;78:1426-1431
- 65 Schnitt SJ. Morphologic risk factors for local recurrence in patients with invasive breast cancer treated with conservative surgery and radiation therapy. *Breast J* 1997;3:261-266
- 66 Hasebe T, Mukai K, Tsuda H, Ochiai A. New prognostic histological parameter of invasive ductal carcinoma of the breast: clinicopathological significance of fibrotic focus. *Pathol Int* 2000;50:263-272
- 67 Fisher ER, Kotmal N, Hermann C, Fisher B. Types of tumor lymphoid response and sinus histiocytosis. *Arch Pathol Lab Med* 1983;107:222-227
- 68 Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:227-238
- 69 Barnes DM, Hanby AM. Oestrogen and progesterone receptors in breast cancer: past, present and future. *Histopathology* 2001;38:271-274
- 70.a Scawn R, Shousha S. Morphologic spectrum of estrogen receptor-negative breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:325-330

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- 70.b Leong AS-Y, Lee AKC. Biological indices in the assessment of breast cancer. *J Clin Pathol* 1995;48:221-238
- 71 Honma N, Sakamoto G, Akiyama F, Esaki Y, Sawabe M, Arai T, Hosoi T, Harada N, Younes M, Takubo K. Breast carcinoma in women over the age of 85: distinct histological pattern and androgen, oestrogen, and progesterone receptor status. *Histopathology* 2003;41:120-127
- 72 McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326:1756-1761
- 73 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817-3827
- 74 Caleffi M, Teague MW, Jensen RA, Vnecak-Jones CL, Dupont WD, Parl FF. P53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer* 1994;73:2147-2156
- 75 van Agthoven T, Timmermans M, Foekens JA, Dorssers LC, Henzen-Logmans SC. Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptors in normal, benign, and malignant human breast tissues using dual staining immunohistochemistry. *Am J Pathol* 1994;144:1238-1246
- 76 Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When the tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:2334-2356
- 77 Bayer-Garner IB, Smoller B. Androgen receptors: a marker to increase sensitivity for identifying breast cancer in skin metastasis of unknown primary site. *Mod Pathol* 2000;13:119-122
- 78 Agoff Sn, Swanson PE, Linden H, Hawes SE, Lawton TJ. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol* 2003;120:725-731
- 79 Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Sem Oncol* 1999;26:51-59
- 80 De Potter CR, Schelfhout AM. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Archiv* 1995;426:107-115
- 81 Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:139-152
- 82.a Kurebayashi J. Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 2001;8:45-51
- 82.b Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Lacopetta B, Fontaine H, Grenier J, Ciline S, Theillet C. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res* 2000;60:1077-1083

- 
- 83 Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridisation: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997;15:2894-2904
- 84 Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S, Terada M, Yamamoto H. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer* 1990;65:1794-1800
- 85 Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009
- 86 Barghava V, Kell DL, van de Rijn M, Warnke RA. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol* 1994;2:143-145
- 87 Caleffi M, Teague MW, Jensen RA, Vnencak-Jones CL, Dupont WD, Parl FF. P53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer* 1994;73:2147-2156
- 88 van Agthoven T, Timmermans M, Foekens JA, Dorssers LC, Henzen-Logmans SC. Differential expression of estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptors in normal, benign, and malignant human breast tissues using dual staining immunohistochemistry. *Am J Pathol* 1994;144:1238-1246
- 89.a Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:2505-2512
- 89.b Caleffi M, Teague MW, Jensen RA, Vnencak-Jones CL, Dupont WE, Parl FF. P53-suppressor gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer* 1994;73:2147-2156
- 90 Hirano A, Emi M, Tsuneizumi M, Utada Y, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Haga S, Kajiwara T, Nakamura Y. Allelic losses of foci at 3q25.1, 8p22, 13q12, 17p13.3 and 22q13 correlate with postoperative recurrence in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:876-882
- 91 Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-259
- 92 Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types of cell death. *Arch Pathol Labor Med* 1993; 117: 1208-14
- 93 Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. Patología estructural y funcional. Sexta Edición. Madrid, McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, 2000

