

Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

Tesi Doctoral

**Contribució de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L
i la inhibició de l'apoptosi en la progressió
metastàtica del càncer de mama**

Yolanda Fernàndez Amurgo

2001

Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

**Contribució de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L i la inhibició de
l'apoptosi en la progressió metastàtica del càncer de mama**

Memòria presentada per
Yolanda Fernández Amurgo

Per optar al grau de
Doctora en Bioquímica

Tesi realitzada sota la direcció de la
Dra. Àngels Sierra Jiménez
en el Departament d'Oncologia Molecular
de l'Institut de Recerca Oncològica
adscribit al departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica
Programa de Biologia i Patologies Cel·lulars (Bienni 1996-1998)
Tutor: Dr. Oriol Bachs Valldeneu

Àngels Sierra

Yolanda Fernández

Barcelona, desembre de 2001

Als meus pares

i

al meu germà

-Hi ha tres menes d'alquimistes -em va dir el meu mestre-. Els qui són vagues perquè no saben de què parlen; els qui són vagues perquè saben de què parlen, però saben que el llenguatge de l'alquímia està adreçat al cor i no pas a la raó.

-Quina és la tercera mena? -li vaig demanar.

-Els qui mai no han sentit parlar de l'alquímia, però que han aconseguit descobrir la Pedra Filosofal mitjançant la seva vida.

L'Alquimista

Agraiments

La realització d'aquesta tesi ha estat possible gràcies a la participació i a l'amistat de moltes persones. Molt especialment, voldria expressar el meu agraïment:

A la Dra. Àngels Sierra, la meva directora de tesi, per oferir-me l'oportunitat de realitzar la tesi sobre un tema que ja em semblava interessant sense pràcticament conèixer-lo. Voldria donar-li les gràcies per totes les idees i consells que m'ha ofert al llarg d'aquests anys; també voldria reconèixer el seu esperit lluitador i agrair-li el coratge i la positivitat en moments crítics. Tampoc voldria deixar de mencionar el seu interès i preocupació perquè en tot moment jo pogués disposar de finançament per tal de poder realitzar aquest treball. Gràcies pel que he après, tant científicament com personalment.

A la Laura, la Sandra i l'Olga, a totes tres els voldria agrair el seu ajut imprescindible. Gràcies per les tardes passades intentant entendre resultats i fent la interpretació correcta; per la seva simpatia, comprensió i amistat; pels bons moments, i també pels no tan bons, compartits tant en el laboratori com fora; per ser així, per la capacitat d'escoltar i per les dosis d'optimisme. A la Laura voldria agrair-li el sentit comú i la coherència, sense oblidar la capacitat de raonament i discussió científica, i l'ajuda tècnica prestada. A la Sandra, que ha contribuït en gran part a la realització d'aquest treball, vull agrair-li la seva participació. Gràcies per l'ajuda tècnica i per la paciència amb els nostres *westerns*; per la seva simpatia i bon humor, i pels tocs d'ironia que tant ens han fet riure. A l'Olga, gràcies pel seu enteniment i consell científic i per les nostres confessions, moltes vegades sense paraules; gràcies per la seva claredat i temperament. També voldria agrair-li la insistència per veure aquest apartat de la tesi, i els seus correus, que d'alguna manera em feien sentir més a prop del laboratori i sempre intentaven animar-me i, seguint el seu consell, també descansava cinc minuts. He de reconèixer que en aquests moments no puc deixar de sentir una miqueta d'enyorança; la veritat és que les trobaré molt a faltar.

A la resta de companys del laboratori, a la Ruth, a l'Antonio, a la Raquel, al Bin Gu i al Toni Coll voldria agrair-los la seva simpatia i amistat. Al Toni Coll, també la paciència per ensenyar-me el dia a dia del laboratori.

A tots els companys del laboratori: Gemma, Elisenda, Jordi, Pere-Jordi, Mònica, Maria, Cristina, Jairo i Miquel-Àngel, per compartir el dia a dia i fer-lo agradable i distès. A la Maria, encara que fa poquet que ens coneixem, voldria agrair-li la naturalitat, l'ajut i consell científic, i tots els moments que hem rigut amb ella i les seves apostes. Al Pere-Jordi, les seves paraules en moments difícils. Gràcies a tots, i en especial al Miquel-Àngel, per permetre'ns compartir la seva manera de fer ciència i per la paciència a l'hora de resoldre els nostres dubtes informàtics. Tampoc vull oblidar-me de l'Olga Campos, la Rosa, la Sílvia, la Isabel, la Laia i la Rosana. Tot i que ara ja no són al laboratori, vaig tenir l'oportunitat de compartir amb elles molts momentets de feina, i també els voldria agrair la seva simpatia i ajuda.

A la Dra. Àngels Fabra per acceptar-me, en el seu moment, al laboratori. A tots els companys del seu laboratori: Antònia, Ana, Pedro, Marc, Mireia, Anna, Eva, Marinela, Agnès, Bo i Feisong per crear un ambient de treball agradable. Voldria agrair a l'Antònia Vinyals els valuosos consells sobre la metodologia en el laboratori, i al Lluís López l'ajut i consell científic en el meu aprenentatge en l'àrea de cultius.

A la Blanca, la Mila i el David. A la Blanca per preocupar-se de tots nosaltres –per ser com la meva segona marona–, per solucionar molts dels problemes tècnics del laboratori i per cuidar les ratolines amb tanta dedicació i precaució. A la Mila pel seu afecte, i per deixar-me ser el seu *Lorenzo*.

També voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que han participat en alguna part d'aquest treball. A la Dra. Àngels Torregrossa per tenir la paciència de realitzar els estudis anatomopatològics de les mostres. A la Núria Rubio pel seu consell

tècnic en les transfeccions cel·lulars. Al Dr. Víctor Moreno per la seva ajuda en l'anàlisi estadística. Al Drs. Jordi Petriz i José Antonio Cancelas per la seva col·laboració en l'anàlisi per citometria de flux d'algunes mostres.

A totes les persones l'Institut de Recerca Oncològica i d'altres que amb el seu suport van permetre que el nostre grup de recerca, i d'altres, poguessin continuar.

Al Dr. Jaume Piulats, del Laboratori de Bioinvestigació de Merck Farma i Química, S.A., per donar-nos l'oportunitat d'establir una col·laboració científica. Al Dr. Francesc Mitjans voldria agrair-li la seva confiança i bona predisposició; i la capacitat de raonament i discussió científica. També voldria donar les gràcies a la Carme, la Tamara, el Ramon i la Gemma pel seu ajut i per fer-me sentir còmoda al laboratori.

A la Marató de TV3, a l'Associació Espanyola Contra el Càncer i al Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya, per fer possible, gràcies a la concessió d'una beca, la realització d'aquest treball experimental. A Merck Farma i Química, S.A. per la seva col·laboració científica i per permetre'm demanar una beca.

Al Dr. Oriol Bachs per la seva dedicació a la tutoria de la tesi i per facilitar les tasques burocràtiques. També voldria agrair-li la bona predisposició que ha demostrat sempre que he necessitat algun document.

A la Pilar López per la seva ajuda en la correcció lingüística d'aquest treball.

A la Cris, la Maria, la Mònica i el Jaume, per la confiança que sempre m'han demostrat. A la Cris voldria agrair-li el caràcter positiu, alegre i assenyat, la seva confiança en escoltar-me i infondre'm dosis d'optimisme. A la Maria, la seva dolçor i tendresa, la seva paciència i comprensió. També voldria agrair les seves visitetes, que no han deixat d'ajudar-me i alhora distreure'm una miqueta. A la Mònica, el seu caràcter actiu i clar i la

persistència a l'hora d'obligar-me a fer els *deures*. Al Jaume, gràcies per la seva paciència i tranquil·litat i per les seves reflexions i paraules. També voldria agrair-los totes les activitats d'esbarjo que m'han preparat durant aquest darrer any. Gràcies per l'amistat i l'estimació demostrades.

Als meus pares i al meu germà per la seva estima, amor i recolzament incondicional. Gràcies sobretot per la seva paciència, especialment a la meva mare. No m'oblido de totes les moixaines i atencions especials que he rebut. Encara que en alguns moments pogués protestar, he de reconèixer que han estat de molta ajuda. Al tiet Carlos, gràcies per l'interès pel que jo feia i pels seus consells. A l'Ana, per la seva espontaneïtat i alegria. Un petó a tots.

També voldria donar les gràcies i alhora demanar disculpes a totes aquelles persones que pugui haver oblidat.

Abreviatures

435	MDA-MB-435P
468	MDA-MB-468
A	adenina
ABC	complex avidina-biotina
ADN	àcid desoxiribonucleic
ADNc	ADN complementari
ADP	adenosina difosfat
AIF	factor inductor d'apoptosi
ANT	translocador de nucleòtids d'adenina
Apaf-1	factor activador de proteases apoptòtiques-1
Arg	arginina
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
ARNr	ARN ribosòmic
Asp	àcid aspàrtic
ATP	adenosina trifosfat
BH	homologia de Bcl-2
BRCA	BReast CAncer susceptibility
BSA	albúmina sèrica bovina
CAD	desoxiribonucleasa activada per caspases
CARD	domini de reclutament de caspases
Caspases	CysteinyI-ASPartate-specific proteinASES
CDI	carcinoma ductal invasiu
CDIS	carcinoma ductal <i>in situ</i>
Ci	curie; unitat internacional radioactiva
CLI	carcinoma lobel·lar invasiu
CLIS	carcinoma lobel·lar <i>in situ</i>
cpm	comptes per minut
Cr ⁵¹	cromat de sodi
d	dia
DAB	diaminobenzidina
DD	domini de mort
DED	domini efector de mort
DEPC	dietilpirocarbonat

Abreviatures

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetil sulfòxid
DPX	solució de distrè, dibutil ftalat i xilè
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EGF	factor de creixement epidèrmic
EGFR	receptor del factor de creixement epidèrmic
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
F	faraday
FGF	factor de creixement fibroblàstic
g	gram
G	guanina
GH	grau histològic
Glu	àcid glutàmic
Gly	glicina
h	hora
HEPES	àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazonaetanosulfònic
His	histidina
HRP	peroxidasa de rave
IAP	inhibidors de l'apoptosi
IGF-1	factor de creixement insulínic-1
IHC	immunohistoquímica
i.m.f.p.	intramammary fat pad
kb	quilobases
kDa	quilodalton
l	litre
LB	medi Luria-Bertani
LOH	pèrdua d'heterozigositat
M	molar
min	minut
MMP	metal·loproteasa de matriu
MOPS	àcid morfolinopropanosulfònic
MTT	bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
N	normal
nm	nanòmetre

O.C.T.	alcohol polivinílic, polietilenglicol i clorur de dimetil-benzil amoni
ODN	oligodesoxinucleòtid
pb	parell de bases
PBS	tampó fosfat salí
PTP	porus de permeabilitat transitòria
RE	receptor d'estrogen
RGD	arginina-glicina-àcid aspàrtic
RP	receptor de progesterona
rpm	revolucions per minut
SBF	sèrum boví fetal
SDS	dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida amb SDS
s	segon
SSC	citrat sòdic salí
TAE	Tris acètic EDTA
TBE	Tris bòric EDTA
TDT	deoxinucleotidil-transferasa terminal
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina
TGF- β	factor de creixement transformant-beta
TNF- α	factor de necrosi tumoral-alfa
TNFR	receptor del factor de necrosi tumoral
TNM	tumor-ganglis-metàstasis
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometà
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End- Labelling
U	unitat enzimàtica internacional
uPA	serín-proteasa activadora del plasminogen tipus uroquinasa
V	volts
VDAC	canal d'anions dependent del voltatge
VEGF	factor vascular de creixement endotelial
W	watt

Índex

I.- Introducció	1
1.- La glàndula mamària.....	3
2.- La patologia mamària benigna.....	5
3.- La patologia mamària maligna: càncer de mama.....	5
3.1.- Estadiatge.....	7
3.2.- Epidemiologia.....	9
3.2.1.- Factors de risc.....	9
3.2.2.- Incidència i mortalitat.....	10
3.3.- Aspectes patogènics.....	11
3.3.1.- Hormones esteroides.....	11
3.3.2.- Factors de creixement.....	12
3.3.3.- Alteracions genètiques.....	13
3.4.- Model genètic de la tumorigènesi mamària.....	17
4.- Progressió metastàtica: etapes.....	19
4.1.- Angiogènesi.....	20
4.2.- Invasió local i intravasació.....	20
4.3.- Transport i interacció.....	22
4.4.- Adhesió/Arrest.....	22
4.5.- Extravasació i migració.....	23
4.6.- Metàstasi.....	24
5.- Apoptosi.....	24
5.1.- Fases de l'apoptosi.....	25
5.1.1.- Fase d'iniciació.....	27
5.1.2.- Fase efectora.....	27
5.1.3.- Fase de degradació.....	28
5.2.- Els membres de la família de Bcl-2.....	29
5.2.1.- Classificació.....	31
5.2.2.- Localització subcel·lular.....	31
5.2.3.- Regulació.....	32
5.2.4.- Proteïnes formadores de porus.....	34
5.2.5.- Mecanismes d'alliberament de citocrom <i>c</i>	34
5.2.6.- Interacció de Bcl-2 i Bcl-x _L amb Apaf-1.....	36
5.2.7.- Bcl-2 i Bcl-x _L en la progressió del cicle cel·lular.....	37

6.-	Expressió de proteïnes antiapoptòtiques i apoptosi en el càncer de mama	37
6.1.-	Expressió de Bcl-2	37
6.2.-	Expressió de Bcl-x _L	38
6.3.-	Expressió de Bcl-2 o Bcl-x _L amb altres proteïnes.....	38
6.4.-	Implicacions terapèutiques de Bcl-2 i Bcl-x _L en el càncer de mama.....	39
II.-	Hipòtesi i objectius.....	41
1.-	Hipòtesi.....	43
2.-	Objectiu general.....	43
3.-	Objectius concrets.....	43
III.-	Material i mètodes	45
1.-	Cultius cel·lulars i cultius de teixits.....	47
1.1.-	Característiques de les línies cel·lulars.....	47
1.2.-	Manteniment dels cultius	47
1.2.1.-	Establiment de subcultius	48
1.2.2.-	Preservació de les cèl·lules	48
1.3.-	Transfeccions cel·lulars	49
1.3.1.-	Transfecció amb liposomes	49
1.3.2.-	Transfecció per electroporació.....	50
1.4.-	Obtenció de cultius primaris	50
2.-	Vectors d'expressió gènica.....	50
2.1.-	Plasmidis	50
2.2.-	Transformació d' <i>E. coli</i>	52
2.3.-	Purificació d'ADN plasmídic.....	52
2.4.-	Construcció antisentit de <i>bcl-x_L</i>	53
3.-	Biologia molecular	55
3.1.-	Anàlisi d'ADN	55
3.1.1.-	Extracció d'ADN	55
3.1.2.-	Southern blot.....	55
3.2.-	Expressió d'ARN	57
3.2.1.-	Extracció d'ARN	57
3.2.2.-	Northern blot.....	58

3.3.- Expressió proteica.....	59
3.3.1.- Extracció de proteïnes totals.....	59
3.3.2.- Western blot	60
3.3.3.- Quantificació densitomètrica de les radiografies	62
4.- Biologia cel·lular	62
4.1.- Assaigs d'apoptosi i viabilitat cel·lular.....	62
4.1.1.- Inducció de mort: factors de creixement i agents quimioterapèutics	62
4.1.2.- ELISA de detecció de la mort cel·lular	63
4.1.3.- Mètode de l'MTT	63
4.2.- Assaig de proliferació cel·lular	64
4.2.1.- Inducció de proliferació: factors de creixement i sèrum	64
4.2.2.- Mètode de la incorporació del precursor de [metil- ³ H]-timidina a l'ADN	64
4.3.- Assaig d'adhesió.....	65
4.3.1.- Immobilització de proteïnes de matriu extracel·lular al suport de plàstic	65
4.3.2.- Adhesió cel·lular per marcatge de les cèl·lules amb ⁵¹ Cr.....	65
4.3.3.- Adhesió cel·lular per tinció amb cristall violeta.....	66
4.4.- Assaig de viabilitat en suspensió	67
5.- Experimentació <i>in vivo</i>	68
5.1.- Animals.....	68
5.2.- Capacitat tumorígena	68
5.2.1.- Inducció dels tumors mamaris.....	68
5.2.2.- Seguiment del creixement dels tumors.....	69
5.3.- Capacitat metastàtica	69
5.4.- Successius implants <i>in vivo/in vitro</i>	70
5.5.- Assaig de competició cel·lular	71
6.- Histologia	72
6.1.- Preservació dels teixits	72
6.1.1.- Inclusió en parafina	72
6.1.2.- Inclusió en O.C.T.	72
6.1.3.- Congelació amb N ₂ líquid	72
6.1.4.- Fixació amb solució de Bouin.....	72
6.2.- Tinció hematoxilina-eosina	72

6.3.- Immunohistoquímica.....	73
6.4.- Fragmentació de l'ADN <i>in situ</i>	74
6.5.- Anàlisi citomètrica dels tumors: apoptosi i cicle cel·lular	74
7.- Anàlisi estadística.....	75
7.1.- Experiments <i>in vitro</i>	75
7.2.- Experiments <i>in vivo</i>	75
7.2.1.- Capacitat tumorigèna i metastàtica.....	75
7.2.2.- Capacitat tumorigèna amb els successius implants <i>in vivo/in vitro</i>	75
IV.- Resultats	77
1.- Apoptosi i expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x _L en tumors organotòpics de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana	79
1.1.- Anàlisi de l'apoptosi	79
1.2.- Expressió de Bcl-2 i Bcl-x _L	79
2.- Sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x _L en la biologia i en el fenotip metastàtic de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana.....	81
2.1.- Resposta cel·lular a l'apoptosi i la proliferació.....	83
2.1.1.- Apoptosi i proliferació induïdes per factors de creixement.....	83
2.1.2.- Apoptosi induïda per agents quimioterapèutics.....	88
2.2.- Relació de la cèl·lula amb el seu entorn.....	90
2.2.1.- Adhesió cel·lular a proteïnes de la matriu extracel·lular.....	91
2.2.2.- Supervivència cel·lular independent d'ancoratge	91
2.2.3.- Capacitat de sobreviure en el torrent sanguini.....	94
2.3.- Activitat tumorigèna i metastàtica	95
2.3.1.- Capacitat tumorigèna	96
2.3.2.- Capacitat metastàtica	99
3.- Contribució de la inhibició de l'apoptosi induïda per sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x _L en la selecció del fenotip metastàtic	102
3.1.- Capacitat tumorigèna en els reimplants	103
3.2.- Capacitat metastàtica en els reimplants.....	108
4.- Reversió del fenotip metastàtic amb una construcció antisentit de <i>bcl-x_L</i>	112
4.1.- Apoptosi induïda per TGF-β i TNF-α	112
4.2.- Adhesió cel·lular a proteïnes de la matriu extracel·lular.....	114
4.3.- Capacitat tumorigèna i metastàtica	114

V.- Discussió	117
1.- Influència de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x _L en el fenotip metastàtic de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana	121
1.1.- Relació de la cèl·lula amb el microentorn	121
1.2.- Inhibició d'apoptosi induïda per factors de creixement	125
1.3.- Selecció del fenotip metastàtic	128
1.4.- Eficiència de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x _L en les cèl·lules.....	131
2.- Contribució de Bcl-2 i Bcl-x _L en la tumorigènesi de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana.....	133
3.- Les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x _L en la resposta a estratègies terapèutiques.....	137
VI.- Conclusions	143
VII.- Bibliografia	147

I.- Introducció

1.- La glàndula mamària

La mama és una glàndula exocrina tubuloalveolar composta, amb secreció apocrina i amb capacitat de resposta hormonal, que es modifica especialment per secretar llet.

En la dona adulta els elements fonamentals de l'estructura de la mama són els 15 o 20 lòbuls que formen la glàndula. Els lòbuls estan situats en la regió profunda de la mama, de manera radial en relació amb el mugró (Figura 1). Cada lòbul conté un canal excretor propi conegut com a galactòfer de primer ordre, que es dilata en la seva porció terminal (si lactífer) i que s'obre a nivell del mugró pels porus galactòfers.

El conducte galactòfer de primer ordre es bifurca dicotòmicament en galactòfers de segon ordre i a mesura que profunditzen en l'interior es van ramificant progressivament, fent-se més petits, per acabar en les unitats tubuloalveolars (ductals i lobel·lars) que representen la unitat funcional de la glàndula (Ruiz, 1993a).

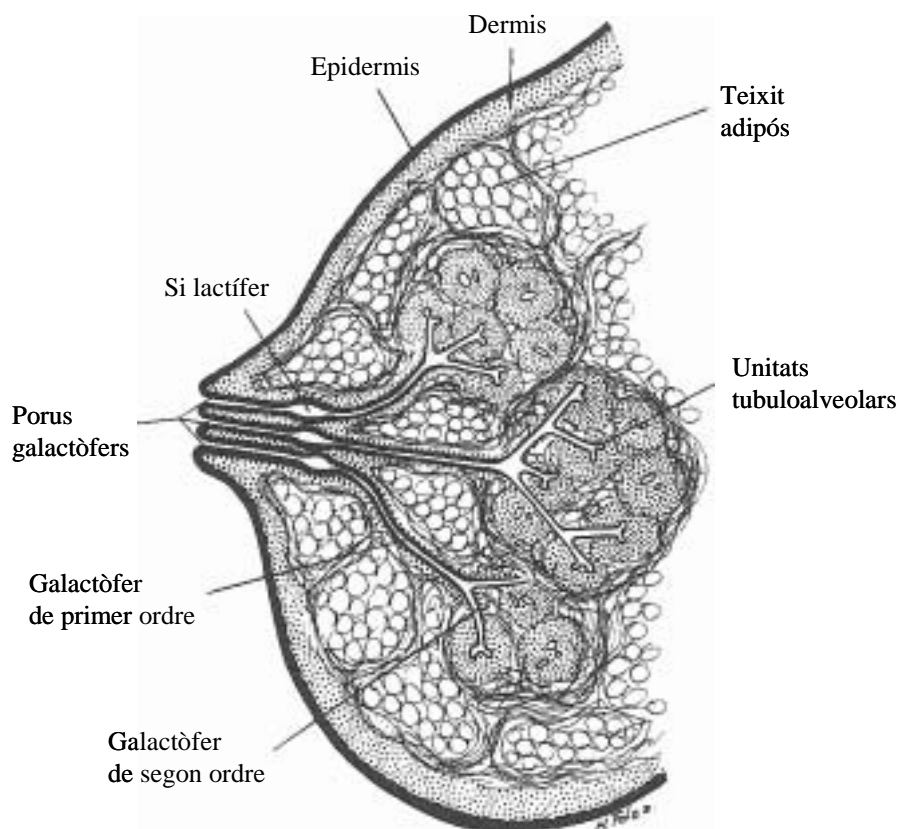


Figura 1.- Esquema de l'estructura de la glàndula mamària (extret de: Vaquero, 1982).

A nivell del si lactífer o per sobre d'ell, els conductes galactòfers estan recoberts per un epiteli luminal cuboïdal estratificat. Però a mesura que els conductes galactòfers profunditzen

en la mama, el seu epitel·li cuboidal es torna cada cop més prim, amb menor nombre de capes de cèl·lules, presentant en els galactòfers de segon ordre dues capes de cèl·lules. En els tubuloalveols de la porció secretora, l'epitel·li del conducte es converteix en una sola capa de cèl·lules (cúbic simple), envoltat per una capa de cèl·lules mioepiteliales que reposen sobre una membrana basal, la funció de les quals és munyir els àcins en el moment de la lactància (Figura 2).

Els lòbuls estan separats els uns dels altres per un teixit conjuntiu especialitzat, lax i ric en cèl·lules, que rep el nom d'estroma perilòbul·lar i que conté una abundant xarxa capil·lar, però una escassa o nul·la presència de cèl·lules adiposes. Cada lòbul està separat dels altres per una teixit connectiu dens que té gran quantitat de cèl·lules adiposes (Powell, 1995).

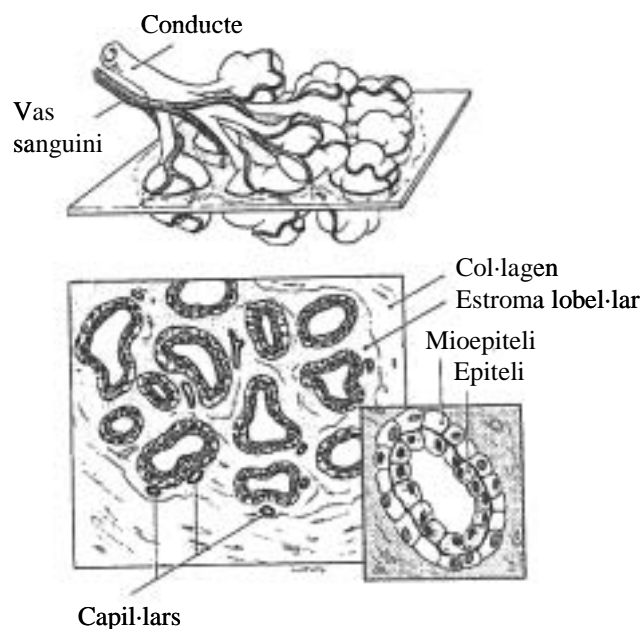


Figura 2.- Esquema transversal tridimensional d'un lòbul, en el qual es destaquen la vascularització de l'estroma i la conservació de l'epitel·li de doble capa en les unitats lòbul·lars més distals (extret de: Powell, 1995).

La glàndula mamària pateix cicles de desenvolupament, diferenciació i apoptosi durant la vida de l'organisme. Aquests canvis cíclics afecten l'estructura i la funció del teixit, i són regulats a través d'hormones i factors de creixement (Hansen i Bissell, 2000).

Les hormones esteroides, estrogen i progesterona, promouen la proliferació i diferenciació de l'epitel·li mamari (Russo i Russo, 1998). En absència d'hormones, els receptors intracel·lulars d'estrogen (RE) i progesterona (RP) es troben en un complex inactiu juntament amb altres proteïnes. Quan les hormones s'uneixen als receptors, el complex oligomèric

inactiu es dissocia i els receptors s'activen i regulen l'expressió gènica directament com un factor de transcripció per unió a l'ADN en elements de resposta específics o indirectament per interaccions cooperatives amb altres factors de transcripció (White *i col.*, 1998).

Entre un 7% i un 30% de les cèl·lules epitelials de mama expressen nivells molt baixos de RE i RP (revisat a Hansen i Bissell, 2000). Aquests nivells fluctuen en conjunció amb els canvis cíclics d'estrogen i progesterona durant el cicle menstrual (Markopoulos *i col.*, 1988).

Factors de creixement com el factor de creixement epidèrmic (EGF) i el factor de creixement insulínic-1 (IGF-1) actuen estimulants la supervivència en les cèl·lules de l'epiteli mamari, mentre que el factor de creixement transformant-beta (TGF- β) indueix la seva mort (Rosfjord i Dickson, 1999).

2.- La patologia mamària benigna

La majoria de les lesions proliferatives benignes de la mama s'esdevenen d'una proliferació coordinada de les cèl·lules epitelials i mioepitelials de la glàndula (Howard i Gusterson, 2000).

Histològicament es distingeixen diversos tipus de lesions: l'ectàsia ductal, el quist, l'adenosi, la hiperplàsia epitelial, el fibroadenoma i el papil·loma intraductal, entre d'altres (Howard i Gusterson, 2000; Mallon *i col.*, 2000).

Les neoplàsies benignes inclouen el fibroadenoma i el papil·loma intraductal. El *fibroadenoma* és el tumor benigne més freqüent de la mama. Aquest s'origina en el lobel, presenta un creixement limitat i dependència hormonal. La seva mida generalment és d'1 a 2 cm de diàmetre, encara que pot arribar a ser de 5 a 7 cm, anomenant-se *fibroadenoma gegant*. L'evolució del fibroadenoma és variable, podent progressar, regressar o estabilitzar-se. Si s'estabilitza, pot calcificar-se amb el temps.

Les lesions benignes de la mama mostren nivells de RE i RP menors que els presents en els tumors malignes (Giani *i col.*, 1986) i absència de les alteracions genètiques freqüentment involucrades en la patologia maligna (Lizard-Nacol *i col.*, 1995).

3.- La patologia mamària maligna: càncer de mama

Els tumors malignes de la mama s'originen per proliferació atípica de l'epiteli dels lobels o dels conductes galactòfers, la qual omple, totalment o parcialment, la seva llum (Lema i Maciel, 1998). Aquests poden classificar-se segons el caràcter no infiltratiu o d'invasió de

l'estroma, pel lloc d'origen histològic i pel patró estructural (Ruiz, 1993b; Powell i Stelling, 1995).

Taula 1.- Classificació histològica del carcinoma de mama

Carcinoma <i>in situ</i>
Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS)
Carcinoma lobel·lar <i>in situ</i> (CLIS)
Carcinoma invasiu
Carcinoma ductal invasiu (CDI)
Carcinoma lobel·lar invasiu (CLI)
Malaltia de Paget del mugró

El *carcinoma ductal in situ* (CDIS) és un carcinoma dels conductes galactòfers que no envaeix l'estroma circundant. Aquest es caracteritza per diversos tipus estructurals: comedocarcinoma (caracteritzat per una massa central de cèl·lules necròtiques), micropapil·lar (en què les cèl·lules envolten la perifèria del conducte formant petites tires de cèl·lules epitelials sense trama fibrovascular) i cribiform (és més sòlid i afecta tot el conducte).

El *carcinoma lobel·lar in situ* (CLIS) és un carcinoma que afecta els àcins terminals de la unitat lobel·lar, els quals apareixen obliterats i distesos per conglomerats laxos de cèl·lules, sense invasió de l'estroma.

El *carcinoma ductal invasiu* (CDI) és el tumor maligne de la mama més freqüent, i s'esdevé per infiltració de l'estroma circundant. Aquest mostra una enorme variació en la morfologia cel·lular i en els patrons de proliferació. En general les cèl·lules es disposen en illots, cordons i formacions glandulars. Però també s'han identificat patrons de CDI associats amb una histologia característica: carcinoma tubular (constituït per cèl·lules regulars i disposades en túbuls ben caracteritzats), carcinoma mucinós (que conté gran quantitat de mucina extracel·lular), carcinoma medul·lar (caracteritzat per una forta infiltració limfoide) i carcinoma papil·lar invasiu (que representa el creixement invasiu de les estructures papil·lars).

El *carcinoma lobel·lar invasiu* (CLI) és un carcinoma invasor constituït per cèl·lules uniformes i semblants a les del CLIS i, generalment, amb un índex mitòtic baix. Les cèl·lules es disposen en una mateixa fila, en disposició lineal (corriolada) o apareixen embotides individualment en el teixit fibrós.

La *malaltia de Paget* del mugró és caracteritza per cèl·lules neoplàsiques en l'epidermis del mugró.

En el carcinoma de mama el grau histològic (GH) és un factor de pronòstic important que s'obté de l'anàlisi patològica del tumor tenint en compte la formació de túbuls, la morfologia nuclear i l'índex de mitosis. Segons aquests paràmetres, els tumors es poden classificar en 3 categories que es mostren en la Taula 2 –que constitueix una modificació de l'esquema de Bloom i Richardson– i permeten estratificar el risc de progressió dels carcinomes (Powell i Stelling, 1995).

Taula 2.- Graus histològics del carcinoma de mama (extreta de: Powell i Stelling, 1995)

Característica	Puntuació
1.- Formació de túbuls	
Els túbuls amb llums visibles són un component principal de la massa tumoral	1
Els túbuls amb llums visibles són un component moderat de la massa tumoral	2
Els túbuls amb llums visibles són un component mínim de la massa tumoral	3
2.- Morfologia nuclear	
Els nuclis presenten escasses variacions de mida i forma	1
Els nuclis presenten moderades variacions de mida i forma	2
Els nuclis presenten acusades variacions de mida i forma	3
3.- Índex de mitosis	
Menys de 10 mitosis per 10 camps a alt augment	1
10-19 mitosis per 10 camps a alt augment	2
20 mitosis o més per 10 camps a alt augment	3
	TOTAL*
Grau histològic I (ben diferenciat)	3-5
Grau histològic II (moderadament diferenciat)	6-7
Grau histològic III (indiferenciat)	8-9

*El total representa la suma d'1, 2 i 3.

3.1.- Estadiatge

Un sistema d'estadiatge del càncer de mama, acceptat universalment, simple, pràctic i que reflecteixi acuradament el pronòstic de les pacients, s'esdevé crític per permetre comparacions de resultats de tractaments entre diferents centres clínics.

El 1987, l'American Joint Comitee on Cancer (AJCC) va publicar, conjuntament amb la Union Internationale Contre le Cancer (UICC) el sistema d'estadiatge AJCC/UICC (Sobin *i col.*, 1988). Aquest sistema s'ha revisat i actualitzat posteriorment fins al definitiu sistema d'estadiatge per al càncer de mama TNM (Tumor-Ganglis-Metàstasis), que incorpora les característiques histològiques del tumor primari i dels ganglis limfàtics regionals.

Taula 3.- Classificació TNM del carcinoma de mama (adaptada de: Yeatman i Bland, 2000)

Classificació	Característiques
Tumor primari (T)	
Tx	No és possible valorar el tumor primari
T0	Absència d'evidències de tumor primari
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (ductal o lobel·lar, o malaltia de Paget sense tumor)
T1	Tumor ≤ 2 cm, en el seu diàmetre màxim
T1a	$\leq 0,5$ cm
T1b	$>0,5 - \leq 1$ cm
T1c	$>1 - \leq 2$ cm
T2	Tumor $>2 - \leq 5$ cm, en el seu diàmetre màxim
T3	Tumor >5 cm, en el seu diàmetre màxim
T4	Tumor de qualsevol mida amb extensió directa a la paret toràcica o a la pell
T4a	Extensió a la paret toràcica
T4b	Edema o ulceració de la pell de la mama
T4c	Ambdós criteris (T4a i T4b)
T4d	Carcinoma inflamatori
Ganglis limfàtics regionals (N)	
Nx	No és possible valorar l'estat dels ganglis limfàtics regionals
N0	Absència de metàstasis en els ganglis limfàtics regionals
N1	Metàstasis en els ganglis limfàtics axil·lars ipsolaterals (mòbils a la palpació)
N1a	Només micrometàstasis, cap $>0,2$ cm
N1b	Metàstasis en gangli(s), algunes $>0,2$ cm
N1bi	Metàstasis en 1-3 ganglis limfàtics, algunes $>0,2$ cm i totes <2 cm, en el seu diàmetre màxim
N1bii	Metàstasis en 4 o més ganglis, algunes $>0,2$ cm i totes <2 cm, en el seu diàmetre màxim
N1biii	Extensió del tumor més enllà de la càpsula d'un gangli limfàtic; metàstasis <2 cm, en el seu diàmetre màxim
N1biv	Metàstasis en un gangli limfàtic ≥ 2 cm, en el seu diàmetre màxim
N2	Metàstasis en els ganglis limfàtics axil·lar ipsolaterals, fixes en altres estructures
N3	Metàstasis en els ganglis limfàtics mamaris interns ipsolaterals
Metàstasis a distància (M)	
Mx	No es pot valorar la presència de metàstasis a distància
M0	Absència de metàstasis a distància
M1	Metàstasis a distància (inclou les metàstasis en els ganglis limfàtics supraclaviculars ipsolaterals)

A partir de la classificació TNM, i segons la correlació de la mida del tumor i l'estat dels ganglis s'obté la classificació per estadis de la malaltia. Els tumors en estadi 0 (Tis, N0, M0) comporten el millor pronòstic i essencialment són 100% curables, mentre que els càncers en

estadi IV generalment estan més enllà de la possibilitat de curació a causa de les metàstasis a distància. Els càncers en estadi I es localitzen a la mama i són de mida reduïda (≤ 2 cm). L'estadi II es reserva per a casos amb metàstasis en ganglis limfàtics regionals i comporta un pronòstic pitjor que el dels estadis I i 0, però millor que el dels estadis III o IV, en què les metàstasis ganglionars són >2 cm, han infiltrat la càpsula del gangli i s'han fixat a altres estructures (Yeatman i Bland, 2000).

3.2.- Epidemiologia

3.2.1.- Factors de risc

Nombrosos estudis epidemiològics han relacionat característiques associades a les dones i/o al seu medi ambiental amb un risc de patir càncer de mama. Els factors més coneguts i els que estan en fase d'investigació estan reunits en la següent taula.

Taula 4.- Factors de risc associats al càncer de mama (adaptada de: Viladiu *i col.*, 1996)

Factors que augmenten el risc	Factors que protegeixen	Factors que potser augmenten el risc
L'augment de l'edat	Edat jove	Ús d'anticonceptius hormonals
Història personal o familiar de càncer de mama	No antecedents familiars o personals	Ús de teràpies de reemplaçament hormonal a la menopausa
Menarquia primerenca (abans dels 12 anys)	Menarquia tardana	Alcohol
Menopausa tardana (després dels 52 anys)	Menopausa precoç, natural o induïda	Obesitat
Primer fill després dels 30 anys	Edat jove al primer embaràs	Dieta abundant en greixos
No tenir fills	Múltiples embarassos	Dieta rica en calories

Tant l'edat com l'existència de casos d'aquest càncer en la família eleven en més de quatre vegades el risc de desenvolupar càncer de mama (Marshall, 1993). De fet, el percentatge de carcinomes de mama lligats a l'herència constitueix al voltant d'un 5 al 10% (Whittemore, 1999).

L'edat de la menarquia i de la menopausa s'han associat al risc de càncer de mama, i donat que els estrògens tenen un efecte potenciador sobre la proliferació de les cèl·lules de l'epiteli mamari, és fàcil concebre que com abans comencin els cicles estrogènics (menarquia primerenca) i com més tard desapareguin (menopausa tardana), més possibilitats existeixen que els estrògens exerceixin una acció negativa, potenciant la multiplicació de les cèl·lules.

Això no obstant, dosis molt més elevades, com passa en els embarassos, causen la diferenciació d'aquestes cèl·lules, fent el teixit mamari més resistent als estímuls estrogènics (revisat a Vogel, 2000).

L'edat tardana del primer embaràs és un dels factors de risc més clars per patir un càncer de mama. La protecció conferida per la maternitat precoç persisteix durant tota la vida, i creix en augmentar la freqüència de parts. D'aquesta manera, les dones amb múltiples fills i primer embaràs en edats molt joves serien les que menys risc tindrien de desenvolupar un càncer de mama (Viladiu *i col.*, 1996).

L'ús d'anticonceptius hormonals mostra un modest increment en el risc per desenvolupar càncer de mama, i no existeixen evidències que aquest excés en el risc persisteixi més enllà dels 10 anys després del cessament de dits tractaments (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (CGHFBC), 1996). Tanmateix, l'ús de teràpies de reemplaçament hormonal (HRT) en el període de la menopausa augmenta el risc en relació amb l'allargament del tractament (CGHFBC, 1997).

El consum de 60 g d'alcohol per dia ha estat associat a un increment lineal en la incidència del càncer de mama entre dones que beuen (Smith-Warner *i col.*, 1998), però es desconeix si la reducció del consum d'alcohol també redueix el risc de càncer de mama (revisat a Vogel, 2000).

L'obesitat postmenopàusica també incrementa el risc, que és degut a la font secundària d'estrògens que ofereix el teixit adipós en l'organisme (Henderson i Feigelson, 2000). Això no obstant, els estudis realitzats no permeten concloure que les dietes riques en greix tinguin una influència en l'augment (Hunter *i col.*, 1996) o que les dietes baixes en greixos s'associïn a una reducció (Holmes *i col.*, 1999) del risc de càncer de mama.

3.2.2.- Incidència i mortalitat

El càncer de mama és el tercer càncer més freqüent en el món, sent el més comunament diagnosticat entre les dones, i s'esdevé la cinquena causa de mort per càncer (Pisani *i col.*, 1999).

La incidència i la mortalitat de càncer de mama és més elevada en els països occidentals i nacions industrialitzades de l'Amèrica del Nord i de l'Europa Occidental, que a l'Àsia i en les nacions menys industrialitzades (Parkin *i col.*, 1999; Mettlin, 2000).

Als Estats Units, l'any 2001, s'estima que el 31% dels nous casos de càncer diagnosticats en dones correspondran a càncers de mama, i constituïran el 15% de les morts per càncer, convertint-se en la segona causa de mort per càncer després del càncer de pulmó (Greenlee *i col.*, 2001).

Entre les dones de Catalunya, anualment, es diagnostiquen prop de 2.500 nous casos de càncer de mama, i la taxa de mortalitat és del 45% (Moreno *i col.*, 1998).

El pronòstic de les pacients amb càncer de mama depèn de l'extensió de la malaltia en el moment del diagnòstic. El millor mètode de què es disposa en l'actualitat per disminuir la mortalitat per càncer de mama és l'screening mamogràfic. Segons mostren els assajos randomitzats dels programes de diagnòstic precoç, es disminueix entre un 20-30% la mortalitat si el diagnòstic es fa en estadis inicials (Ruiz i Guillem, 1998).

La incidència de CDIS ha augmentat amb l'aplicació de l'screening mamogràfic, i representa el 15-20% dels casos de càncer detectats (Shoker i Sloane, 1999). Les pacients amb CDIS presenten un alt risc de patir CDI, fins a 11 vegades més que l'esperat en la població general (revisat a Sakorafas i Tsioton, 2000). El CLIS representa de l'1 al 6% dels càncers observats, i la presència de CLIS incrementa 10 vegades el risc de desenvolupar un càncer de mama invasiu (Bodian *i col.*, 1996).

El CDI és el més freqüent –un 60-80% de tots els casos de carcinoma de mama– mentre que el CLI només en representa el 5-10%. Però el CLI té major incidència de multicentricitat i bilateralitat que el CDI i una lleugera millor supervivència global (revisat a Mallon *i col.*, 2000).

La principal causa de mort de les pacients amb càncer de mama invasiu, igual que en molts altres tumors sòlids, és el desenvolupament de les metastàsis (Nicolson, 1998). La supervivència al cap de 5 anys del diagnòstic de la malaltia és del 96% en dones amb càncer de mama localitzat, del 77% per a les que presentaven metàstasis regionals i només d'un 21% per a les diagnosticades amb metàstasis distants. Segons la mida del tumor, la supervivència al cap de 20 anys és del 90% per a dones amb tumors de mama ≤ 1 cm, i aquesta supervivència disminueix quan els tumors són més grans (Smith, 2000).

3.3.- Aspectes patogènics

3.3.1.- Hormones esteroides

Els RE i RP participen en la iniciació i/o progressió de la malignitat. Aproximadament dues terceres parts dels càncers de mama expressen RE, i la meitat d'aquests expressen ambdós receptors (McGuire, 1978). La presència de RE i RP podrien conferir a les cèl·lules epitelials mamàries un avantatge de creixement selectiu durant el desenvolupament del càncer de mama (Hansen i Bissell, 2000; Groshong *i col.*, 1997).