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- 94 Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metas Rev* 1992; 11: 95-103
- 95 Kerr JRF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- 96 Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull* 1997;53:591-603
- 97 Albright CD, Liu R, Mar MH, Shin OH, Vrablic AS, Salganik RI, Zeisel SH. Diet, apoptosis, and carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1997;422:97-107
- 98 Bennett RE, Harrison MW, Bisop CJ, Searle J, Kerr JF. The role of apoptosis in atrophy of the small gut mucosa produced by repeated administration of cytosine arabinoside. *J Pathol* 1984; 142: 259-63
- 99 Clutton S. The importance of oxidativestress in apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:662-668
- 100 Hickman JA, Boyle CC. Apoptosis and cytotoxins. *Br Med Bull* 1997;53:632-643
- 101 Lyons SK, Clarke AR. Apoptosis and carcinogenesis. *Br Med Bull* 1997;53:554-569
- 102 Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 from a ternary complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 5841-5845
- 103 Rinkenberger JL, Korsmeyer SJ. Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:589-596
- 104 Korsmeyer SJ. Programmed cell death and the regulation of apoptosis. *Harvey Lect* 1999;95:21-41
- 105 Slater AF, Nobel CS, Orrenius S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:59-62
- 106 Young LS, Dawson CW, Elipoulos AG. Viruses and apoptosis. *Br Med Bull* 1997; 53: 509-21
- 107 Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13: 239-52
- 108 Miura M, Zhu H, Rotello R. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$  converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced3*. *Cell* 1993;75:653-60
- 109 Hilbi H, Moss JE, Hersh D. Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 1998;273:32895-32900
- 110 Chhanabhai BM, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Reed JC, Gascoyne RD. Immunohistochemical analysis of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme/ced-3 family protease, CPP32/Yama/Caspase-3, in Hodgkin's disease. *Blood* 1997;90:2451-2455

- 111 Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, Casano FJ, Miller DK, Molineaux SM, Yamin TT, Yu VL, Nicholson DW. Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICErelIII and ICErelIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 1995;270:15870-15876
- 112 Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Res* 1995;55:2737-2742
- 113 Liu X, Kim CN, Pohl J, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *J Biol Chem* 1996;271:13371-13376
- 114 Fernández-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang L, Yu Z, Croce CM, Salveson G. Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res* 1995;55:6045-605
- 115 Wang J, Zheng L, Lobito A. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 1999;98:47-58
- 116 Luque J, Heráez A. *Biología molecular e ingeniería genética*. Harcourt 2001, pág 432
- 117 Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Cell Biol* 1998;8:267-271
- 118 Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16
- 119 Kidd V. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Ann Rev Physiol* 1998; 60: 533-573
- 120 Gorman AM, Orrenins S, Cecattelli S. Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport* 1998; 9: 49-55
- 121 Zou H, Henzel W, Liu X. Apaf1, a human protein homologous to C Elegans CED-4 participate in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413
- 122 Kluck RM, Bossy Wetzler E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6
- 123 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
- 124 Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell* 1995;82:349-352
- 125 Tan X, Wang J. The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 116-120
- 126 Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase - 9, Bcl-xL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 5841-5845

## BIBLIOGRAFIA

---

- 127 Lipponen P, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994; 173: 333-339
- 128 Zheng WQ, Zhan RZ. Quantitative comparison of apoptosis to cell proliferation and p53 protein in breast carcinomas. *Analyt. Quant Cytol Histol* 1998; 20: 1-6
- 129 Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocrine-Rel Cancer* 1999; 6: 13-16
- 130 Mustonen M, Taunio H, Pääkkö P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathol* 1997; 31: 347-353
- 131 Ellis PA, Smith IE, Detre S, Burton SA, Salter J, A'Hern R, Walsh G, Johnston SRD, Dowsett M. Reduced apoptosis and proliferation and increased bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 48: 107-116
- 132 Slooten HJ van, Vijver MJ van de, Velde CJ van de, Dierendonck JH van. Loss of Bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death but also with increased proliferation activity. *Br J Cancer* 1998; 77: 789-796
- 133 Weisman JH, Jonker RR, Keijzer R, Velde CJH, van de Cornelisse CJ, Dierendonck JH van. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 7-12
- 134 Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 1997; 251: 98-102
- 135 McConkey DJ. Calcium flux measurement in cell death. In: Cotter TG, Martin SJ, editors. *Techniques in apoptosis. A user's guide*. London: Portland Press Ltd; 1996: 133-148
- 136 Eastman A. Assay for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca<sup>++</sup> associated with apoptosis. *Met Cell Biol* 1995; 46: 41-55
- 137 Kroemer G. The protooncogene bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med* 1997; 3: 614-20
- 138 Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 1998; 252:1-15
- 139 Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 1996; 157: 3980-3987
- 140 Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanem C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis* 1998; 3: 115-121
- 141 Nicoletti Y, Migliorati G, Pagliacci MC. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 1991; 139: 271-279



- 142 Darzynkiewicz Z, Li X. Measurements of cell death by flow cytometry. In: Cotter TG, Martin SJ, editors. *Techniques in apoptosis. A user's guide*. London: Portland Press Ltd; 1996: 71-106
- 143 Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 1995; 184: 39-51
- 144 Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, Schie RCAA van, LaFace DM. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182: 1545-1556
- 145 Engeland M van, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996; 24: 131-139
- 146 Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF. Imaging of Apoptosis (programmed cell death) with Tc99m Annexin V. *J Nucl Med* 1999; 40: 184-191
- 147 Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5214-5218
- 148 Ngan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the Bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1988; 318: 1638-1644
- 149 Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlations with particular reference to estrogen receptor status. *Virchows Arch* 1994; 424: 47-51
- 150 Krajewsky S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994; 145: 1323-36
- 151 Krajewsky S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Reed JC. Reduced expression of the proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combined chemotherapy and shortened survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 4471-8
- 152 Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, Leek RD, Fina P, Fox S, Bonzanini M, Girlando S, Morelli L, Eccher C, Pezzella F, Doglioni C, Dalla Palma P, Harris A.. Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: a study with long-term follow-up. *Hum Pathol* 1996; 27: 1149-1155
- 153 Bargou RC, Dainet PT, Mapara MY, Bommert K, Wagener C, Killinch B, Royer HD, Dörken B. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer* 1995; 60: 854-859

## BIBLIOGRAFIA

---

- 154 Kapucuoglu N, Losi L, Eusebi V. Immunohistochemical localization of Bcl-2 and Bax Proteins in in situ and invasive breast carcinomas. *Virchows Archiv* 1997; 430: 17-22
- 155 Sierra A, Castellsague X, Coll T, Mañas S, Escobedo A, Moreno A, Fabra A. Expression of death-related genes and their relationship to loss of apoptosis in T1 ductal breast carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 79: 103-110
- 156 Veronese S, Mauri FA, Caffo O, Scaioli M, Aldovini D, Perrone G, Galligioni E, Delioni C, Dalla Palma P, Barbareschi M. Bax immunohistochemical expression in breast carcinoma: a study with long term follow-up. *Int J Cancer* 1998; 79: 13-18
- 157 Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, Recant WM. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: 230-7
- 158 Sirvent JJ, Aguliar MC, Olona M, Pelegrí A, Blázquez S, Gutiérrez C. Prognosis value of apoptosis in breast cancer (pT1-pT2). A TUNEL, p53, bcl-2, bag-1 and bax immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 2004;19:759-770
- 159 Silvestrini R, Venerois S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzeti M, di Fronzo G, Rilke F; Veronesi U. The bcl-2 protein: A prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499
- 160 Kymionis GD, Dimitrakakis CE, Konstadoulakis MM, Arzimanoglou I, Leandros E, Chalkiadakis G, Keramopoulos A, Michalakis S. Can expression of apoptosis genes, bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients?. *J Surg Res* 2001; 99: 161-168
- 161 Bellamy CO. p53 and apoptosis. *Br Med Bull* 1997; 53: 522-538
- 162 Meterissian SH. Apoptosis. Its role in the progression of and chemotherapy for carcinoma. *J Am Col Surg* 1997; 184: 658-666
- 163 Soini Y, Pääkkö P, Letho VP. Histological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 1998; 153: 1041-1053
- 164 Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, Watanabe T, Kanno W, Kiyoshi H, Tsuchiya A. Apoptotic index correlates to bcl-2 and p53 protein expression. Histological grade and prognosis in invasive breast cancers. *Anticancer Res* 1998; 18: 1989-1998
- 165 Jong JS de, Diest J van, Baak JPA. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 368-377
- 166 Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive carcinoma. *Cancer* 1998; 82:1296-1302
- 167 Allan DJ, Howell A, Roberts SA, Williams GT, Watson RJ, Coyde JD, Clarke RB, Laidlaw IJ, Potten CS. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. *J Pathol* 1991;163: 337-342