La concentració d'aquests receptors és utilitzada com a marcador de pronòstic i supervivència, i com a indicador clínic de l'efectivitat terapèutica (Mansour *i col.*, 1994;

McGuire i Clark, 1992). Els tumors RE- i RP-positius són més diferenciats i, generalment, responen a teràpies antihormonals; en canvi, els tumors RE- i RP-negatius són més indiferenciats i rarament responen a teràpies antihormonals (Hansen i Bissell, 2000).

En els tumors de mama s'han identificat mutacions i transcrits anormals del gen del *RE*, però moltes d'aquestes alteracions també existeixen en el teixit normal. Si bé aquests mutants poden contribuir a la resistència hormonal (revisat a Ingvarsson, 1999).

3.3.2.- Factors de creixement

Els factors de creixement que regulen el desenvolupament de la glàndula mamària també influeixen en la patologia tumoral del càncer de mama.

El paper del TGF- β en càncer de mama és complex. En la mama normal i en les primeres etapes de la tumorigènesi el TGF- β té un efecte inhibidor del creixement. En contraposició, diverses línies cel·lulars derivades de carcinomes de mama invasius són menys sensibles o són resistents a l'efecte antiproliferatiu del TGF- β (Reiss i Barcellos-Hoff, 1997).

Aquesta pèrdua de sensibilitat pot ser deguda a la inactivació de gens que es codifiquen pels receptors de TGF- β o per altres elements de la via de senyalització, i ha estat lligada a la progressió tumoral perquè s'associa a un increment del potencial invasiu i/o metastàtic de les cèl·lules neoplàsiques (revisat a Bourhis *i col.*, 2000).

Durant la progressió del càncer de mama s'observa que la producció de TGF- β per les cèl·lules tumorals augmenta (Gorsch *i col.*, 1992), i aquest es diposita majoritàriament en els marges d'avançament dels tumors on hi ha les àrees de creixement actiu (Dalal *i col.*, 1993). El TGF- β modifica les interaccions cèl·lula-cèl·lula i/o cèl·lula-substrat, incrementant la mobilitat cel·lular (Reiss i Barcellos-Hoff, 1997). De fet, cèl·lules de càncer de mama humana exposades a TGF- β *in vitro* o transfectades amb un vector d'expressió contenint el TGF- β són significativament més tumorigèniques que les cèl·lules control quan s'injecten en ratolines immunodeprimides (Welch *i col.*, 1990; Arrick *i col.*, 1992). El TGF- β també pot actuar com un supressor del sistema immunitari i permetre a les cèl·lules tumorals que el produeixen escapar de la vigilància immunitària (Arteaga *i col.*, 1993).

L'EGF i l'IGF-1 actuen com a factors de supervivència en les cèl·lules de l'epiteli mamari neoplàsic (Rosfjord i Dickson, 1999).

El factor de necrosi tumoral- α (TNF- α), malgrat que presenta una expressió molt limitada en la mama, és un factor efectiu en la ràpida i directa inducció de la mort en línies cel·lulars de càncer de mama (Rosfjord i Dickson, 1999).

3.3.3.- Alteracions genètiques

La patogènesi del càncer de mama implica un conjunt complex i heterogeni d'alteracions genètiques. Aquestes alteracions inclouen amplificacions en proto-oncogens com *c-myc*, *ciclina D1* i *c-erbB2*, originant-se proteïnes que es sobreexpressen i estimulen el creixement o la invasivitat cel·lular, i mutacions o pèrdues al·lèliques en gens supressors de tumors com *p53*, que deixen d'expressar-se o produeixen una proteïna no funcional (Hutchinson i Muller, 2000). En la Taula 5 es sumariuen les principals alteracions genètiques descrites.

Taula 5.- Principals alteracions genètiques en el càncer de mama

Gen	Localització	Defecte molecular	Freqüència (%)	Referències
<i>c-myc</i>	8q24	Amplificació	1-50	Revisat a Nass i Dickson, 1997; Scorilas <i>i col.</i> , 1999; Deming <i>i col.</i> , 2000
<i>c-erbB2</i>	17q11	Amplificació	10-40	Revisat a Ménard <i>i col.</i> , 2000
<i>ciclina D1</i>	11q13	Amp./Sobreexp.	15-50	Revisat a Barnes, 1997
<i>ciclina E</i>	19q12->q13	Sobreexpressió	0-88	Keyomarsi <i>i col.</i> , 1994; Scott i Walker, 1997; Nielsen <i>i col.</i> , 1996
<i>EGFR</i>	7q21	Sobreexp./Amp.	40	Fox i Harris, 1997
<i>p53</i>	17p13	Mutació puntual/ /LOH	15-34	Revisat a Hartmann <i>i col.</i> , 1997
<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	17q21 13q12-13	Mutació puntual/ /LOH	5-10	Revisat a Ellisen i Haber, 1998

- *c-myc*

El protooncogèn *c-myc* es codifica per a un factor de transcripció implicat en la proliferació cel·lular, la diferenciació i l'apoptosi (Bièche i Lidereau, 1995). En condicions normals, la proteïna c-Myc accelera el cicle cel·lular escurçant la fase G1, i redueix o elimina el requeriment de factors de creixement per la proliferació. També causa immortalització cel·lular i inhibeix la diferenciació de diversos tipus de cèl·lules i, en determinades condicions restrictives, pot induir apoptosi (revisat a Nass i Dickson, 1997).

L'amplificació del *locus c-myc* en càncer de mama s'ha observat amb una freqüència de l'1% al 50%, sent la mitjana global del 15,7% (Deming *i col.*, 2000). Aquesta variabilitat pot ser atribuïda a la baixa sensibilitat d'alguns dels mètodes utilitzats, al grau del tumor estudiat i

a un nombre petit de casos en molts dels treballs (Liao i Dickson, 2000). Diversos estudis observen que l'amplificació de *c-myc* és pronòstic d'una recurrència precoç i/o una supervivència baixa (Berns *i col.*, 1996; Roux-Dosseto *i col.*, 1992; Scorilas *i col.*, 1999), mentre que d'altres no hi troben aquesta correlació (Liao i Dickson, 2000; Deming *i col.*, 2000). En determinats estudis l'amplificació de *c-myc* es correlaciona amb tumors d'alt GH (Adnane *i col.*, 1989; Tavassoli *i col.*, 1989), metàstasis en els ganglis limfàtics (Berns *i col.*, 1992) o RE negatius (Persons *i col.*, 1997; Bolufer *i col.*, 1994).

En carcinomes de mama invasius amb part de component *in situ*, s'observa que l'amplificació de *c-myc* és present en ambdós tipus de teixits, suggerint que l'amplificació pot esdevenir en una etapa inicial de la progressió tumoral, però no sempre persisteix en les metàstasis (Watson *i col.*, 1993).

- *c-erbB2/neu/HER2*

Amb aquests tres noms es coneix el protooncogèn *c-erbB2*, un receptor transmembrana amb activitat tirosina quinasa (Bièche i Lidereau, 1995). Està amplificat i/o sobreexpressat en aproximadament un 10-40% dels carcinomes de mama (revisat a Ménard *i col.*, 2000).

Diversos estudis han suggerit una correlació entre l'amplificació i/o sobreexpressió de *c-erbB2* i altres paràmetres indicatius de la progressió del tumor com alt GH, metàstasis en els ganglis limfàtics i absència d'expressió de receptors hormonals, entre d'altres (Toikkanen *i col.*, 1992; Slamon *i col.*, 1987). *c-erbB2* és un indicatiu de mal pronòstic en pacients amb ganglis limfàtics positius, suggerint un important paper biològic en la progressió de tumors avançats que sobreexpressen *c-erbB2*. En contraposició, no existeix un acord en el valor predictiu d'aquest gen en les pacients amb ganglis limfàtics negatius (Gusterson *i col.*, 1992).

La sobreexpressió de *c-erbB2* en càncers de mama s'associa a una resposta a tractaments quimioterapèutics basats en doxorubicina (Paik *i col.*, 1998) i a la resistència a tractaments basats en moduladors de receptors hormonals com el tamoxifen (Carlomagno *i col.*, 1996). La resposta és desigual en règims quimioterapèutics basats en metotrexat o en taxans (Baselga *i col.*, 1997; Yu i Hung, 2000).

L'ús d'anticossos monoclonals dirigits al domini extracel·lular de l'oncoproteïna *c-erbB2* han mostrat resultats encoratjadors tant *in vitro* com en assaigs preclínic i clínic. Aquests anticossos inhibeixen el creixement per modulació del receptor; provoquen la disrupció dels heterodimers de *c-erbB2* i disminueixen la seva fosforilació i activitat catalítica (revisat a Ménard *i col.*, 2000).

En un nombre reduït de casos, es mostra coamplificació de *c-erbB2* i *c-myc* (Gaffey *i col.*, 1993; Bolufer *i col.*, 1994). A més, la sobreexpressió de *c-erbB2* s'associa a la

sobreexpressió de *p53* i a proliferació augmentada (Barnes *i col.*, 1996).

- *ciclina D1*

El gen de la *ciclina D1* resideix en la regió cromosòmica 11q13, la qual es troba amplificada en el 15-20% dels tumors primaris de mama. Encara que la Ciclina D1 es sobreexpressa en un 50% d'aquests carcinomes, sense que sigui secundària de l'amplificació (revisat a Barnes, 1997).

La capacitat oncogènica de la Ciclina D1 es basa en la fosforilació de la proteïna Rb per complexos de la Ciclina D1 amb Cdk-4 o Cdk-6. Llavors, un excés de Ciclina D1 produiria la hiperfosforilació permanent de Rb, que conduiria a la pèrdua del punt de control en la transició entre les fases G1 i S del cicle cel·lular (Barnes i Gillett, 1998).

La Ciclina D1 no s'expressa en patologies benignes de la mama, però es sobreexpressa freqüentment en CDIS (revisat a Barnes i Gillett, 1998). La sobreexpressió de la Ciclina D1 s'associa a un bon pronòstic i a la resposta al tractament amb tamoxifen en tumors infiltrants ben diferenciats i amb RE positius (Gillett *i col.*, 1996).

- *ciclina E*

El gen de la *ciclina E*, que resideix en la regió cromosòmica 19q12->q13, és sobreexpressa, i no s'amplifica, en tumors primaris de mama (Keyomarsi *i col.*, 1994; Scott i Walker, 1997; Nielsen *i col.*, 1996).

La Ciclina E forma complexos amb la Cdk-2 i regula l'inici de la fase S. En condicions normals, la fosforilació de Rb requereix Ciclina D1/Cdk-4 abans de l'acció de la Ciclina E/Cdk-2 (Lundberg i Weinberg, 1998). Les cèl·lules malignes poden utilitzar preferentment una Ciclina per fosforilar Rb, i l'altra s'esdevé redundant (Gray-Bablin *i col.*, 1996).

La Ciclina E es sobreexpressa freqüentment en CDIS d'alt GH (Stanta *i col.*, 1998) i la seva sobreexpressió es correlaciona amb RE negatius (Scott i Walker, 1997) i amb un mal pronòstic, fins i tot en pacients amb ganglis negatius (Porter *i col.*, 1997; Nielsen *i col.*, 1996).

- *EGFR*

El receptor del factor de creixement epidèrmic (*EGFR*), també conegut com *c-erbB1*, és una glicoproteïna de membrana amb funció tirosina quinasa, que intervé en el desenvolupament mamari normal i durant la lactància (Fox i Harris, 1997).

L'*EGFR* és activat o amplificat en el 40% dels carcinomes de mama (Fox i Harris, 1997). L'expressió d'un nombre anormalment elevat de receptors pot provocar la proliferació cel·lular en presència de concentracions molt petites dels seus lligants, EGF o TGF- α (Ethier, 1995).

Nivells alts d'EGFR es troben en tumors de pacients amb una recurrència precoç i supervivència baixa (Nicholson *i col.*, 1991), absència de RE (Toi *i col.*, 1994) i baixa resposta al tamoxifen (Nicholson *i col.*, 1994), indicant que els senyals a través d'aquest receptor poden ser importants en el desenvolupament i adquisició de la independència hormonal.

- *p53*

El gen *p53* es codifica per a un factor de transcripció tetramèric, p53, que regula la proliferació cel·lular i l'apoptosi. Aquest gen supressor de tumors és el més freqüentment mutat en tumors humans. En càncer de mama, aquesta freqüència és del 15-34% (revisat a Hartmann *i col.*, 1997). La majoria de mutacions en *p53* són mutacions puntuals que originen la substitució d'un aminoàcid per un altre. Aquestes formes mutades són capaces d'unir-se a les normals i formar els tetràmers, que es converteixen en inactius i no s'uneixen a l'ADN o ho fan en menor afinitat, sent la mutació d'un únic al·lel de *p53* una acció dominant sobre la de l'al·lel normal (revisat a Hainaut i Hollstein, 2000).

p53 regula la transcripció del gen *mdm-2*, una proteïna implicada en la degradació de la mateixa p53, i això provoca que la mutació de p53 produeixi acumulació de la proteïna (revisat a Hainaut i Hollstein, 2000). A més de les mutacions de p53, alguns tumors de mama inactiven la p53 per sobreexpressió de l'ARNm del gen *mdm-2* (Bueso-Ramos *i col.*, 1996).

En resposta al dany a l'ADN, la quantitat de p53 en la cèl·lula augmenta per prolongació de la seva vida mitjana, que normalment és de 15 min, i s'indueix l'expressió de la proteïna p21, encarregada d'evitar la divisió de la cèl·lula fins que el dany en l'ADN és reparat (revisat a Levine, 1997). Si el dany en l'ADN és excessiu, impossible de reparar, el cúmul de p53 indueix l'expressió de la proteïna proapoptòtica Bax i la repressió paral·lela de l'antiapoptòtica Bcl-2, amb el resultat final d'apoptosi (Bates i Vousden, 1999).

L'expressió de *p53* s'associa a RE negatius, a alt GH, a positivitat per EGFR i c-erbB2 (Poller *i col.*, 1992) i a pitjor pronòstic, particularment en pacients de càncer de mama amb ganglis negatius (Silvestrini *i col.*, 1996; Falette *i col.*, 1998). Determinats estudis han correlacionat l'expressió de p53 amb reduïda resposta a hormonoteràpia (Berns *i col.*, 1998), quimioteràpia (Aas *i col.*, 1996; Clahsen *i col.*, 1998) o radioteràpia (Lowe *i col.*, 1994). En contraposició, altres l'han correlacionat amb incrementada resposta a quimioteràpia (Stal *i col.*, 1995; Hawkins *i col.*, 1996) o radioteràpia (Silvestrini *i col.*, 1997).

- *Pèrdua d'heterozigositat (LOH)*

En càncer de mama altes freqüències de LOH s'esdevenen en determinades regions corresponents als cromosomes 1, 3p, 6q, 7q, 8p, 9p, 10q, 11, 13q, 16q, 17, 18q, 22q i X (revisat a Ingvarsson, 1999).

En algunes de les regions cromosòmiques perdudes es localitzen gens supressors de tumors coneguts com *nm23*. Nivells reduïts d'expressió de *nm23* produeixen un increment de la capacitat metastàtica de les cèl·lules tumorals (revisat a Steeg *i col.*, 1993), i s'associen a metastasis en ganglis limfàtics (Bertheau *i col.*, 1998). Nivells alts d'expressió de *nm23* s'han trobat en tumors ben diferenciats, i s'associen a major temps de supervivència (Heimann *i col.*, 1998).

Altres gens localitzats en les regions delecionades són candidats a gens supressors de tumors com l'*E-cadherina* (16q22,1). Aquest es troba mutat en una gran proporció dels tumors de mama lobel·lars, però no en els ductals (Berx *i col.*, 1996; Vos *i col.*, 1997).

- *BRCA1* i *BRCA2*

Entre un 5 i un 10% dels càncers de mama familiars s'originen per mutacions hereditàries en els gens supressors de tumors *BRCA1* i *BRCA2* (BREast CANcer susceptibility genes 1 i 2). Aquestes mutacions es distribueixen al llarg de la regió codificant dels gens i la majoria (80% i 90%, respectivament) produeixen proteïnes *BRCA1* i *BRCA2* truncades i inactives. D'altra banda, no s'han detectat mutacions somàtiques d'aquests gens en el càncer de mama esporàdic (revisat a Ellisen i Haber, 1998).

BRCA1, localitzat en el cromosoma 17q21, s'associa a càncer de mama i ovari, i les seves mutacions són responsables del 45% de tots els casos de càncers de mama familiars. *BRCA2*, en 13q12-13, presenta major susceptibilitat al càncer de mama que al d'ovari, i les seves mutacions es donen en un 40% dels casos (revisat a Bièche i Lidereau, 1995; Gómez i González, 1998).

3.4.- Model genètic de la tumorigènesi mamària

En el càncer de mama, no existeixen evidències que la transformació de les cèl·lules epitelials en hiperplàsia atípica, carcinoma *in situ* i carcinoma invasiu siguin etapes d'un mateix procés, donat que experimentalment no s'han pogut desenvolupar models que reproduïxin aquests tipus de lesions de manera seqüencial (revisat a Hansen i Bissell, 2000). Tanmateix, s'ha qüestionat si hi ha un únic model genètic per a la tumorigènesi mamària donada l'heterogeneïtat bioquímica, histològica i clínica d'aquest càncer. Bièche i Lidereau (1995) van proposar un model de progressió que adapta les diferents alteracions oncogèniques que hi participen als canvis patològics de l'epiteli mamari sense tenir en compte la variabilitat d'aquest càncer.

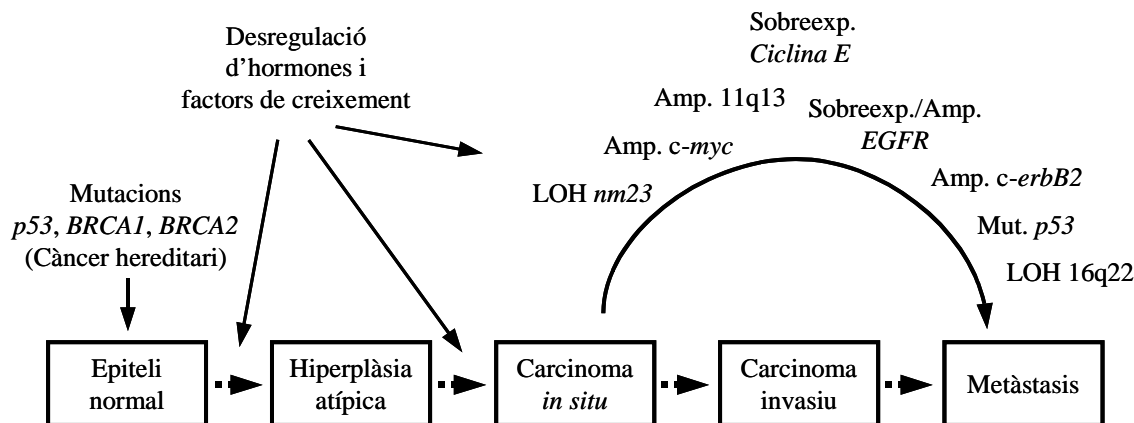


Figura 3.- Model de progressió que adapta les alteracions oncogèniques descrites als canvis patològics de l'epiteli (adaptat de: Bièche i Lidereau, 1995).

L'amplificació oncogènica no és un esdeveniment primerenc en el procés de carcinogènesi del càncer de mama, perquè és trobada en cèl·lules tumorals que han adquirit inestabilitat genòmica i tolerància a la seva presència (Beckmann *i col.*, 1997), però no en la malaltia mamària benigna (Gusterson *i col.*, 1988; Lizard-Nacol *i col.*, 1995). En la hiperplàsia ductal, l'amplificació d'oncogens és detectada només a nivells baixos per gens localitzats en 11q13 (Fantl *i col.*, 1990), però s'incrementa en el CDIS.

La LOH de regions cromosòmiques tampoc es detecta en la patologia benigna de la mama (Lizard-Nacol *i col.*, 1995). Això no obstant, en la hiperplàsia ductal amb atípia o sense s'observen pèrdues, suggerint que el desenvolupament de la hiperplàsia pot implicar diferents gens supressors de tumors. En el CDIS, la LOH és comuna, i pot ser important en el desenvolupament del càncer de mama no invasiu (O'Connell *i col.*, 1998).

Les mutacions del gen *p53* s'esdevenen en les etapes tardanes de la tumorigènesi, excepte en pacients amb la síndrome de Li-Fraumeni (Bièche i Lidereau, 1995). Aquests individus hereden un al·lel mutat, i són susceptibles de desenvolupar múltiples càncers, incloent càncer de mama, com a conseqüència de la mutació del segon al·lel de *p53* (Ingvarsson, 1999).

El fenotip de cada cèl·lula és el resultat de la interacció entre el seu potencial genètic i el seu microentorn. Les alteracions genètiques són necessàries, encara que no suficients, per donar lloc al fenotip maligne. De fet, la sobreestimulació hormonal és una etapa crucial en la transició de l'epiteli normal a la proliferació hiperplàsica benigna en el càncer de mama (King, 1993); els factors de creixement també influeixen en la patologia tumoral i el sistema immunitari procura que les cèl·lules anormals que apareixen a l'organisme siguin selectivament eliminades (revisat a Bièche i Lidereau, 1995).

4.- Progressió metastàtica: etapes

La metàstasi es defineix com la formació d'un o més focus tumorals secundaris en òrgans no contigus al del tumor primari, i és quasi sempre la causa dels fracassos dels tractaments i de la mort de les pacients amb càncer (Welch i Wei, 1998).

El procés metastàtic es divideix en diverses etapes biològiques seqüencials (Figura 4). Primer hi ha un *creixement tumoral*, que és seguit per la formació de nous vasos sanguinis (*angiogènesi*). Algunes cèl·lules tumorals es desprenen del tumor primari, envaeixen l'estroma circundant (*invasió local*) i penetren en el torrent sanguini o limfàtic (*intravasació*). Les cèl·lules tumorals, a la sang o la limfa, interactuen amb altres tipus cel·lulars de manera que poden sobreviure fins arribar a l'òrgan diana (*transport i interacció*). En el lloc secundari, les cèl·lules s'adhereixen a molècules específiques o queden aturades per limitacions físiques (*adhesió/arrest*). Posteriorment, surten de la circulació (*extravasació*) i envaeixen i migren a través de l'estroma del teixit diana (*migració*). Finalment, la proliferació de les cèl·lules tumorals en els òrgans colonitzats dóna lloc a les *metàstasis* (Welch i Wei, 1998; Engers i Gabbert, 2000).

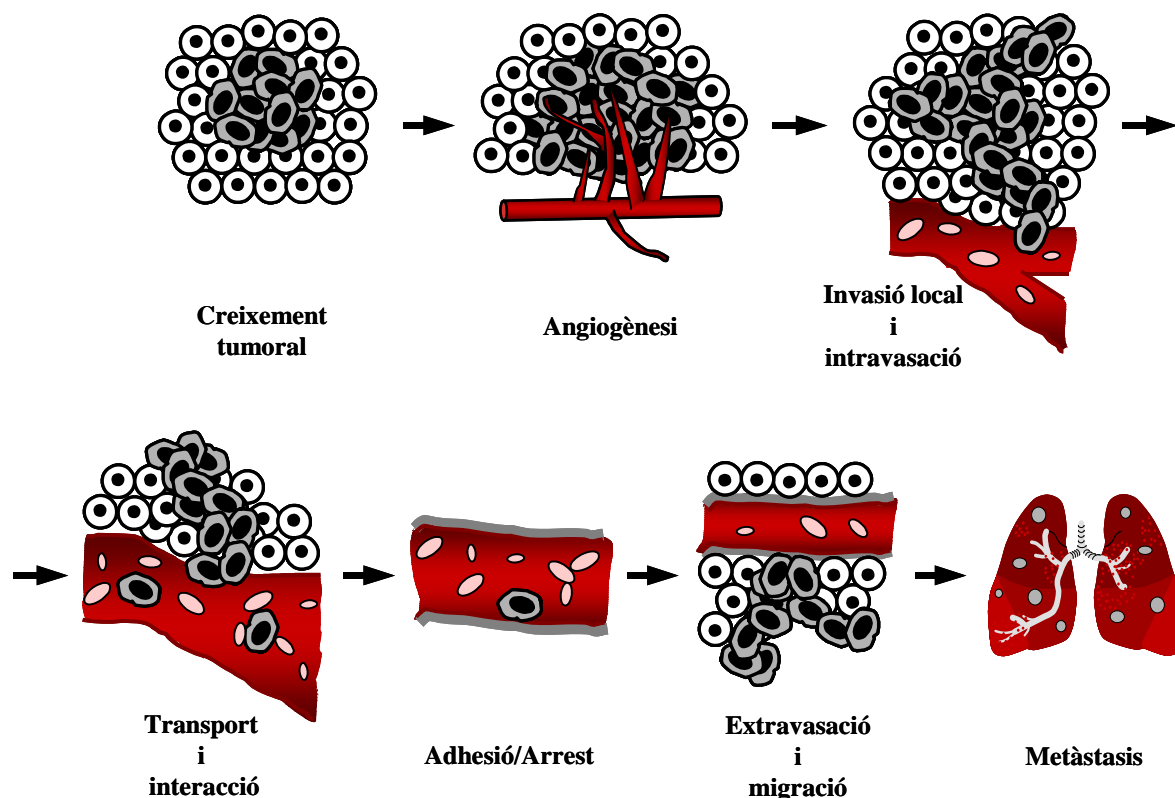


Figura 4.- Etapes de la progressió metastàtica (adaptat de: Welch i Rinker-Schaeffer, 1999).

El càncer de mama es dissemina per via limfàtica i via hemàtica, sent les localitzacions metastàtiques més freqüents els ganglis axil·lars i supraclaviculars homolaterals (61%), ossos (60%), pulmons (34%), cervell (23%) i fetge (20%) (Mallon *i col.*, 2000; Carty *i col.*, 1995).

4.1.- Angiogènesi

L'angiogènesi és un procés rellevant pel creixement dels tumors primaris i de les metastasis, sense el qual les cèl·lules tumorals moren per deficiència de nutrients i oxigen, i per falta d'eliminació d'anhídrid carbònic, àcid làctic i altres substàncies tòxiques, ja que els intercanvis per difusió simple es dificulten en les cèl·lules internes del tumor (Bouck *i col.*, 1996).

El procés d'angiogènesi pot dividir-se en tres etapes: la proliferació de les cèl·lules endotelials, la degradació de la matriu extracel·lular i la migració de les cèl·lules endotelials en direcció a la massa tumoral (Woodhouse *i col.*, 1997). Els nous vasos sanguinis són més permeables a les cèl·lules tumorals que els vasos del teixit normal (Ellis i Fidler, 1996).

La formació de nous vasos està regulada per molècules promotores i inhibidores alliberades per les cèl·lules tumorals i per les cèl·lules de l'hoste. Factors angiogènics com el factor vascular de creixement endotelial (VEGF) i el factor de creixement fibroblàstic (FGF) bàsic i àcid augmenten la proliferació de les cèl·lules endotelials, i factors angiostàtics com la trombospondina-1 (TSP-1) indueixen l'apoptosi de les cèl·lules endotelials (revisat a Compagni i Christofori, 2000).

Els enzims de degradació de la matriu extracel·lular, com les metal·loproteases (MMPs), i les molècules de la superfície cel·lular, com les integrines, també poden induir angiogènesi. La integrina $\alpha_v\beta_3$ és essencial per a la proliferació de les cèl·lules endotelials (Brooks *i col.*, 1994). De fet, $\alpha_v\beta_3$ s'uneix directament a la metal·loproteasa MMP-2, induint una connexió entre les molècules de la superfície cel·lular i la degradació de la matriu (Brooks *i col.*, 1996).

L'angiogenina, un polipèptid no glicosilat de 14 kDa, promou l'activació de les proteases de les cèl·lules endotelials que degraden components de la membrana basal, i incrementa l'adhesió de les cèl·lules endotelials proliferants (revisat a Böhle i Kalthoff, 1999).

4.2.- Invasió local i intravasació

Per metastatitzar les cèl·lules canceroses s'han de desprendre del tumor sòlid, i per a això requereixen la pèrdua de les adhesions intercel·lulars, que són essencials per a la integritat dels teixits epitelials, la polaritat cel·lular i la diferenciació (Böhle i Kalthoff, 1999).

A nivell molecular, les interaccions cèl·lula-cèl·lula homotípiques s'esdevenen essencialment per dos grups de molècules d'adhesió: la superfamília de les immunoglobulines, independents de Ca^{2+} , i la família de les cadherines, dependents de Ca^{2+} (Engers i Gabbert, 2000).

De totes les cadherines, l'E-cadherina, una glicoproteïna transmembrana de 120 kDa que s'expressa en la superfície basolateral de les cèl·lules epitelials, ha estat una de les més intensament estudiades pel seu paper com a supressora de la invasió i la metastasi (Bracke *i col.*, 1996; Mareel *i col.*, 1997). La part extracel·lular de la molècula interactua amb molècules d'E-cadherina d'altres cèl·lules, i la cua intracitoplasmàtica forma un complex amb la proteïna citoplasmàtica β - o γ -catenina, la qual connecta amb el citoesquelet mitjançant l' α -catenina.

Els contactes cèl·lula-cèl·lula, igual que els cèl·lula-matriu extracel·lular, confereixen als epitelis cel·lulars una forta senyal de supervivència; sent la pèrdua d'adhesió cel·lular un potent inductor d'apoptosi. L'apoptosi induïda per la falta d'aquests senyals derivats de l'adhesió es coneix amb el nom d'*anoikis*. De fet, per tal de metastatitzar, les cèl·lules tumorals han de desenvolupar resistència a l'*anoikis* facilitant-se així la supervivència independent d'ancoratge (Del Peso, 2000).

Les cèl·lules tumorals degraden la matriu extracel·lular tant per increment de l'expressió i secreció de proteases, com per la disminució de la producció dels inhibidors d'aquestes proteases (Böhle i Kalthoff, 1999). Es coneixen diversos tipus de proteases: les MMPs, les serín-proteases, les cisteïnil-proteases i les aspartil-proteases (Engers i Gabbert, 2000).

Les MMPs són enzims importants per a la lisi de proteïnes de la matriu extracel·lular com el col·lagen, el proteoglicà, l'elastina, la laminina i la fibronectina (Böhle i Kalthoff, 1999). Aquestes proteases són secretades com proenzims que s'activen extracel·lularment per un tall proteolític (Stamenkovic, 2000). L'activitat de les MMPs és controlada pels inhibidors tissulars de les metal·loproteases (TIMPs) (Gomez *i col.*, 1997).

La serín-proteasa activadora del plasminogen tipus uroquinasa (uPA), quan s'uneix al seu receptor, converteix el plasminogen inactiu en l'enzim actiu plasmina. L'activitat d'uPA és regulada pels inhibidors de l'activador del plasminogen (PAIs). La plasmina degrada diverses proteïnes de la matriu com la fibrina, la fibronectina i la vitronectina (Andreasen *i col.*, 2000).

Les cèl·lules tumorals poden moure's a l'atzar (quimiocinesi) o en resposta a gradients de factors solubles (quimiotaxi); també cap a proteïnes insolubles de la matriu (haptotaxi) o bé induïdes per factors secretats per elles mateixes. Es coneixen alguns factors potenciadors de la mobilitat, com el factor de creixement hepàtic (HGF), el factor de mobilitat autocrina (AMF),

el FGF àcid i bàsic, a més del IGF-I i -II, la interleuquina-6 (IL-6) i el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) (revisat a Böhle i Kalthoff, 1999).

La migració cel·lular requereix una interacció dinàmica entre la cèl·lula i la matriu extracel·lular. En el marge davant de les cèl·lules tumorals es formen extensions cel·lulars (filopodis, lamelipodis i pseudopodis), conseqüència de cicles d'acoblament i desorganització de xarxes de filaments entrecreuats d'actina (Welch *i col.*, 1997). Aquestes extensions interactuen amb components de la matriu extracel·lular, com el col·lagen de tipus-I i -IV, la laminina, la fibronectina i la vitronectina mitjançant les integrines, una família de receptors transmembrana constituïts per una cadena α i una β unides no covalentment (Holly *i col.*, 2000). El lligant extracel·lular específic amb què interactuen és definit per la cadena α , mentre que la cadena β s'uneix a proteïnes citoplasmàtiques. Moltes integrines interactuen amb la seqüència peptídica arginina-glicina-àcid aspàrtic (RGD) present en les proteïnes de la matriu extracel·lular (Hynes, 1992).

Les unions entre la cèl·lula i la matriu extracel·lular generen unes forces que estiren el marge de la cèl·lula endavant. La cèl·lula es contrau, i s'alliberen les interaccions integrina-matriu de la part posterior de la cèl·lula, produint-se el desplaçament cel·lular. Els receptors alliberats són reciclats per endocitosi i transport vesicular i/o pel moviment dirigit endavant en la superfície cel·lular (Sheetz *i col.*, 1999).

Les cèl·lules tumorals contacten i degraden la matriu que recobreix els vasos sanguinis o limfàtics i creuen les seves parets penetrant en el torrent circulatori. Durant aquest procés, les cèl·lules han de suportar deformacions que dependran de la rigidesa de les parets i la disparitat entre el seu propi diàmetre i el del vas (Böhle i Kalthoff, 1999).

4.3.- Transport i interacció

Després d'entrar en el sistema vascular, les cèl·lules tumorals es disseminen pel torrent sanguini fins a arribar a teixits distants (Engers i Gabbert, 2000). Durant aquest transport, les cèl·lules viatgen individualment o formen agregats amb altres cèl·lules tumorals o amb plaquetes i altres tipus cel·lulars per tal de sobreviure a l'atac del sistema immunitari (Welch i Wei, 1998).

4.4.- Adhesió/Arrest

L'aturament de les cèl·lules tumorals circulants en els vasos de l'òrgan diana pot aconseguir-se per adhesió directa a la superfície de les cèl·lules endotelials o per retenció

mecànica en els microcapil·lars (Welch i Wei, 1998).

Les interaccions entre les cèl·lules tumorals i les endotelials estan regulades per les selectines, que són unes proteïnes transmembrana de les cèl·lules endotelials (E-selectina). Els seus lligants són oligosacàrids de la superfície cel·lular tipus sialil-Lewis (Böhle i Kalthoff, 1999). De fet, una incrementada unió d'àcid siàlic a la membrana cel·lular disminueix l'adhesió intercel·lular de les cèl·lules del tumor i millora l'adhesió de les cèl·lules tumorals a les cèl·lules endotelials per interacció de les selectines a sialil-Lewis A o sialil-Lewis X (Amado *i col.*, 1998).

D'altra banda, la interacció d'integrines a seqüències RGD de proteïnes de la matriu extracel·lular també juga un paper important en l'adhesió de les cèl·lules tumorals circulants a l'endoteli (Böhle i Kalthoff, 1999). Pèptids sintètics contenint la seqüència RGD redueixen aquesta adhesió *in vitro* i *in vivo* (Saiki *i col.*, 1989).

4.5.- Extravasació i migració

Les cèl·lules que s'adhereixen a l'endoteli poden induir una ràpida retracció activa de les cèl·lules endotelials que els permet interaccionar amb la membrana basal. Es produeix la degradació local de la membrana basal, alhora que es formen pseudopodis en la cèl·lula tumoral, els quals creuen dita membrana. Finalment, les cèl·lules endotelials es relaxen, completant-se l'extravasació de la cèl·lula tumoral que queda separada del torrent sanguini al mateix temps que es restableix el flux en el vas penetrat (Gómez i Curiel, 1998).

És conegut que les cèl·lules de cada tipus de tumor tenen una tendència a formar metàstasis en òrgans específics. Existeixen dues hipòtesis per explicar aquest fet. La primera, coneguda com *seed and soil* (*llavor i sòl*) proposa que cada cèl·lula tumoral s'estableix allà on troba un microentorn adient per les seves capacitats i possibilitats de proliferar, predint l'existència de receptors i senyals propicis en els teixits on creixeran les metàstasis (Paget, 1889). La segona hipòtesi, anomenada *mecànica*, plantejada quaranta anys més tard per James Ewing, proposa que la preferència d'un teixit per allotjar el creixement de metàstasis depèn del nombre de cèl·lules tumorals que arriba per la circulació sanguínia segons la seva localització i anatomia. D'acord amb això, les cèl·lules tumorals formaran metàstasis en el primer microcapil·lar adient en què quedin atrapades. De fet, ambdues hipòtesis no són excloents, sinó que, probablement, contitueixen part de la veritable situació (Chambers *i col.*, 2000).

Recentment, Müller *i col.* (2001) han identificat quimiocines en òrgans diana i receptors de quimiocines en cèl·lules tumorals, suggerint una nova teoria basada en la quimioatracció per la formació de metàstasis en determinats òrgans.

4.6.- Metàstasi

La invasió d'un òrgan per una cèl·lula tumoral, o per un grup d'elles, no implica necessàriament que allà s'hagi de desenvolupar una metàstasi clínicament aparent. De fet, l'establiment de metàstasis per les cèl·lules tumorals que han aconseguit arribar a la circulació sanguínia o limfàtica és, afortunadament, un procés molt poc eficient, estimat en menys d'un 0,05% de les cèl·lules que hi arriben (Liotta *i col.*, 1974). Aquestes cèl·lules poden quedar en fase latent durant un període de temps variable, *tumor dormancy*, durant el qual poden ser destruïdes per diversos mecanismes immunològics, entrar en apoptosi o proliferar quan les condicions del microentorn siguin adients (Engers i Gabbert, 2000).

Aquestes micrometàstasis poden mantenir-se molt actives i contenir tant cèl·lules en divisió com cèl·lules en apoptosi. El motiu que aquestes micrometàstasis no creixin pot ser per l'equilibri que existeix entre la proliferació i l'apoptosi (Holmgren *i col.*, 1995). D'altra banda, moltes d'aquestes cèl·lules tumorals estan aturades en la fase G0 del cicle cel·lular (Marches *i col.*, 1998) i, posteriorment, són capaces d'entrar en el cicle i establir les metàstasis clínicament aparents molts anys després de l'exèresi del tumor primari.

Un mecanisme limitant per al desenvolupament de les metàstasis pot ser la neoformació de vasos sanguinis. Funcionalment, qualsevol tumor en el qual els nivells de factors antiangiogènics superin els nivells de factors angiogènics podria estar en *dormancy* i ser indetectable (Hart, 1999). L'exèresi d'alguns tumors primaris ha estat associada al creixement de les micrometàstasis, i se suposa que el tumor primari produeix un inhibidor de l'angiogènesi que reprimeix la vascularització de les metàstasis i limita el seu creixement (O'Reilly *i col.*, 1994).

L'absència d'hormones o de factors de creixement necessaris per a la proliferació de les cèl·lules tumorals també pot influir en el seu estat de *dormancy* (Hart, 1999).

5.- Apoptosi

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular programada que s'esdevé per activació d'un mecanisme de suïcidi cel·lular, molt conservat evolutivament, i dirigit fonamentalment a eliminar les cèl·lules supèrflues, velles o danyades en els organismes multicel·lulars (Steller, 1995; Jacobson *i col.*, 1997).

El procés d'apoptosi participa en esdeveniments fisiològics com l'homeostasi normal dels teixits, el desenvolupament embriogènic i la resposta immunològica. Així, un excés d'apoptosi pot conduir a alteracions en el desenvolupament i a l'aparició de malalties

neurodegeneratives, mentre que les deficiències poden portar a malalties autoimmunitàries i a la formació de tumors per increment del nombre de cèl·lules (Thompson, 1995).

Les cèl·lules apoptòtiques presenten un patró d'alteracions morfològiques característic (Figura 5). Primer, la cèl·lula es contrau i perd els contactes intercel·lulars (*pèrdua d'adhesió*). Posteriorment, el citosol i la cromatina es condensen i la cèl·lula s'encongeix (*condensació*). La cromatina que tendeix a marginar-se en forma de mitja lluna contra l'embolcall nuclear es fragmenta i, seguidament, el nucli i la cèl·lula es trenquen en diverses vesícules anomenades cossos apoptòtics (*fragmentació*). Aquests cossos apoptòtics són ràpidament fagocitats i digerits per cèl·lules fagocítiques sense desencadenar una resposta inflamatòria (*fagocitosi*) (McConkey, 1998; Hetts, 1998).

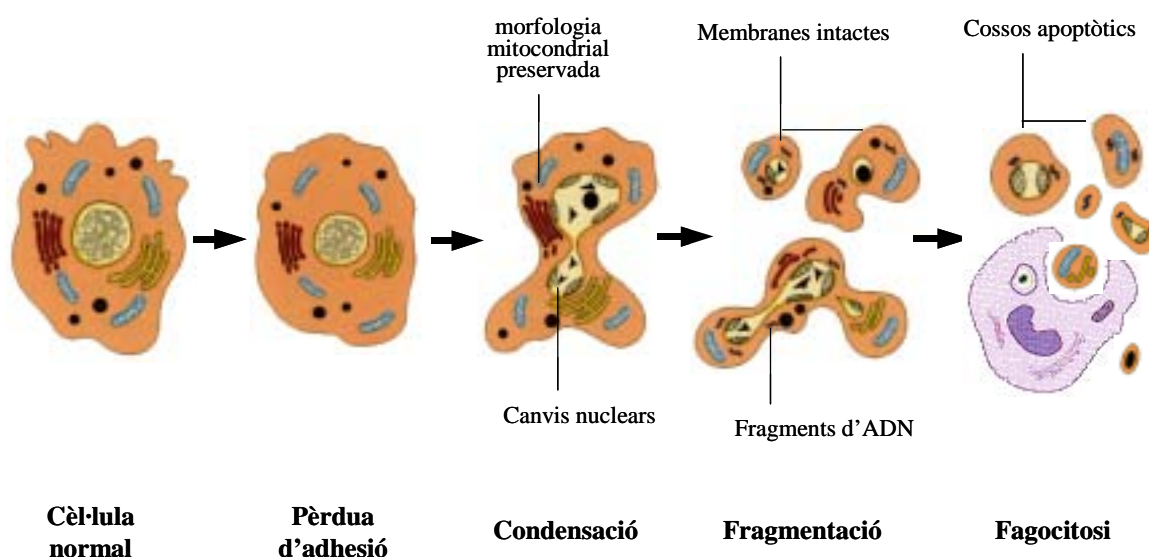


Figura 5.- Característiques morfològiques de l'apoptosi (adaptat de: Wyllie *i col.*, 1998).

5.1.- Fases de l'apoptosi

El procés d'apoptosi pot dividir-se en tres etapes que inclouen una fase d'inducció, que és heterogènia i depèn de l'estímul inductor de mort, una fase efectora comuna durant la qual la cèl·lula pren la decisió de viure o morir i una fase comuna de degradació en la qual la cèl·lula manifesta els canvis bioquímics i morfològics característics de les etapes finals de l'apoptosi (Kroemer *i col.*, 1997).