- 168 Slooten HJ van, Clahsen PC, Dierendonck JH van, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, Velde CJ van de, Vijver MJ van de. Expression of Bcl-2 in node negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of peri-operative chemotherapy. *Br J Cancer* 1996; 74: 78-85
- 169 Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma V-M, Syrjänen K. The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 687-92
- 170 Evan GI, Harrington E, McCarthy N, Gilbert C, Benedict MA, Nunez G. Integrated control of cell proliferation and apoptosis by oncogenes. In: *Apoptosis and Cell Cycle Control in Cancer*. Thomas NSB (ed). BIOS Scientific:Oxford, pp. 109-129
- 171 Berns EMJJ, Klijn JGM, Putten WLJ van, Staveren IL van, Portengen H, Fockens JA. c-myc amplification is a better prognosis factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1107-13
- 172 Borg A, Baldetorp B, Fernö M, Olsson H, Sigurdsson H. c-myc amplification an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer* 1992; 51: 687-91
- 173 Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma V-M, Syrjänen K. Expression of p53 protein has no independent prognostic value in breast cancer. *J Pathol* 1995; 177: 225-232
- 174 Kato T, Kamoeka S, Kimura T, Tanaka S, Nishikawa T, Kobayashi M. p53, mitosis, apoptosis and necrosis as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 1105-1112
- 175 Harn HJ, Shen KL, Yuch KC, Ho LI, Yu JC, Chiu SC, Lee WH. Apoptosis occurs more frequently in intraductal carcinoma than in infiltrating duct carcinoma of human breast and correlates with altered p53 expression detected by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC nick and labelling (TUNEL). *Histopathol* 1997; 31: 534-9
- 176 Slooten HJ van, Vijver MJ van de, Borresen A, Eyfjord JE, Valgardsdottir R, Scherneck S, Nesland JM, Devilee P, Cornelisse CJ, Dierendonck JH van. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol* 1999; 189: 504-513
- 177 Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis breast cancer. *J Natl cancer Inst* 1992;84:845-855
- 178 Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995; 1: 1029-1034