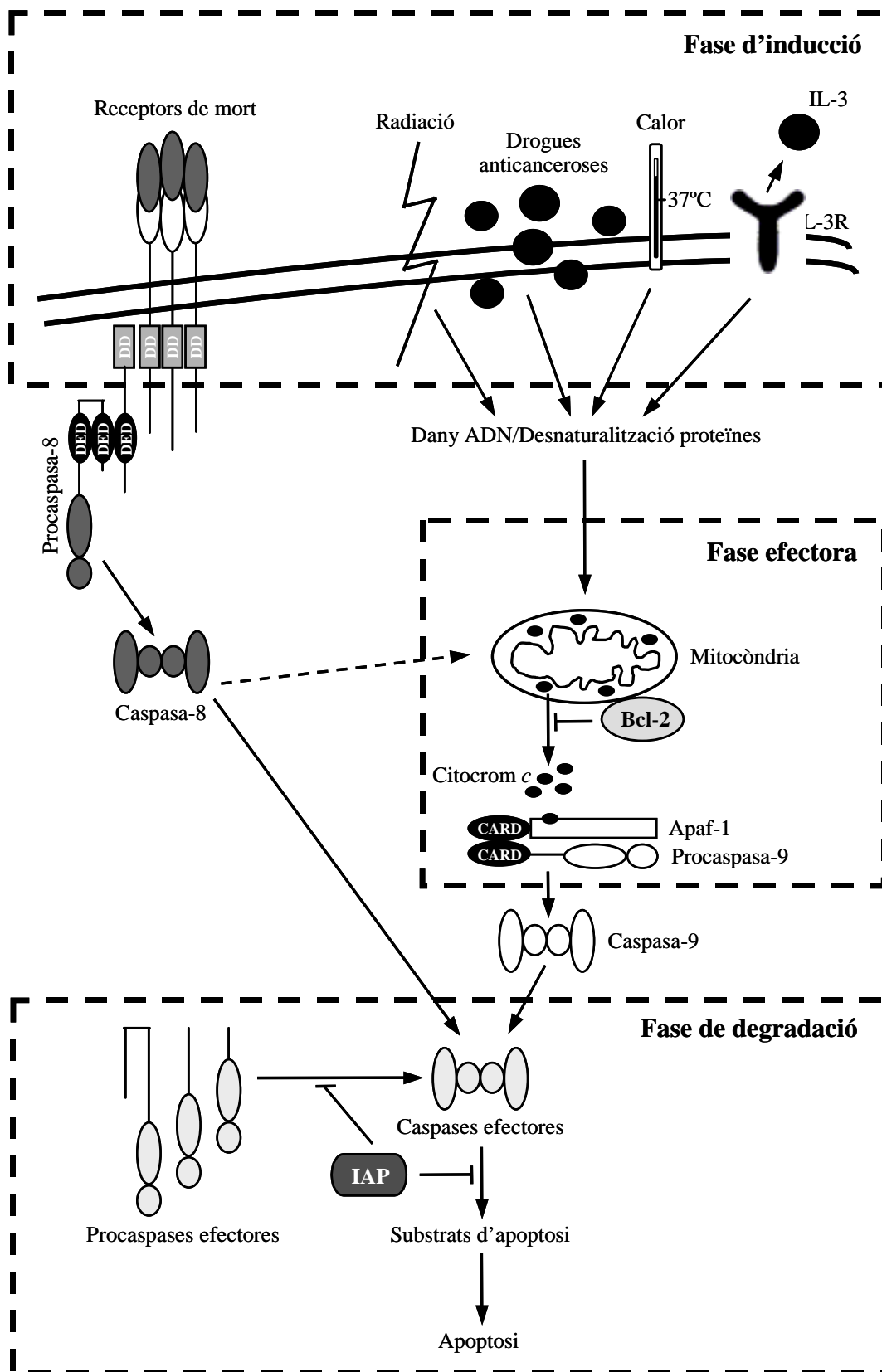


Figura 6.- Representació esquemàtica de les fases de l'apoptosi i de les principals vies apoptòtiques en mamífers (adaptat de: Jäättelä, 1999 i Slee *i col.*, 1999).

5.1.1.- Fase d'iniciació

Durant aquesta fase, la cèl·lula rep estímuls extracel·lulars o intracel·lulars inductors d'apoptosi, que poden diferenciar-se en dos grups segons els seus mecanismes d'acció (Del Peso, 2000).

- *Apoptosi induïda per receptors de mort*

Els receptors de mort pertanyen a la superfamília del receptor del factor de necrosi tumoral (TNFR) (Ashkenazi i Dixit, 1998), que inclou Fas (també anomenat APO-1 o CD95) (Nagata, 1997), TNFR1 (p55 o CD120a) (Smith *i col.*, 1994), DR3 (Apo3 o TRAMP) (Bodmer *i col.*, 1997) i DR4 i DR5 (Apo2 o KILLER) (Pan *i col.*, 1997; Chaudhary *i col.*, 1997). La unió dels lligants extracel·lulars (FasL, TNF, Apo3L i Apo2L/TRAIL, respectivament, essent aquest darrer lligant tant de DR4 com de DR5) als seus respectius receptors indueix la seva trimerització.

La cua citoplasmàtica de cada receptor presenta un domini conservat anomenat domini de mort (DD) que interactua amb proteïnes citoplasmàtiques adaptadores que també contenen aquest domini DD (Ashkenazi i Dixit, 1998).

La porció citoplasmàtica del trimer Fas interactua amb FADD (Fas Associating protein with a Death Domain) (Chinnaiyan *i col.*, 1995), i la cua citoplasmàtica de TNFR1 amb TRADD (TNFR-Associated Death Domain protein) (Hsu *i col.*, 1995).

Les proteïnes adaptadores contenen també dominis efectors de mort (DED) que recluten diverses molècules de procaspasa-8, produint-se una elevada concentració local del zimogen. Aquestes condicions d'afluència d'enzim permeten l'activació de la procaspasa-8, que propaga el senyal de mort per processament directe d'altres caspases (revisat a Slee *i col.*, 1999).

- *Apoptosi induïda per senyals d'estrès*

Les senyals d'estrès, tals com la depleció de factors de creixement, hipòxia, radiació, drogues citotòxiques, xoc tèrmic, indueixen apoptosi activant vies de transducció menys caracteritzades que les desencadenades pels receptors de mort (Thompson, 1995). Aquests senyals d'estrès es tradueixen en alteracions cel·lulars diverses, que poden ésser detectades i integrades a la mitocondria de la cèl·lula (Kluck *i col.*, 1997), on desencadenen l'alliberament de citocrom *c* mitocondrial, que condueix a l'activació de procaspasa-9 (revisat a Del Peso, 2000).

5.1.2.- Fase efectora

La mitocondria té un paper central en la fase efectora de l'apoptosi induïda per gran varietat d'estímuls (Susin *i col.*, 1998; Loeffler i Kroemer, 2000). En molts dels models d'apoptosi estudiats fins al moment, la permeabilització de la membrana mitocondrial és un

esdeveniment crític que condueix a l'alliberament de diverses molècules essencials per a l'apoptosi de l'espai intermembrana mitocondrial (Kroemer i Reed, 2000). Algunes de les molècules alliberades inclouen procaspases, citocrom *c* i un factor inductor d'apoptosi (AIF), que activa les nucleases que tallen l'ADN en fragments d'unes 50 kb de longitud (Brenner i Kroemer, 2000).

Les proteïnes de la família de Bcl-2 influeixen en la regulació d'aquesta fase efectora de l'apoptosi, essent un punt clau en la regulació del procés apoptòtic (Zamzami *i col.*, 1998) (apartat 5.2).

5.1.3.- Fase de degradació

Molts dels canvis morfològics que s'esdevenen durant la fase de degradació de l'apoptosi són produïts per un grup de cisteïnes proteases, les caspases (CysteinyI-ASPartate-specific proteinASES), que són activades específicament en les cèl·lules després d'un estímul proapoptòtic (Alnemri *i col.*, 1996). Fins a la data, més de 14 caspases diferents han estat clonades i parcialment caracteritzades en mamífers, i la majoria han estat implicades en el procés d'apoptosi (Earnshaw *i col.*, 1999; Thornberry i Lazebnik, 1998).

Les caspases són sintetitzades en la cèl·lula com a zimògens o proenzims inactius constituïts per quatre dominis: un prodomini aminoterminal de mida variable, un domini gran (p20), un domini petit (p10) i una regió d'enllaç entre el domini gran i el petit flanquejada per residus d'àcid aspàrtic (Asp) (revisat a Nicholson i Thornberry, 1997). Les procaspases poden ser activades per un tall proteolític entre el prodomini i la subunitat gran, i un altre tall entre la subunitat gran i la subunitat petita. Aquest talls proteolítics tenen lloc després d'un residu d'Asp. Les caspases actives estan constituïdes per dos heterodímers p20/p10 que interactuen mitjançant les subunitats petites per formar un tetràmer amb dos llocs catalítics actius. Cada lloc actiu està format per seqüències de la subunitat gran i petita, que proveeixen els aminoàcids necessaris per al reconeixement dels substrats i la catàlisi (Earnshaw *i col.*, 1999).

Les caspases s'han classificat segons la seva posició en la cascada proteolítica en caspases iniciadores i caspases efectores (Nuñez *i col.*, 1998). Les caspases iniciadores deriven de precursors amb prodominis llargs (caspases-2, -8, -9 i -10), que contenen dominis DED o CARD (CASPase Recruitment Domain) (Hofmann *i col.*, 1997), i són les responsables d'interactuar amb els activadors específics de la ruta i d'activar les caspases efectores. Aquestes són derivades de precursors amb prodominis curts (caspases-3, -6, -7 i -14) i contribueixen a l'execució de l'apoptosi (Li i Yuan, 1999).

Un dels substrats de les caspases és la nucleasa que talla l'ADN genòmic entre els nucleosomes, generant fragments d'ADN amb longituds corresponents a múltiples sencers de 180 pb típics de l'apoptosi (Wyllie, 1980). L'ADN nucleasa coneguda com desoxiribonucleasa activada per caspases (CAD) preexisteix en les cèl·lules normals com un complex inactiu amb una subunitat inhibidora, anomenada ICAD (Inhibitor Caspase-Activated Desoxyribonuclease) (Nagata, 2000). L'activació de la CAD s'esdevé per l'acció de la caspasa-3 en la subunitat inhibidora, resultant l'alliberament i activació de la subunitat catalítica (Sakahira *i col.*, 1998).

Altres efectes secundaris de l'activació de les caspases són la proteòlisi de les làmines nuclears, que es tradueix en l'encongiment i la condensació nuclear (Rao *i col.*, 1996; Buendia *i col.*, 1999); el truncament de la quinasa 2 activada per p21 (PAK2), que permet la invaginació de la membrana cel·lular (Rudel i Bokoch, 1997), i la degradació de proteïnes del citoesquelet, com la fodrina i la gelsolina, que causen la pèrdua de la forma cel·lular (Kothakota, 1997).

S'han descrit processos apoptòtics independents de caspasa que discorren per mecanismes encara no dilucidats. Exemples d'això són la sobreexpressió de Bax (Xiang *i col.*, 1996) i l'acció d'alguns agents quimioterapèutics (McCarthy *i col.*, 1997) que indueixen apoptosi fins i tot en presència de diferents inhibidors de caspases.

5.2.- Els membres de la família de Bcl-2

El gen *bcl-2* (B-Cell Leukemia/lymphoma-2) és un oncogèn inicialment descrit en limfomes fol·liculars de cèl·lules B. La juxtaposició del cromosoma 18 amb el *locus* de la immunoglobulina en el cromosoma 14 produeix sobreexpressió de la proteïna Bcl-2 augmentant la supervivència dels limfòcits B (Tsujimoto *i col.*, 1985). Posteriorment fou identificat com l'homòleg del repressor de l'apoptosi *ced-9* descrit a *C. elegans*.

Actualment, es coneix que Bcl-2 pertany a una família creixent de proteïnes reguladores de l'apoptosi, les quals poden promoure la supervivència cel·lular o la mort cel·lular (revisat a McDonnell *i col.*, 1996).

El *bcl-2* humà codifica per una proteïna de 25 kDa que té quatre dominis conservats coneguts com dominis d'homologia de Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 i BH4) (Figura 7).

Les regions funcionalment importants (BH1, BH2 i BH3) dels membres antiapoptòtics queden disposades pròximes en l'espai i formen una clivella hidrofòbica localitzada en la superfície de les proteïnes antiapoptòtiques, funcionant de manera anàloga a un receptor (Muchmore *i col.*, 1996). Els dominis BH1 i BH2 són essencials per a la funció d'inhibició de l'apoptosi, i per a les interaccions d'aquestes proteïnes amb el domini BH3 de proteïnes

agonistes de la mort (Sedlak *i col.*, 1995; Yin *i col.*, 1994).

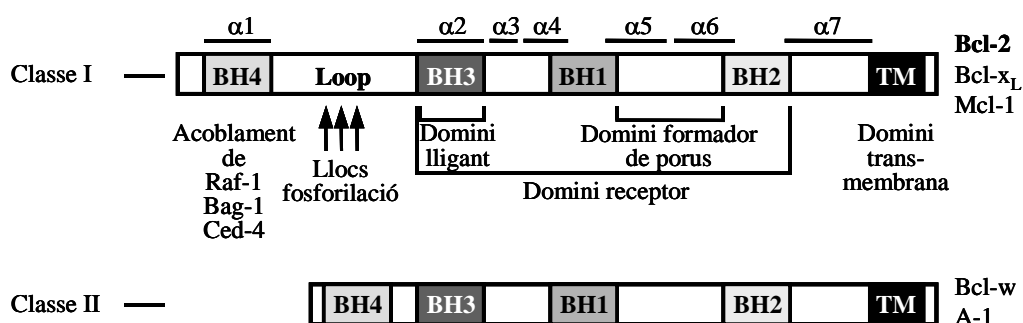
El domini BH3 és requerit per heterodimeritzar amb membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2 i per promoure l'apoptosi (Chittenden *i col.*, 1995).

El domini BH4 es troba en la regió aminoterminal dels membres antiapoptòtics i està involucrat en la interacció amb proteïnes reguladores de la mort no relacionades amb Bcl-2, com la proteïna quinasa Raf-1 (Wang *i col.*, 1994), la fosfatasa calcineurina (Shibasaki *i col.*, 1997) i Ced-4 (Huang *i col.*, 1998) entre d'altres. BH4 evita l'alliberament de citocrom *c* i la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial que s'esdevenen durant l'apoptosi (Shimizu *i col.*, 2000).

Entre els dominis BH3 i BH4 es troba un domini loop, d'aproximadament 60 residus de longitud, que conté serines/treonines fosforilables.

Finalment, presenta un domini transmembrana carboxiterminal que influeix en la seva localització intracel·lular (Kelekar i Thompson, 1998).

Membres antiapoptòtics



Membres proapoptòtics

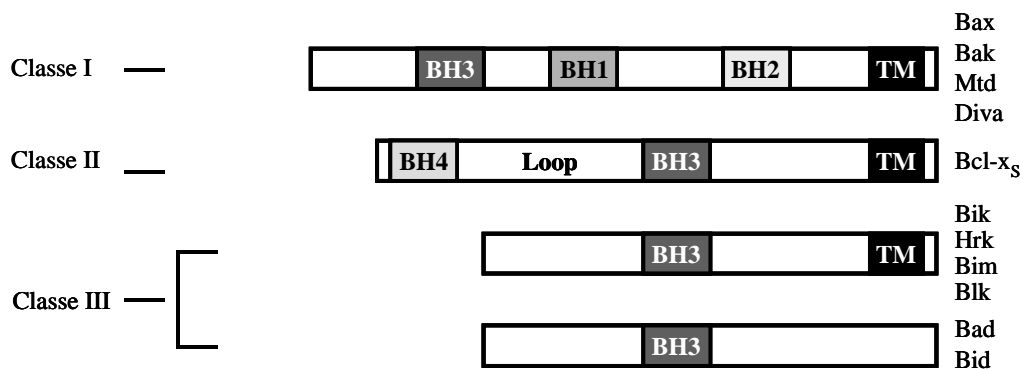


Figura 7.- Classificació de les proteïnes de la família de Bcl-2 segons la seva funció i els seus dominis d'organització. Es mostra l'estructura general de les proteïnes, i s'identifiquen els dominis d'homologia de Bcl-2 (BH) i el domini transmembrana (TM) (adaptat de: Kelekar i Thompson, 1998 i Kroemer, 1997).

5.2.1.- Classificació

Els membres de la família de Bcl-2 poden classificar-se segons la seva funció i els seus dominis estructurals en (Figura 7):

- Membres antiapoptòtics com Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, A1 (Bfl-1), Bcl-w i Boo, que exerceixen una activitat inhibidora de la mort, presenten els quatre dominis d'homologia de Bcl-2 (BH1 a BH4) i poden classificar-se en dues classes: els membres antiapoptòtics de classe I, que contenen el domini loop, i els membres antiapoptòtics de classe II, que no el presenten.

- Membres proapoptòtics com Bax, Bak, Mtd/Bok, Bcl-x_S, Bad, Diva, Bid, Bik, Bim, Hrk (DP5), Blk, Bnip3 i Bnip3L, que exerceixen una activitat inductora de la mort i poden ser classificats en tres classes en funció dels dominis d'homologia que presenten.

Els membres proapoptòtics de classe I presenten tres dominis d'homologia de Bcl-2 (BH1, BH2 i BH3), els de classe II amb una única proteïna, Bcl-x_S, que conté dominis BH3 i BH4, i el domini loop, i els de classe III que presenten només el domini BH3.

Amb l'excepció de Bad i Bid, tots els membres de la família presenten el domini transmembrana carboxiterminal (Kelekar i Thompson, 1998; Tsujimoto i Shimizu, 2000).

5.2.2.- Localització subcel·lular

Bcl-2 es localitza exclusivament en membranes intracel·lulars: reticle endoplàsmic, membrana nuclear i membranes mitocondrials. A la mitocòndria, Bcl-2 no està distribuït de manera difosa sinó que presenta una distribució desigual en els llocs de contacte entre la membrana mitocondrial externa i la interna (Krajewski *i col.*, 1993). Per contra, Bax i una gran part de Bcl-x_L es localitzen en el citosol, tot i que contenen el domini transmembrana carboxiterminal. La localització d'aquestes proteïnes canvia durant l'apoptosi; per exemple, Bax es transloca del citosol a la mitocòndria quan s'indueix apoptosi (Hsu *i col.*, 1997).

Els membres proapoptòtics Bad i Bid, que no presenten la seqüència hidrofòbica d'ancoratge a la membrana, presenten una distribució citoplasmàtica difosa en absència de senyals de mort (Kelekar i Thompson, 1998).

Al reticle endoplàsmic, Bcl-2 inhibeix l'apoptosi induïda per alguns estímuls com la sobreexpressió de *c-myc* i privació de sèrum (Zhu *i col.*, 1996), però no és efectiu en evitar l'apoptosi induïda per *terc*-butilhidroperòxid o etopòsid (Zamzami *i col.*, 1998).

En l'embolcall nuclear, s'ha suggerit que Bcl-2 modula l'apoptosi per afectació de la translocació nuclear de factors de transcripció com p53 (Beham *i col.*, 1997) i NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) (Linette *i col.*, 1996).

De fet, Bcl-2 és un inhibidor de l'apoptosi més eficient quan es localitza a la mitocòndria que en el reticle endoplàsmic i en l'embolcall nuclear (Zamzami *i col.*, 1998).

5.2.3.- Regulació

La regulació dels membres de la família de Bcl-2 inclou diversos mecanismes (Figura 8):

- *Dimerització*

Una important característica dels membres de la família de Bcl-2 és la seva habilitat per formar homodímers i heterodímers. Quan Bax es sobreexpressat en cèl·lules, homodimeritza i indueix la mort cel·lular. En canvi, quan Bcl-2 o Bcl-x_L són sobreexpressats, aquests heterodimeritzen amb Bax i inhibeixen la mort (revisat a Yang i Korsmeyer, 1996). Dificultats estructurals impedeixen que Bcl-2 no formi homodímers *in vitro* ni *in vivo* (Conus *i col.*, 2000).

Bak és funcionalment similar a Bax, però interactua amb major eficiència amb Bcl-x_L que amb Bcl-2 (Farrow *i col.*, 1995). De fet, Bak i Bax poden tenir diferent especificitat cel·lular, igual que Bcl-2 i Bcl-x_L (Yang i Korsmeyer, 1996).

Bad forma heterodímers amb Bcl-2 o Bcl-x_L i inhibeix la seva activitat antiapoptòtica. La forta interacció de Bad amb Bcl-x_L segresta Bcl-x_L dels heterodímers Bcl-x_L/Bax, alliberant-se Bax, i induint-se l'apoptosi (Yang *i col.*, 1995).

La capacitat de Bcl-x_S per induir apoptosi correlaciona amb l'habilitat per formar heterodímers amb Bcl-x_L o Bcl-2 (Chang *i col.*, 1999).

- *Fosforilació*

El taxol i altres agents quimioterapèutics que actuen sobre el procés de polimerització i despolimerització dels microtúbuls indueixen la fosforilació de Bcl-2 en residus de serina del domini loop, i aquesta modificació inhibeix la seva activitat antiapoptòtica (Haldar *i col.*, 1996). De fet, s'ha proposat que Bcl-2 és el guardià de la integritat dels microtúbuls (Haldar *i col.*, 1997). Bcl-x_L és també fosforilat després de la disrupció dels microtúbuls (Poruchynsky *i col.*, 1998).

En contraposició, altres estudis suggereixen que la fosforilació de Bcl-2 pot ser requerida per la seva funció antiapoptòtica en línies cel·lulars dependents de factors de creixement (Ito *i col.*, 1997).

La proteïna proapoptòtica Bad, en presència d'un factor de supervivència, és fosforilada en dues serines (Ser-112 i Ser-136) i segrestada en el citosol per una molècula anomenada 14-3-3. Després d'un senyal de mort, Bad es desfosforila i s'associa amb Bcl-x_L o Bcl-2, induint-se l'apoptosi (Zha *i col.*, 1996).

• *Proteòlisi*

La proteòlisi del domini loop de Bcl-2 i Bcl-x_L provoca la pèrdua del domini BH4, i la consegüent exposició del domini BH3 les converteix en proteïnes proapoptòtiques (Cheng *i col.*, 1997; Clem *i col.*, 1998).

Després del tractament amb TNF- α o Fas, Bid, una proteïna només de domini BH3, és tallada per caspasa-8 generant un fragment carboxiterminal p15 que s'incorpora a la mitocòndria, on indueix apoptosi (Li *i col.*, 1998; Luo *i col.*, 1998).

• *Translocació*

Bim, una proteïna només de domini BH3, es localitza en els microtúbuls associats al complex motor de dineïna i, després d'un senyal de mort, es dissocia del complex motor i es produeix la translocació a la mitocòndria, on interacciona amb Bcl-2 per antagonitzar la seva funció antiapoptòtica (Gross *i col.*, 1999).

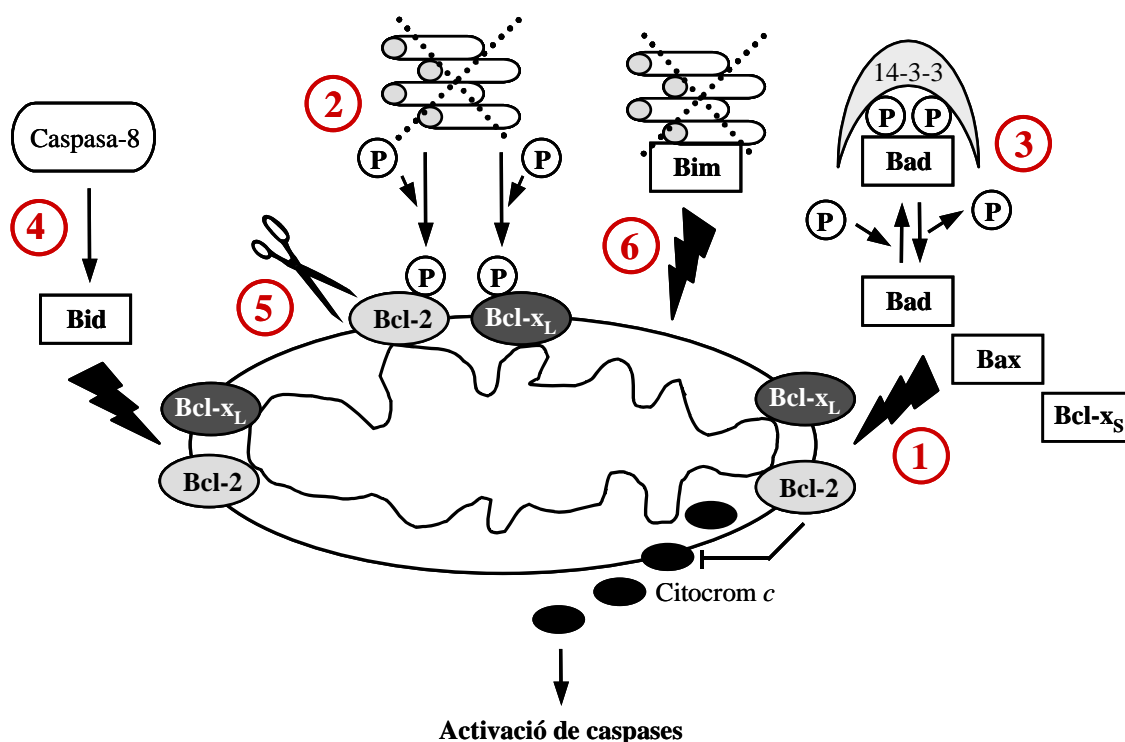


Figura 8.- Regulació dels membres de la família de Bcl-2. 1) Heterodimerització entre membres proapoptòtics i antiapoptòtics de la família. Tant els homodímers com els heterodímers són molècules asimètriques. 2) Agents que danyen els microtúbuls fosforilen i inactiven Bcl-2 i Bcl-x_L. 3) Factors de supervivència promouen la fosforilació de Bad, provocant el segrest de Bad per 14-3-3 en el citosol. 4) El tall de Bid induït per caspasa-8 provoca la translocació de Bid a la mitocòndria i el subsegüent alliberament del citocrom c. 5) Diversos estímuls indueixen un tall dependent de caspases i inactiven Bcl-2 i Bcl-x_L. 6) Bim, segrestada normalment pel complex motor de dineïna, s'incorpora a la mitocòndria per induir apoptosi (adaptat de: Fadeel *i col.*, 1999).

5.2.4.- Proteïnes formadores de porus

Bcl-x_L, Bcl-2 i Bax poden formar canals en membranes lipídiques sintètiques (Minn *i col.*, 1997; Schendel *i col.*, 1997; Schlesinger *i col.*, 1997). Les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L tendeixen a formar canals petits que adopten una conformació més tancada, preferint els cations, mentre que la proteïna proapoptòtica Bax tendeix a formar canals més grans, els quals adopten una conformació més oberta i prefereixen els anions (revisat a Schendel *i col.*, 1998).

L'estructura tridimensional de Bcl-x_L conté un parell d'hèlixs hidrofòbiques centrals (α 5 i α 6) que són suficientment llargues per penetrar en la bicapa lipídica. Aquestes queden protegides de l'ambient aquós per unes altres 5 a 7 hèlixs amfipàtiques que orienten la seva superfície hidrofòbica cap a les hèlixs centrals i la seva superfície hidrofílica cap a la superfície externa (Muchmore *i col.*, 1996). L'estructura tridimensional de Bid és similar a la de Bcl-x_L i, recentment, s'ha demostrat que el fragment carboxiterminal de Bid de 15 kDa també pot formar porus en membranes lipídiques (Schendel *i col.*, 1999).

Això no obstant, encara està per determinar si aquestes proteïnes poden formar canals iònics *in vivo* i si regulen l'apoptosi mitjançant la creació d'aquests canals (Tsujiimoto i Shimizu, 2000) o si aquests canals són suficientment grans per permetre el pas de les proteïnes al seu través (Hengartner, 2000).

5.2.5.- Mecanismes d'alliberament de citocrom *c*

El mecanisme pel qual s'indueix l'alliberament de citocrom *c* de la mitocondria és encara desconegut, però s'ha proposat l'obertura d'un megacanal mitocondrial anomenat porus de permeabilitat transitòria (PTP), o bé l'obertura d'un canal a la membrana mitocondrial externa, bastant gran per permetre al citocrom *c* passar al seu través (revisat a Antonsson i Martinou, 2000).

El PTP és un complex multiproteic que es forma en els llocs de contacte entre la membrana mitocondrial externa i la interna, on Bax, Bcl-2 i Bcl-x_L són particularment abundants (revisat a Reed, 1998). El PTP està compost per diverses proteïnes incloent l'hexoquinasa, la creatina quinasa mitocondrial, el canal d'anions dependent del voltatge (VDAC) present en la membrana externa, el translocador de nucleòtids d'adenina (ANT) de la membrana mitocondrial interna, el receptor perifèric de benzodiazepina i la proteïna de matriu ciclofilina D (Figura 9). Finalment, Bax (però no Bcl-2 o Bcl-x_L) també forma part d'aquest complex interactuant amb VDAC (Narita *i col.*, 1998) i amb ANT (Marzo *i col.*, 1998).

L'obertura d'aquest canal no selectiu permet un equilibri de ions dins la matriu i l'espai intermembrana en la mitocondria, dissipant-se així el gradient electroquímic i desacoblant-se la cadena respiratòria (revisat a Petit *i col.*, 1996). Això ocasiona la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la cessació de la producció d'ATP mitocondrial. A més, l'obertura del canal indueix l'entrada d'aigua en la matriu mitocondrial rica en proteïnes. L'augment del volum de la matriu pot produir el trencament de la membrana mitocondrial externa, alliberant-se així proteïnes localitzades dins l'espai intermembrana al citosol com el citocrom *c*, AIF (Susin *i col.*, 1996) i caspases-2, -3 i -9, les quals són segrestades en aquests orgànuls en determinades circumstàncies (Mancini *i col.*, 1998; Susin *i col.*, 1998).

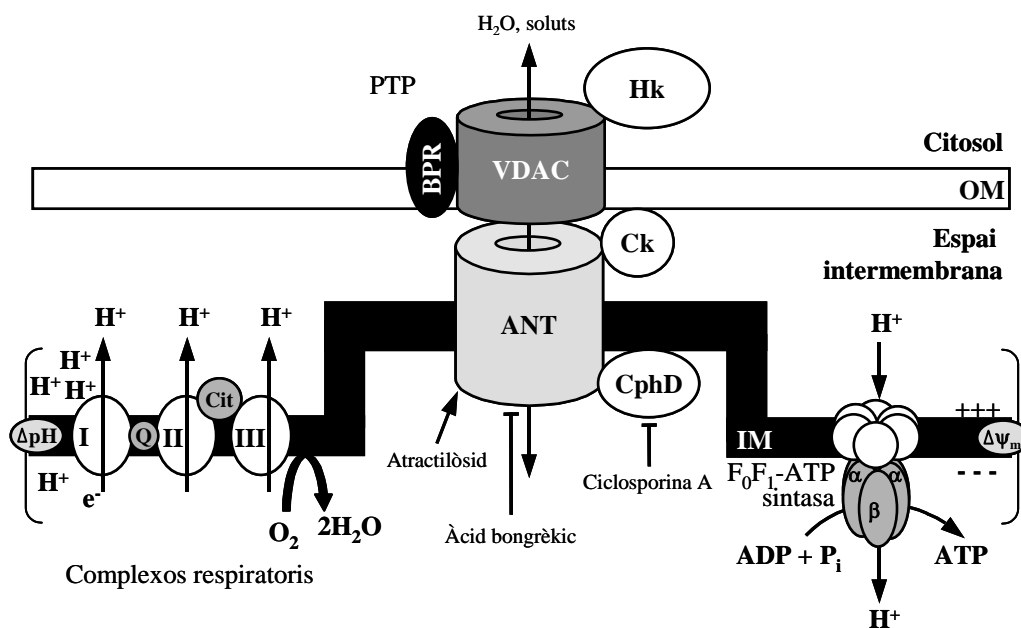


Figura 9.- Representació dels complexos respiratoris, la F_0F_1 -ATP sintasa i el porus de permeabilitat mitocondrial transitòria (PTP) en la membrana mitocondrial interna (IM) i externa (OM). El gradient electroquímic mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es manté principalment per un gradient de H^+ generat pel transport d'electrons (ΔpH). Aquest gradient de H^+ és utilitzat per la F_0F_1 -ATP sintasa per sintetitzar ATP. El PTP està compost per diverses proteïnes com l'hexoquinasa (HK), la creatina quinasa mitocondrial (CK), el canal d'anions dependent del voltatge (VDAC), translocador de nucleòtids d'adenina (ANT), el receptor perifèric de benzodiazepina (BPR) i la ciclofilina D (CycD). Diferents agents que indueixen o inhibeixen l'obertura del PTP són mostrats (adaptat de: Gross *i col.*, 1999).

La sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl- x_L inhibeix l'obertura del PTP induïda per molts estímuls, incloent agents que actuen directament en la mitocondria (Kluck *i col.*, 1997; Marchetti *i col.*, 1996; Shimizu *i col.*, 1996; Susin *i col.*, 1996; Yang *i col.*, 1997). S'ha descrit que Bcl-2 evita l'obertura del PTP per increment del flux de protons de la matriu, inhibint-se així la respiració mitocondrial i la producció de radicals lliures (Shimizu *i col.*, 1998). Bcl- x_L

manté l'intercanvi mitocondrial d'ATP/ADP sota condicions de creixement subòptimes per estabilització de la funció de l'ANT, que és dependent de la funció de VDAC (Vander Heiden *i col.*, 1999). A la inversa, la sobreexpressió de Bax en cèl·lules o la seva addició a mitocondries aïllades indueix l'obertura del PTP i en conseqüència la pèrdua del potencial de membrana (Finucane *i col.*, 1998; Marzo *i col.*, 1998; Xiang *i col.*, 1996).

El segon mecanisme a través del qual el citocrom *c* podria ser alliberat de la mitocondria implica l'obertura d'un altre gran canal, diferent del PTP, a la membrana mitocondrial externa. Aquest canal podria ser un canal format per Bax (Figura 10) o un canal format per VDAC i Bax (revisat a Antonsson i Martinou, 2000).

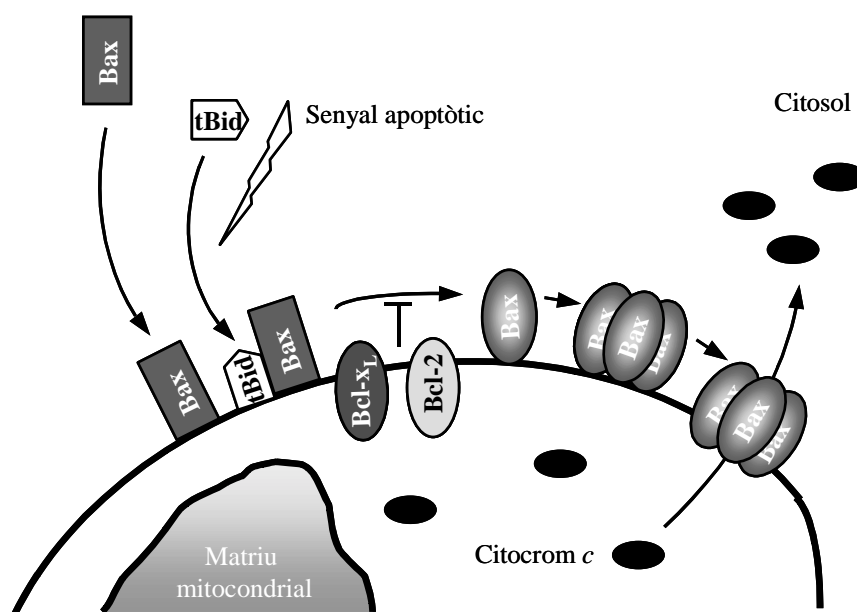


Figura 10.- Després d'un senyal apoptòtic, Bax transloca del citosol a la mitocondria. Seguidament, Bax pateix un canvi conformacional, oligomeritza i s'insereix en la membrana mitocondrial externa. Això és ràpidament seguit per l'alliberament de citocrom *c*. Aquests fets són induïts per Bid i inhibits per Bcl-2 o Bcl-x_L, probablement per interacció directa amb Bax (extret de: Desagher i Martinou, 2000).

5.2.6.- Interacció de Bcl-2 i Bcl-x_L amb Apaf-1

El factor activador de proteases apoptòtiques-1 (Apaf-1) és la molècula adaptadora que regula l'activació de procaspasa-9. En el citosol, el citocrom *c* s'uneix a Apaf-1 i, en presència d'ATP, promou un canvi conformacional en Apaf-1 que desencadena la seva oligomerització. L'oligòmer d'Apaf-1 recluta procaspasa-9 per interacció dels dominis CARDs presents en les dues molècules i l'activa, propagant-se el senyal de mort per processament directe d'altres caspases (Li i Yuan, 1999).

Bcl-x_L, mitjançant el domini BH4, interactua amb Apaf-1, inhibint l'associació d'Apaf-1 amb procaspasa-9 a través dels seus dominis CARDs, i evita l'activació de caspasa-9 (Pan *i col.*, 1998). Això no obstant, la unió a Apaf-1 no és essencial per a la funció protectora de Bcl-2, ja que s'ha demostrat que Bcl-2 no s'uneix a Apaf-1 o ho fa molt feblement, suggerint-se que Bcl-2 inhibeix l'apoptosi al mateix nivell o posteriorment a l'activació d'Apaf-1 (revisat a Hengartner, 1998).

5.2.7.- Bcl-2 i Bcl-x_L en la progressió del cicle cel·lular

Bcl-2 i Bcl-x_L actuen en el cicle cel·lular independentment de la seva funció antiapoptòtica (Vairo *i col.*, 1996; Huang *i col.*, 1997a).

La sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L no afecta l'índex de creixement de fibroblastes en condicions òptimes, però en fibroblastes quiescents sí que pot inhibir la progressió del cicle cel·lular; retardant l'entrada en fase S i mantenint les cèl·lules en G0 (O'Reilly *i col.*, 1996). En limfòcits, l'expressió constitutiva de Bcl-2 té poc efecte en la seva proliferació o diferenciació, però significativament accelera la sortida de les cèl·lules a G0 en resposta a agents que indueixen diferenciació. Per tant, sota determinades condicions Bcl-2 afavoreix l'estat de quiescència (Vairo *i col.*, 1996).

S'ha demostrat que existeix un residu de tirosina conservat en la regió carboxiterminal del domini BH4 de Bcl-2 i Bcl-x_L, que és requerit perquè aquestes proteïnes inhibeixin l'entrada en el cicle cel·lular, però és dispensable per la seva activitat antiapoptòtica. Modificacions posttraduccionals d'aquest residu podrien ser essencials per a la interacció amb una proteïna que reguli la transició G0/G1, inhibint-se l'entrada en cicle cel·lular (Huang *i col.*, 1997a).

Recentment, s'ha reportat que Bcl-2 endarrereix l'entrada en cicle cel·lular per increment dels nivells de p27 i p130 que afavoreixen el manteniment del complex p130 amb E2F4, reprimint-se la transcripció del gen E2F1, que es codifica per a una proteïna que permet l'entrada en cicle cel·lular (Vairo *i col.*, 2000).

6.- Expressió de proteïnes antiapoptòtiques i apoptosi en el càncer de mama

6.1.- Expressió de Bcl-2

Bcl-2 s'expressa en el citoplasma de les cèl·lules epitelials dels ductes grans i petits de la glàndula mamària. Les cèl·lules de l'estroma i les mioepitelials no expressen la proteïna (Sierra *i col.*, 1995).

La sobreexpressió de Bcl-2 s'esdevé en lesions benignes, i en el càncer de mama oscil·la entre el 60-80% dels casos, depenent de la sèrie (Leek *i col.*, 1994; Gee *i col.*, 1994).

L'expressió de Bcl-2 es correlaciona amb la positivitat de RE i RP (Leek *i col.*, 1994) i amb la pèrdua d'apoptosi dels tumors (revisat a Lipponen, 1999). Bcl-2 s'expressa essencialment en tumors de GH-I i -II, mentre que en tumors indiferenciats de GH-III freqüentment n'és absent (Sierra *i col.*, 1995; Lipponen *i col.*, 1995).

La relació de Bcl-2 amb altres paràmetres de pronòstic és contradictòria. L'expressió de Bcl-2 en el tumor primari s'ha associat a un increment en el risc de metàstasis ganglionars en pacients amb tumors de GH-I o -II (Sierra *i col.*, 1995; Singh *i col.*, 1998). Això no obstant, altres estudis no han mostrat relació entre la immunoreactivitat de Bcl-2 i l'estat dels ganglis limfàtics, presència de metàstasis o supervivència lliure de malaltia (Silvestrini *i col.*, 1994; Hellemans *i col.*, 1995; Berardo *i col.*, 1998). Això pot ser degut a l'heterogeneïtat dels grups estudiats, que inclouen tumors petits i grans (T1-T4) amb alt índex de proliferació i diferent GH, el quals poden presentar diferents mecanismes de progressió (Ceccarelli *i col.*, 1995). De fet, la mida del tumor s'ha considerat un dels factors clínics associats amb l'estat dels ganglis limfàtics axil·lars (Ravdin *i col.*, 1994).

6.2.- Expressió de Bcl-x_L

La proteïna antiapoptòtica Bcl-x_L mostra expressió feble en l'epiteli mamari normal, mentre que en l'epiteli mamari maligne està sobreexpressada en aproximadament el 75% dels casos (Krajewski *i col.*, 1999), essent més alta en tumors de GH-III que en els de GH-I i -II, en els quals Bcl-2 és predominant (Olopade *i col.*, 1997; Sierra *i col.*, 1998).

S'ha descrit que la sobreexpressió de Bcl-x_L s'associa amb l'increment del nombre de ganglis limfàtics positius en el moment del diagnòstic (Olopade *i col.*, 1997). Això no obstant, altres treballs no han trobat augment del risc de metàstasis associades a l'expressió de Bcl-x_L en tumors T1 (≤ 2 cm) (Sierra *i col.*, 1998).

6.3.- Expressió de Bcl-2 o Bcl-x_L amb altres proteïnes

Existeix una relació inversa entre l'expressió de Bcl-2 i la de p53 en els CDI de mama (Leek *i col.*, 1994; Zhang *i col.*, 1997). L'expressió de p53 és més comuna en tumors de GH-III que en els de GH-I i -II, i en tumors RE negatius que en els RE positius (Sierra *i col.*, 1996; Gonzalez-Campora *i col.*, 2000). D'altra banda, no s'ha trobat correlació entre l'expressió de Bcl-x_L i la presència o no de p53 en les cèl·lules tumorals.

L'associació entre l'expressió de Bcl-2/pèrdua d'apoptosi es correlaciona amb el risc de metàstasis ganglionars en els CDI de mama (Sierra *i col.*, 1996). La proteïna p53 mutada pot inhibir l'apoptosi, reemplaçant la funció de Bcl-2, i s'ha mostrat un efecte regulador negatiu de la transcripció de *bcl-2* per la proteïna p53 mutada en cèl·lules de càncer de mama (Haldar *i col.*, 1994).

L'expressió de Bcl-2 inhibeix l'apoptosi induïda per c-Myc sense afectar la seva funció mitogènica (Fanidi *i col.*, 1992). En el carcinoma de mama la sobreexpressió de Bcl-2 i c-Myc incrementa el risc de metàstasis ganglionars en tumors de GH-I o -II, fet que suggereix una cooperació sinèrgica entre ambdós oncogens (Sierra *i col.*, 1999).