## BIBLIOGRAFIA

---

- 179 Kovach JS, Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham J, Schaid D, Sommer SS. Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1093-1096
- 180 Turner BC, Gumbs AA, Carbone CJ, Carter D, Glazer PM, Haffty BG. Mutant p53 protein overexpression in women with ipsilateral breast tumor recurrence following lumpectomy and radiation therapy. *Cancer* 2000; 88: 1091-1098
- 181 Sirvent JJ, Fortuño-Mar A, Olona M; Orti A. Prognosis value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histol Histopathol* 2001; 16: 99-106
- 182 Thirion A, Rouanet P, Thezenas S, Detournay D, Grenier J, Lopez-Crapez E. Interest of investigating p53 status in breast cancer by four different methods. *Oncol Rep* 2002; 9: 1167-1172
- 183 Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993; 72: 3641-3647
- 184 Lipponen P, Aaltomaa S, Syrjänen S, Syrjänen K. P53 protein expression in breast cancer as relates to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 1993; 55: 51-56
- 185 Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 213-217
- 186 Charpin C, DeVicor B, Andrac L, Amabile J, Bergeret D, LaVaut MN, Allasia C, Piana L. P53 quantitative immunohistochemical analysis in breast carcinomas. *Hum. Pathol* 1995; 26:159-166
- 187 Gohring UJ, Scharl A, Heckel C, Ahr A, Crombach G. p53 protein in 204 patients with primary breast carcinoma: immunohistochemical detection and clinical value as a prognostic factor. *Arch Gynecol Obstet* 1995; 256: 139-146
- 188 Rosanelli GP, Steindorfer P, Wirnsberger GH, Klimpfinger M, Ratschek M, Puerstner P, Auner H, Berhold A. Mutant p53 expression and DNA analysis in human breast cancer comparison with conventional clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 1995; 15: 581-586
- 189 Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 1995; 13: 821-830
- 190 Sirvent JJ, Salvado MT, Santafe M, Martinez S, Brunet J, Alvaro T; Palacios J. p53 in breast cancer. Its relation to histological grade, lymph-node status, hormone receptors, cell-proliferation fraction (Ki-67) and c-erbB-2. Immunohistochemical study of 153 cases. *Histol Histopathol* 1995; 10: 531-539
- 191 Horne GM, Anderson JJ, Tiniakos DG, McIntosh GG, Thomas MD, Angus B, Henry JA, Lennard TW, Horne CH. p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinomas: a comparison of four antibodies for immunohistochemistry. *Br J Cancer* 1996; 73: 29-35

- 192 Katoh A, Breier S, Stemmler N, Specht S, Blanock K, D'Amico F. P53 protein expression in human breast carcinoma: lack of prognosis potential for recurrence of the disease. *Anticancer Res* 1996; 16: 1301-1304
- 193 Chen HH, Su WC, Chang TW, Lee WY. p53 and c-erbB-2 but not bcl-2 are predictive of metastasis-free survival in breast cancer patients receiving post-mastectomy adjuvant radiotherapy in Taiwan. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32: 332-339
- 194 Volkmann M, Sinn HP, Gaugel D, Frey M, Hajjar Y, Ludwig J, Hansel S, Bastert G, Wallwiener D, Fiehn W, Zentgraf H, Huober J. Anti-p53 in breast cancer: concordance of different assay procedures and association with p53 antigen expression. *Oncol* 2002; 63: 297-305
- 195 Lipponen P, Pietiläinen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjänen K. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 1995; 177: 49-55
- 196 Hockenbery DM. The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 1992; 4: 413-20
- 197 Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Willsher P, McClelland RA, Hoyle HB, Kyme SR, Finlay P, Blamey RW, Nicholson RI. Immunohistochemical localisation of Bcl-2 protein in human breast cancer and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994; 59: 619-28
- 198 Sierra A, Lloveras B, Castellsague X, Moreno L, García-Ramírez M, Fabra A. Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 60: 54-60
- 199 Sundland AS, Ahn C, Battifora H. Estudio inmunohistoquímico de bcl-2 y MIB-1/Ki-67 en el carcinoma de mama. Análisis retrospectivo en 238 casos. *Medicina* 1996; 56: 255-58
- 200 Bhargava V, Thor A, Deng G, Ljung BM, Moore II DH, Waldmann F, Benz C, Goodson III W, Mayal B, Chew K, Smith HS. The association of p53 immunopositivity with tumour proliferation and other prognostic indicators in breast cancer. *Mod Pathol* 1994; 17: 361-368
- 201 Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with estrògens receptor-positive, epidermal growth factor receptor negative tumors and in situ. *Br J Cancer* 1994; 69:135-139
- 202 Silvestrini R, Venerois S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzeti M, di Fronzo G, Rilke F; Veronesi U. The bcl-2 protein: A prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499
- 203 Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C, Palma PD, Mauri FA, Boracchi P, Bevilacqua P, Caffo O, Morelli L, Verderto P. Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 189-198