6.4.- Implicacions terapèutiques de Bcl-2 i Bcl-x_L en el càncer de mama

L'expressió de Bcl-2 s'ha associat amb resistència a la quimioteràpia (Bonetti *i col.*, 1998), però altres estudis han mostrat associació de Bcl-2 amb una millor resposta als antiestrògens com el tamoxifen (Elledge *i col.*, 1997; Zhang *i col.*, 1998). Això és conseqüència de les diferències en les poblacions investigades, el tipus i duració del tractament, l'ús d'hormones junt amb quimioteràpia i el criteri utilitzat per separar els tumors positius dels negatius en els diferents estudis, cosa que fa difícil comparar resultats (Bonetti *i col.*, 1998).

La sobreexpressió de Bcl-2 amb pèrdua d'apoptosi en tumors de baix GH i <2 cm, identifica una població de pacients amb càncer de mama que poden beneficiar-se d'una teràpia més agressiva, ja que aquestes pacients poden tenir més probabilitat de patir metàstasis ganglionars (Sierra *i col.*, 1996).

D'altra banda, la sobreexpressió de Bcl-x_L també s'ha implicat en la quimioresistència del càncer de mama (Reed, 1997). Tanmateix, l'expressió de Bcl-x no ha estat avaluada en pacients que han rebut teràpia antihormonal o quimioteràpia, on nivells alts d'aquesta proteïna podrien anticipar una associació amb mal pronòstic.

II.- Hipòtesi i objectius

1.- Hipòtesi

En el càncer de mama, la sobreexpressió de gens implicats directament en el rescat de la mort cel·lular programada (*bcl-2* o *bcl-x_L*) i la inhibició de l'apoptosi que se'n pugui derivar, pot ser un esdeveniment que faciliti el cúmul d'alteracions necessàries perquè algunes poblacions tumorals puguin sobreviure en el torrent sanguini, colonitzar teixits distants i, finalment, desenvolupar metàstasis.

2.- Objectiu general

Obtenir un model experimental de carcinoma de mama ortotòpic amb el qual es pugui estudiar la contribució que la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L, junt amb la inhibició de l'apoptosi que indueixen, pot tenir en diferents etapes de la progressió metastàtica del càncer de mama humà.

3.- Objectius concrets

- Avaluar les repercussions que la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L té en diferents activitats biològiques associades a la progressió metastàtica de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana.
- Analitzar la conducta tumorigena i metastàtica de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana que sobreexpressen Bcl-2 o Bcl-x_L.
- Estudiar la contribució de la inhibició de l'apoptosi induïda per sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L en la selecció del fenotip metastàtic.
- Abordar la reversió dels fenotips que s'associïn més clarament a la progressió metastàtica com a aproximació patogènica i terapèutica.

III.- Material i mètodes

1.- Cultius cel·lulars i cultius de teixits

1.1.- Característiques de les línies cel·lulars

En aquest treball s'han utilitzat tres línies cel·lulars derivades d'adenocarcinoma de mama humana (Taula 6): MCF-7, MDA-MB-468 (468), que van procedir de l'ATCC (American Type Culture Collection, EUA) (referències HTB-22 i HTB-132, respectivament) i MDA-MB-435P (435), que va ser amablement cedida per la Dra. Price del M. D. Anderson Cancer Center (Houston, TX).

La línia MCF-7 va ser derivada a partir d'un vessament pleural d'una pacient caucàsica de 69 anys amb adenocarcinoma de mama metastàtic (Soule *i col.*, 1973). Aquestes cèl·lules presenten morfologia epitelial, creixen en monocapa formant ductes i expressen RE.

La línia 468 va ser derivada a partir d'un vessament pleural d'una pacient negra de 51 anys amb adenocarcinoma de mama metastàtic (Pathak *i col.*, 1979). Són cèl·lules amb morfologia epitelial, creixen en monocapa i tenen una mutació puntual d'una G -> A en el codó 273 donant com a resultat la substitució d'una Arg -> His en la proteïna p53 (Nigro *i col.*, 1989).

La línia 435 va ser derivada a partir d'un vessament pleural d'una pacient caucàsica de 31 anys amb adenocarcinoma ductal de mama metastàtic (Cailleau *i col.*, 1978). Aquestes cèl·lules presenten morfologia epitelial, creixen en monocapa, tenen una mutació puntual d'una G -> A en el codó 266 donant com a resultat la substitució d'una Gly -> Glu en la proteïna p53 (O'Connor *i col.*, 1997) i presenten amplificacions dels gens *c-myc* i *neu*.

Taula 6.- Característiques fenotípiques i oncogèniques de les línies cel·lulars MCF-7, MDA-MB-468 i MDA-MB-435P

MCF-7	MDA-MB-468	MDA-MB-435P
Hormonodependent (RE positives)	Hormonoindependent	Hormonoindependent
No metastàtica	No metastàtica	Metastàtica
<i>p53</i> normal	<i>p53</i> mutat	<i>p53</i> mutat <i>c-myc</i> i <i>neu</i> amplificats

1.2.- Manteniment dels cultius

El cultiu de les línies cel·lulars es va realitzar en condicions d'esterilitat pròpies del cultiu de cèl·lules eucariotes. Periòdicament, es van obtenir sobrenedants dels cultius per

detectar la presència de micoplasma utilitzant el test Gen-Probe® Mycoplasma T. C. (Gen-Probe Inc.).

El medi de cultiu emprat va ser DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/HAM'S nutrient mixture F-12 (1:1, v/v) (Gibco BRL) suplementat amb un 2% (v/v) d'L-glutamina 200 mM (Gibco BRL), un 1% (v/v) d'L-piruvat 100 mM (Gibco BRL) i un 10% (v/v) de sèrum boví fetal (SBF) (Biological Industries, Israel), inactivat durant 30 min a 56°C. Per a les MCF-7, el medi de cultiu es va suplementar també amb 10 µg/ml d'insulina (Sigma, St. Louis, MO).

Les cèl·lules es van mantenir en un incubador humidificat a 37°C amb una atmosfera al 5% de CO₂.

1.2.1.- Establiment de subcultius

La proporció de subcultiu adient per a aquestes línies cel·lulars va variar de 1:3 a 1:6 per a les MCF-7, de 1:2 a 1:4 per a les 468 i de 1:4 a 1:8 per a les 435, a partir de cultius en condicions òptimes de subconfluència.

Les cèl·lules es van tractar amb una solució 0,05% de tripsina i 0,2 g/l d'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) (Gibco BRL), i una vegada desadherides del suport de plàstic es va bloquejar l'acció de la tripsina amb medi de cultiu.

Els rentats de les cèl·lules es van fer amb tampó fosfat salí (PBS) estèril (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 9,35 mM NaHPO₄·2H₂O, 1,47 mM KH₂·PO₄, pH 7,2-7,4) i es van centrifugar a 1.000 rpm durant 10 min a 4°C.

El recompte de les cèl·lules es va realitzar amb una cambra de Neubauer (Blaubrand®, Alemanya), i la viabilitat cel·lular es va determinar a partir d'una alíquota de la suspensió cel·lular diluïda en una solució de blau tripan (Sigma) al 0,04% en PBS.

El nombre de cèl·lules viables (no tenyides amb el colorant)/ml es va obtenir multiplicant la mitjana de cèl·lules per camp pel factor de dilució amb el blau de tripan i pel volum de comptatge de la cambra (10⁴). La viabilitat cel·lular s'expressa en tant per cent de cèl·lules viables respecte del nombre total de cèl·lules i, en tots els assajos duts a terme en aquest treball, la viabilitat cel·lular va ser superior al 90%.

1.2.2.- Preservació de les cèl·lules

La congelació de les cèl·lules es va realitzar amb cultius cel·lulars en fase exponencial. Després de la tripsinització, les cèl·lules rentades es van resuspendre en medi de congelació fred (DMEM/F-12 suplementat amb 20% SBF i 10% dimetil sulfòxid (DMSO)). Els criotubs

amb 1 ml de suspensió cel·lular es van mantenir en el Cryo 1°C Freezing Container “Mr. Frosty” (Nalgene®) a -80°C durant 4 h i, posteriorment, es van emmagatzemar en N₂ líquid.

1.3.- Transfeccions cel·lulars

Es van utilitzar dos mètodes de transfecció diferents a causa de la desigual efectivitat de transfecció en els diferents models cel·lulars. Les cèl·lules MCF-7 i 435 es van transfectar utilitzant liposomes comercials i, les 468, per electroporació.

En tots els casos es va partir de cultius exponencials de cèl·lules amb una viabilitat cel·lular superior al 96%.

1.3.1.- Transfecció amb liposomes

Les cèl·lules a transfectar es van sembrar en plaques de cultiu de 100 mm (Techno Plastic-Products A.G., TPP, Suïssa) a una concentració de 250.000-500.000 cèl·lules/placa i es van incubar fins a un 30-50% de confluència.

Les solucions de transfecció es van preparar en tubs Corning estèrils de 5 ml, i a cada placa s’hi van afegir 200 µl de solució de transfecció contenint:

- Solució A: 10 µg ADN plasmídic en 100 µl medi Opti-MEM®.
- Solució B: 20 µl de Lipofectin® (Life Technologies) en 100 µl de medi Opti-MEM®.

La barreja de les dues solucions es va incubar a temperatura ambient durant 30 min.

El primer dia de transfecció, es va fer un rentat de les cèl·lules amb 5 ml de medi Opti-MEM® I Reduced Serum Medium modification of MEM (Eagle’s) (Gibco BRL), s’hi van afegir 5 ml d’Opti-MEM® i es van incubar durant 2 h.

Després d’aspirar el medi, es van afegir 8 ml de medi Opti-MEM® i 200 µl de la solució de transfecció corresponent en cada placa, i es van incubar tota una nit a 37°C.

El segon dia de transfecció, la solució de transfecció es va substituir pel medi fresc corresponent a cada tipus cel·lular suplementat amb el 20% de SBF.

El tercer dia de transfecció, el medi es va bescanviar per un medi fresc amb el 20% de SBF i l’antibiòtic de selecció corresponent: 500 µg/ml de geneticina i/o 100 µg/ml de zeozina (sensible a la llum). Posteriorment, el canvi de medi es va dur a terme segons l’evolució del creixement cel·lular.

Al cap de les 4 setmanes de transfecció van començar a aparèixer les colònies de cèl·lules. L’aïllament de cada colònia es va fer rasant amb un escuradents estèril i es van sembrar en plaques de 96 pous amb el medi de selecció corresponent per cada línia cel·lular.

1.3.2.- Transfecció per electroporació

El primer dia de transfecció, 400 µl d'una suspensió cel·lular de 10×10^6 cèl·lules/ml en PBS es van posar a l'interior d'una cubeta d'electroporació de 2 mm, i s'hi van afegir 20 µg d'ADN plasmídic en aigua bidestil·lada estèril. La barreja es va sotmetre a un voltatge de 500 V, una capacitança de 100 µF i una resistència R10 (720 Ω) durant 1 ms (0.9) en l'aparell d'electroporació.

Un cop electroporades les cèl·lules es van incubar 10 min a temperatura ambient a l'interior de la cubeta. La suspensió cel·lular es va resuspendre amb 10 ml de medi de cultiu i es va sembrar el contingut en plaques de 6 pous durant 24 h.

El segon dia de transfecció, el medi es va bescanviar per medi fresc amb el 20% de SBF i 500 µg/ml de geneticina. Posteriorment, el canvi de medi es va dur a terme segons l'evolució del creixement cel·lular.

Després de 4 setmanes de transfecció van començar a aparèixer les colònies de cèl·lules, que es van aïllar de la mateixa manera que en l'apartat 1.3.1.

1.4.- Obtenció de cultius primaris

A partir dels tumors induïts en ratolines atímiques per implant ortotòpic (i.m.f.p.) de les diferents línies cel·lulars (apartat 5.4) es van establir cultius primaris.

El tumor extirpat es va transferir a una placa de plàstic contenint sèrum fisiològic Braun, i es va trossejar amb un bisturí. La suspensió del teixit amb 10 ml de tripsina es va posar a agitar en un erlenmeyer estèril amb tap amb una mosca agitadora durant 3-15 min a 37°C. La suspensió es va filtrar amb una malla de niló, i després de neutralitzar l'efecte de la tripsina amb medi de cultiu, es va centrifugar a 1.000 rpm 10 min a 4°C. Les cèl·lules es van resuspendre amb medi al 20% de SBF amb 500 µg/ml de geneticina, i es van sembrar en una placa de cultiu fins a obtenir cultius subconfluents.

2.- Vectors d'expressió gènica

2.1.- Plasmidis

Per induir l'expressió gènica es van utilitzar els plasmidis SFFV-*neo* i ZeoSV2 (+). El plasmidi SFFV-*neo-bcl-2* contenint l'ADNc que codifica per la proteïna Bcl-2 va ser cedit amablement pel Dr. Nuñez de la Universitat de Michigan, i el SFFV-*neo-bcl-x_L* contenint l'ADNc que es codifica per a la proteïna Bcl-x_L i el SFFV-*neo* sense la inserció van ser cedits amablement pel Dr. Fernández-Luna de la Universitat de Santander.

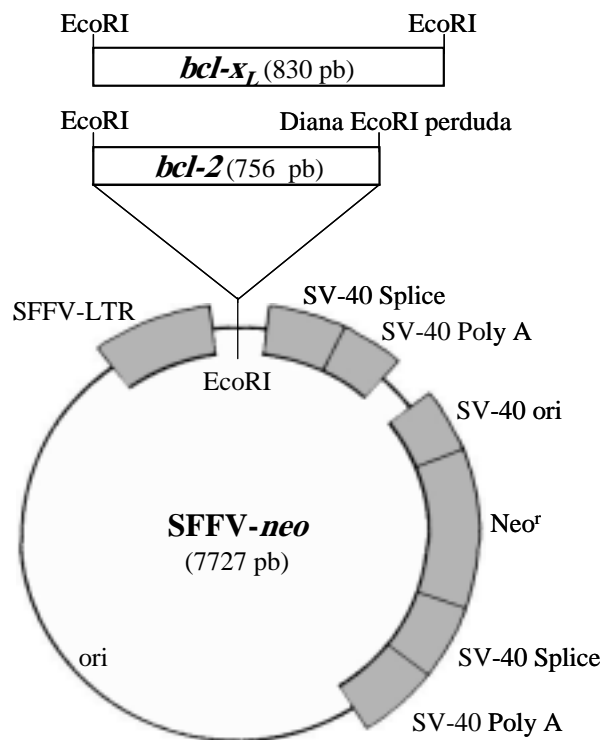


Figura 13.- Esquema del plasmidi SFFV-*neo* (adaptat de: Fuhlbrigge *i col.*, 1988) i la inserció dels ADNc del *bcl-2* i *bcl-x_L*.

El plasmidi ZeoSV2 (+) va ser cedit gentilmente per Antònia Vinyals, de l'Institut de Recerca Oncològica.

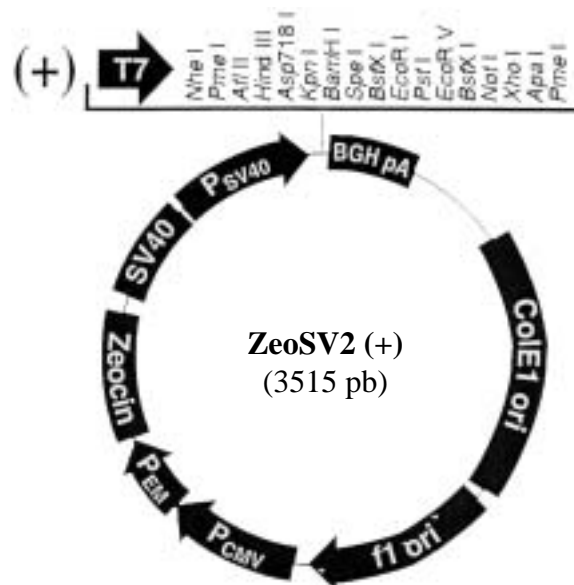


Figura 14.- Esquema del plasmidi ZeoSV2 (+) (Invitrogen®).

2.2.- Transformació d'*E. coli*

Per a la transformació dels bacteris, es van utilitzar bacteris competents Epicurean Coli® Sure® Competent Cells (Stratagene) o DH5 α , que es van transformar per xoc tèrmic seguint el protocol establert per la casa comercial.

Una alíquota de 100 μ l dels bacteris transformats es va sembrar en una placa de plàstic bacteriològic estèril de 10 cm de diàmetre (Soria Greiner), prèviament preparada amb medi LB (Luria-Bertani)-agar estèril (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracte de llevat, 0,5% (p/v) NaCl, 1,5% (p/v) agar, pH 7,5) i 50 μ g/ml d'ampicil·lina o 25 μ g/ml de zeozina. Les plaques es van incubar tota una nit a 37°C.

Les colònies resistents ben aïllades es van separar de la matriu d'agar amb una nansa estèril, es van inocular en medi LB estèril (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracte de llevat, 0,5% (p/v) NaCl, pH 7,5) contenint 50 μ g/ml d'ampicil·lina o 25 μ g/ml de zeozina i es van incubar en agitació a 225 rpm durant 16 h a 37°C.

La preservació dels bacteris transformats creixent exponencialment es va fer amb glicerol estèril a -80°C.

2.3.- Purificació d'ADN plasmídic

Per purificar l'ADN plasmídic es va optar pel sistema QIAGEN Plasmid Purification (Qiagen). Prèviament, es van inocular 2 μ l del glicerol bacterià que conté el plàsmid a purificar en 2 ml de medi LB amb ampicil·lina o zeozina i es van incubar en agitació a 225 rpm durant 8 h a 37°C. El cultiu iniciat es va diluir amb 500 ml de medi LB amb ampicil·lina o zeozina, i es va fer créixer en agitació a 225 rpm durant tota una nit a 37°C.

Es va seguir el protocol de lisi alcalina (Birnboim i Doly, 1979) indicat per la casa comercial i, finalment, es va dissoldre l'ADN unit a la resina amb 500 μ l de TE estèril (10 mM Tris-(hidroximetil)-aminometà (Tris)-HCl pH 8, 1 mM EDTA).

- *Determinació de la concentració d'ADN*

Per a la quantificació de l'ADN es va utilitzar un espectrofotòmetre Beckman a 260 i 280 nm. El càlcul de la concentració d'ADN es va obtenir segons la fórmula:

$$[\text{ADN}] = (\text{Absorbància}_{260\text{nm}}) \times (0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times D$$

on D = factor de dilució (Saambrok *i col.*, 1989).

- *Determinació de la qualitat de l'ADN*

Els ADN plasmídics purificats SFFV-*neo-bcl-2*, SFFV-*neo-bcl-x_L*, SFFV-*neo* i ZeoSV2 (+) es van digerir a 37°C durant tota una nit utilitzant els enzims de restricció EcoRI i BamHI:

Reactiu	Volum (μl)
ADN purificat (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1
Tampó de digestió 10 \times (Boehringer Mannheim)	2
Aigua bidestil·lada estèril	16
Enzim de restricció (Boehringer Mannheim): EcoRI 10 U/ml o BamHI 10 U/ml	1

Els productes de la digestió de l'ADN plasmídic amb els enzims de restricció es van comprovar en un gel d'agarosa a 1% (p/v) en tampó Tris bòric EDTA (TBE) (89 mM Tris, 89 mM àcid bòric, 2 mM EDTA, pH 8,3).

Quantitats iguals d'ADN plasmídic digerit i no digerit es van diluir amb tampó de càrrega blau bromfenol 6 \times (0,25% (p/v) blau bromfenol, 30% (v/v) glicerol, 60 mM EDTA), i com a marcador de pes molecular es va utilitzar l'1 kb DNA Ladder (Gibco BRL), que serveix com a estàndard de cadenes dobles lineals entre 500 pb i 12 kb. L'electroforesi es va portar a terme durant 1 h a 100 V.

El gel es va tenyir amb una solució 2 ng/ μl de bromur d'etidi i, després de destenyir-lo amb aigua bidestil·lada, es va visualitzar l'ADN en el transil·luminador i es va fotografiar.

2.4.- Construcció antisentit de *bcl-x_L*

Per obtenir la construcció antisentit de *bcl-x_L* es va optimitzar una digestió doble dels vectors SFFV-*neo-bcl-x_L* i ZeoSV2 (+) amb els enzims de restricció BamHI i EcoRI. Primer, l'ADN es va digerir a 37°C durant 2 h amb BamHI:

Reactiu	<i>bcl-x_L</i> o <i>zeo</i>
ADN purificat (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	25 μl
Tampó de digestió 10 \times (Boehringer Mannheim)	5 μl
Aigua bidestil·lada estèril (Braun)	17 μl
Enzim de restricció BamHI 10 U/ml (Boehringer Mannheim)	3 μl

i després amb EcoRI durant tota una nit:

Reactiu	<i>bcl-x_L</i> o <i>zeo</i>
Digestió de SFFV- <i>neo-bcl-x_L</i> o ZeoSV2 (+) amb BamHI	50 µl
Tampó de digestió 10× (Boehringer Mannheim)	5 µl
Aigua bidestil·lada estèril (Braun)	58 µl
Enzim de restricció EcoRI 10 U/ml (Boehringer Mannheim)	3 µl

Els productes de les digestions de l'ADN plasmídic es van separar en gels d'agarosa a l'1% en tampó Tris acètic EDTA (TAE) (40 mM Tris, 20 mM àcid acètic, 1 mM EDTA, pH 8). Es va separar i purificar un fragment de 0,6 kb de l'ADNc del *bcl-x_L* escindit com a fragment EcoRI-BamHI, i l'ADN plasmídic ZeoSV2 (+) flanquejat per les dianes EcoRI-BamHI, seguint el procediment GENE CLEAN-II® (Bio 101, Inc.), que conté una matriu de sílice especialment formulada, anomenada GLASSMILK®, que uneix ADN de cadena simple i doble sense adjuntar-hi contaminants.

- *Lligament*

El fragment de l'ADNc del *bcl-x_L* escindit com a fragment EcoRI-BamHI es va clonar en el lloc BamHI-EcoRI de l'ADN plasmídic ZeoSV2 (+) i donà lloc a la construcció antisentit.

La inserció *bcl-x_L* es va sotmetre a 70°C durant 10 min i, després de mantenir-la 10 min més en gel, es va preparar la reacció de lligament que es va incubar tota una nit a 4°C:

Reactiu	µl
Insert <i>bcl-x_L</i> (100 ng)	1
Vector ZeoSV2 (+) (100 ng)	3
Aigua bidestil·lada estèril	20
Tampó T4 DNA Lligase 10× (M1801) (Promega)	3
T4 DNA Lligase (M1801) (Promega)	3

La proporció molar d'extrems lliures de vector va ser sis vegades superior a la d'extrems lliures d'insert.

3.- Biologia molecular

3.1.- Anàlisi d'ADN

3.1.1.- Extracció d'ADN

5×10^6 cèl·lules d'un cultiu exponencial es van lissar amb tampó TE (apartat 2.3) contenint un 10% de dodecil sulfat sòdic (SDS) i 10 mg/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim). Les mostres es van incubar a 37°C durant tota una nit i, posteriorment, a 55°C durant 1 h amb agitació suau. Es van tractar dues vegades amb un volum de fenol i es van centrifugar durant 20 min a 3.500 rpm a 4°C. La fase aquosa es va tractar dues vegades amb un volum de SEVAG (cloroform:alcohol isoamflic, 24:1), i a la fase aquosa resultant se li van afegir 1:50 volums de NaCl 5 M i 2,5 volums d'etanol absolut fred (Carlo Erba Reagenti) abans d'incubar-la a -80°C durant tota una nit.

El pèl·let obtingut de centrifugar les mostres durant 25 min a 3.500 rpm a 4°C es va rentar amb etanol al 70% fred i es va deixar assecar a l'aire durant tota una nit.

L'ADN es va resuspendre amb tampó TE i, abans de guardar-lo a 4°C, se'n va determinar la concentració i la qualitat (apartat 2.3).

3.1.2.- Southern blot

Aquesta tècnica consisteix en la transferència d'ADN a una membrana de nitrocel·lulosa, on queda immobilitzat i on té lloc la reacció d'hibridació entre l'ADN i l'ADNc desnaturalitzat en fragments de cadena senzilla.

- *Digestió de l'ADN*

Es van digerir 20 µg d'ADN per mostra amb l'enzim de restricció EcoRI segons les següents proporcions:

Reactiu	Quantitat	µl
ADN (2 µg/µl)	20 µg	10
BSA 10×	10% volum final	8
Espermidina 0,1 M	4% volum final	3,2
Tampó de digestió 10×	10% volum final	8
EcoRI 10 U/ml	80 U	8
Aigua bidestil·lada estèril	-	42,8

La barreja de tots els components de la digestió, a excepció de l'enzim, es va incubar 1 h a 4°C i, posteriorment, s'hi va afegir l'enzim de restricció i es va incubar tota una nit a 37°C amb agitació suau.

- *Electroforesi de l'ADN*

Les mostres digerides es van separar en gels d'agarosa al 0,8% en TBE (apartat 2.3). Les condicions d'electroforesi van ser 5-10 min a 100 V i a 36 V (2 V per cm de llargària del gel) tota una nit. El gel es va tenyir i destenyir seguint el protocol especificat en l'apartat 2.3.

- *Transferència de l'ADN a membranes de nitrocel·lulosa*

El gel es va rentar durant 30 min amb solució desnaturant A (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) i, després de tractar-lo amb aigua bidestil·lada, es van fer rentats de 15 min amb solució neutralitzant B (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 6), fins que el pH final de la solució va ser 7.

La transferència a membranes de niló carregades positivament (Boehringer Mannheim Biochenica) es va realitzar per capil·laritat amb tampó de citrat sòdic salí (SSC) 10× (1,5 M NaCl, 0,15 M acetat trisodicdihidratat, pH 7) durant 20 h.

La membrana es va remullar en tampó 3× SSC durant 5 min i l'ADN es va fixar a la membrana a 80°C durant 2 h.

- *Obtenció de la sonda d'ADNc marcada radioactivament*

El plasmidi SFFV-*neo-bcl-x_L* es va digerir a 37°C durant tota la nit amb l'enzim de restricció EcoRI:

Reactiu	<i>bcl-x_L</i>
ADN purificat (1 µg/µl)	25 µl
Tampó de digestió 10× (Boehringer Mannheim)	5 µl
Aigua bidestil·lada estèril (Braun)	17 µl
Enzim de restricció EcoRI 10 U/ml (Boehringer Mannheim)	3 µl

Els productes de la digestió de l'ADN plasmídic es van separar en gels d'agarosa a l'1% en tampó TAE, i es va purificar l'ADNc de *bcl-x_L* provinent de la banda tenyida i retallada de la matriu d'agarosa, utilitzant el procediment GENE CLEAN-II® (apartat 2.4).

L'ADNc purificat es va marcar utilitzant les Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (Pharmacia Biotech). El procediment consisteix en el marcatge per encebament a l'atzar (*random priming*) en el qual tots els components, és a dir, els desoxiribonucleòtids

trifosfat d'adenina, guanina i timina, l'enzim Exo (-) Klenow i els cebadors aleatoris, excepte la mostra i l' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -desoxiribonucleòtid-trifosfat de citidina, es subministren conjuntament en forma de boles (*beads*) estables a temperatura ambient. Per al marcatge, cada bola es va resuspendre en 50 μl d'una mescla aquosa amb 2 μl de la sonda purificada i desnaturalitzada (3 min a 95-100°C i 2 min en gel), 5 μl d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -desoxiribonucleòtid-trifosfat de citidina (3.000 Ci/mmol) (Redivue, Amersham) i 43 μl d'aigua bidestil·lada estèril. La mescla es va incubar durant 30 min a 37°C i es va purificar amb les microcolumnes ProbeQuant™ G-50 (Pharmacia Biotech). Aquestes són unes columnes de microcentrífuga plenes amb la resina Sephadex G-50 DNA Grafe F, preequilibrada en tampó Tris salí EDTA (STE) 150 mM pH 8,0.

La radioactivitat incorporada a la sonda es va determinar en el comptador β amb el programa de Cerenkov d'1 min.

- *Hibridació de l'ADN amb sondes específiques*

La membrana es va col·locar en un tub d'hibridació amb el tampó de prehibridació (10 \times Denhart's, 3 \times SSC, 0,2% SDS) i 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'esperma de salmó desnaturalitzat, durant un mínim de 4 h a 65 °C en rotació.

Al tub d'hibridació s'hi va afegir un volum de sonda marcada i desnaturalitzada (5 min a 95-100°C) equivalent a 2×10^6 cpm/ml, i es va hibridar durant 18 h a 65°C en rotació.

La membrana es va rentar: 20 min a temperatura ambient en agitació suau amb una solució de tampó 2 \times SSC/0,1% SDS, 20 min a 65°C dins un tub d'hibridació amb una solució amb 2 \times SSC/0,1% SDS i dues vegades 15 min a 65°C amb una solució de 1 \times SSC/0,1% SDS, en les condicions anteriors.

Posteriorment, la membrana es va col·locar en un casset amb un film de raigs X (Amersham) a -80°C durant el temps necessari per obtenir un bon senyal d'hibridació.

3.2.- Expressió d'ARN

Tot els procediments es van dur a terme en condicions lliures d'ARNases, per evitar que l'ARN es degradés.

3.2.1.- Extracció d'ARN

L'aïllament d'ARN total es va fer a partir de 15×10^6 cèl·lules d'un cultiu exponencial seguint el mètode d'extracció amb tiocianat de guanidina i fenol-cloroform (Chomczynski i Sacchi, 1987).

- *Determinació de la concentració d'ARN*

La quantificació de l'ARN es va dur a terme en l'espectrofotòmetre, i la concentració es va calcular segons la fórmula:

$$[\text{ARN}] = (\text{Absorbància}_{260\text{nm}}) \times (0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times D$$

on D = factor de dilució (Saambrok *i col.*, 1989).

- *Determinació electroforètica de la qualitat de l'ARN*

La qualitat dels ARN es va comprovar per electroforesi en gels d'agarosa a l'1% en tampó TBE (apartat 2.3). 2-3 μl d'ARN total es van diluir amb tampó de càrrega RNA Blue 10 \times (50% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 0,4% (p/v) blau de bromfenol, 0,4% (p/v) xilencianol en aigua amb un 1% dietilpirocarbonat (DEPC)). Es va utilitzar el marcador de pes molecular 250 ng de l'escala d'1 kb (Gibco BRL), que serveix com a estàndard de cadenes dobles lineals d'entre 500 pb i 12 kb. L'electroforesi es va realitzar a 100-125 V durant 15-20 min.

El gel es va tenyir durant 10 min amb la solució 2 ng/ μl de bromur d'etidi i, després d'eliminar l'excés de bromur, es va visualitzar l'ARN en el transil·luminador i es va fotografiar.

3.2.2.- Northern blot

Aquesta tècnica permet la transferència d'ARN a una membrana de niló, on queda immobilitzat i on té lloc la reacció d'hibridació entre l'ARN i l'ADNc desnaturalitzat en fragments de cadena senzilla.

- *Electroforesi de l'ARN*

Les mostres es van separar en gels d'agarosa a l'1,1% (p/v)/formaldehid al 6% (v/v) en tampó MOPS (0,04 M àcid morfolinopropanosulfònic (MOPS), 10 mM acetat sòdic, 1 mM EDTA, pH 7).

A 10 μl d'ARN (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se li van afegir 5 μl de tampó MOPS 10 \times , 10 μl de formaldehid al 30% i 25 μl de formamida al 100%. La mescla es va incubar 10 min a 60-65°C abans de diluir-la amb 5 μl dels tampó de càrrega RNA Blue Juice 10 \times . Per determinar la mida dels transcrits es va utilitzar el marcador de pes molecular 0,24-9,5 kb RNA Ladder (Gibco BRL). L'electroforesi es va dur a terme a 100 V durant 5-10 min i a 20-25 V tota una nit.

El gel es va tenyir amb 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromur d'etidi en aigua-DEPC durant 10-15 min, i es va destenyir durant 1-2 h en aigua-DEPC en agitació suau per visualitzar l'ARN.

- *Transferència de l'ARN a membranes de niló*

La transferència a membranes de niló (Qiabrane, Qiagen) es va realitzar per capil·laritat amb tampó 10× SSC durant 20 h. Prèviament, el gel es va tractar amb 20× SSC durant 1-2 h, amb canvis cada 20 min.

Posteriorment, es va fixar l'ARN a la membrana i es va preparar la sonda d'ADNc marcada radioactivament segons s'especifica en l'apartat 3.1.2.

- *Hibridació de l'ARN amb sondes específiques*

La membrana es va col·locar en un tub d'hibridació amb tampó de prehibridació (50% formamida, 5× SSC, 5× Denhart's) i 100 µg/ml d'ADN d'esperma de salmó desnaturalitzat. La prehibridació va tenir lloc en el forn d'hibridació durant un mínim de 2 h a 42°C en rotació.

Un volum de sonda marcada equivalent a 5×10^6 cpm i 100 µg/ml d'ADN d'esperma de salmó es van desnaturalitzar durant 5 min a 95-100°C i es va afegir al tampó d'hibridació (50% formamida, 5× SSC, 1× Denhardt's, 10% sulfat de dextrà). La mescla es va afegir al tub d'hibridació i es va hibridar durant 18-20 h a 42°C en rotació.

La membrana es va rentar amb una solució de tampó 2× SSC/0,1% SDS durant 30 min a temperatura ambient i 1 h en un bany d'agitació a 55°C, i amb una solució de tampó 0,1× SSC/0,1% SDS durant 30 min a 55°C. El senyal d'hibridació es va controlar durant els rentats amb un comptador Geiger.

Posteriorment, la membrana es va col·locar en un casset i es va posar un film de raigs X a -80°C durant el temps necessari per obtenir un bon senyal d'hibridació. La quantificació densitomètrica de les radiografies es va fer segons l'apartat 3.3.3.

3.3.- Expressió proteica

3.3.1.- Extracció de proteïnes totals

5×10^6 cèl·lules d'un cultiu exponencial es van lisar amb 300 µl de tampó de lisi amb triple detergent (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,02% azida sòdica, 0,01% SDS, 1% nonidet P-40, 0,5% deoxicolata sòdica) contenint 4,8 µl de PMSF 30 mM i 3 µl d'aprotinina 5 mg/ml durant 30 min en gel. Les mostres es van centrifugar a 14.000 rpm durant 30 min a 4°C i es va recuperar el sobrenedant.

- *Determinació de la concentració de proteïnes*

La concentració de proteïnes es va determinar utilitzant el BCA* Protein Assay Reagent A and B (Pierce) seguint el protocol de la casa comercial.

Es va obtenir una recta patró per un rang de concentració de 0-5000 µg/ml d'albumina sèrica bovina (BSA). L'absorbància de cada concentració de BSA es va mesurar a una longitud d'ona de 540 nm en l'espectrofotòmetre, i a partir de la mitjana de les absorbàncies de les mostres i per interpolació amb la recta patró, es va obtenir la concentració de proteïnes de cada mostra.

3.3.2.- Western blot

La tècnica de western blot (Towbin *i col.*, 1979) permet la detecció de proteïnes d'una mostra fent ús d'anticossos específics per a la proteïna d'interès.

- *Electroforesi de les proteïnes*

L'electroforesi en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) és el sistema més emprat per separar proteïnes en funció del seu pes molecular (Laemmli, 1970).

En aquest tipus d'electroforesi les proteïnes corren seqüencialment a través de dos tipus de gels de diferent concentració de poliacrilamida. Primer a través d'un gel concentrador al 3% de poliacrilamida (125 mM Tris pH 6,8, 3% acrilamida/N',N'-bis-metilen-acrilamida, 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,04% persulfat amònic), que permet l'agrupament de les proteïnes presents a la mostra i, posteriorment, a través d'un gel separador al 12% de poliacrilamida (375 mM Tris pH 8,8, 12% Acrilamida/N',N'-bis-metilen-acrilamida, 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,04% persulfat amònic), que a causa d'una mida de porus inferior actua de veritable separador de proteïnes.

En el gel es van carregar 50 µg de proteïna diluïts amb aigua bidestil·lada estèril fins a un volum de 20 µl i amb 5 µl de tampó de mostra 5× (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% glicerol, 2% SDS, 0,1% blau de bromfenol, 0,86 M β-mercaptoetanol). Prèviament a la càrrega en el gel, les mostres es van desnaturalitzar 5 min a 90°C. Per determinar el pes molecular de les bandes que apareixen es va utilitzar el marcador de pes molecular BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Gibco BRL).

L'electroforesi es va dur a terme en tampó d'electroforesi (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% SDS) a 120 V durant 1 h i 30 min.

- *Transferència de les proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa*

Un cop finalitzada l'electroforesi, les proteïnes es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa emprant el sistema Mini-Protean II (Bio-Rad, Alemanya).

El gel que conté les proteïnes i la membrana de nitrocel·lulosa Hybond™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) es van equilibrar durant 30 min en tampó de transferència (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glicina, 20% Metanol). El tampó de transferència manté les

proteïnes amb càrrega negativa i migren cap a l'ànode, desplaçant-se del gel a la membrana. La transferència es va efectuar en fred a 100 V durant 3 h 30 min.

- *Immunodetecció de les proteïnes amb anticossos específics*

Després de la transferència, la membrana es va incubar en solució de bloqueig (5% Moliko milk, 0,1% Tween-20 en PBS) durant 1 h a temperatura ambient en agitació suau. Posteriorment, es va incubar amb l'anticòs primari corresponent diluït en solució de bloqueig durant 1 h i 30 min a temperatura ambient en agitació.

Els anticossos primaris emprats van ser:

- anti-Bcl-2: anticòs monoclonal clon 124 (Cambridge Research Biochemicals) utilitzat a dilució 1:200.

- anti-Bcl-2: anticòs monoclonal clon H-100 (Santa Cruz Biotechnology) utilitzat a dilució 1:200.

- anti-Bcl-x_{S/L}: anticòs policlonal clon S-18 (Santa Cruz Biotechnology) que reconeix la part aminoterminal de la proteïna, i es va utilitzar a dilució 1:200.

- anti-Bcl-x_{S/L}: anticòs policlonal clon M-125 (Santa Cruz Biotechnology) que reconeix els aminoàcids 1-125 de la part aminoterminal de la proteïna, i es va utilitzar a dilució 1:200.

- anti-Bcl-x: anticòs policlonal (Transduction Laboratories) que reconeix la part carboxiterminal de la proteïna, i es va utilitzar a dilució 1:200.

- anti-Actina: anticòs monoclonal clon AC-40 (Sigma Chemical) utilitzat a dilució 1:500.

Després de rentar la membrana amb PBS-Tween (0,2% Tween-20 en PBS), es va incubar amb l'anticòs secundari diluït en solució de bloqueig durant 1 h i 30 min a temperatura ambient en agitació.

Els anticossos secundaris emprats van ser:

- anti-IgG de ratolí conjugada amb peroxidasa de rave (HRP) (Amersham Life Science, USA) utilitzat a dilució 1:1000.

- anti-IgG de conill conjugada amb HRP (Amersham Life Science) utilitzat a dilució 1:1000.

La membrana es va rentar amb PBS-Tween i es va revelar amb el sistema de detecció quimioluminiscent ECL (Pierce, Cultek), que és una mescla de dues solucions (1:1) que contenen respectivament H₂O₂ i luminol (substrat de la HRP) i agent amplificador del senyal.

Per captar la llum emesa durant el transcurs de la reacció, la membrana es va col·locar en un casset amb un film de raigs X de 15 s a 20 min.

- *Deshibridació de l'anticòs unit a la membrana*

La membrana es va rentar amb PBS-Tween i es va incubar amb tampó de deshibridació (62,4 mM Tris-HCl pH 6,7, 0,1 M β -mercaptoetanol) durant 30 min a 50°C. Es van repetir els rentats i la membrana es va tornar a hibridar amb un altre anticòs.

3.3.3.- Quantificació densitomètrica de les radiografies

Les imatges de les radiografies es van digitalitzar amb un escàner Epson Scan! l132 versió 2.10S (©Seiko Corp.) i es van mantenir en suport informàtic, utilitzant el programa Adobe Photoshop™ (Adobe™). Aquestes imatges es van processar amb un software d'anàlisi densitomètrica (Phoretix 1D Advanced, Non-Linear Dynamics, UK) que va assignar a cada banda obtinguda una intensitat.

4.- Biologia cel·lular

4.1.- Assaigs d'apoptosi i viabilitat cel·lular

4.1.1.- Inducció de mort: factors de creixement i agents quimioterapèutics

Els factors de creixement i els agents quimioterapèutics emprats per induir mort cel·lular van ser:

- TGF- β i TNF- α

Aquests factors de creixement es van utilitzar a concentracions de (h)TGF- β (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) de 0,25 a 20 ng/ml o a concentracions de r(h)TNF- α (Boehringer Mannheim) de 12,5 a 200 U/ml en medi de cultiu sense sèrum. Als pouets destinats al control s'hi va afegir medi de cultiu sense sèrum.

- Paclitaxel

Una solució de l'agent quimioterapèutic paclitaxel (Sigma, St. Louis, MO) concentrada (1 mg/ml en DMSO) es va diluir en medi de cultiu sense sèrum a la concentració desitjada. Es van utilitzar concentracions de paclitaxel de 0,4 a 10.000 ng/ml en medi de cultiu sense sèrum, i als pouets destinats al control s'hi va afegir medi de cultiu sense sèrum amb la concentració més alta de DMSO present en les cèl·lules tractades amb paclitaxel.

- Tamoxifen

Una solució de l'antagonista d'estrògens tamoxifen (Sigma, St. Louis, MO) concentrada (20 mM en etanol) es va diluir en medi de cultiu sense estrògens (DMEM/F-12 sense vermell

de fenol (Gibco BRL) suplementat amb un 1% (v/v) de charcoal-treated SBF, un 1% (v/v) d'aminoàcids no essencials 100× (Flow Laboratories) i un 1% (v/v) d'L-glutamina 200 mM) a la concentració desitjada. Es van utilitzar concentracions de tamoxifen de 12,5 a 400 nM en medi de cultiu sense estrògens, i als pous destinats al control s'hi va afegir medi de cultiu sense estrògens amb la concentració d'etanol equivalent a la més alta present en les cèl·lules tractades amb tamoxifen.

4.1.2.- ELISA de detecció de la mort cel·lular

Utilitzant el sistema ELISA de detecció de la mort cel·lular (Boehringer Mannheim) *in vitro* es van determinar els fragments citoplasmàtics d'ADN associats a histones (mono- i oligonucleosomas) que es generen durant l'apoptosi.

Les cèl·lules procedents d'un cultiu en fase exponencial es van sembrar a una concentració de 1×10^4 cèl·lules/ml medi de cultiu per triplicat en plaques de 24 pous durant 72 h. Es van rentar dues vegades amb medi de cultiu sense sèrum i, posteriorment, s'hi va afegir 1 ml de medi de cultiu sense sèrum amb factors de creixement o sense durant 48 a 72 h.

Posteriorment, es van recollir les cèl·lules del sobrenedant del cultiu, donat que les cèl·lules apoptòtiques es desadhereixen, i les de la monocapa, i es va seguir el protocol indicat per la casa comercial.

A la mitjana dels valors de l'absorbància a 405 nm de cada mostra se li va restar el fons de l'immunoassaig, que va correspondre als pous sense mostra, però en què es va seguir el mateix tractament. L'enriquiment específic dels mono- i oligonucleosomas alliberats al citoplasma es va calcular com a absorbància de les cèl·lules tractades/absorbància de les cèl·lules control.

4.1.3.- Mètode de l'MTT

L'assaig del bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli (MTT) és un mètode colorimètric, basat en les sals de tetrazoli, que mesura només l'activitat metabòlica de cèl·lules vives, però no la de cèl·lules mortes. L'anell de tetrazoli és trencat per diverses deshidrogenases mitocondrials de cèl·lules vives i es forma un producte de color blau fosc (formazan) que es solubilitza amb DMSO. La quantitat de formazan generat per cèl·lula permet extrapolar el nombre de cèl·lules metabòlicament actives (Alley *i col.*, 1988).

Les cèl·lules procedents d'un cultiu en fase exponencial es van sembrar a una concentració de $3 \cdot 10^3$ cèl·lules/100 µl medi de cultiu per quadruplicat en plaques de 96 pous durant 24-48 h. Es va aspirar el medi utilitzant una xeringa amb una agulla de galga 30G

1/2", i es van fer dos rentats amb medi de cultiu sense sèrum abans d'afegir-hi 100 µl de les solucions de TGF-β, TNF-α o paclitaxel, o amb medi de cultiu sense estrògens abans d'afegir-hi les de tamoxifen durant 48 a 120 h.

Els resultats obtinguts van representar la mitjana ± desviació estàndard de l'absorbància a 540 nm, un cop feta la resta de la mitjana dels blancs que va correspondre als pous sense cèl·lules, però en què es va seguir el mateix tractament. El percentatge de viabilitat cel·lular es va definir com a absorbància de les cèl·lules tractades/absorbància de les cèl·lules control × 100.

4.2.- Assaig de proliferació cel·lular

4.2.1.- Inducció de proliferació: factors de creixement i sèrum

Els factors de creixement i el sèrum emprats per induir proliferació cel·lular van ser:

- IGF-1, TGF-β i TNF-α

El factor de creixement r(h)IGF-1 (Boehringer Mannheim) es va utilitzar a concentracions de 2,5 a 80 ng/ml en medi de cultiu sense sèrum, i les concentracions de TGF-β i TNF-α van ser les que es descriuen en l'apartat 4.1.1.

- Sèrum

Aquest es va utilitzar a concentracions de SBF (Biological Industries, Israel) de 0,5 a 20% en medi de cultiu sense sèrum. Als pous destinats al control s'hi va afegir medi de cultiu sense sèrum.

4.2.2.- Mètode de la incorporació del precursor de [metil-³H]-timidina a l'ADN

Es van sembrar 3-10×10³ cèl·lules/100 µl medi de cultiu per quadruplicat en pous de plaques de 96 pous durant 24-48 h. Es van fer dos rentats amb medi de cultiu sense sèrum abans d'afegir-hi 100 µl de les solucions de TGF-β, TNF-α, IGF-1 o sèrum durant 48 a 120 h. I, 18 h abans de finalitzar l'experiment, es van addicionar 50 µl de [metil-³H]-timidina (82 Ci/mmol, Amersham) que van correspondre a 1 µCi/pou.

Les cèl·lules es van fixar dues vegades amb 100 µl d'una solució aquosa d'àcid tricloracètic (TCA) al 5% (p/v) en fred durant 15 min, es van deshidratar dues vegades amb 250 µl d'una solució etanol/èter (2:1, v/v) durant 10 min i, després d'aspirar la solució, les plaques es van deixar assecar a temperatura ambient. Es van lisar les cèl·lules amb 100 µl de NaOH 1N a 60°C i passats 30-60 min una alíquota de 50 µl de cada pou es va diluir en 5 ml de

líquid de guspireig (Optiphase “HiSafe” 2, Wallac), es van agitar vigorosament i es van deixar reposar durant 30 min. La incorporació de [metil-³H]-timidina es va quantificar al comptador de guspireig, amb un programa de comptatge d’1 min.

Els resultats obtinguts van representar la mitjana \pm desviació estàndard dels comptes per minut (cpm) de cada mostra, un cop feta la resta de la mitjana del blanc d’incorporació sense cèl·lules. L’índex de proliferació es va definir com la incorporació de [metil-³H]-timidina de les cèl·lules tractades respecte de la del control de cèl·lules no tractades.

4.3.- Assaig d’adhesió

L’adhesió cel·lular es va analitzar emprant dues tècniques alternatives: marcatge amb cromat de sodi (⁵¹Cr) per a les cèl·lules 435, i tinció amb cristall violeta per a les 468 i MCF-7, ja que aquestes dues línies cel·lulars no incorporen el ⁵¹Cr.

4.3.1.- Immobilització de proteïnes de matriu extracel·lular al suport de plàstic

Es van utilitzar diverses proteïnes de la matriu extracel·lular com la laminina murina (Upstate Biotechnology, Reactiva), la fibronectina murina (Gibco BRL®, Life Technologies) i el col·lagen de tipus IV murí (Collaborative Biomedical Products, Becton Dickinson) a concentració de 40 µg/ml en PBS. Com a control positiu d’adhesió es va utilitzar el Matrigel® (Collaborative Biomedical Products, Becton Dickinson), que és un extracte de matriu extracel·lular, a concentració de 250 µg/ml en PBS. En plaques de 96 pous s’hi van afegir 100 µl de les solucions de laminina, fibronectina i col·lagen IV, i 50 µl de la solució de matrigel i es van incubar 2 h a 37°C.

Els pous amb les proteïnes de matriu extracel·lular ja immobilitzades, excepte els pous tractats amb matrigel, es van rentar dues vegades amb 200 µl de PBS. Els llocs d’unió inespecífica es van bloquejar amb 150 µl de medi amb BSA (Sigma) a l’1% (p/v) inactivat durant 1-2 h a 37°C. El control d’adhesió inespecífica es va obtenir tractant 3 pous sense substrat immobilitzat amb la BSA a l’1%.

4.3.2.- Adhesió cel·lular per marcatge de les cèl·lules amb ⁵¹Cr

- *Marcatge de les cèl·lules amb ⁵¹Cr*

El protocol de marcatge va ser una adaptació del descrit per Sonnenberg (1990). En un tub Eppendorf estèril es van posar 0,8 ml d’una suspensió cel·lular de 5×10^6 cèl·lules/ml en medi de cultiu i 0,2 ml de ⁵¹Cr (250-500 mCi/mg Cr, Amersham). Els tubs es van segellar amb

Parafilm® i es van mantenir en rotació orbital durant 2 h a temperatura ambient. Es va diluir la suspensió cel·lular amb 9 ml de medi de cultiu i es va centrifugar a 1.000 rpm durant 10 min a 4 °C. Les cèl·lules es van resuspendre amb 10 ml de medi i es van mantenir en rotació durant 45 min. Després de rentar-les dues vegades amb 10 ml de medi amb BSA al 2%, es van resuspendre a concentració de 1×10^6 cèl·lules/ml en BSA al 2% i es van comptar al comptador d'emissió gamma. L'activitat específica de les cèl·lules marcades va oscil·lar, en tots els assaigs fets, entre 0,5 i 1 cpm/cèl·lula.

- *Adhesió cel·lular a proteïnes de matriu extracel·lular*

A la placa tractada amb les proteïnes de matriu extracel·lular s'hi van afegir 100 µl d'una suspensió cel·lular amb 1×10^5 cèl·lules marcades amb ^{51}Cr /ml en medi BSA al 2% i es van incubar durant 18 h. Tanmateix, en tubs de comptatge, s'hi van posar 100 µl de la suspensió, per mesurar el nombre total de cpm de les cèl·lules sembrades.

Els pous es van rentar 2 vegades amb 200 µl de PBS, per tal d'eliminar les cèl·lules no adherides als substrats immobilitzats. Després de l'última aspiració es van afegir 100 µl d'una solució de Triton X-100 al 0,2% (v/v). Es van recollir les cèl·lules adherides amb un bastonet recobert amb cotó i es van posar en tubs, que es van comptar al comptador d'emissió gamma.

L'adhesió inespecífica als pouets sense substrat immobilitzat, en tots els assaigs duts a terme, va ser inferior a l'1% de les cèl·lules inicialment sembrades. Els resultats es van expressar com a percentatge d'adhesió cel·lular específica a un substrat determinat respecte del 100% de cèl·lules sembrades inicialment per pou, una vegada restada l'adhesió inespecífica.

4.3.3.- Adhesió cel·lular per tinció amb cristall violeta

- *Preparació de les cèl·lules*

Aquest mètode alternatiu per analitzar l'adhesió cel·lular es va adaptar del descrit per Turnay (1994), amb alguna modificació. Les cèl·lules procedents d'un cultiu en fase exponencial es van resuspendre en 10 ml de medi de cultiu i es van mantenir en rotació orbital durant 1 h a temperatura ambient. Seguidament, es van rentar amb 10 ml de medi BSA al 2%, i es van resuspendre a una concentració de 5×10^5 cèl·lules/ml de medi BSA al 2%.

- *Adhesió cel·lular a proteïnes de matriu extracel·lular*

A la placa de 96 pous tractada amb les proteïnes de matriu extracel·lular es van afegir 100 µl de la suspensió cel·lular amb 5×10^5 cèl·lules/ml en medi BSA al 2% i es va incubar durant 18 h. El nombre total de cèl·lules inicialment sembrades es va obtenir sembrant per sextuplicat 100 µl de la suspensió cel·lular en pous no tractats. Es van rentar 2 vegades amb

200 µl de PBS, per tal d'eliminar les cèl·lules no adherides als substrats immobilitzats. Això no obstant, els pous que serveixen per determinar el nombre de cèl·lules sembrades es van aspirar amb xeringa i agulla, per tal de perdre el mínim de cèl·lules, i no es van rentar.

- *Revelat de les plaques*

Les cèl·lules es van fixar amb 100 µl d'una solució de glutaraldehid (Sigma) a l'1% en PBS en fred durant 10 min. Les plaques es van centrifugar a $90 \times g$ durant 5 min a 4°C i es van rentar amb 100 µl de PBS fred. Després de repetir els rentats dues vegades més, s'hi van afegir 200 µl d'una solució aquosa de cristall violeta al 0,2% en 20% de metanol durant 10 min. Es van rentar les plaques amb aigua de l'aixeta fins que no va sortir colorant i es van deixar assecar a temperatura ambient. El cristall violeta es va dissoldre en 200 µl de SDS a l'1% i es va mesurar l'absorbància de cada pou a l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 540 nm.

Els resultats obtinguts van representar la mitjana \pm desviació estàndard de l'absorbància a 540 nm, un cop feta la resta de la mitjana de l'adhesió inespecífica. El percentatge d'adhesió cel·lular específica a un substrat determinat es va definir com a absorbància de les cèl·lules adherides al substrat/absorbància de les cèl·lules inicialment sembrades $\times 100$.

4.4.- Assaig de viabilitat en suspensió

La capacitat de supervivència de les cèl·lules en un medi líquid es va analitzar mantenint-les en suspensió i examinant la viabilitat mitjançant el test de l'MTT de forma seriada (Nikiforov *i col.*, 1996). En tubs de polipropilè de 50 ml es van resuspendre 2×10^4 cèl·lules/ml en 30 ml de medi suplementat amb tampó HEPES 200 mM pH 7,1-7,4 i es van sotmetre a agitació per rotació suau a 37°C durant 16-64 h. Després de cada període d'incubació, les cèl·lules es van centrifugar a 1.000 rpm durant 10 min a 4°C, es van resuspendre en medi de cultiu fresc a una concentració de 2×10^5 cèl·lules/ml, i 100 µl de la suspensió cel·lular es van sembrar en 10 pous de plaques de 96 durant 4 h a 37°C abans d'assajar la viabilitat cel·lular per MTT (apartat 4.1.3).

El percentatge de viabilitat cel·lular es va definir com a absorbància_{540nm} de les cèl·lules en rotació creixent en placa 4 h/absorbància_{540nm} de les cèl·lules creixent en placa 4 h $\times 100$.

5.- Experimentació *in vivo*

5.1.- Animals

Per a la realització d'aquests estudis es van utilitzar ratolines atímiques de 4-6 setmanes de la soca Balb/c Nude (IFFA-CREDO, Lió, França) que es van mantenir en isoladors amb menjar i beure *ad libitum* a una temperatura de 20-22°C, amb cicles de llum/fosc de 12/12 h, estabulats a l'Animalari de Petits Rosegadors de l'Institut de Recerca Oncològica. L'experimentació es va dur a terme en cabines de flux laminar vertical, en condicions específiques lliures de patògens.

Tots els procediments als quals es van sotmetre els animals es van realitzar d'acord amb les recomanacions per al correcte tractament i ús dels animals de laboratori.

5.2.- Capacitat tumorigena

5.2.1.- Inducció dels tumors mamaris

Els tumors ortotòpics es van induir inoculant 1×10^6 cèl·lules d'un cultiu exponencial en 50 µl de DMEM per les 435 i MCF-7, i en 50 µl de Matrigel® (Collaborative Biomedical Products, Becton Dickinson) a concentració de 9,17 mg/ml per les 468. El Matrigel® és un extracte aïllat del tumor d'Engelbreth-Holm-Swarm que conté una mescla dels components presents en la membrana basal (Kleinman *i col.*, 1986). Aquest és líquid a 4°C, però solidifica ràpidament formant un gel, immediatament després de la implantació en els ratolins (Sweeney *i col.*, 1991).

Les ratolines es van anestesiar per via intraperitoneal amb 0,25 ml d'una solució anestèsica composta per 0,4 mg/ml Dehidrobenzperidol® (droperidol, Syntex) i 0,8 mg/ml Dormicum® (midazolam, Roche). La regió inguinal dreta es va desinfectar amb una solució dèrmica de Betadine® (Asta Medica), es va realitzar una obertura de 5 mm per tal de visualitzar el teixit mamari, i es va injectar dins del greix la suspensió cel·lular. L'aparició d'una bombolla de líquid va servir per comprovar que no va vessar res sobre la superfície, que es va netejar amb un bastonet de cotó mullat en alcohol abans de suturar amb grapes la pell externa de l'animal, seguit de l'aplicació de Betadine®. Les ratolines es van mantenir sota una font de calor (bombeta de 60 W situada a 20 cm dels animals) fins que es van despertar de l'anestèsia.

Les cèl·lules MCF-7, perquè esdevinguin tumorigenes, requereixen estrògens i, en conseqüència, després de la inoculació de les cèl·lules, entre les escàpules se'ls va implantar

un pèl·let que allibera estrògens (0,72 mg β -estradiol, Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA).

5.2.2.- Seguiment del creixement dels tumors

Una vegada el tumor primari va ser externament palpable, aquest es va mesurar 2 vegades per setmana amb un peu de rei. Es van registrar els diàmetres longitudinal i transversal del tumor, i el volum tumoral (en mm^3) es va calcular segons la fórmula:

$$\text{Volum tumoral} = a \times b^2/2$$

on a = diàmetre gran del tumor i b = diàmetre petit del tumor, ambdós expressats en mm.

Quan el volum dels tumors va ser aproximadament de 100 mm^3 es van extirpar. Les ratolines es van anestesiàr i, després de desinfectar la regió del tumor amb Betadine®, es va fer una obertura per visualitzar-lo i extreure'l. Abans de suturar amb grapes la pell externa de l'animal, es va mantenir una lleugera pressió amb un bastonet recobert de cotó mullat amb alcohol per evitar el sagnat. Les ratolines es van mantenir sota una font de calor fins que es van despertar de l'anestèsia, per abreuçar el postoperatori.

Els tumors es van rentar amb sèrum fisiològic Braun (B | Braun) i es van assecar sobre una gasa estèril per pesar-los i mesurar el volum amb el peu de rei.

5.3.- Capacitat metastàtica

Per valorar l'activitat metastàtica dels tumors es va fer la necròpsia a les ratolines, ja fos per mort natural o per sacrifici amb èter-anestèsia. Es va fer una incisió ventrotoràcica que va permetre visualitzar els ganglis inguinals i axil·lars i la cavitat abdominal i toràcica. Es van extreure els ganglis inguinals i axil·lars i es va fer una observació macroscòpica (mida, color, forma, distensió, hemorràgies, engrandiment, etc.) de cada un dels òrgans de la cavitat peritoneal (aparell digestiu, ronyons, melsa, pàncrees i fetge), extirpant aquells que van presentar un aspecte anòmal. Es van extreure els ganglis lumbar, renals i mesentèrics. Es va obrir la cavitat toràcica i es van extirpar els pulmons, el cor i els ganglis mediastínics. Finalment, es va fer una incisió entre les escàpules i es van treure els ganglis cervicals.

Els òrgans extrets es van rentar amb sèrum fisiològic i, una vegada eliminat l'excés de líquid, es van pesar i es van incloure en parafina (apartat 6.1.1). Els pulmons amb metàstasis aparents es van fixar amb solució de Bouin (apartat 6.1.4) per fer la seva quantificació.

El recompte de les metàstasis pulmonars es va fer per observació en la lupa estereoscòpica dels lòbuls dels pulmons i per mesurament del diàmetre màxim de cada nòdul.

5.4.- Successius implants *in vivo/in vitro*

Es van establir cultius primaris (apartat 1.4) dels tumors extirpats en el 1^è implant ortotòpic (apartat 5.2) per cada una de les línies cel·lulars inicialment inoculades. En les cèl·lules obtingudes *in vitro* es va descartar la contaminació per micoplasma (apartat 1.2) i es va comprovar l'expressió estable de Bcl-2 i Bcl-x_L per western blot (apartat 3.3). Posteriorment, es van implantar cultius exponencials de les cèl·lules establertes en l'animal d'experimentació i es van tornar a derivar cultius primaris dels tumors generats. Aquest procediment es va repetir 3 vegades (Figura 15). En cada implant es va fer el seguiment de la capacitat tumorígena i metastàtica de cada una de les variants cel·lulars inoculades en les ratolines (apartat 5.2 i 5.3).

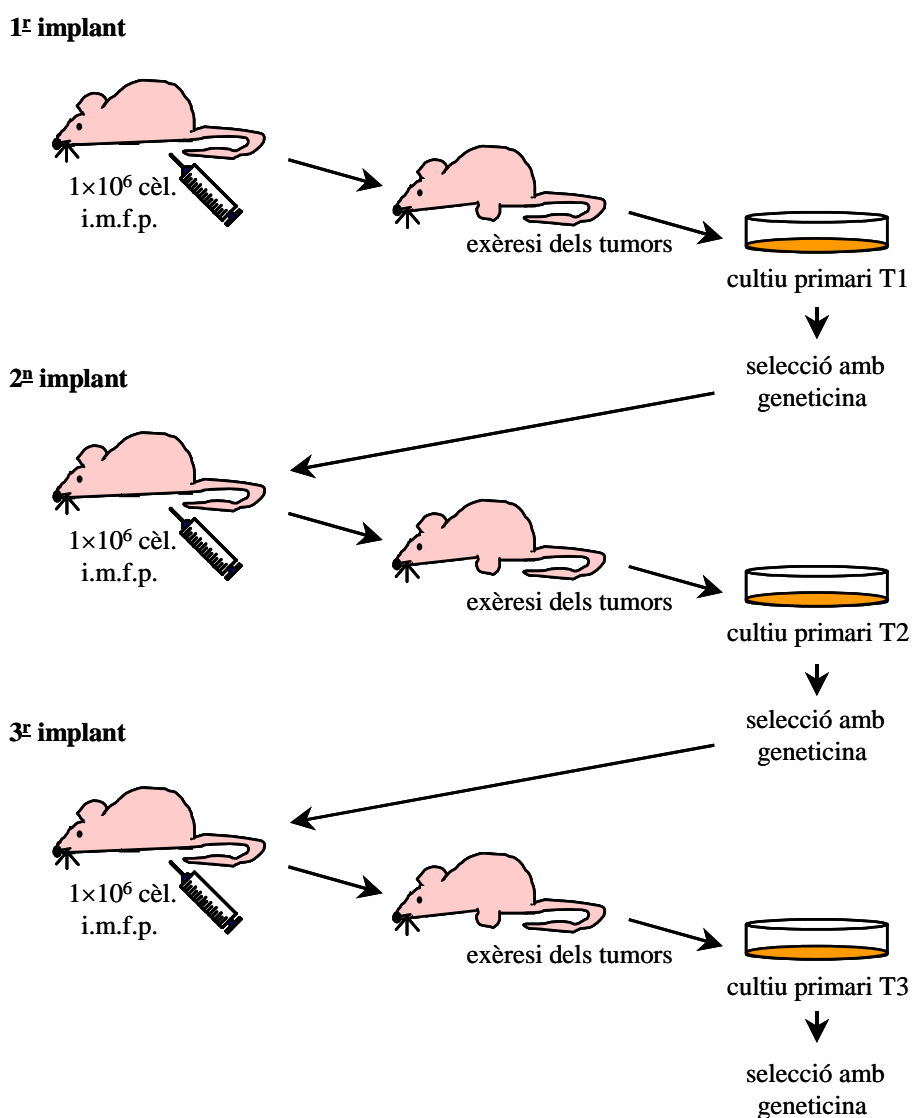


Figura 15.- Esquema del procediment experimental dels successius implants *in vivo/in vitro*.

5.5.- Assaig de competició cel·lular

La supervivència de les cèl·lules en el torrent sanguini es va analitzar mitjançant un assaig de competició cel·lular (Nikiforov *i col.*, 1996). Es va preparar una barreja de cèl·lules 435/Neo i 435/Bcl- x_L en proporció 3:1, que es va injectar per via intravenosa (1×10^6 cèl·lules/0,05 ml DMEM/ratolina) a la vena caudal.

Les cèl·lules injectades es van aïllar dels pulmons de les ratolines sacrificant els animals a diferents temps després de la inoculació: 15 min, 2, 4, 8 i 16 h. Els pulmons extirpats es van rentar amb medi de cultiu i es van dissecar amb estisores i bisturí. L'homogenat de cada pulmó es va sembrar en flascons de cultiu i, passats 4-5 dies, les cèl·lules tumorals es van seleccionar amb medi de cultiu amb 500 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina. Un altre grup d'animals es va deixar fins que les ratolines van presentar un estat moribund propi de la malaltia metastàtica, i llavors es van examinar els pulmons i es van aïllar les metastasis.

Els cultius cel·lulars obtinguts a diferents intervals de temps es van expandir per analitzar per southern blot (apartat 3.1) la proporció d'ADNc de *bcl-x_L* respecte a la barreja inicial de cèl·lules injectades.

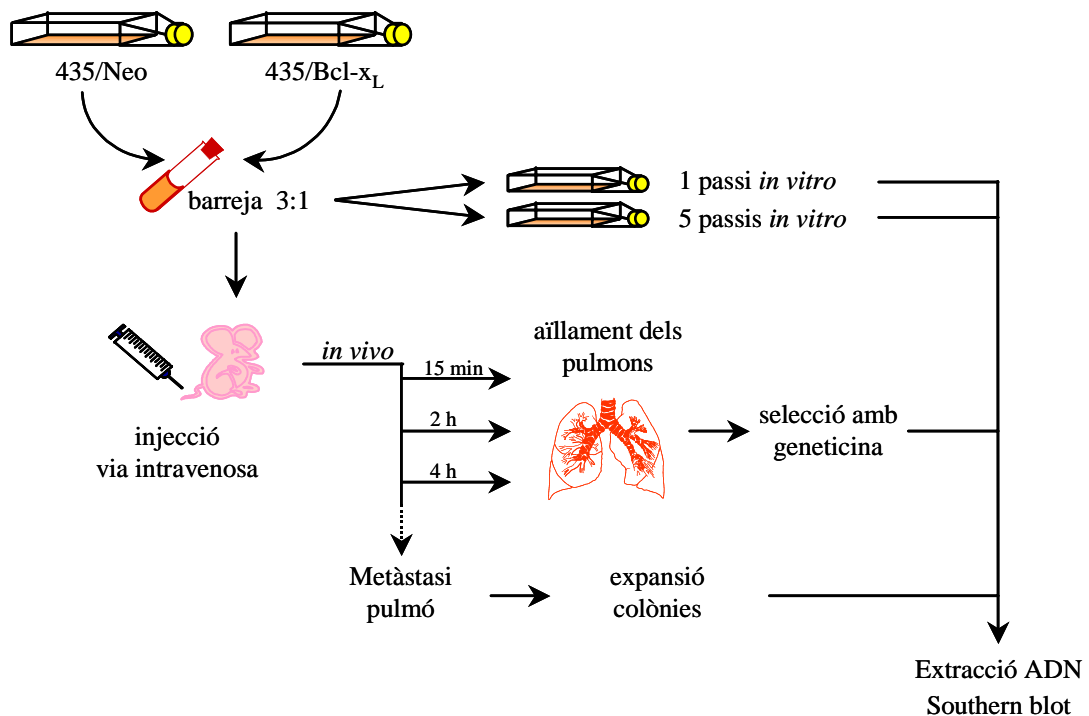


Figura 16.- Esquema de l'assaig de competició cel·lular *in vivo*.

6.- Histologia

6.1.- Preservació dels teixits

6.1.1.- Inclusió en parafina

Per a l'anàlisi histològica els teixits es van fixar amb una solució de formalina tamponada (10% formaldehid (Merck) en tampó fosfat pH 7,2 (Merck)) durant 24 h i, posteriorment, es van incloure en parafina.

6.1.2.- Inclusió en O.C.T.

Alternativament els teixits es van preservar en una matriu d'O.C.TTM (Tissue Tek) que permet la congelació dels teixits mantenint la seva estructura. Es va posar la mostra en un criomotlle (Tissue Tek) amb O.C.T., i aquest en un recipient amb isopentà (Merck) refredat amb N₂ líquid, i quan va estar completament sòlid es va guardar a -80°C.

6.1.3.- Congelació amb N₂ líquid

Algunes mostres es van congelar en N₂ líquid per assegurar la posterior obtenció de proteïnes, ARN o ADN. La mostra es va transferir a un eppendorf i es va congelar directament en N₂ líquid abans de guardar-la a -80°C.

6.1.4.- Fixació amb solució de Bouin

Quan es va voler mantenir la integritat del teixit per quantificar les metàstasis, els òrgans a fixar es van transferir a una solució de Bouin (fixador de Bouin (Sigma) en formalina tamponada (1:5, v/v)). El volum de solució va ser 5 vegades el volum de l'òrgan fixat, el líquid de fixació es va renovar a les 24 h de la inclusió i es van mantenir a temperatura ambient.

6.2.- Tinció hematoxilina-eosina

El teixit en parafina es va tallar en seccions de 3-5 micres en el micròtom ATOM, i els talls es van estendre en un bany amb aigua a 37°C i es van recollir amb portaobjectes de 76x26 mm (Menzel-Glaser), que es van assecar a 37°C durant tota una nit.

Les mostres es van desparafinar fent 3 rentats de 10 min amb xilol (Merck), 3 de 5 min amb alcohol absolut (Merck), 3 de 5 min amb alcohol al 96% (Merck) i 2 de 5 min amb alcohol al 70% (Merck).

Posteriorment, es van hidratar fent un rentat de 5 min amb aigua bidestil·lada i es van tenyir amb una solució d'hematoxilina de Mayer (Merck) al 80% prèviament filtrada de 3-5

min. Es van rentar amb aigua corrent sota l'aixeta i amb aigua bidestil·lada durant 5 min, i després es van passar per una solució d'alcohol amb HCl a l'1%, que decolora i envermelleix afavorint el color blavós, i en aigua corrent sota l'aixeta fins que va virar el color.

Es van tenyir les mostres amb una solució d'eosina (Merck) al 25% en etanol al 80% durant 5 min. Es van rentar 1-2 vegades amb alcohol al 70%, 2-3 vegades amb alcohol al 96%, 2-3 amb alcohol absolut, i es van deshidratar amb xilol per aplicar el medi d'inclusió per histologia DPX (Fluka) i visualitzar-les al microscopi òptic Olympus.

6.3.- Immunohistoquímica

El teixit parafinat es va tallar en seccions de 3-5 micres i es van recollir amb portaobjectes prèviament tractats amb poli-L-lisina (Sigma) al 20%.

Les mostres es van desparafinar segons s'explica a l'apartat 6.2, però just després dels rentats amb l'alcohol absolut es va inhibir la peroxidasa endògena amb una solució 1,5% (v/v) de peròxid d'hidrogen en metanol durant 5 min en la foscor.

Les mostres es van permeabilitzar amb tampó citrat 0,1 M pH 6 al microones durant 3 min a temperatura mitjana i es van deixar a temperatura ambient durant 20 min. Les preparacions es van incubar en una cambra humida fosca amb 200 µl d'una solució de bloqueig TNK* (100 mM Tris, 550 mM NaCl, 10mM KCl, 2% BSA, 0,1% triton X-100 (Merck), 2% sèrum normal de cabra (Vector)) durant 1 h a temperatura ambient. S'hi van afegir 200 µl de l'anticòs primari policlonal anti-Bcl-x_{SL} (S-18) (Santa Cruz Biotechnology) a dilució 1:400 en PBS amb BSA al 2%, i es van deixar a la cambra humida tota una nit a 4°C.

Es van fer 3 rentats de 5 min amb PBS i s'hi van afegir 200 µl de l'anticòs secundari biotinitat (Vector) a dilució 1:1000 en PBS amb BSA al 2% durant 30 min a temperatura ambient. Es van fer 3 rentats de 5 min amb PBS per afegir-hi el complex avidina-biotina (ABC) (Vector) a dilució 1:25 en tampó TNK* durant 30 min a temperatura ambient. Es van repetir els rentats de PBS, i es van revelar les preparacions amb una solució de diaminobenzidina (DAB) (Sigma) al 0,25% amb peròxid d'hidrogen al 0,0075% en PBS. La DAB és un cromogen oxidable pel peròxid d'hidrogen que en presència de l'enzim dóna lloc a un precipitat marró intens, i el grau de la tinció es va controlar en el microscopi òptic.

Les preparacions es van rentar amb aigua corrent i es van contratenyir els nuclis amb hematoxilina (apartat 6.2).

6.4.- Fragmentació de l'ADN *in situ*

Per determinar l'apoptosi en seccions de tumors en parafina es va utilitzar el mètode descrit per Gavrieli (1992), que marca l'ADN fragmentat *in situ* identificant les cèl·lules apoptòtiques. És l'anomenat mètode TUNEL de Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End-Labeling.

Després de la desparafinació les preparacions es van tractar amb 20 µg/ml de proteïnasa K (Sigma) durant 15 min i, posteriorment, es va inactivar la peroxidasa endògena amb una solució de peròxid d'hidrogen al 2% durant 5 min en la foscor. La deoxinucleotidil-transferasa terminal (TDT) (0,3 e.u./µl) i la deoxiuridina (dUTP) biotilada (Boehringer Mannheim, Germany) en tampó TDT (Boehringer Mannheim) es van afegir a les preparacions i es van incubar durant 60 min a 37°C. El senyal es va amplificar amb el complex ABC revelant amb DAB i, finalment, els nuclis es van contratenyir amb hematoxilina (apartat 6.3).

6.5.- Anàlisi citomètrica dels tumors: apoptosi i cicle cel·lular

L'apoptosi i el cicle cel·lular es van analitzar per citometria de flux en els tumors congelats. Es van realitzar 15-20 seccions de 50 micres per mostra en un criòtom termostatitzat a -20°C, es van rentar amb PBS i es van centrifugar per eliminar l'O.C.T. El teixit es va trossejar amb un bisturí en una placa amb PBS i es va filtrar amb una malla de niló. La suspensió cel·lular es va centrifugar i les cèl·lules es van resuspendre amb metanol (Merck) al 70% fred (-20°C) durant 15 min a 4°C per fixar i permeabilitzar les membranes.

Les mostres es van rentar amb PBS, i es van incubar amb 0,02 µg/µl d'anticòs monoclonal anti-Citoqueratina 8/18 conjugat amb fluoresceïna (FITC) (NovoCastra), que és específic per a les cèl·lules humanes, durant 30 min a 4°C en la foscor. Com a control negatiu de la tinció de fons de l'anticòs, una part de la suspensió cel·lular es va incubar amb un anticòs monoclonal anti-IgG no específica conjugada amb FITC (Santa Cruz Biotechnology).

Després de dos rentats amb PBS, l'ADN es van tenyir utilitzant una solució de 20 µg/ml de iodur de propidi (Sigma) en PBS contenint 5 mg/ml d'ARNasa (Sigma). Les mostres es van incubar un mínim d'1 h a la foscor a 4°C abans de l'anàlisi en el citòmetre de flux EPICS-XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Es van analitzar un mínim de 10.000 cèl·lules per triplicat.

Les cèl·lules amb un contingut d'ADN subdiploide es van considerar cèl·lules apoptòtiques, i l'anàlisi del cicle cel·lular de la població Citoqueratina positiva es va realitzar utilitzant el programa Modfit LT 2.0 (Verity Software House Inc, ME). Aquest programa, que

empra mètodes d'ajust no lineal, va assimilar les dades experimentals a corbes matemàtiques i va calcular el percentatge de cèl·lules presents en cada fase del cicle.

7.- Anàlisi estadística

7.1.- Experiments *in vitro*

Els resultats d'adhesió cel·lular, viabilitat en suspensió i cicle cel·lular s'expressen com a mitjana \pm desviació estàndard. L'anàlisi estadística entre els grups es va realitzar per anàlisi de la variança o ANOVA.

7.2.- Experiments *in vivo*

7.2.1.- Capacitat tumorigèna i metastàtica

Els resultats del volum tumoral i del nombre de metastasis pulmonars s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística entre els grups es va obtenir aplicant els tests no paramètrics de Kruskal-Wallis (K Independent Samples) i Mann-Whitney (2 Independent Samples).

Totes aquestes anàlisis estadístiques es van fer utilitzant el Statistical Package of the Social Sciences (SPSS) 8.0 per Windows.

7.2.2.- Capacitat tumorigèna amb els successius implants *in vivo/in vitro*

Per analitzar els resultats del volum tumoral amb els successius implants en l'animal d'experimentació es va utilitzar un model lineal mixt d'anàlisi de la variança amb efectes fixos i aleatoris, on la variable dependent va ser el volum del tumor (mm^3) i les variables independents l'implant (1^{a} , 2^{a} i 3^{a}), la línia cel·lular (Neo i Bcl) i el temps (d). Es va tenir una recta per línia cel·lular i implant en funció del temps.

Després d'estudiar les dades, el millor model d'anàlisi del volum del tumor respecte del temps va incloure els efectes de l'implant, de la línia cel·lular i les interaccions línia-temps i implant-temps.

Per tenir en compte la variabilitat d'una ratolina a una altra, el model va incloure un efecte aleatori per a cada animal d'experimentació. Els models finals es van ajustar amb el mètode de la màxima versemblança restringida (REML), i totes les anàlisis es van fer amb les funcions S-PLUS utilitzant la base de dades NLME.

Per a totes les anàlisis realitzades el valor de la p de dues cues es va considerar estadísticament significatiu quan va ser menor de 0,05.

IV.- Resultats

1.- Apoptosi i expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en tumors organotòpics de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana

1.1.- Anàlisi de l'apoptosi

Les cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana MCF-7, 468 i 435 es van implantar i.m.f.p. en ratolines atímiques Balb-c/Nude i quan els tumors van assolir un volum aproximat de 100 mm³ es van extirpar i es va determinar l'apoptosi mitjançant el mètode TUNEL.

L'apoptosi dels tumors disminueix inversament al grau de diferenciació cel·lular (Figura 17). Els nuclis apoptòtics en els tumors de cèl·lules MCF-7 van ser més nombrosos i estaven més uniformement distribuïts, mentre que en els tumors de les 468 la tinció nuclear es va localitzar en àrees més restringides. Al contrari, en els tumors de cèl·lules 435 només es van detectar cèl·lules apoptòtiques de manera esporàdica.

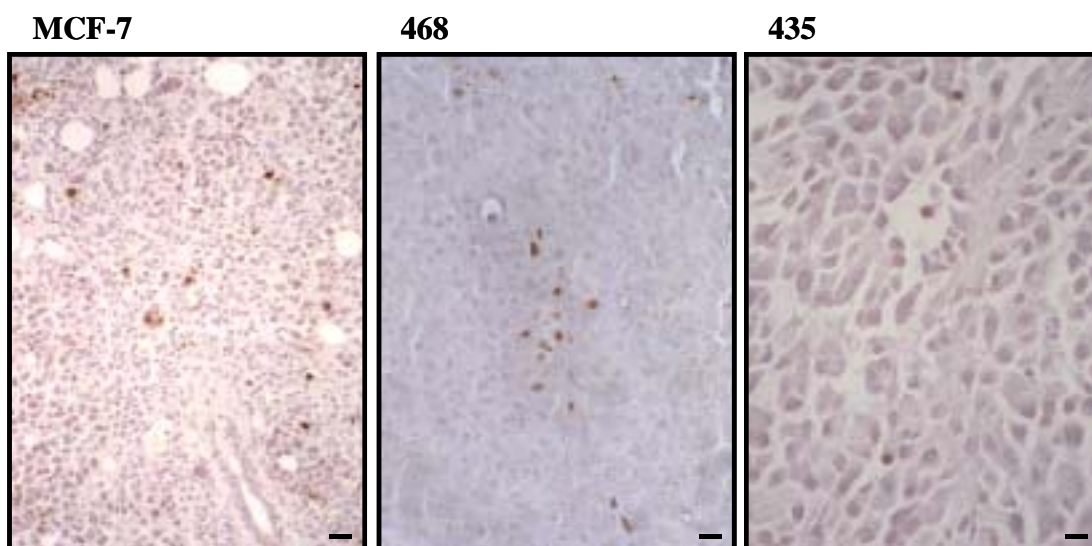


Figura 17.- Apoptosi en tumors de cèl·lules MCF-7, 468 i 435. Mitjançant el mètode TUNEL es va detectar l'ADN fragmentat *in situ* amb DAB (coloració marró) i els nuclis es van contratenyir amb hematoxilina (coloració blava). Els resultats van ser els més representatius de cinc tumors estudiats per cada línia cel·lular (barra d'escala, 50 µm).

1.2.- Expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L

En els tumors induïts es va analitzar l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L per immunohistoquímica (IHC) i western blot, essent l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L diferent entre ells (Figura 18).

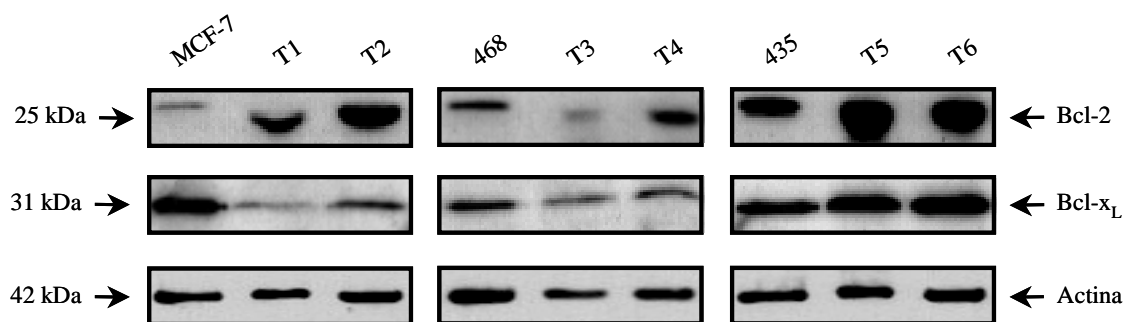


Figura 18.- Expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L en cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana *in vitro* i en els seus respectius tumors desenvolupats *in vivo*. Anàlisi per western blot de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-x_L dels lisats cel·lulars de les cèl·lules MCF-7, 468 i 435 i dels tumors (T1 i T2, T3 i T4, i T5 i T6) obtinguts per injecció i.m.f.p. d' 1×10^6 cèl·lules. Es van carregar 50 µg de proteïna total de cada mostra, i l'expressió d'Actina es va utilitzar com a control de càrrega proteica.

L'expressió de Bcl-2 en els tumors no es va correlacionar amb el grau de diferenciació cel·lular, sent els tumors derivats de cèl·lules MCF-7 i 435 els que van presentar els nivells més alts, i els tumors 468 els més baixos. Per contra, l'expressió de Bcl-x_L augmenta amb el grau de diferenciació cel·lular, mostrant els tumors MCF-7 els nivells més baixos i els tumors 435 els més alts.

Els tumors MCF-7 i 468 van expressar nivells més alts de Bcl-2 que de Bcl-x_L i, en canvi, els tumors derivats de cèl·lules 435 van mostrar nivells d'expressió semblants de les dues proteïnes.

L'expressió de Bcl-2 *in vitro* va ser inferior a la dels tumors *in vivo* i, en canvi, la de Bcl-x_L va ser superior a la dels tumors MCF-7 i 468 i inferior a la dels 435. Donat que *in vitro* l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L va ser diferent de l'observada en les anàlisis *in vivo* dels tumors, l'expressió d'aquestes proteïnes podria ser modulada pel microentorn del teixit.

2.- Sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L en la biologia i en el fenotip metastàtic de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana

Per tal d'esbrinar la influència de la sobreexpressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en l'activitat metastàtica del càncer de mama, les cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana MCF-7, 468 i 435 es van transfectar amb el vector d'expressió SFFV-*neo* contenint els gens antiapoptòtics *bcl-2* o *bcl-x_L* humans o sense la inserció, com a control. Els transfectants estables es van seleccionar utilitzant l'antibiòtic genèticina.

L'expressió proteica de Bcl-2 i Bcl-x_L es va determinar per western blot (Figura 19) utilitzant anticossos específics (anti-Bcl-2 clon H-100 i anti-Bcl-x_{S/L} clon S-18).

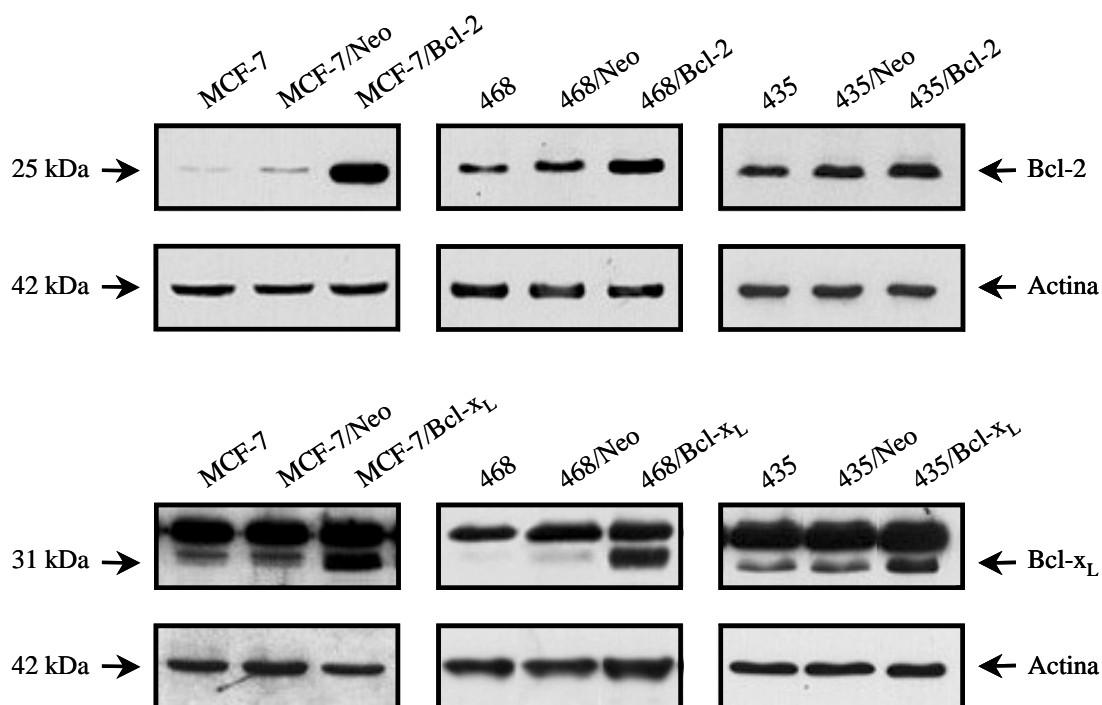


Figura 19.- Expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L en els transfectants cel·lulars. Anàlisi per western blot de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-x_L dels lisats cel·lulars de les cèl·lules MCF-7, MCF-7/Neo, MCF-7/Bcl-2 i MCF-7/Bcl-x_L, 468, 468/Neo, 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L, i 435, 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L. Es van carregar 50 µg de proteïna total de cada mostra, i l'expressió d'Actina es va utilitzar com a control de càrrega proteica.