## BIBLIOGRAFIA

---

- 204 Veronese S, Mauri FA, Caffo O, Scaioli M, Aldovini D, Perrone G, Galligioni E, Delioni C, Dalla Palma P, Barbareschi M. Bax immunohistochemical expression in breast carcinoma: a study with long term follow-up. *Int J Cancer* 1998; 79: 13-18
- 205 Wu J, Shao ZM, Shen ZZ, Lu JS, Han QX, Fontana JA, Barksy SH. Significance of apoptosis and apoptosis-related proteins, bcl-2 and bax in primary breast cancer. *Breast J* 2000; 6: 44-52
- 206 Sjöström J, Blomqvist C, von Boguslawsky K, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmström P, Ostenstadt B, Wist E, Valvere V, Takayama S, Reed JC, Saksela E. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 811-816
- 207 Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994; 145: 1191
- 208 Kobayashi S, Iwase H, Ito Y, Yamashita H, Iwata H, Yamashita T, Ito K, Toyama T, Nakamura T, Masaoka A. Clinical significance of bcl-2 gene expression in human breast cancer tissues. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42: 173-181
- 209 Bukholm I, Bukholm G, Nesland JM. Reduced expression of both Bax and Bcl-2 is independently associated with lymph node metastasis in human breast carcinomas. *A.P.M.I.S.* 2002; 110: 214-220
- 210 Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erb-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer Res* 2000; 20: 4221-4226
- 211 Kymionis GD, Dimitrakakis CE, Konstadoulakis MM, Arzimanoglou I, Leandros E, Chalkiadakis G, Keramopoulos A, Michalas S. Can expression of apoptosis genes, bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients?. *J Surg Res* 2001; 99: 161-168
- 212 Villar E, Redondo M, Rodrigo I, Garcia J, Avila E, Matilla A. Bcl-2 expression and apoptosis in primary and metastatic breast carcinomas. *Tumor Biol* 2001; 22: 137-145
- 213 Yang Q, Sakurai T, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Nakamura M, Nakamura Y, Mori I, Kakudo K. Prognostic value of Bcl-2 in invasive breast cancer receiving chemotherapy and endocrine therapy. *Oncol. Rep* 2003; 10: 121-125
- 214 Del Bufalo D, Biroccio A, Triscivoglio D, Bruno T, Floridi A, Aquino A, Zupi G. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *Eur J Cancer* 2002; 38:2455-2462
- 215 Srinivas P, Abraham E, Ahamed I, Madhavan M, Vijayalakshmi NR, Naiv MK, Balam P. Apoptotic index: use in predicting recurrence in breast cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 233-238
- 216 Vakkala M, Lähteenmäki K, Raunio H, Pääkkö P, Soini Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5:319-324

- 
- 217 Pillai MR, Kesari AL, Chellam VG, Madhavan J, Nair P, Nair MK. Spontaneous programmed cell death in infiltrating duct carcinoma: Association with p53, BCL-2, hormone receptors and tumour proliferation. *Pathol Res Pract* 1998; 194: 549-557
- 218 Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30
- 219 Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; 80: 279-84
- 220 Keane MM, Ettenberg SA, Lowrey GA, Russell EK, Lipkowitz S. Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res* 1996; 56: 4791-8
- 221 Herrnring C, Reiner T, Jeschke U, Makovitzky J, Kruger K, Gerber B, Kabelitz D, Friese K. Expression of the apoptosis-inducing ligands FasL and TRAIL in malignant and benign human breast tumors. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 4791-8
- 222 Mullauer L, Mosberger L, Grusch M, Rudas M, Chott A. Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer. *J Pathol* 2000; 190: 20-30
- 223 Herr I, Wilhelm D, Bohler T, Angel P, Debatin KM. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J* 1997; 16: 6200-8
- 224 Friesen C, Herr L, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996; 2: 574-7
- 225 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1601-8
- 226 Davidson NE, Hahm HA, Armstrong DK. Apoptosis and breast cancer. In: Hickman JA, Dive C, ed. *Cancer drug discovery and development: Apoptosis and cancer chemotherapy*. Human Press, Totowa, New Jersey 1999; 291-303
- 227 Patey DH, Scarff RW. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet* 1928; 1: 801-804
- 228 Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377
- 229 Elston CW, Ellis IO. Pathological prognosis factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol* 1991;4:403-410
- 230 Coburn NG, Chung MA, Fulton J, Cady B. Decreased breast cancer tumor size, stage and mortality in Rhode Island: an example of a well-screened population. *Cancer* 2004;11:222-227