L'expressió de Bcl-2 dels clons seleccionats va ser 10 vegades més alta en el clon MCF-7/Bcl-2, 3 en el 468/Bcl-2 i 2 en el 435/Bcl-2 respecte del corresponent control Neo. L'expressió de Bcl-x_L va ser 4 vegades més alta en el clon MCF-7/Bcl-x_L, 6 en el 468/Bcl-x_L i 2 en el 435/Bcl-x_L respecte del respectiu clon Neo.

En les anàlisis d'expressió proteica per western blot de Bcl-x_L es va detectar una segona proteïna immunoreactiva d'aproximadament 34 kDa de pes molecular en les tres línies cel·lulars. Aquesta banda va ser detectada mitjançant dos anticossos més anti-Bcl-x (anti-Bcl-x_{S/L} clon M-125 i anti-Bcl-x), però la reactivitat va ser més suau que l'observada amb l'anticòs anti-Bcl-x_{S/L} clon S-18.

Alternativament també es van analitzar els nivells d'ARN per northern blot, sent l'expressió d'ARN en els transfectants de Bcl-x_L de les cèl·lules 435 més alta que la del clon Neo (Figura 20). El pool de cèl·lules transfectades amb Bcl-x_L va permetre avaluar la variació clonal, i l'expressió proteica de Bcl-x_L en aquest va ser 1,6 vegades més alta que la del clon Neo.

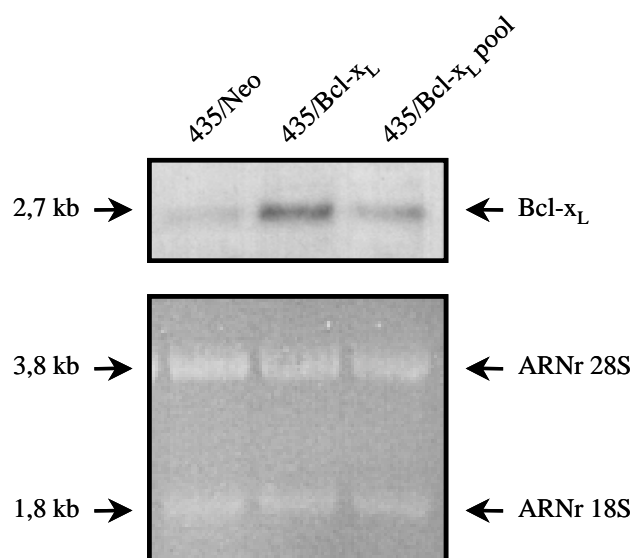


Figura 20.- Expressió de l'ARN del *bcl-x_L* en els transfectants de la línia cel·lular 435. Anàlisi per northern blot de l'ARN total (20 µg) dels lisats cel·lulars de les cèl·lules 435/Neo i 435/Bcl-x_L. La membrana es va hibridar amb una sonda de l'ADNc del *bcl-x_L*, i la tinció de l'ARN amb bromur d'etidi es va utilitzar com a control de càrrega.

Com a resultat de la transfecció en les cèl·lules 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L es van observar canvis en la seva morfologia cel·lular respecte dels cultius de la línia 468 parental o del transfectant control 468/Neo (Figura 21). Aquests canvis van consistir en l'aparició d'una subpoblació de cèl·lules que mostraven augment del diàmetre cel·lular i múltiples nuclis. Contràriament, en els transfectants de Bcl-2 o Bcl-x_L de les cèl·lules MCF-7 i 435 no es van evidenciar modificacions morfològiques.

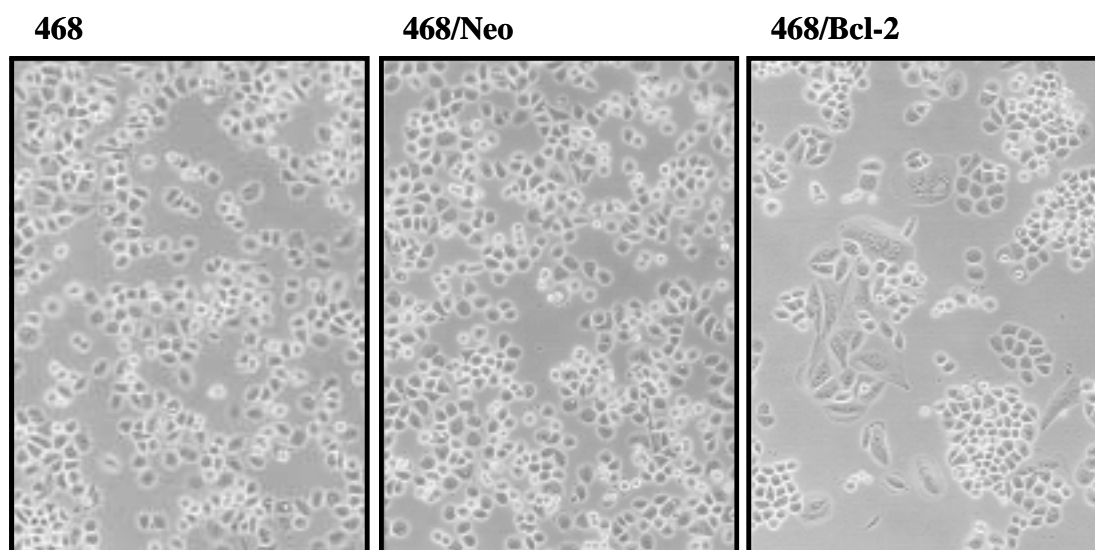


Figura 21.- Fotografies representatives de les cèl·lules 468, 468/Neo i 468/Bcl-2 creixent en condicions estàndards de cultiu ($\times 100$).

2.1.- Resposta cel·lular a l'apoptosi i la proliferació

2.1.1.- Apoptosi i proliferació induïdes per factors de creixement

Per estudiar la funció inhibidora de l'apoptosi associada a la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L en els transfectants obtinguts es va avaluar la supervivència cel·lular enfront de diferents factors de creixement (TGF- β i TNF- α).

Bcl-2 i Bcl-x_L indueixen resistència a la mort cel·lular desencadenada per TGF- β en les cèl·lules MCF-7, 468 i 435, i per TNF- α només en les cèl·lules 435 (Figura 22).

El TGF- β té efecte citotòxic en les cèl·lules MCF-7/Neo, 468/Neo i 435/Neo, i aquest efecte s'inhibeix quan les cèl·lules sobreexpressen Bcl-2 o Bcl-x_L. Així, a 5 ng/ml de TGF- β , la viabilitat de les cèl·lules MCF-7/Neo i 468/Neo va ser de l'ordre del 70% i la de les 435/Neo del 40%, incrementant-se fins al 100% en els transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les cèl·lules MCF-7 i 468, i fins al 60-90% en els de les 435.

El TNF- α no indueix activitat citotòxica en les cèl·lules MCF-7/Neo i 468/Neo, i aquesta no es modifica quan les cèl·lules sobreexpressen Bcl-2 o Bcl-x_L. En les cèl·lules 435/Neo, el TNF- α té activitat citotòxica que s'inhibeix en els transfectants 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L. Aquesta inhibició va ser d'un 40% per a les 435/Bcl-x_L i d'un 20% per a les 435/Bcl-2.

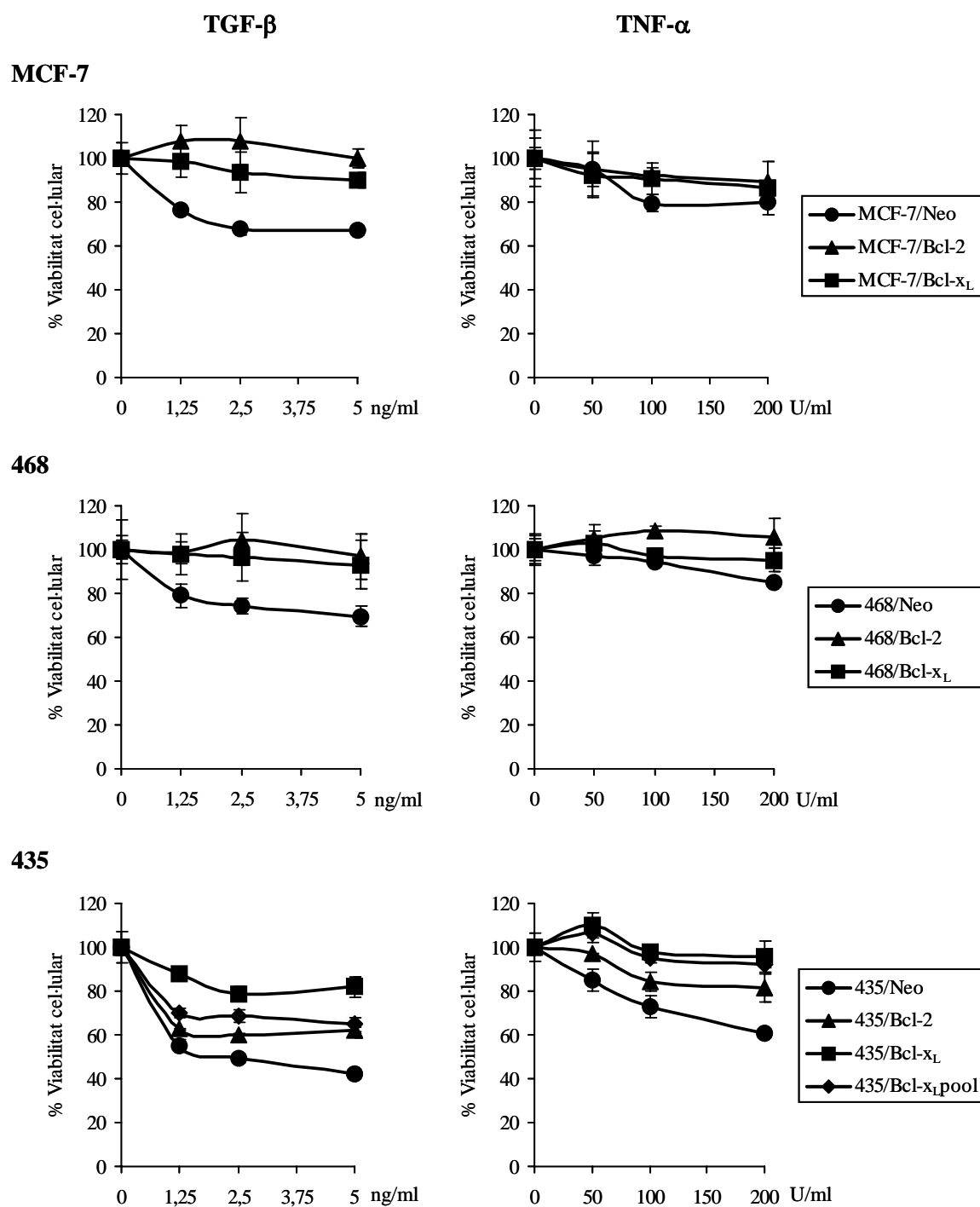
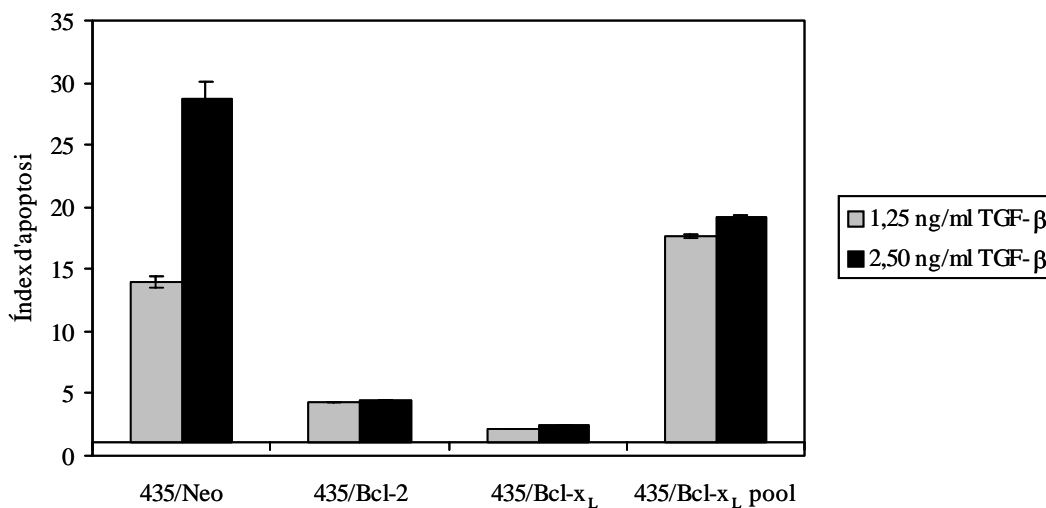


Figura 22.- Viabilitat cel·lular dels transfectants de Bcl-2 o Bcl-x_L de les línies cel·lulars MCF-7, 468 i 435. Aquestes gràfiques mostren el percentatge de cèl·lules viables mesurat per l'assaig de l'MTT, on els transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L van ser cultivats sense sèrum en presència de (h)TGF- β a 1,25-5 ng/ml o r(h)TNF- α a 50-200 U/ml durant 120 h.

L'apoptosi induïda per TGF- β i TNF- α es va estudiar en els transfectants de 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L utilitzant un sistema ELISA de detecció dels fragments citoplasmàtics d'ADN associats a histones (Figura 23).

TGF- β



TNF- α

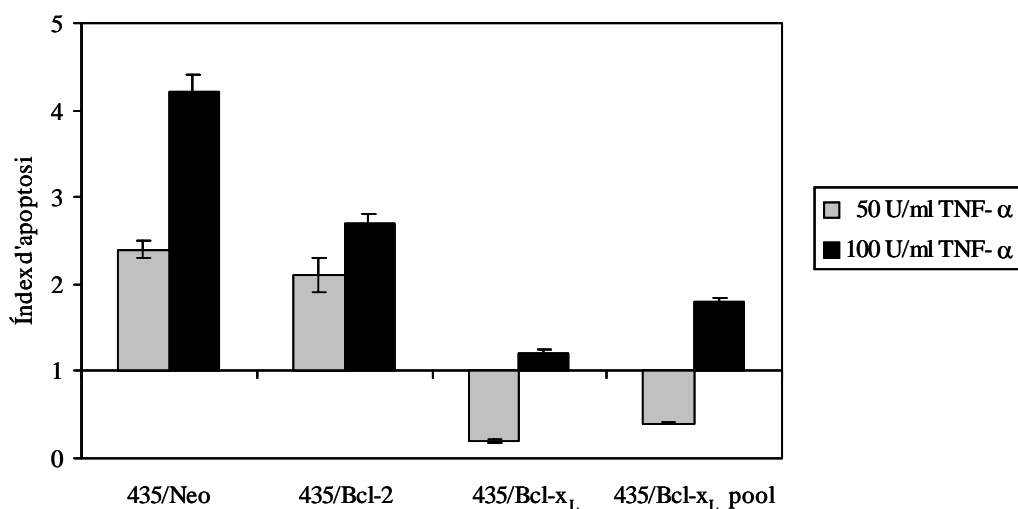


Figura 23.- Inducció d'apoptosi en els transfectants de Bcl-2 o Bcl-x_L de les cèl·lules 435. Aquestes gràfiques mostren l'índex d'apoptosi mesurat pel mètode quantitatiu ELISA, en què les cèl·lules 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L van ser cultivades sense sèrum en presència de (h)TGF- β a 1,25 i 2,5 ng/ml o r(h)TNF- α a 50 i 100 U/ml durant 72 h. L'índex d'apoptosi representa l'absorbància_{405nm} de les cèl·lules tractades respecte a l'absorbància_{405nm} de les cèl·lules control.

Les cèl·lules 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L estimulades amb TGF- β presenten menys apoptosi que les 435/Neo. L'efecte més important es va observar en la concentració de 2,5 ng/ml, en què l'índex d'apoptosi es va establitzar tant en els transfectants de Bcl-2 com en els de Bcl-x_L, mentre que en les cèl·lules 435/Neo va augmentar fins a 30 vegades més que en les cèl·lules no tractades.

En el cas del TNF- α , 50 U/ml no van exercir activitat apoptòtica en els cultius 435/Bcl-x_L, però en les 435/Neo i 435/Bcl-2 l'índex d'apoptosi va ser de 2,5 i 2 vegades més que les cèl·lules no tractades, respectivament. A la dosi de 100 U/ml els transfectants de Bcl-x_L i Bcl-2 van presentar menys apoptosi que les cèl·lules 435/Neo.

Per tal d'analitzar el desequilibri entre proliferació i mort cel·lular es va determinar la incorporació de timidina tritiada en resposta a l'estimulació amb aquestes citocines (Figura 24).

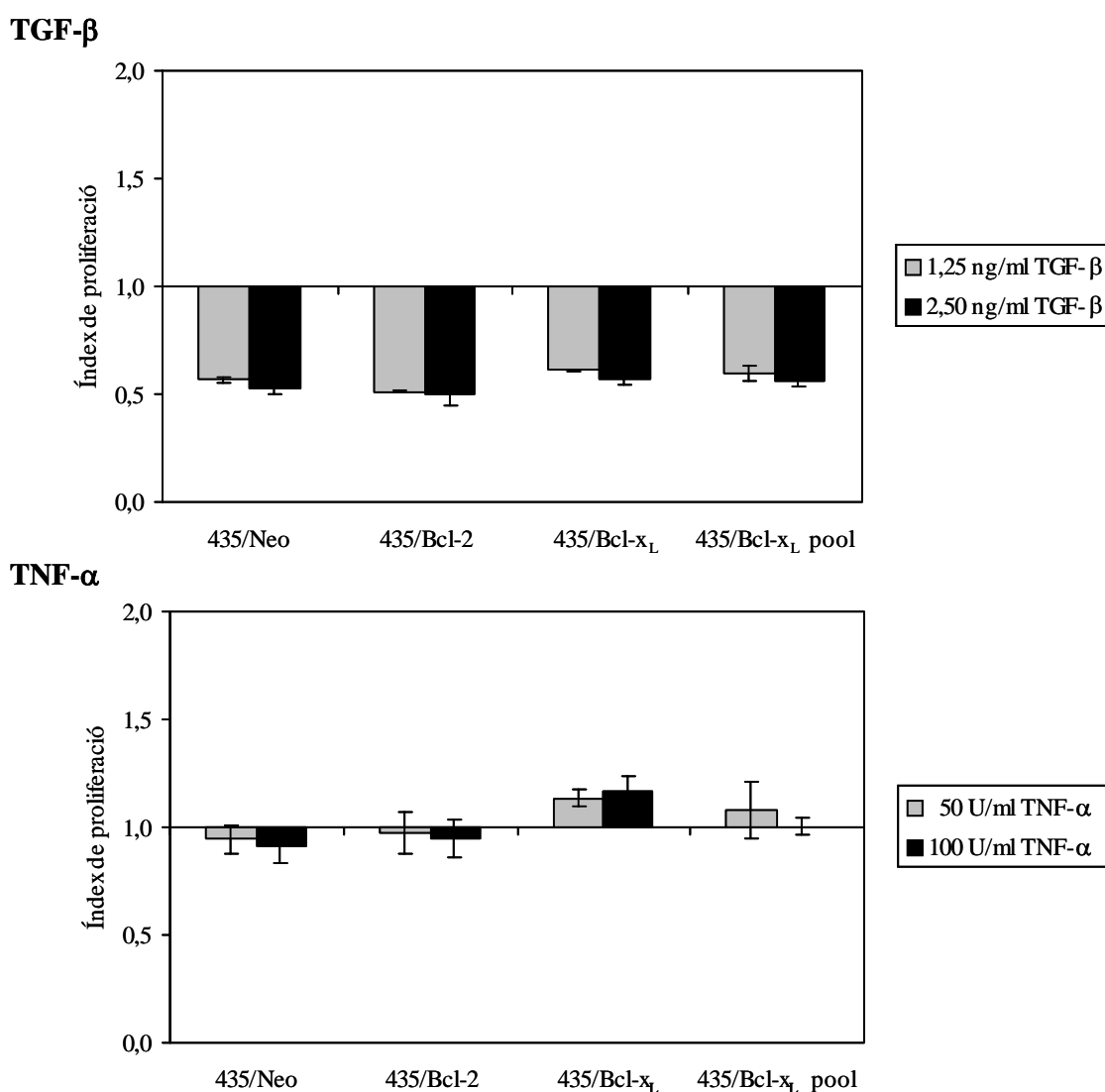


Figura 24.- Activitat proliferativa dels transfectants de Bcl-2 o Bcl-x_L de les cèl·lules 435. Aquestes gràfiques mostren la proliferació de les cèl·lules 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L cultivades sense sèrum en presència de (h)TGF- β a 1,25 i 2,5 ng/ml o r(h)TNF- α a 50 i 100 U/ml durant 72 h. L'índex de proliferació representa la incorporació de [metil-³H]-timidina de les cèl·lules tractades respecte a la de les cèl·lules no tractades.

El TGF- β mostra activitat citostàtica en els cultius 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L. Tanmateix, el TNF- α exerceix activitat citostàtica en les cèl·lules 435/Neo i 435/Bcl-2, però no modifica la proliferació basal de les cèl·lules 435/Bcl-x_L.

Per contrastar aquestes observacions es va estudiar la resposta de les cèl·lules als factors inductors de supervivència com l'IGF-1 i el sèrum (Figura 25).

L'IGF-1 indueix proliferació moderada en els cultius de les cèl·lules 435/Bcl-x_L en comparació amb les cèl·lules 435/Bcl-x_L pool, 435/Bcl-2 o 435/Neo. Com es mostra en el quadre superior de la Figura 25, la retirada del sèrum afecta menys les cèl·lules 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L que les cèl·lules control. El creixement de les cèl·lules 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L va ser un 20% menor a l'1% de sèrum que en condicions estàndards de cultiu, mentre que en les 435/Neo va disminuir gairebé un 40%.

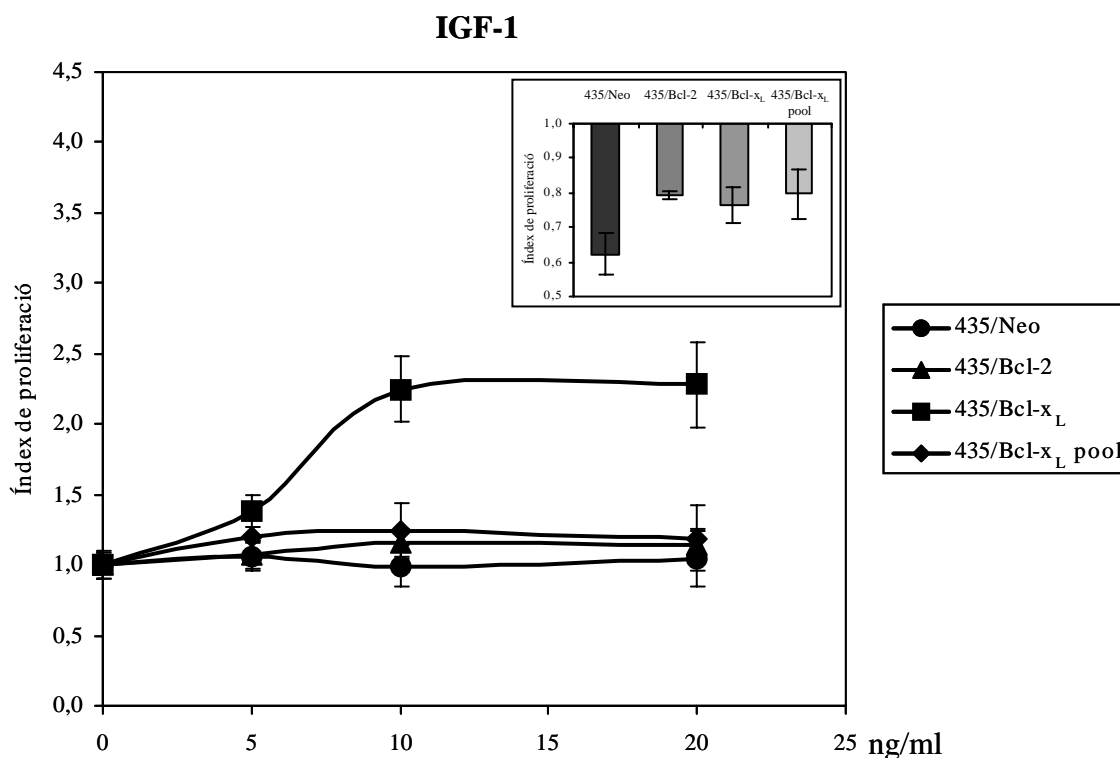


Figura 25.- Cèl·lules 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L cultivades sense sèrum en presència de r(h)IGF-1 a 5-20 ng/ml, i testades a les 72 h per la incorporació de [metil-³H]-timidina. El quadre superior indica l'efecte inhibitor del creixement en cèl·lules cultivades a una concentració de sèrum de l'1%.

En condicions estàndards de cultiu, es va observar que el creixement dels transfectants 468/Bcl-2 era menor que el dels transfectants 468/Neo. L'efecte de la sobreexpressió de Bcl-2 en la proliferació de les cèl·lules 468 també es va estudiar en presència de TGF- β , TNF- α , IGF-1 i sèrum (Figura 26).

El TGF- β i el TNF- α tenen activitat citostàtica en les cèl·lules 468/Neo i 468/Bcl-2. L'IGF-1 indueix proliferació moderada en les cèl·lules 468/Bcl-2 en comparació amb les cèl·lules 468/Neo. Això no obstant, la resposta de les cèl·lules 468/Bcl-2 a dosis creixents de sèrum és menor que la de les 468/Neo, que presenten un creixement major. Així, al 10% de sèrum el creixement de les 468/Bcl-2 va ser 3 vegades menor a l'observat en les 468/Neo.

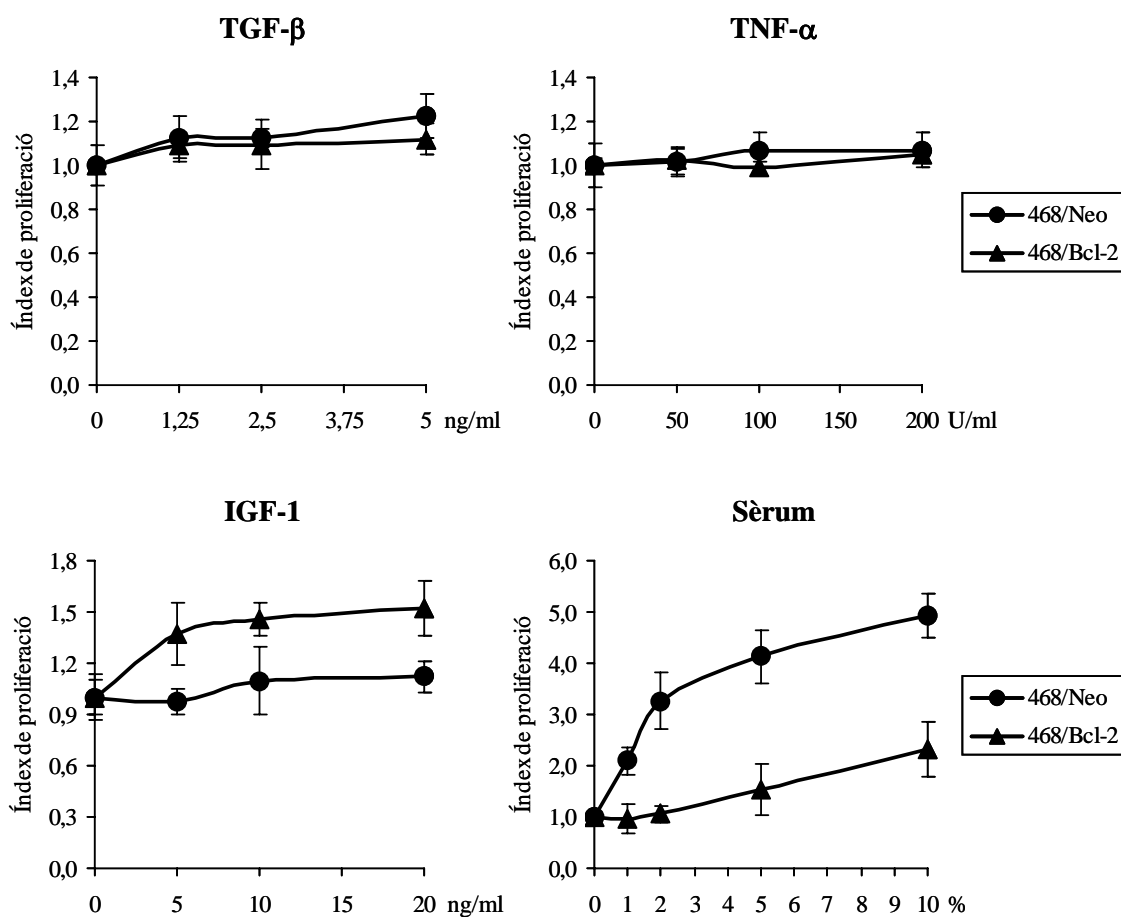


Figura 26.- Activitat proliferativa dels transfectants de Bcl-2 o Bcl-x_L de les cèl·lules 468. Aquestes gràfiques mostren la proliferació de les cèl·lules 468/Neo i 468/Bcl-2 cultivades sense sèrum en presència de (h)TGF- β a 1,25-5 ng/ml, r(h)TNF- α a 50-200 U/ml, r(h)IGF-1 a 5-20 ng/ml o sèrum a 1-10%. L'índex de proliferació representa la incorporació de [metil-³H]-timidina de les cèl·lules tractades respecte a la de les cèl·lules no tractades.

2.1.2.- Apoptosi induïda per agents quimioterapèutics

Per tal d'analitzar l'efecte de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L en la inhibició de l'apoptosi induïda per diferents vies es va estudiar la supervivència cel·lular dels clons enfront de diferents agents quimioterapèutics (paclitaxel i tamoxifen).

Bcl-2 i Bcl-x_L inhibeixen l'apoptosi induïda per paclitaxel en les cèl·lules MCF-7 i 468, però no exerceixen el seu efecte antiapoptòtic en les cèl·lules 435 (Figura 27).

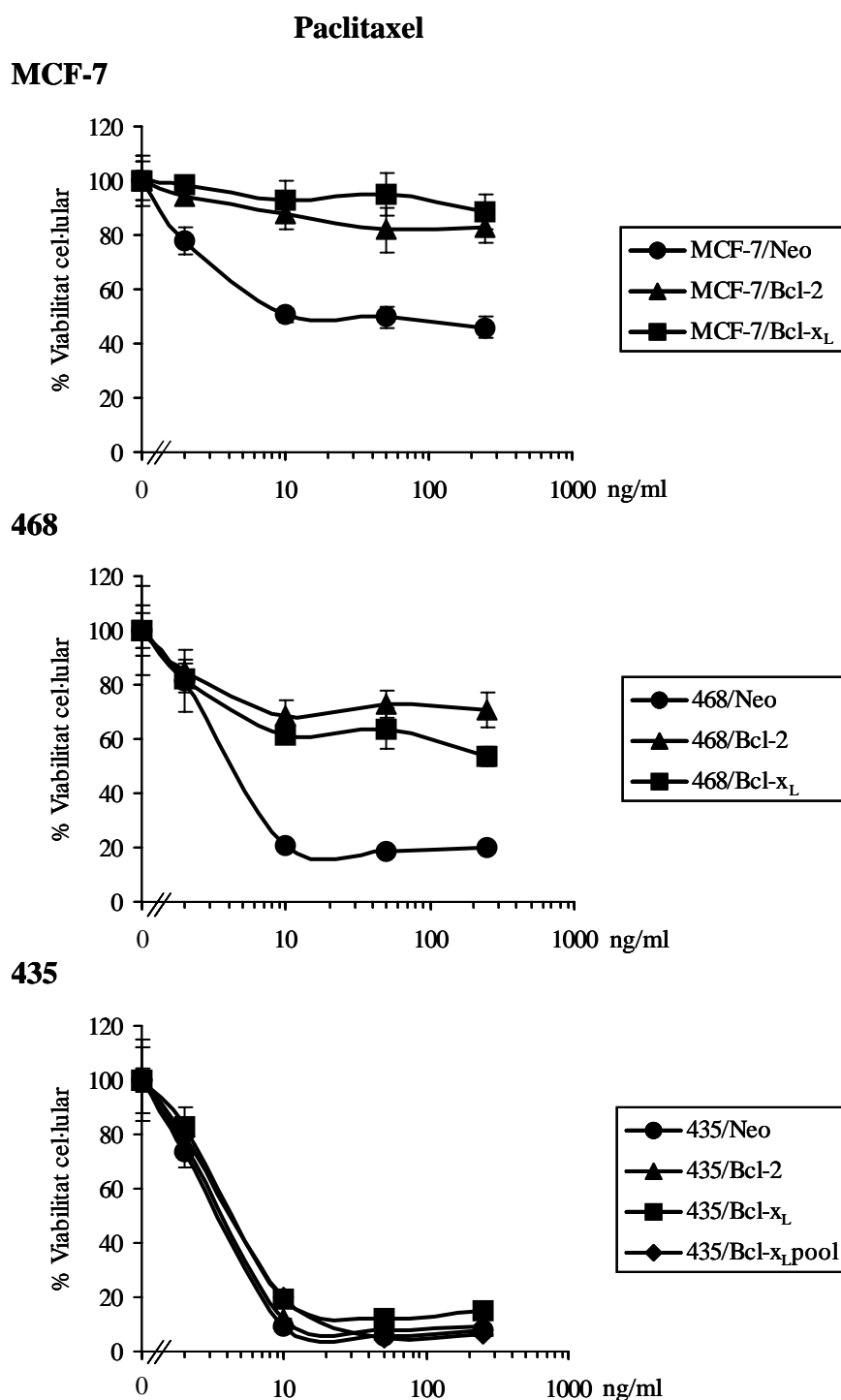


Figura 27.- Activitat citotòxica del paclitaxel en els transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les línies MCF-7, 468 i 435. Aquestes gràfiques mostren el percentatge de viabilitat cel·lular mesurat per l'assaig de l'MTT, en què els transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L van ser cultivats sense sèrum en presència de paclitaxel a 2-250 ng/ml durant 72 h.

Les cèl·lules MCF-7 són les més resistents al tractament amb paclitaxel *in vitro*. Així, a 250 ng/ml de paclitaxel, la viabilitat cel·lular de les MCF-7/Neo va ser del 50%, la de les 468/Neo del 20% i la de les 435/Neo del 10%. Els transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les cèl·lules MCF-7 i 468 van recuperar l'efecte citotòxic del fàrmac en un 30-50%, mentre que no va arribar a un 10% d'augment en els transfectants de les cèl·lules 435, respecte als seus controls.

Bcl-2 i Bcl-x_L inhibeixen l'apoptosi induïda per l'antiestrogen tamoxifen en les cèl·lules MCF-7 dependents d'estrògens (Figura 28). A la concentració de 100 nM de tamoxifen, la mitjana \pm desviació estàndard del percentatge de cèl·lules viables en els cultius tractats respecte de les cèl·lules en medi de cultiu sense estrògens va ser: $116,2 \pm 3,4$ per a les cèl·lules MCF-7/Bcl-2; $108,6 \pm 8,4$ per a les MCF-7/Bcl-x_L i $66,4 \pm 3,7$ per a les MCF-7/Neo.

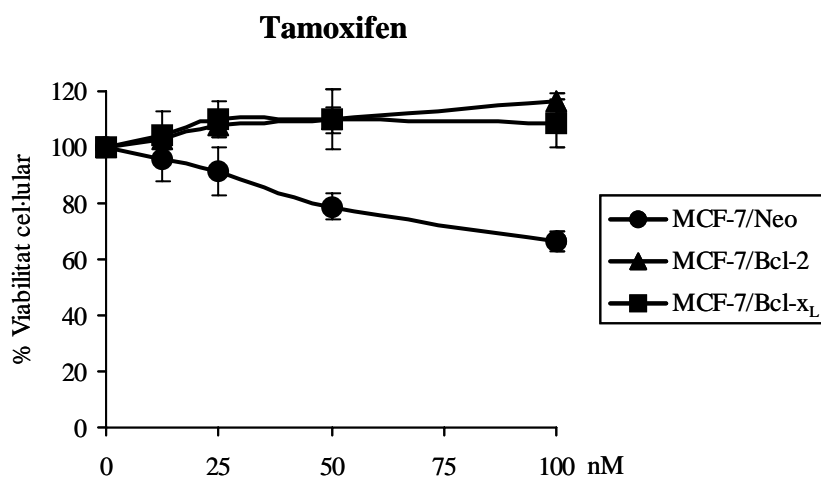


Figura 28.- Activitat citotòxica del tamoxifen en els transfectants MCF-7/Bcl-2 i MCF-7/Bcl-x_L. Aquesta gràfica mostra el percentatge de viabilitat cel·lular mesurat per l'assaig de l'MTT, en què els transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L van ser cultivats sense sèrum i sense estrògens en presència de tamoxifen a 12,5-100 nM durant 120 h.

2.2.- Relació de la cèl·lula amb el seu entorn

Per analitzar la influència de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en diferents etapes del procés metastàtic es va determinar la capacitat d'adhesió de les cèl·lules a proteïnes de la matriu extracel·lular i la seva capacitat per sobreviure en condicions no adherents *in vitro* i en el torrent sanguini *in vivo*.

2.2.1.- Adhesió cel·lular a proteïnes de la matriu extracel·lular

Es va avaluar l'adhesió de les cèl·lules tumorals a matrigel, laminina, fibronectina i col·lagen IV.

Bcl-2 i Bcl-x_L disminueixen l'adhesió a proteïnes de la matriu extracel·lular en les cèl·lules 435 i que, per contra, no la modifiquen en les cèl·lules 468 i MCF-7 (Figura 29).

L'adhesió de les cèl·lules 435/Neo al matrigel va ser un 20-30% menor que l'observada en les cèl·lules 468/Neo i MCF-7/Neo (ANOVA, $p=0,0017$). També es va observar que les cèl·lules 435/Neo presentaven menys capacitat d'adhesió a les proteïnes de la matriu extracel·lular (laminina, fibronectina i col·lagen IV) que les cèl·lules 468/Neo i MCF-7/Neo.

La capacitat d'adhesió dels transfectants 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L va disminuir un 13-21% a la laminina (ANOVA, $p=0,0002$), un 12-19% a la fibronectina (ANOVA, $p=0,0026$) i un 16-25% al col·lagen IV (ANOVA, $p<0,0001$), respecte al control de cèl·lules 435/Neo. Contràriament, no es van observar modificacions en l'adhesió dels transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les cèl·lules 468 i MCF-7 a laminina, fibronectina i col·lagen IV.

2.2.2.- Supervivència cel·lular independent d'ancoratge

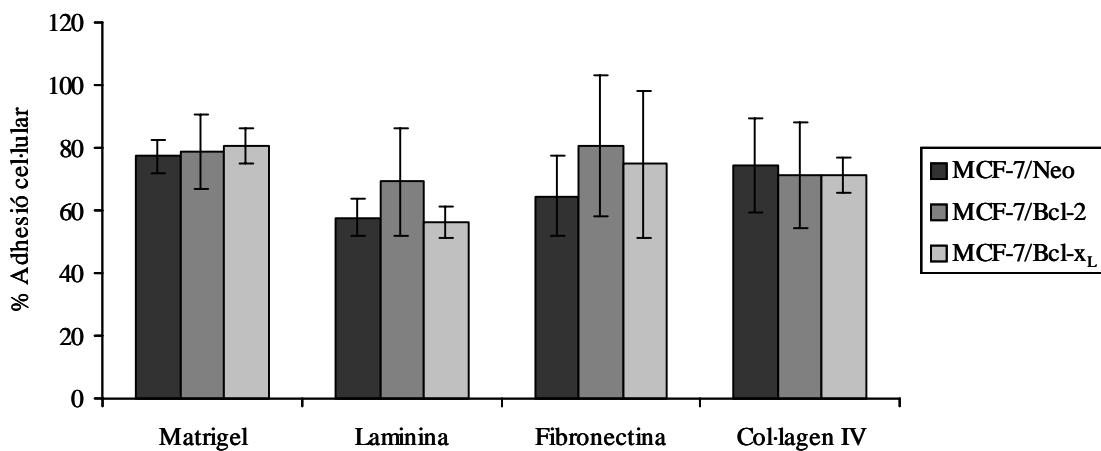
La possibilitat que la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L en les cèl·lules indueixi l'adaptació a viure sense adherir-se es va estudiar assajant la viabilitat cel·lular en suspensió. Les cèl·lules es van mantenir en agitació per rotació i, donat que l'agregació cel·lular pot esdevenir durant els assajos de flotació de llarg termini, es va minimitzar aquest problema limitant els assajos a 16-64 h.

Bcl-2 i Bcl-x_L incrementen la supervivència en suspensió de les cèl·lules MCF-7, 468 i 435, rescatant les cèl·lules de l'*anoikis* o mort cel·lular per desadhesió de la matriu extracel·lular (Figura 30).

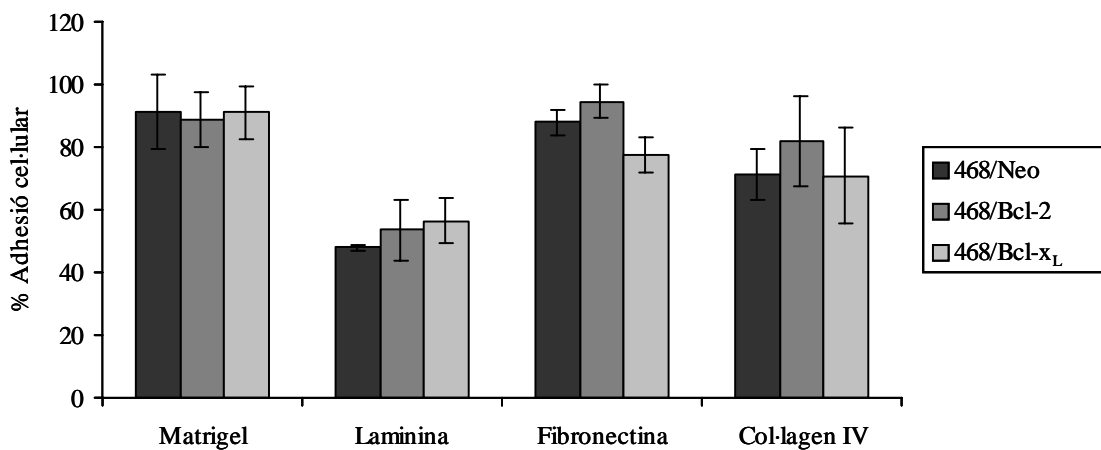
Les cèl·lules 435 presenten major capacitat de supervivència en suspensió que les cèl·lules 468 i MCF-7. Així, la viabilitat cel·lular a les 16 h es va reduir un 50% en les 435, mentre que la disminució va ser d'un 80% en les 468 i MCF-7 (ANOVA, $p<0,0001$).

El percentatge de cèl·lules que sobreexpressen Bcl-2 o Bcl-x_L que viuen en condicions de no-adherència és més alt que en les cèl·lules control de les tres línies cel·lulars en els diferents períodes de temps (ANOVA, $p<0,0001$). No obstant això, aquestes diferències disminueixen al llarg del temps per a les cèl·lules MCF-7 i 468, i augmenten per a les 435. Així, a les 64 h de rotació, Bcl-2 i Bcl-x_L van rescatar de la mort per *anoikis* un 20-40% de cèl·lules 435, però només un 5-10% de les cèl·lules 468 i MCF-7.

MCF-7



468



435

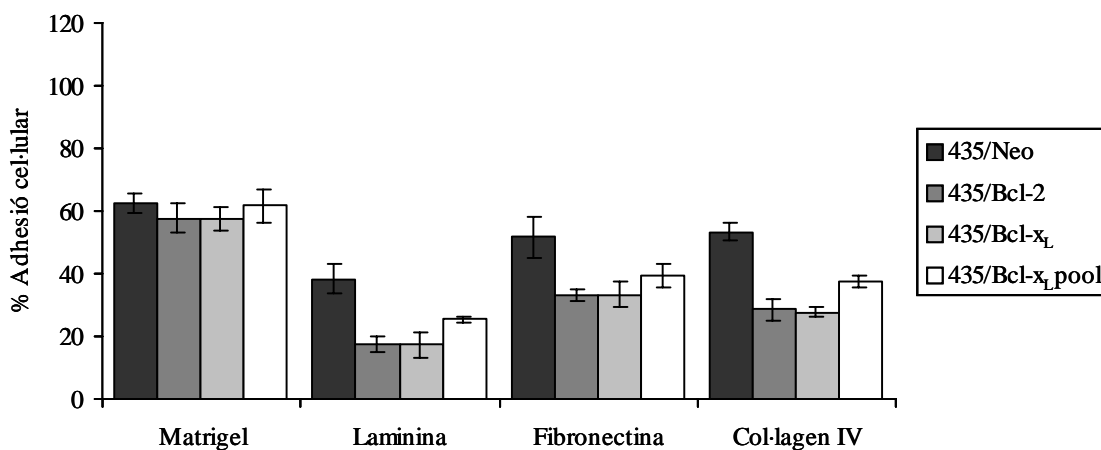


Figura 29.- Adhesió a proteïnes de la matriu extracel·lular dels transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les cèl·lules MCF-7, 468 i 435. Els resultats s'expressen com a percentatge de cèl·lules adherides a matrigel, laminina, fibronectina i col-lagen IV respecte a les cèl·lules sembrades, i representen la mitjana ± desviació estàndard de 4 experiments independents fets per triplicat.

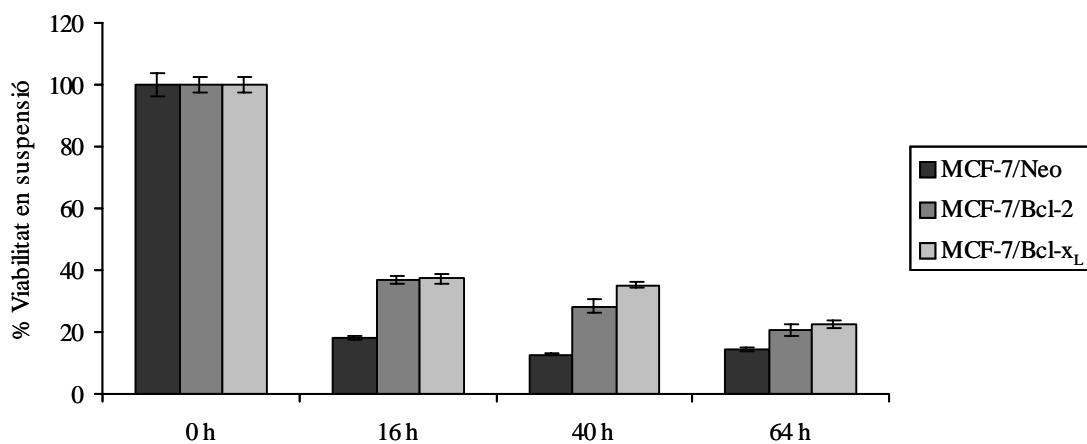
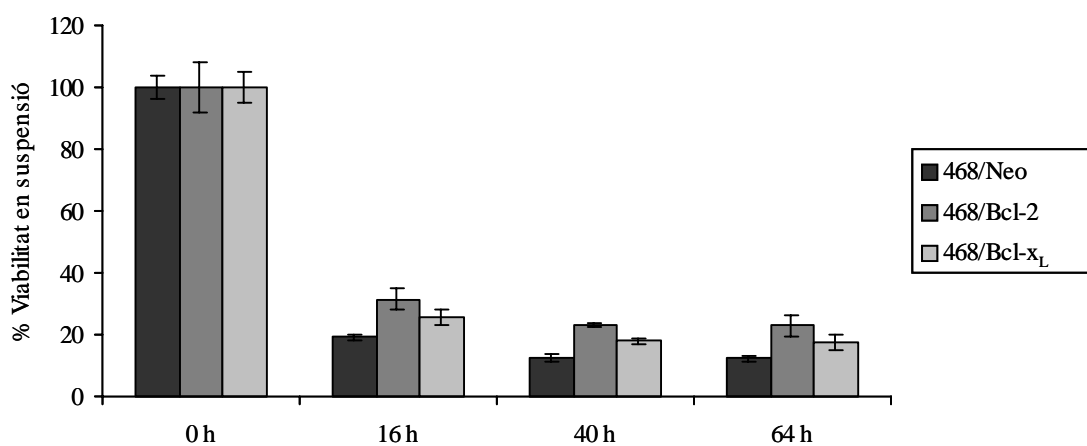
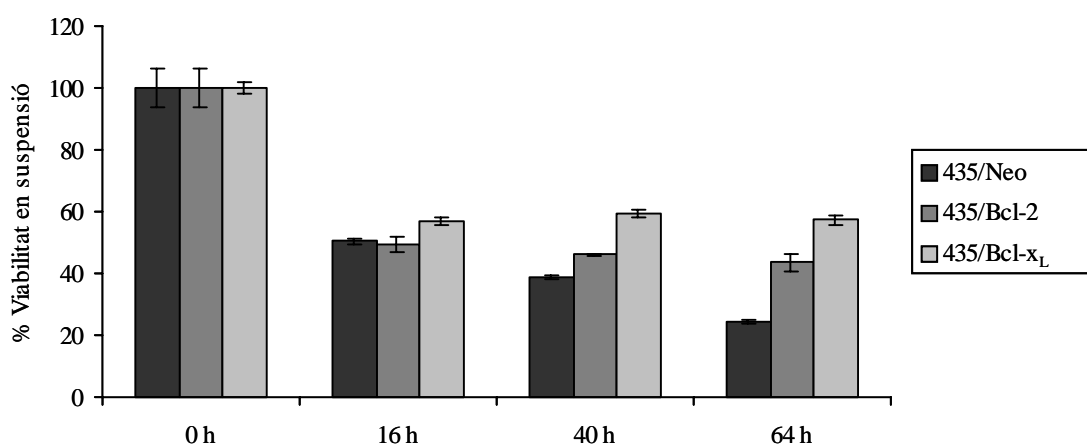
MCF-7**468****435**

Figura 30.- Anàlisi de la viabilitat en suspensió de les cèl·lules MCF-7/Neo, MCF-7/Bcl-2 i MCF-7/Bcl-x_L, 468/Neo, 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L, i 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L. Es representa el percentatge de cèl·lules viables després d'èsser sotmeses a agitació per rotació durant 16, 40 i 64 h, i la quantificació es va fer mitjançant l'assaig de l'MTT al cap de 4 h de cultiu. Aquests resultats representen la mitjana \pm desviació estàndard d'un dels tres experiments independents fets amb 10 rèpliques.

2.2.3.- Capacitat de sobreviure en el torrent sanguini

Basant-nos en el fet que els transfectants 435/Bcl-x_L van presentar adhesió disminuïda a diversos components de la matriu extracel·lular i augment de la supervivència en suspensió, es va analitzar la supervivència en el torrent sanguini per assaig de competició cel·lular (Figura 16).

Prèviament, es va realitzar un banc de dilucions de diferents barreges de les cèl·lules 435/Neo i 435/Bcl-x_L per demostrar que mitjançant southern blot es podien detectar canvis en la proporció del transcrit d'ADNc de *bcl-x_L* (Figura 31).

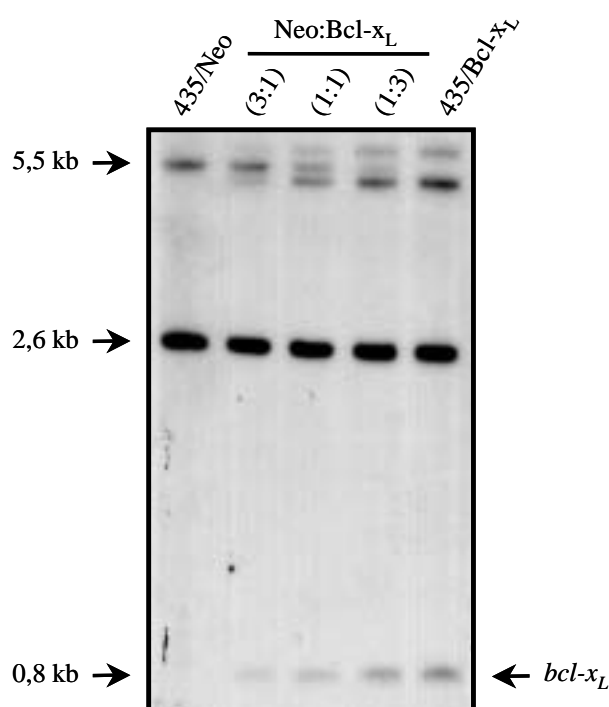


Figura 31.- Anàlisi prèvia de l'ADNc de *bcl-x_L* de diferents barreges de cèl·lules 435/Neo i 435/Bcl-x_L per avaluar els canvis en la proporció de cèl·lules en el torrent sanguini a diferents períodes de temps.

El senyal de l'ADNc de *bcl-x_L* va augmentar proporcionalment al nombre de cèl·lules 435/Bcl-x_L present en les barreges. Així, per southern blot es van poder determinar els canvis en la proporció de les cèl·lules Neo:Bcl-x_L, respecte a la proporció de cèl·lules presents en la barreja original, a diferents intervals de temps després de la seva injecció intravenosa.

Bcl-x_L confereix avantatge per sobreviure en el torrent sanguini a les cèl·lules tumorals 435 que aquest vehicula (Figura 32).

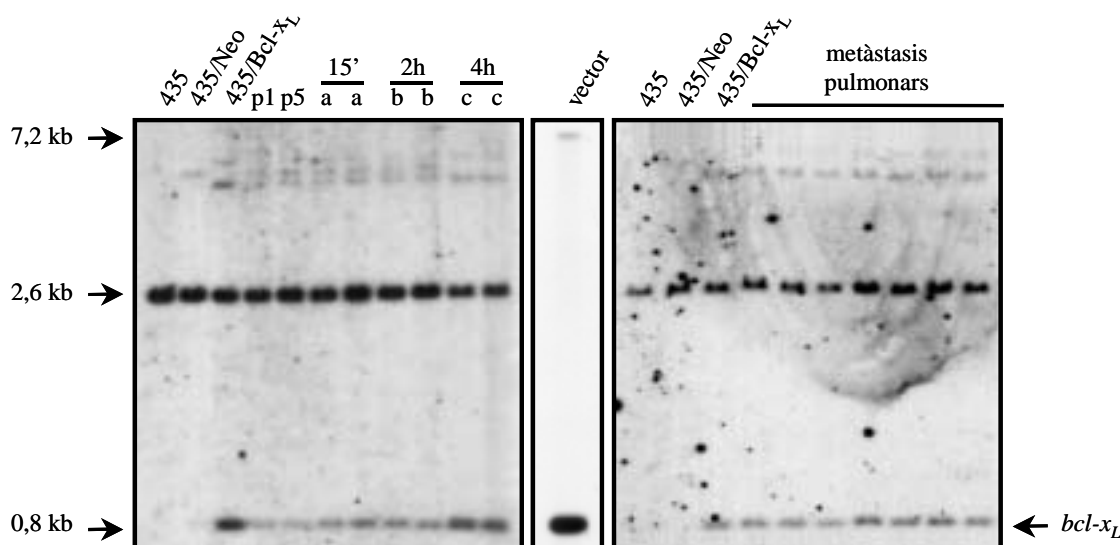


Figura 32.- Supervivència en el torrent sanguini de les cèl·lules 435/Bcl-x_L. Una barreja de cèl·lules 435/Neo i 435/Bcl-x_L en proporció 3:1, respectivament, es van injectar per via intravenosa en ratolines Balb-c/Nude. L'ADN es va determinar en la barreja de cèl·lules abans de la injecció (p1), després de cinc passis *in vitro* (p5) i en cèl·lules recuperades dels pulmons al cap de 15 min (a), 2 h (b) i 4 h (c) després de la injecció. El vector amb el *bcl-x_L* i les cèl·lules 435/Neo i 435/Bcl-x_L es van utilitzar com a control. En la part esquerra, es mostra l'anàlisi de l'ADN de cèl·lules que es van obtenir de diferents nòduls metastàtics pulmonars.

En les cèl·lules recuperades dels pulmons es va observar un enriquiment de cèl·lules 435/Bcl-x_L respecte a les 435/Neo al cap de 15 min, i s'assolí el màxim després de les 4 h. En aquest punt el senyal de Bcl-x_L de les cèl·lules obtingudes dels pulmons és similar al de les 435/Bcl-x_L en cultiu. Però 16 h després de la injecció només es van recuperar unes poques cèl·lules tumorals, indicant que la mort de la major part de les cèl·lules injectades s'esdevé en aquest període de temps.

Tanmateix, les ratolines van presentar metàstasis pulmonars i els cultius primaris obtinguts d'aquestes van revelar que les colònies metastàtiques desenvolupades eren preferencialment originades de cèl·lules 435/Bcl-x_L.

2.3.- Activitat tumorigèna i metastàtica

La capacitat tumorigèna i metastàtica de les cèl·lules es va avaluar per implantació de 1×10^6 cèl·lules dins el greix del teixit mamari de la part inguinal dreta de les ratolines atímiques Balb-c/Nude.

2.3.1.- Capacitat tumorigèna

La tumorigènesi dels transfectants de les cèl·lules MCF-7 es va estudiar fins al 36^è dia d'implant, ja que a partir d'aquest les ratolines van començar a morir. La incidència dels tumors MCF-7 va ser del 100% en tots els casos, i la mitjana \pm error estàndard del volum dels tumors expressat en mm³ el 36^è dia d'implant va ser: $33,27 \pm 5,45$ per als tumors MCF-7/Bcl-2 i $40,81 \pm 5,82$ per als tumors MCF-7/Neo (*Kruskal-Wallis*, $p=0,27$).

Les ratolines van presentar signes de toxicitat secundaris a l'administració d'estrògens requerits perquè aquestes cèl·lules esdevinguessin tumorigenes, mostrant disminució de pes i mort a partir del 36^è dia d'implant. Quan es va fer la necròpsia a les ratolines no es van observar signes de malaltia metastàtica aparent en els diferents ganglis limfàtics, els pulmons ni en cap dels òrgans de la cavitat peritoneal. L'anàlisi histològica de les mostres per tinció hematoxilina-eosina no va evidenciar micrometàstasis en els diferents òrgans, però es van observar signes d'hipertrofia uterina i d'èctasi pulmonar i hepàtica.

Posteriorment, es van realitzar experiments de tumorigènesi amb aquestes cèl·lules administrant a les ratolines els estrògens per via enteral, però no es va observar el desenvolupament dels tumors. Atès que no va ser possible resoldre aquest problema, els resultats que es mostren a partir d'aquest punt fan referència només als transfectants derivats de les cèl·lules 468 i 435.

El creixement dels tumors 468 és lent, i per tal d'escurçar el temps d'exèresi, les cèl·lules es van implantar resuspeses en matrigel, que conté components presents en la membrana basal i facilita el creixement tumoral. En la Figura 33 es representa aquest creixement, i es mostra que Bcl-2 i Bcl-x_L contribueixen a disminuir la tumorigènesi d'aquestes cèl·lules.

La incidència dels tumors 468 va ser del 100%. Els tumors 468/Neo ($n=7$), 468/Bcl-2 ($n=4$) i 468/Bcl-x_L ($n=5$) es van detectar el dia 14^è d'implant, i la seva mida va augmentar molt lleugerament durant els 30 dies següents, per fer-se aparents el dia 42^è (Figura 34). L'exèresi dels tumors es va realitzar als 68 dies per tal que els tumors 468/Bcl-2 i 486/Bcl-x_L assolissin un volum mínim de 100 mm³.

El creixement tumoral de les cèl·lules 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L va ser inferior al dels tumors induïts amb les cèl·lules 468/Neo, i aquestes diferències es van fer més evidents a mesura que la mida dels tumors augmentava. La mitjana \pm error estàndard del volum dels tumors expressat en mm³ el dia de l'exèresi va ser: $138,53 \pm 14,84$ per als tumors 468/Bcl-2;

$80,29 \pm 9,07$ per als 468/Bcl-x_L i $266,13 \pm 14,07$ per als 468/Neo (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,03$).

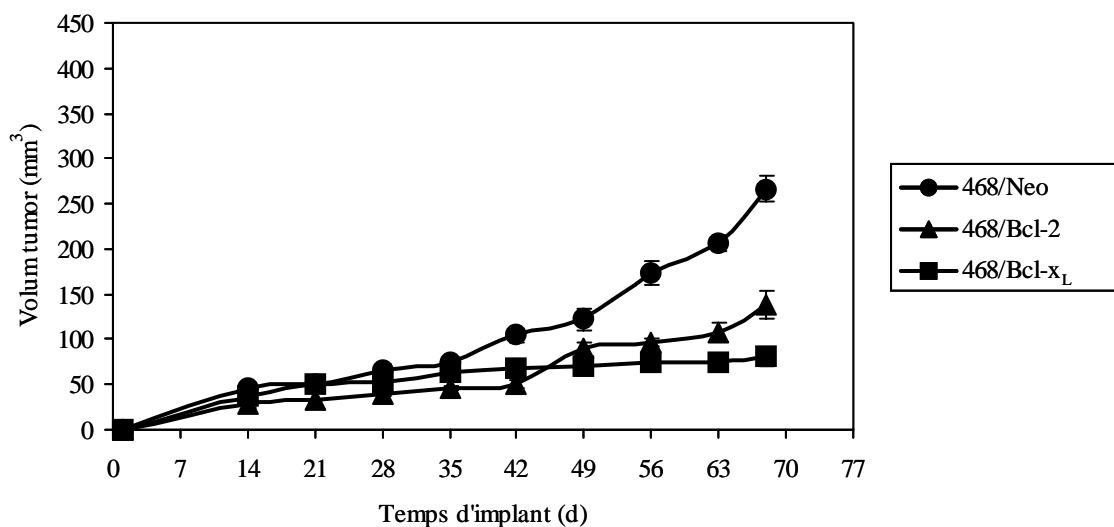


Figura 33.- Creixement dels tumors induïts per implantació ortotòpica dels transfectants 468/Neo, 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L. El volum dels tumors es va calcular utilitzant la fórmula: $\text{Volum (mm}^3\text{)} = a \times b^2/2$, on a i b són els diàmetres major i menor (en mm), respectivament, i els resultats representen la mitjana \pm error estàndard.

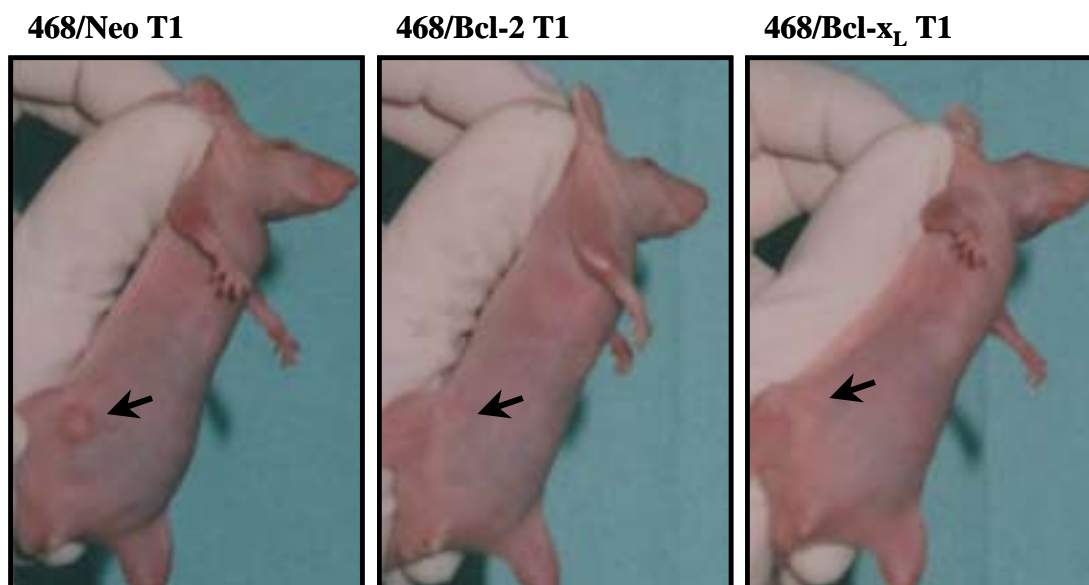


Figura 34.- Fotografies representatives dels tumors derivats de les cèl·lules 468/Neo, 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L creixent en ratlincs atímiques Balb-c/Nude el dia 42^è de l'implant.

Posteriorment, es va estudiar el cicle cel·lular i l'apoptosi dels tumors derivats de les cèl·lules 468/Neo, 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L per citometria de flux utilitzant l'anticòs anti-Citoqueratina 8/18, que és específic per a cèl·lules humanes (Figura 35).

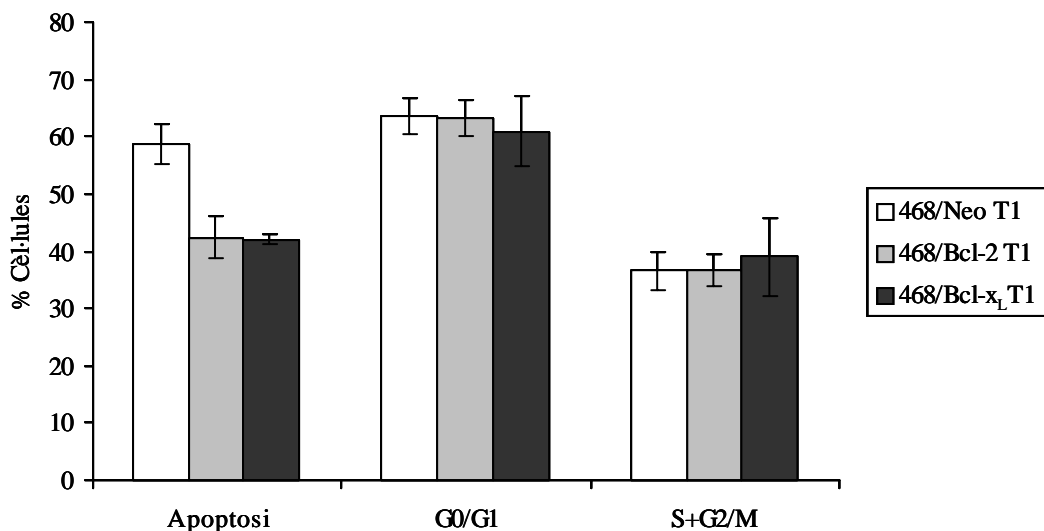


Figura 35.- Anàlisi del contingut d'ADN en les diferents fases del cicle cel·lular i l'apoptosi en els tumors de les cèl·lules 468/Neo, 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L. Es mostra la distribució de les cèl·lules en les fases G0/G1 i S+G2/M del cicle cel·lular i les cèl·lules amb un contingut d'ADN subdiploide es consideren cèl·lules apoptòtiques.

Els tumors 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L mostren menor apoptosi que els tumors 468/Neo. La mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules apoptòtiques va ser: $42,34 \pm 3,61$ en els tumors 468/Bcl-2; $42,09 \pm 0,93$ en els 468/Bcl-x_L i $58,64 \pm 3,60$ en els 468/Neo (ANOVA, $p=0,0007$). El contingut d'ADN en les diferents fases del cicle cel·lular va ser similar en els diferents tumors (ANOVA, $p=0,77$).

Per a les ratolines inoculades amb els transfectants 435/Bcl-2, 435/Bcl-x_L i 435/Neo la incidència de tumorigènesi va ser del 100%. Els tumors van aparèixer dues setmanes després de l'implant, i es van extirpar al cap de 49 dies (Figura 36).

El creixement dels tumors 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L és lleugerament major que el dels tumors 435/Neo. La mitjana ± error estàndard del volum dels tumors expressat en mm³ el dia de l'exèresi va ser: $89,83 \pm 4,98$ per als tumors 435/Bcl-2; $98,03 \pm 5,21$ per als 435/Bcl-x_L; $110,50 \pm 5,21$ per als 435/Bcl-x_L pool i $71,79 \pm 6,08$ per als 435/Neo. Aquestes diferències en la mida del tumor van ser estadísticament significatives (Kruskal-Wallis, $p=0,019$).

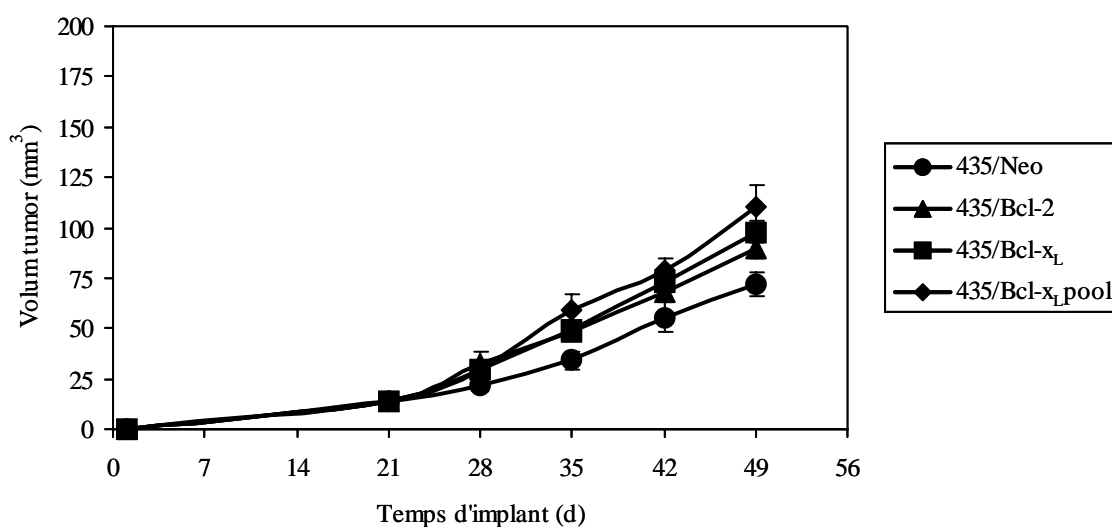


Figura 36.- Creixement dels tumors induïts per implantació ortotòpica dels transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les cèl·lules 435. El volum dels tumors es va calcular utilitzant la fórmula: Volum (mm³)= $a \times b^2/2$, on a i b són els diàmetres major i menor (en mm), respectivament, i els resultats representen la mitjana \pm error estàndard.

2.3.2.- Capacitat metastàtica

La línia cel·lular 468 no és metastàtica, i per analitzar el paper de Bcl-2 i Bcl-x_L en la inducció del fenotip metastàtic d'aquests tumors, es va fer el seguiment de les ratolines durant un any des de la implantació de les cèl·lules, havent extret els tumors als 68 dies.

Passat aquest temps les ratolines es van sacrificar i en la necròpsia no es van observar lesions metastàtiques aparents en els diferents ganglis limfàtics, els pulmons ni en cap dels òrgans de la cavitat peritoneal. Els ganglis limfàtics inguinals, lumbar, mesentèrics, axil·lars, mediastínic i cervicals i els pulmons es van extreure i es van incloure en parafina per analitzar-los histològicament.

L'estudi patològic de les mostres per tinció hematoxilina-eosina no va evidenciar micrometàstasis en els òrgans analitzats, fet que indica que la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L no és suficient per induir capacitat metastàtica a les cèl·lules 468.

Inicialment, els tumors de cèl·lules 435 són metastàtics, i generalment les ratolines es moren per metàstasis pulmonars al cap de 6-8 mesos de l'implant ortotòpic de les cèl·lules. Però la capacitat metastàtica dels tumors 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L es va posar de manifest al cap de 4 mesos de l'implant de les cèl·lules en les ratolines, que mostraven signes clínics de malaltia pulmonar.

Resultats

En la necròpsia es va observar la presència de metàstasis pulmonars en el 100% de les ratolines. Els pulmons es van fixar amb Bouin i les metàstasis es van comptar en la lupa estereoscòpica (Figura 37).

Bcl-2 i Bcl-x_L incrementen el potencial metastàtic de les cèl·lules 435, ja que els tumors 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L indueixen major nombre de metàstasis pulmonars ≤3 mm i >3 mm de diàmetre que els tumors 435/Neo. La mitjana ± error estàndard del nombre de metàstasis pulmonars ≤3 mm i >3 mm per ratolina van ser: 29,00 ± 7,56 i 4,5 ± 1,04 per als tumors 435/Bcl-2; 19,00 ± 5,34 i 8,5 ± 1,55 per als 435/Bcl-x_L; 22,00 ± 3,85 i 4,4 ± 0,98 per als 435/Bcl-x_L pool i 6,60 ± 1,81 per als 435/Neo, que no van incloure metàstasis >3 mm. Aquestes diferències en el nombre de metàstasis per ratolina va mostrar diferències estadísticament significatives entre els grups tant en les metàstasis ≤3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,025$) com en les >3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,004$).

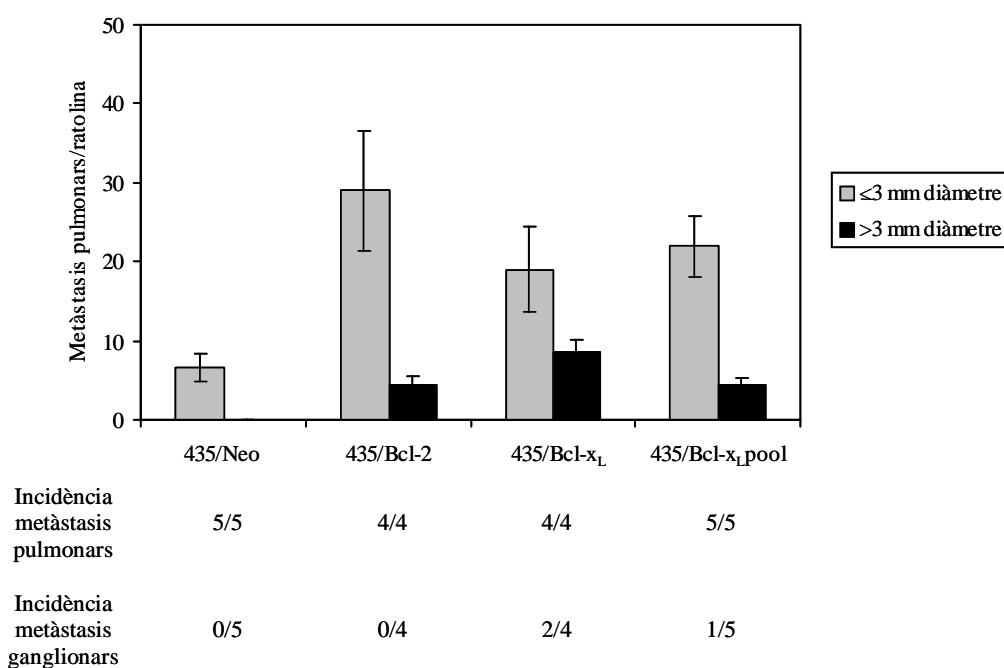


Figura 37.- Capacitat metastàtica de les cèl·lules 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L al cap de 4 mesos de l'implant ortotòpic. La gràfica mostra la mitjana del nombre de metàstasis pulmonars per ratolina, separades en metàstasis ≤3 mm i >3 mm de diàmetre. En la part inferior de la gràfica apareix la incidència de metàstasis pulmonars i ganglionars per cada una de les línies.

En la Figura 38 A es mostra l'aspecte macroscòpic de les diferències observades en el nombre de metàstasis pulmonars induïdes pels tumors 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L. L'anàlisi microscòpica d'alguns dels pulmons va evidenciar les metàstasis en el parènquima pulmonar de cèl·lules amb característiques de carcinoma de mama 435 (Figura 38 B).

Els ganglis limfàtics inguinals, lumbar, mesentèrics, axil·lars, mediastínic i cervicals també es van extreure i es van incloure en parafina per analitzar-los histològicament (Figura 37).

Les ratolines inoculades amb els transfectants de Bcl-x_L van desenvolupar metàstasis ganglionars en el 33% dels casos, sense detectar-se afectació ganglionar en les ratolines dels transfectants Neo ni Bcl-2.

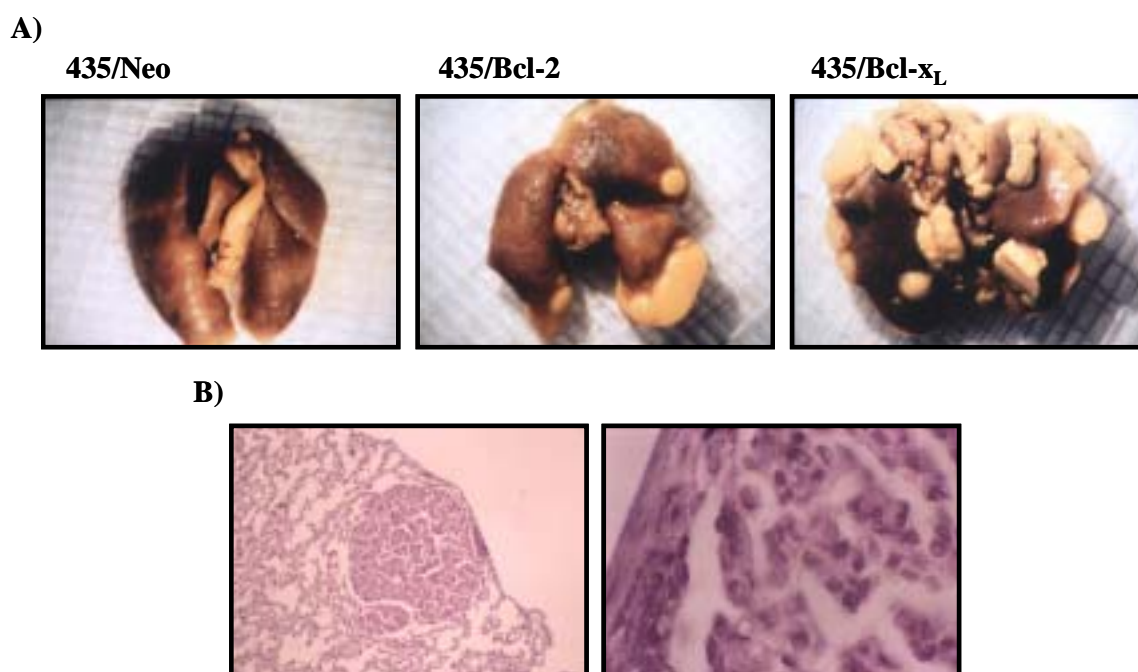


Figura 38.- Fotografies representatives de les metàstasis pulmonars ($\times 0,8$) induïdes pels tumors 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L al cap de 4 mesos de l'implant i.m.f.p. (A). Tinció d'hematoxilina-eosina d'una metàstasi pulmonar dels tumors 435/Bcl-x_L, visualitzada al microscopi òptic ($\times 33$), i un detall de l'anterior ($\times 200$) (B).

3.- Contribució de la inhibició de l'apoptosi induïda per sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L en la selecció del fenotip metastàtic

Per tal de determinar si la presència de Bcl-2 o Bcl-x_L i la consegüent inhibició de l'apoptosi induïda per aquestes proteïnes afavoria la selecció d'un fenotip metastàtic més agressiu en els tumors 435 o si induïa finalment el fenotip metastàtic en els tumors 468 no metastàtics, es van realitzar successius implants *in vivo/in vitro* de les cèl·lules derivades per cultiu primari (Figura 15).

Després de cada implant *in vivo/in vitro* es va comprovar que els nivells d'expressió de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-x_L es mantien al llarg del procediment experimental (Figura 39).

Es va observar que els tumors obtinguts del 3^r implant (468/Bcl-2 T3 i 435/Bcl-2 T3 i 435/Bcl-x_L T3) mantenen els nivells de sobreexpressió de les proteïnes Bcl-2 o Bcl-x_L similars als dels transfectants inicials.

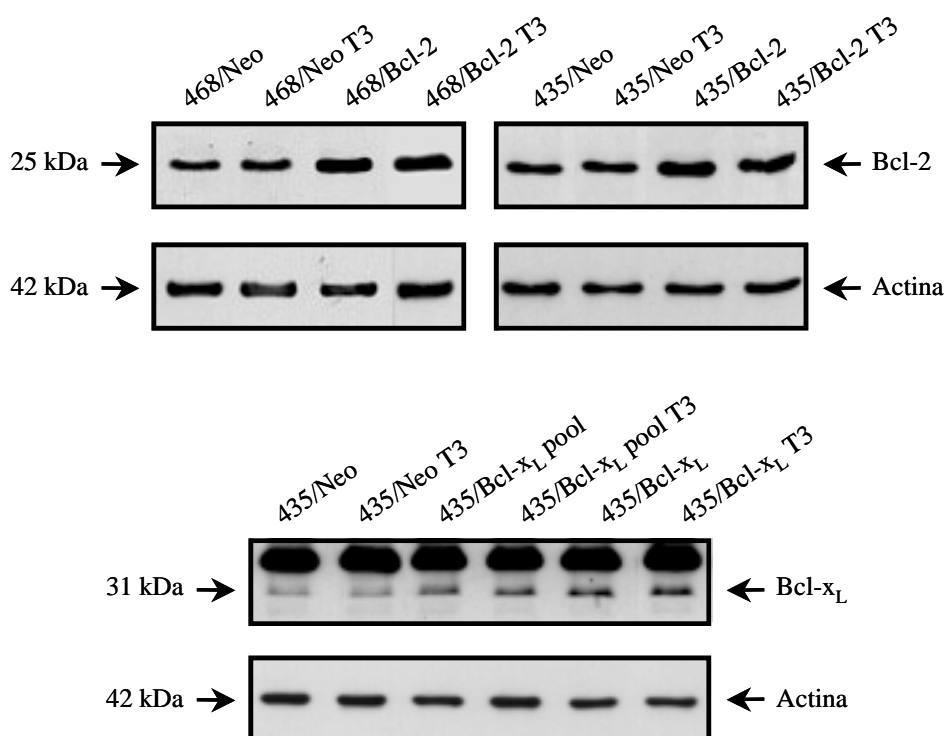
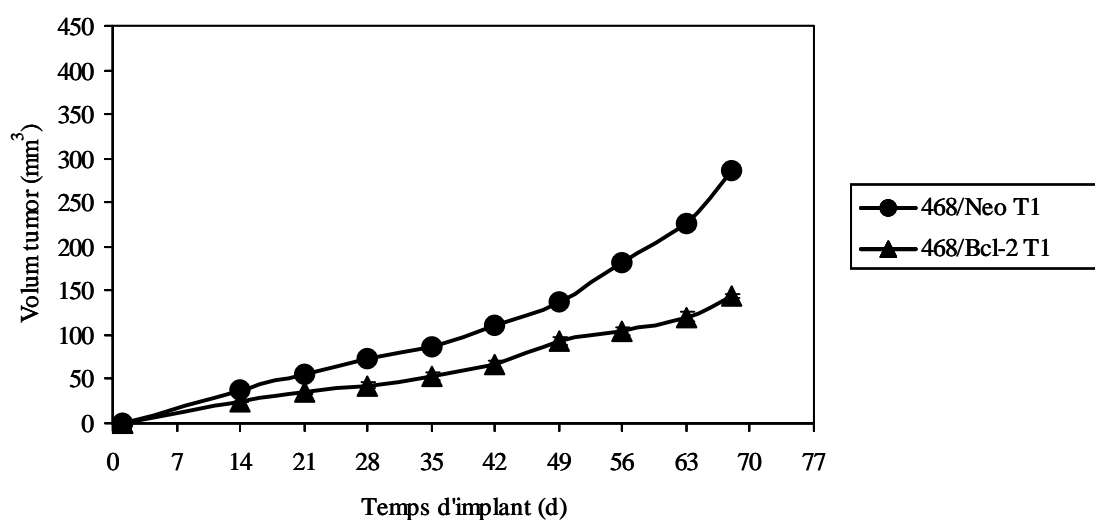


Figura 39.- Expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L en els successius implants *in vivo/in vitro* dels transfectants de les cèl·lules 468 i 435. Anàlisi per western blot de la proteïna Bcl-2 en els lisats de les cèl·lules 468/Neo, 468/Bcl-2, 435/Neo, 435/Bcl-2 i en les derivades dels tumors del 3^r implant: 468/Neo T3, 468/Bcl-2 T3, 435/Neo T3 i 435/Bcl-2 T3, i de la proteïna Bcl-x_L en els lisats de les cèl·lules 435/Neo, 435/Bcl-x_L pool, 435/Bcl-x_L i 435/Neo T3, 435/Bcl-x_L pool T3 i 435/Bcl-x_L T3. Es van carregar 50 µg de proteïna total de cada mostra, i l'expressió d'Actina es va utilitzar com a control de càrrega proteica.

3.1.- Capacitat tumorigèna en els reimplants

En la Figura 40 es representa el creixement dels tumors derivats del 2ⁿ i 3^r implant *in vivo/in vitro* de les cèl·lules 468 coinjectades amb matrigel, observant-se que Bcl-2 inhibeix el creixement dels tumors 468 en els successius implants *in vivo/in vitro*.