## BIBLIOGRAFIA

---

- 231 Zapata JM, Krajewska M, Krajewski S, Huang RP, Takayama S, Wangin HG, Adamson E, Reed JC. Expression of multiple apoptosis-regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:129-140
- 232 O'Donovan M, Crown J, Stunell H, Hill ADK, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:738-742
- 233 Franklin RA, McCubrey JA: Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* 2000;14:2019-2034
- 234 Hadjiloucas I, Gilmore AP, Bundrer NJ, Streuli CH. Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics. *Br J Cancer* 2001;85:1522-1526
- 235 Nakopoulou L, Alexandrou P, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Lazaris AC, Davaris PS. Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer. *Pathobiology* 2001;69:266-273
- 236 Soini Y, Pääkkö P. Apoptosis and expression of caspases 3, 6 and 8 in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *APMIS* 1999;107:1043-150
- 237 Sirvent JJ, Fortuño A, Ortí A, Olona M, Razquin S, Raventós A. Valor pronóstico de los receptores hormonales, índice de proliferación celular (Ki-67) y factores clinicopatológicos en el carcinoma ductal infiltrante de mama. Estudio inmunohistoquímico de 192 pacientes. *Rev Senología y Patol Mam* 2000;13:184-191
- 238 Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S. Natural history of node-negative breast cancer. A study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1995;13:1144-1151
- 239 Leitner SP, Swern AS, Weinberger D. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer* 1995;76:2266-2274
- 240 Seidman H, Schnaper LA, Aisner SC. Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastases. *Cancer* 1995;75:65-71
- 241 Snelling JD, Abdullah N, Brown G, King DM, Moskovic E, Gui GP. Measurement of tumour size in case selection for breast cancer therapy by clinical assessment and ultrasound. *Eur J Surg Oncol* 2004;30:5-9
- 242 Koomägo R, Volm M. Relationship between the expression of caspase-3 and the clinical outcome of patients with non-small-cell lung cancer. *Anticancer Res* 2000;20:403-496
- 243 Nakagawara A, Nakamura Y, Ikeda H, Hisawa T, Kuida K, Su MS, Zhao H, Cnaan A, Sakiyama S. High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) and CPP32 in favourable human neuroblastomas. *Cancer Res* 1997;57:4578-4584



- 
- 244 Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM. Molecular ordering of the cell death pathway: bcl-2 and bcl-xl function upstream of the ced-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1996;271:4573-4576
- 245 Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6
- 246 Hockenber D, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-6965
- 247 Mancini M, Nicholson D, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytologic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998;40:1485-1495
- 248 Cattoretti G, Becker MHG, Key G. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357-363
- 249 Kajiwara M, Toyoshima S, Yao T, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Apoptosis and cell proliferation in medullary carcinoma of the breast: a comparative study between medullary and non-medullary carcinoma using the TUNEL method and immunohistochemistry. *J Surg Oncol* 1999;70:209-216
- 250 Hlupic L, Jakic-Razumovic J, Bozikov J, Coric M, Belev B, Vrbanec D. Prognostic value of different factors in breast carcinoma. *Tumori* 2004;90:112-119
- 251 Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, Mors R, Haegeler P, Eber M, Ghnassia JP. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 2004;40:205-211
- 252 Koda M, Sulkowski S, Kanczuga-Koda L, Surmacz E, Sulkowska M. Expression of ERalpha, ERbeta and Ki-67 in primary tumors and lymph node metastases in breast cancer. *Oncol Res* 2004;11:753-759
- 253 Oestreicher N, White E, Malone KE, Porter PL. hormonal factors and breast tumor proliferation: do factors that affect cancer risk also affect tumor growth?. *Breast Cancer Res Treat* 2004;85:133-42



## **8 ANNEXES**