2ⁿ implant



3^r implant

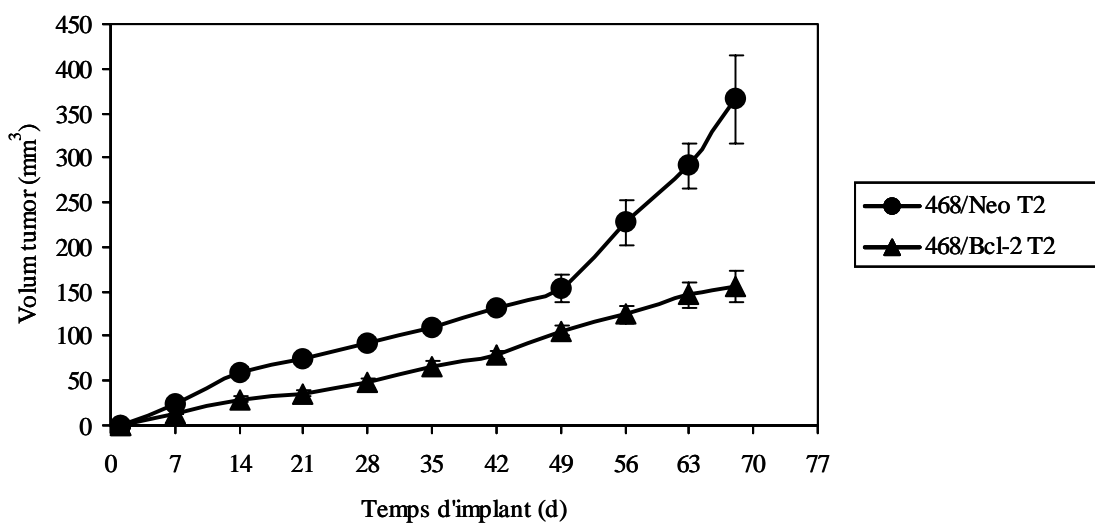


Figura 40.- Capacitat tumorigèna dels transfectants de Bcl-2 de les cèl·lules 468 després del 2ⁿ i 3^r implant *in vivo/in vitro*. Els resultats representen la mitjana del volum del tumor \pm error estàndard per cada grup experimental.

La incidència de tumorigènesi en les ratolines inoculades amb les cèl·lules 468 va ser del 100% en tots els casos, i es va observar disminució en el període de latència d'aparició dels tumors del 2ⁿ al 3^r implant ortotòpic. Així, en el 2ⁿ implant els tumors van ser mesurables el dia 14^e i, en el 3^r, el 7^e dia.

Resultats

Els tumors 468/Bcl-2 T1 (n=5) i T2 (n=6) van créixer menys que els respectius tumors 468/Neo T1 (n=5) i T2 (n=5), i aquestes diferències van augmentar amb els successius implants. La mitjana \pm error estàndard del volum dels tumors expressats en mm^3 el dia de l'exèresi van ser: en el 2ⁿ implant, $144,10 \pm 2,24$ per als tumors 468/Bcl-2 T1 i $286,21 \pm 5,66$ per als 468/Neo T1 (*Kruskal-Wallis*, $p=0,009$), i en el 3^{er} implant, $155,59 \pm 17,21$ per als 468/Bcl-2 T2 i $365,50 \pm 49,45$ per als 468/Neo T2 (*Kruskal-Wallis*, $p=0,006$).

Les dades del volum dels tumors obtingudes dels successius implants *in vivo/in vitro* es van analitzar utilitzant un model lineal mixt d'anàlisi del volum del tumor respecte del temps que inclou els efectes de l'implant i de la línia cel·lular.

Per tal d'ajustar les dades a la linearitat les mesures del volum del tumor es van transformar a escala logarítmica interpretant-se com a volum exponencial, i donat que el 7^è dia els valors diferien de la linearitat es va descartar aquest dia.

El model va permetre tractar cada implant per separat (1^{er}, 2ⁿ i 3^{er}) i agrupar les línies cel·lulars en dos grups (Neo i Bcl-2). Els pendents de cada implant ($p=0,32$) i de cada línia cel·lular ($p=0,13$) no van donar diferències estadísticament significatives a partir del dia 14^è. El model va generar una recta diferent per línia cel·lular i implant (Figura 41).

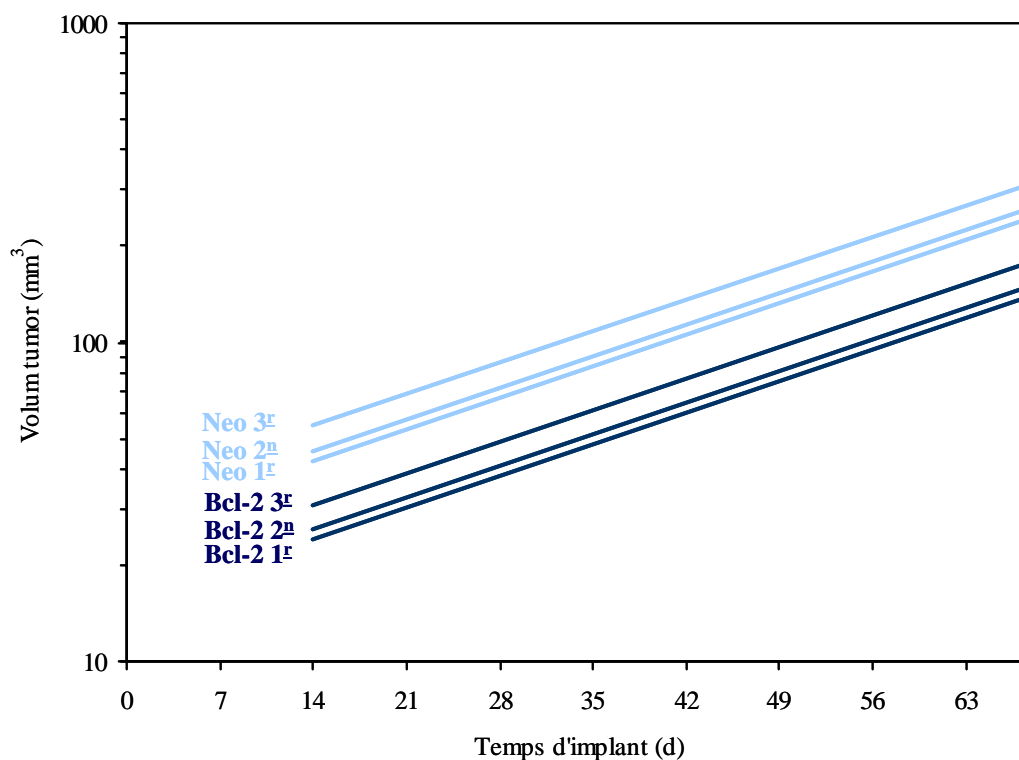


Figura 41.- Representació gràfica de la tumorigènesi dels transfectants 468 utilitzant l'ajust del model lineal mixt que compara el volum tumoral dels tres implants successius.

El pendent de les rectes ens dóna la velocitat de creixement dels tumors i es va mostrar que a partir del dia 14^è les rectes tenien el pendent constant per a totes les línies i tots els implants. Així, dels 14 als 68 dies, els tumors van presentar creixement exponencial augmentant cada dia un 4,8% el seu volum.

El dia 14^è es va observar que ja s'havien establert les diferències en el volum dels tumors Neo i Bcl-2 ($p < 0,0001$) i aquestes diferències es van incrementar amb els successius implants ($p < 0,0001$).

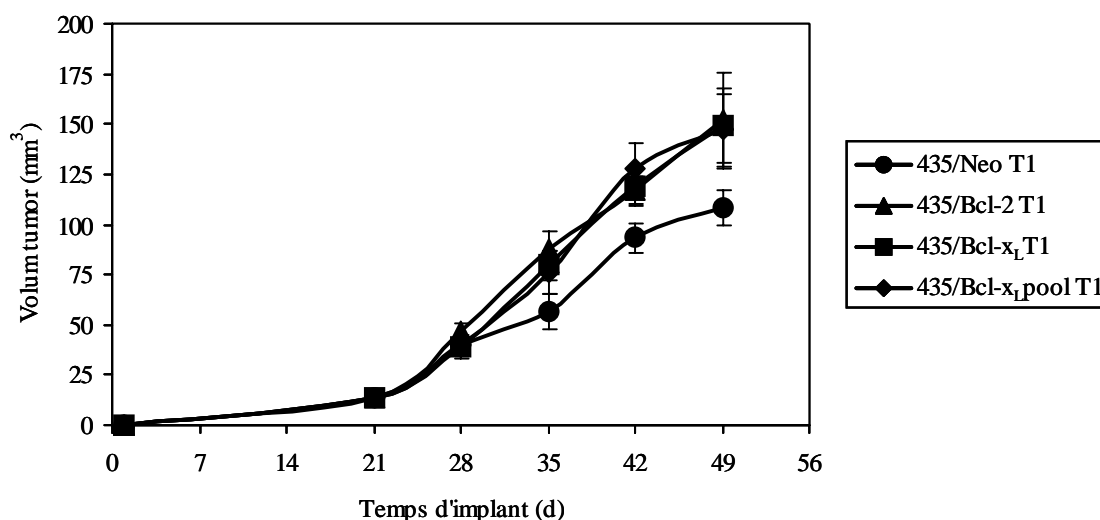
El creixement dels tumors derivats del 2ⁿ i 3^r implant *in vivo/in vitro* de les cèl·lules 435 es mostra en la Figura 42, i s'observa que Bcl-2 i Bcl-x_L incrementen el volum dels tumors amb els successius implants *in vivo/in vitro*.

La incidència dels tumors 435 va ser del 100% en tots els casos, i es va observar una disminució en el període d'aparició dels tumors del 2ⁿ al 3^r implant. Així, en el 2ⁿ implant els tumors es van fer aparents el dia 21^è i, en el 3^r, el dia 14^è.

El volum dels tumors va augmentar amb els successius implants *in vivo/in vitro*, i es va assolir un mateix volum en un interval de temps cada cop menor. Així, en el 3^r implant els tumors es van extirpar dues setmanes abans del període prèviament establert de 49 dies, perquè al cap de 35 dies ja tenien un volum similar al dels altres dos implants.

En el 2ⁿ i 3^r implants també es va observar que el creixement dels tumors 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L era lleugerament major que el dels tumors 435/Neo, i aquestes diferències es van incrementar amb els implants. La mitjana \pm error estàndard del volum dels tumors expressat en mm³ el dia de l'exèresi va ser: en el 2ⁿ implant, 151,86 \pm 23,61 per als tumors 435/Bcl-2 T1; 149,24 \pm 18,53 per als 435/Bcl-x_L T1; 146,97 \pm 18,22 per als 435/Bcl-x_L pool T1 i 107,97 \pm 8,84 per als 435/Neo T1 (*Kruskal-Wallis*, $p=0,25$), i en el 3^r implant, 127,72 \pm 11,21 per als 435/Bcl-2 T2; 166,87 \pm 9,51 per als 435/Bcl-x_L T2; 166,10 \pm 25,61 per als 435/Bcl-x_L pool T2 i 96,20 \pm 12,11 per als 468/Neo T2 (*Kruskal-Wallis*, $p=0,027$).

2^a implant



3^a implant

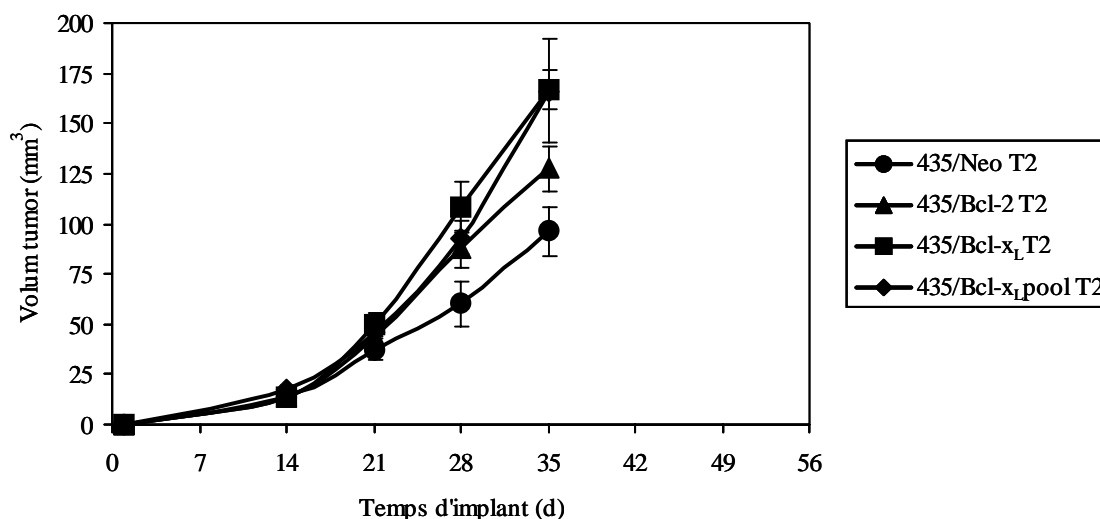


Figura 42.- Capacitat tumorigena dels transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les cèl·lules 435 després del 2^a i 3^a implant *in vivo/in vitro*. Els resultats representen la mitjana del volum del tumor ± error estàndard per cada grup experimental.

Les dades del volum dels tumors derivades dels successius implants *in vivo/in vitro* també es van analitzar utilitzant el model lineal mixt d'anàlisi del volum del tumor respecte del temps que inclou els efectes de l'implant i de la línia cel·lular.

El model va permetre tractar cada implant per separat (1^a, 2^a i 3^a) i agrupar les línies cel·lulars en dos grups (Neo i Bcl). El pendent de cada implant va donar diferències estadísticament significatives entre elles ($p=0,0001$) i les línies cel·lulars 435/Bcl-2, 435/Bcl-x_L i 435/Bcl-x_L pool es van englobar en el grup anomenat Bcl, donat que no van mostrar diferències estadísticament significatives entre elles ($p=0,2804$). El model va generar una recta

per línia cel·lular i implant (Figura 43).

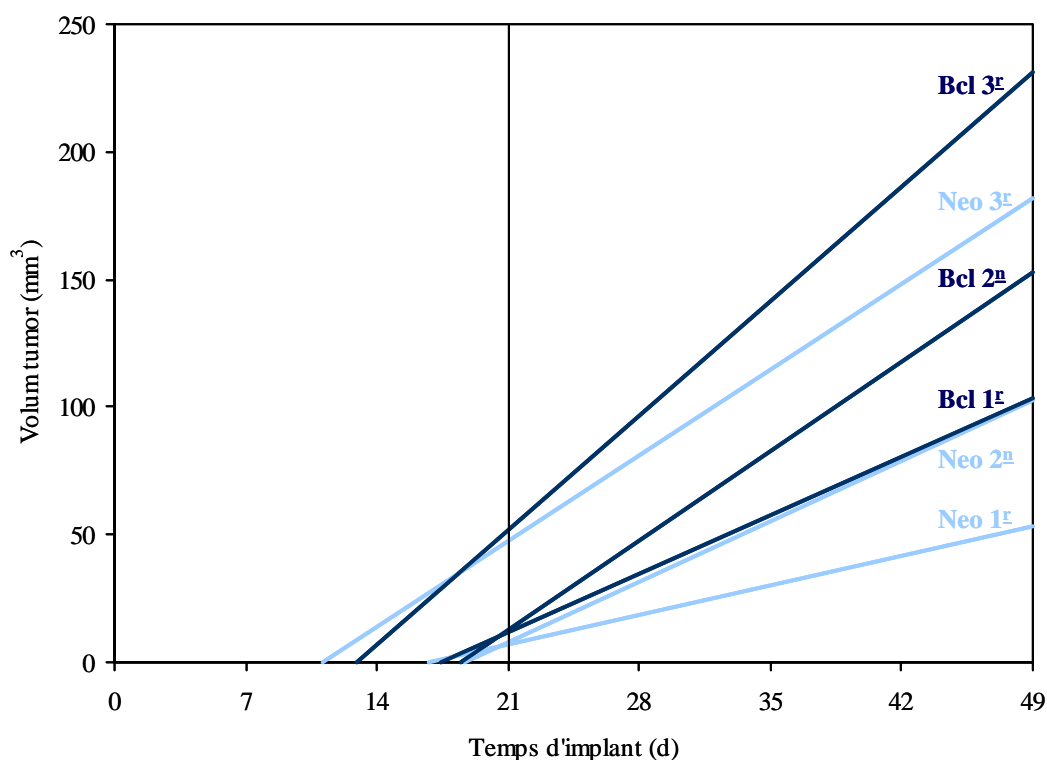


Figura 43.- Representació gràfica de la tumorigènesi dels transfectants 435 utilitzant l'ajust del model lineal mixt que compara el volum tumoral dels tres implants successius. El model genera una recta per línia cel·lular i implant. El punt de tall amb l'eix d'abscisses ens dona el moment en què comencen a créixer els tumors, i el pendent de les rectes la seva velocitat de creixement.

El punt de tall amb l'eix d'abscisses ens dona el moment en què comencen a créixer els tumors, observant-se que els tumors del 3^r implant comencen a créixer abans que els del 1^r i 2ⁿ. Així, el punt de tall de les rectes Neo 3^r i Bcl 3^r amb l'eix d'abscisses va estar entre els 11-13 dies, mentre que el dels Neo i Bcl del 1^r i 2ⁿ implant van estar al voltant dels 17-19 dies. Tanmateix, no s'observen diferències entre Neo i Bcl en l'inici del creixement dels tumors.

La intersecció de les rectes amb l'eix d'ordenades no és cap dada rellevant, donat que és una perllongació de les rectes i implicaria volums negatius.

El pendent de les rectes ens dona la velocitat de creixement dels tumors, i es va observar que la velocitat de creixement és major en els tumors Bcl respecte als Neo ($p < 0,0001$), i que aquest augment s'incrementa amb els successius implants *in vivo/in vitro* ($p < 0,0001$).

3.2.- Capacitat metastàtica en els reimplants

Donat que després d'un any de seguiment de l'evolució de les ratolines implantades amb les cèl·lules 468/Bcl-2 i 468/Bcl-x_L no es va induir el fenotip metastàtic, els experiments de selecció *in vivo/in vitro* es van realitzar només per als transfectants de Bcl-2.

En el 2ⁿ i 3^r implant, els tumors 468/Bcl-2 T1 i 468/Bcl-2 T2, respectivament, no van desenvolupar metàstasis. En la necròpsia no es van observar lesions metastàtiques aparents en els diferents ganglis limfàtics, els pulmons ni en cap dels òrgans de la cavitat peritoneal. Els ganglis limfàtics inguinals, lumbar, mesentèrics, axil·lars, mediastínic i cervicals i els pulmons es van extreure i es van incloure en parafina per analitzar-los histològicament.

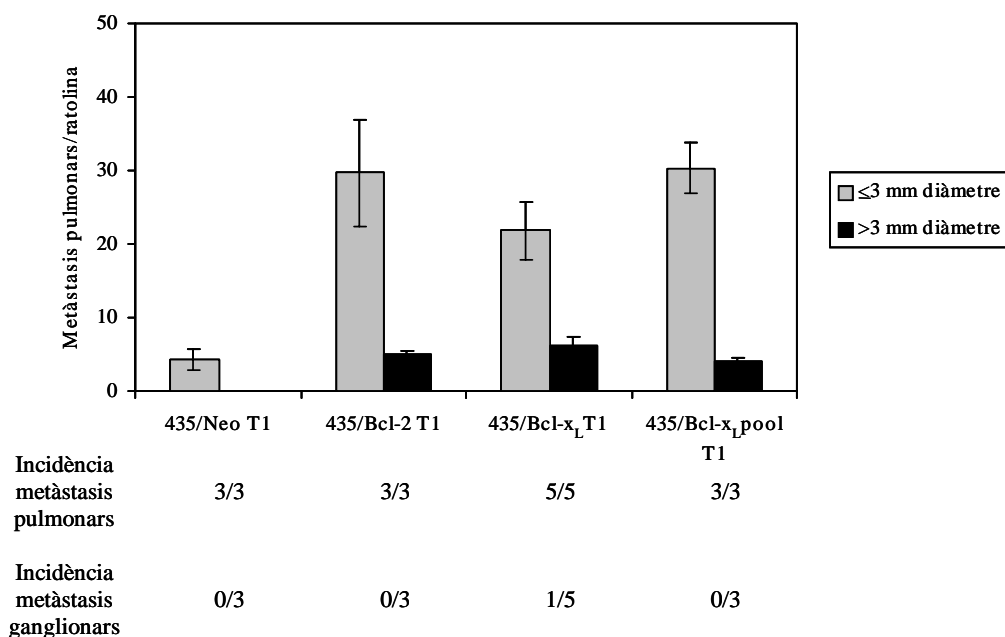
L'estudi histològic de les mostres per tinció hematoxilina-eosina va mostrar que, després dels successius implants en l'animal d'experimentació, Bcl-2 no és capaç d'induir capacitat metastàtica a les cèl·lules 468 no metastàtiques.

En la Figura 44 es mostra la capacitat metastàtica dels tumors 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L del 2ⁿ i 3^r implant.

En el 2ⁿ implant, els tumors de 435/Bcl-2 T1 i 435/Bcl-x_L T1 produeixen major nombre de metàstasis pulmonars ≤ 3 mm, i > 3 mm de diàmetre que els tumors 435/Neo T1, sent aquest augment similar a l'observat en el del 1^r implant ortotòpic. La mitjana \pm error estàndard del nombre de metàstasis pulmonars ≤ 3 mm i > 3 mm per ratolina van ser: $29,67 \pm 7,31$ i $5,00 \pm 0,58$ per als tumors 435/Bcl-2 T1; $30,33 \pm 3,53$ i $4,00 \pm 0,58$ per als 435/Bcl-x_L pool T1; $21,80 \pm 4,00$ i $6,20 \pm 1,20$ per als 435/Bcl-x_L T1 i $4,33 \pm 1,45$ per als 435/Neo T1, que no van induir metàstasis > 3 mm. La mitjana del nombre de metàstasis per ratolina va mostrar diferències estadísticament significatives entre els grups tant en les metàstasis ≤ 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,05$) com en les > 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,045$).

En el 3^r implant, els tumors 435/Bcl-2 T2 i 435/Bcl-x_L pool T2 també donen major nombre de metàstasis pulmonars ≤ 3 mm, i > 3 mm de diàmetre que els transfectants 435/Neo T2, augmentant respecte al 1^r i 2ⁿ implant. La mitjana \pm error estàndard de les metàstasis pulmonars ≤ 3 mm i > 3 mm per ratolina van ser: $35,80 \pm 8,60$ i $11,60 \pm 1,96$ per als tumors 435/Bcl-2 T2; $31,40 \pm 3,80$ i $8,80 \pm 2,08$ per als 435/Bcl-x_L pool T2; $4,40 \pm 1,17$ per als 435/Bcl-x_L T2 i $7,25 \pm 2,87$ per als 435/Neo T2, que no van induir metàstasis > 3 mm. Aquestes divergències en el nombre de metàstasis per ratolina van mostrar diferències estadísticament significatives entre els grups tant en les metàstasis ≤ 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,004$) com en les > 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,002$).

2^a implant



3^a implant

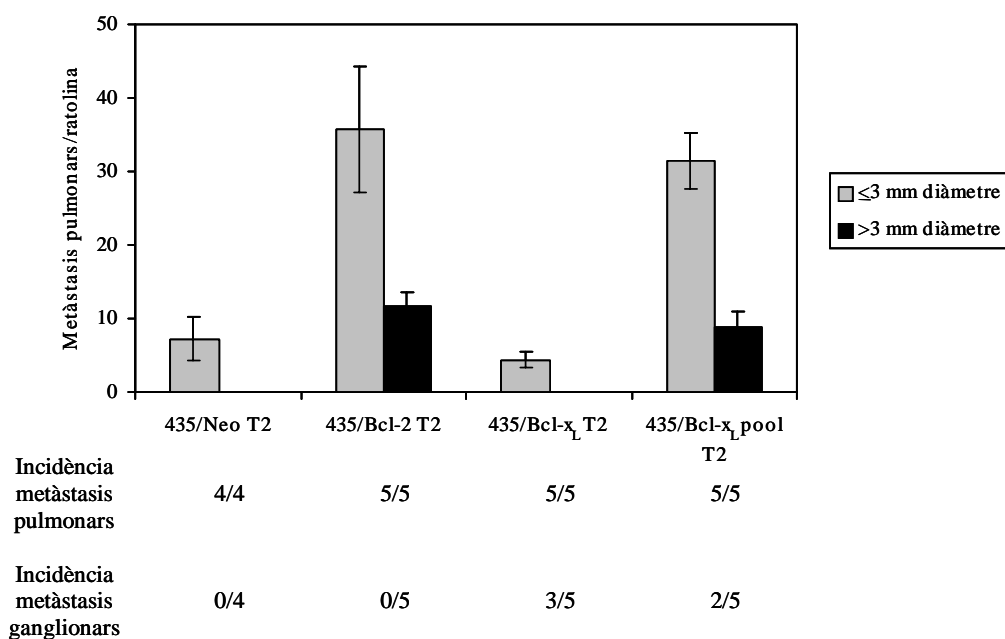


Figura 44.- Capacitat metastàtica dels transfectants de Bcl-2 i Bcl-x_L de les cèl·lules 435 després del 2^a i 3^a implant *in vivo/in vitro* al cap de 4 mesos de l'implant ortotòpic. La gràfica mostra la mitjana del nombre de metàstasis pulmonars per ratolina, que es separen en metàstasis ≤3 mm i >3 mm de diàmetre. En la part inferior de la gràfica apareix la incidència de metàstasis pulmonars i ganglionars per cada un dels grups.

A)

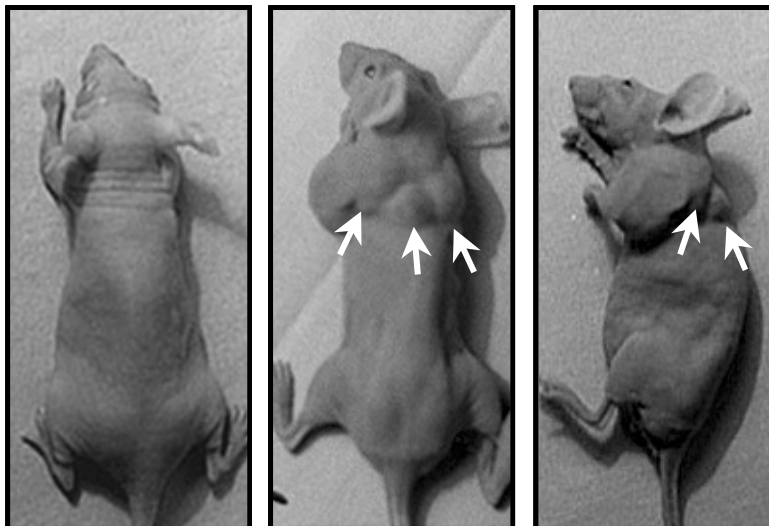
435/Bcl-x_L T2



B)

435/Neo T2

435/Bcl-x_L T2



C)

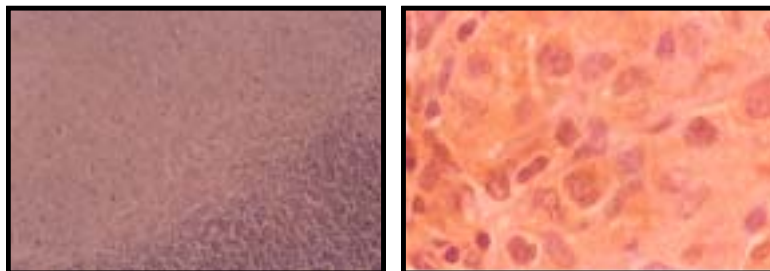


Figura 45.- Fotografies representatives de l'organoespecificitat metastàtica de les cèl·lules 435/Bcl-x_L T2. A) Pulmons de ratolines inoculades amb les cèl·lules 435/Bcl-x_L T2, en què s'observen majoritàriament metàstasis en els ganglis mediastínic (×0,8). B) Metàstasis ganglionars cervicals i axil·lars de tumors 435/Bcl-x_L T2. C) Anàlisi histològica d'una metàstasi ganglionar cervical 435/Bcl-x_L T2 on es mostra, a l'esquerra, la infiltració ganglionar del teixit tenyit amb hematoxilina-eosina i, a la dreta, l'expressió IHC de Bcl-x_L.

Tanmateix, els tumors 435/Bcl-x_L T2 van presentar un nombre molt baix de metàstasis pulmonars, i en aquest cas les ratolines van morir per metàstasis ganglionars i no per metàstasis pulmonars. Bcl-x_L afavoreix la metàstasi ganglionar en cèl·lules 435 amb els successius implants *in vivo/in vitro*, observant-se que un 60% de les ratolines presentava els ganglis mediastínic, cervicals i axil·lars afectats, i els pulmons pràcticament lliures de metàstasi (Figura 45).

En els tumors 435/Bcl-x_L pool T2, un 40% de les ratolines van presentar metàstasis ganglionars, encara que també presentava metàstasis pulmonars. En contraposició, cap de les ratolines inoculades amb els transfectants de Bcl-2 van mostrar ganglis afectats, igual que les ratolines inoculades amb la línia Neo.

En conseqüència, s'esdevé un canvi en l'organoespecificitat de les metàstasis en els transfectants de Bcl-x_L de les cèl·lules 435.

4.- Reversió del fenotip metastàtic amb una construcció antisentit de *bcl-x_L*

Per tal de demostrar que el creixement de les metàstasis està lligat a la sobreexpressió de Bcl-*x_L*, la línia cel·lular 435/Bcl-*x_L* es va cotransfectar amb el vector d'expressió ZeoSV2 (+) contenint una seqüència de 0,6 kb de l'ADNc del gen antiapoptòtic *bcl-x_L* en orientació antisentit o sense la inserció, com a control.

L'expressió proteica de Bcl-*x_L* es va determinar per western blot utilitzant un anticòs policlonal anti-Bcl-x (Figura 46).

Els transfectants de Bcl-*x_L* antisentit mostren menys expressió de la proteïna que les cèl·lules 435/Bcl-*x_L*, i fins i tot els nivells observats són lleugerament menors als de les cèl·lules Neo.

En els clons seleccionats la cotransfecció amb la seqüència antisentit de *bcl-x_L* no va modificar els nivells de la proteïna proapoptòtica Bcl-*x_S*. És a dir, cal que no hi hagi reducció de proteïnes proapoptòtiques perquè pugui induir-se la mort cel·lular.

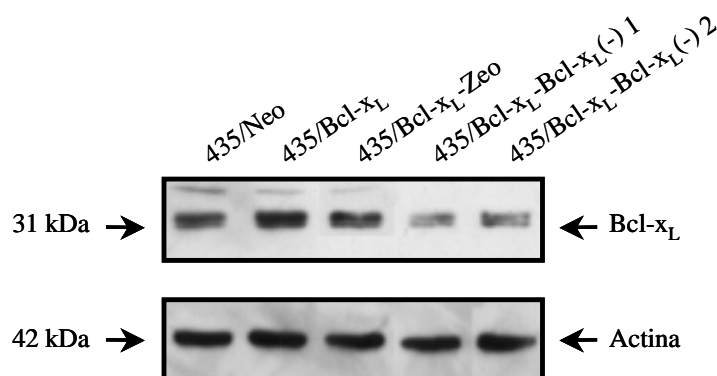


Figura 46.- Expressió de Bcl-*x_L* en els transfectants antisentit de les cèl·lules 435/Bcl-*x_L*. Anàlisi per western blot de la proteïna Bcl-*x_L* en els lisats cel·lulars 435/Neo, 435/Bcl-*x_L*, 435/Bcl-*x_L*-Zeo i 435/Bcl-*x_L*-Bcl-*x_L*(-) antisentit. Es van carregar 50 µg de proteïna total de cada mostra, i l'expressió d'Actina es va utilitzar com a control de càrrega proteica.

4.1.- Apoptosi induïda per TGF-β i TNF-α

En els transfectants 435/Bcl-*x_L*-Bcl-*x_L*(-) es van realitzar tests biològics per tal d'estudiar si la disminució de l'expressió de Bcl-*x_L* en les cèl·lules 435/Bcl-*x_L* era capaç de revertir la resistència a l'apoptosi observada prèviament. Es va analitzar la supervivència cel·lular dels clons antisentit enfront dels factors de creixement TGF-β i TNF-α testats anteriorment, i

s'observà que la seqüència de *bcl-x_L* antisentit indueix apoptosi en les cèl·lules 435/Bcl-*x_L*-Bcl-*x_L*(-) a nivells similars als que mostren les cèl·lules 435/Neo (Figura 47). Així, a 5 ng/ml de TGF- β i a 200 U/ml de TNF- α , la viabilitat cel·lular per a les cèl·lules 435/Bcl-*x_L* va ser del 80-90%, i aquesta viabilitat va disminuir en les cèl·lules 435/Bcl-*x_L*-Bcl-*x_L*(-) antisentit d'un 40-50%. La inducció d'apoptosi en les cèl·lules 435/Bcl-*x_L*-Bcl-*x_L*(-) antisentit va ser lleugerament menor a l'observada en les cèl·lules 435/Neo, fet que podria correspondre a uns nivells de Bcl-*x_L* també menors en aquests clons respecte al clon Neo.

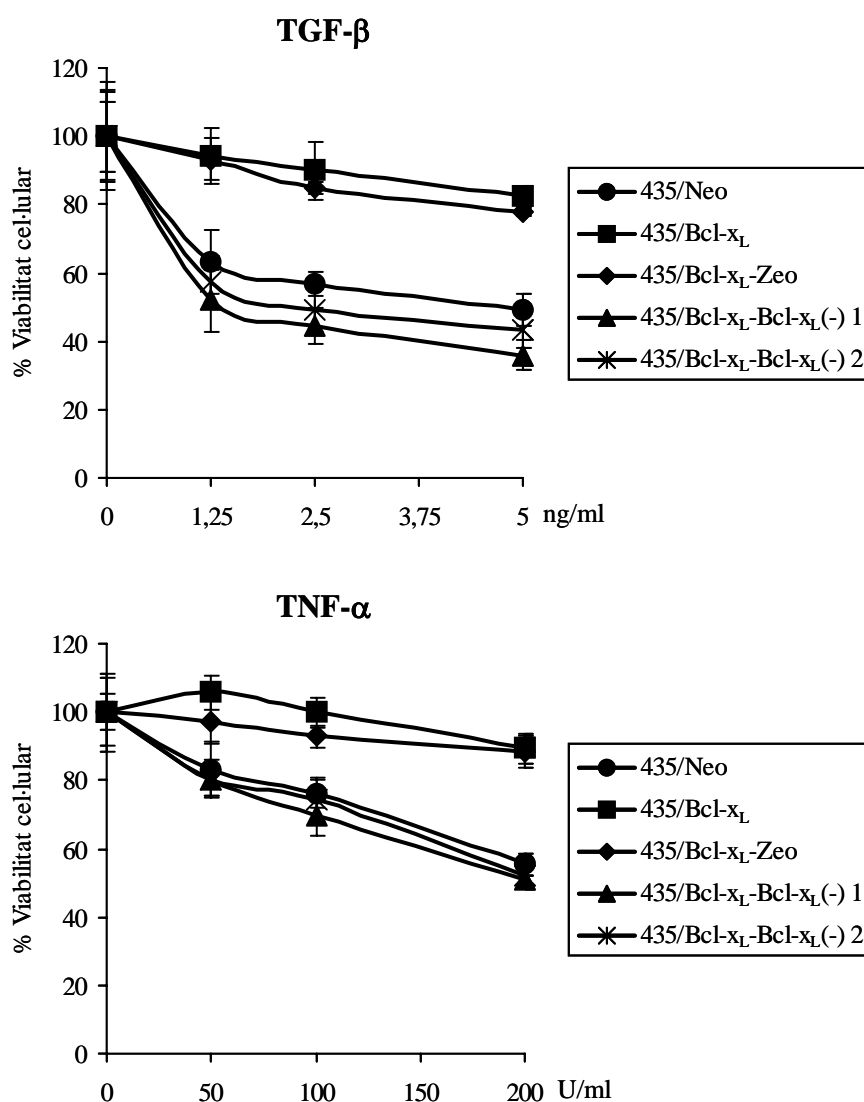


Figura 47.- Viabilitat cel·lular dels transfectants de Bcl-*x_L* antisentit de la línia 435/Bcl-*x_L*. Aquesta gràfica mostra el percentatge de viabilitat cel·lular mesurat per l'assaig de l'MTT, on les cèl·lules de Bcl-*x_L* van ser cultivats sense sèrum en presència de (h)TGF- β a 1,25-5 ng/ml o r(h)TNF- α a 50-200 U/ml durant 120 h.

4.2.- Adhesió cel·lular a proteïnes de la matriu extracel·lular

In vitro també es va analitzar si la disminució dels nivells de Bcl-x_L recuperava l'adhesió cel·lular en diverses proteïnes de la matriu extracel·lular (Figura 48).

La disminució dels nivells de proteïna Bcl-x_L s'associa a augment de l'adhesió a proteïnes de la matriu extracel·lular (laminina i col·lagen IV), a nivells comparables al transfectant Neo. Així, els transfectants antisentit de Bcl-x_L van recuperar un 25% de l'adhesió cel·lular a la laminina i un 18% al col·lagen IV respecte a la del transfectant 435/Bcl-x_L (ANOVA, $p < 0,0001$).

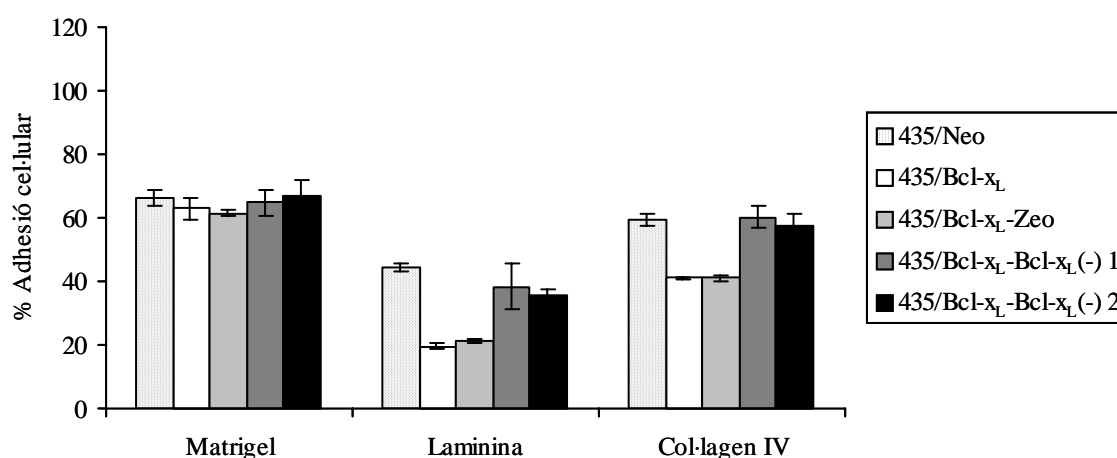


Figura 48.- Adhesió dels transfectants antisentit de Bcl-x_L obtinguts de les cèl·lules 435/Bcl-x_L. Els resultats s'expressen com a percentatge de cèl·lules adherides a matrigel, laminina i col·lagen IV respecte a les cèl·lules sembrades, i representen la mitjana ± desviació estàndard de 3 experiments independents fets per triplicat.

4.3.- Capacitat tumorigèna i metastàtica

En la Figura 49 es representa el creixement tumoral i.m.f.p. per a un dels transfectants antisentit de les cèl·lules 435/Bcl-x_L.

La incidència en l'aparició del tumor va ser del 100% en tots els casos. Els tumors van aparèixer dues setmanes després de l'implant, i es van extirpar al cap de 49 dies. El creixement dels tumors 435/Bcl-x_L-Bcl-x_L(-) antisentit va ser lleugerament menor que el dels tumors 435/Bcl-x_L-Zeo i 435/Bcl-x_L. La mitjana ± error estàndard del volum dels tumors expressat en mm³ el dia de l'exèresi va ser: 73,69 ± 6,06 per als tumors 435/Bcl-x_L-Bcl-x_L(-) antisentit; 88,51 ± 6,46 per als 435/Bcl-x_L-Zeo i 98,25 ± 9,86 per als 435/Bcl-x_L (Kruskal-Wallis, $p = 0,12$).

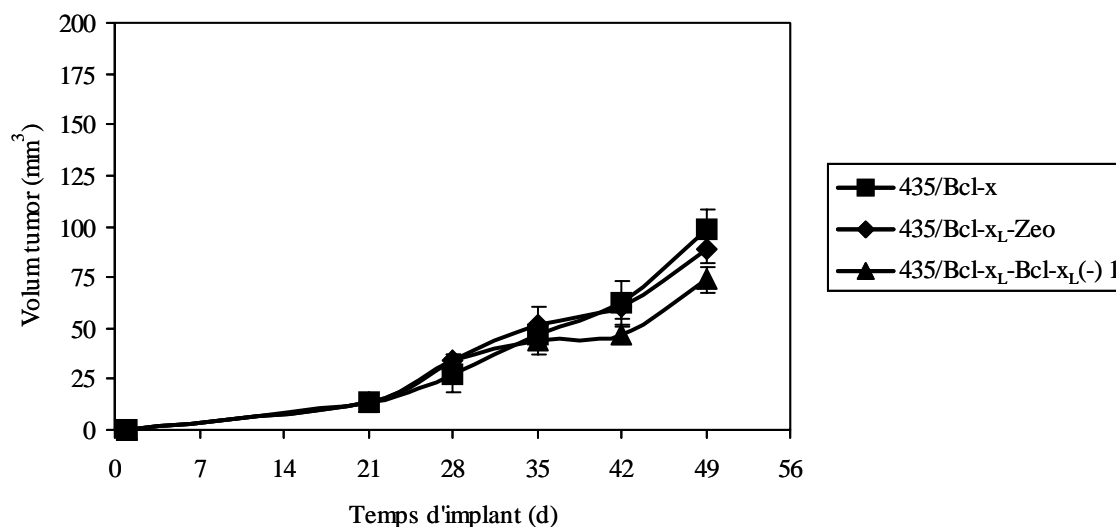


Figura 49.- Creixement dels tumors induïts per implantació ortotòpica d'un dels transfectants antisentit de Bcl-x_L. El volum dels tumors es va calcular utilitzant la fórmula: Volum (mm³)= $a \times b^2/2$, on a i b són els diàmetres major i menor (en mm), respectivament, i els resultats representen la mitjana \pm error estàndard.

La seqüència antisentit de *bcl-x_L* pot induir la reversió del fenotip metastàtic que s'esdevé en les cèl·lules 435/Bcl-x_L. Els tumors 435/Bcl-x_L-Bcl-x_L(-) antisentit no indueixen metàstasis pulmonars ≤ 3 mm ni >3 mm de diàmetre al cap de 4 mesos de l'implant ortotòpic. La incidència de metàstasis pulmonars per als tumors 435/Bcl-x_L i 435/Bcl-x_L-Zeo va ser del 100%. Així, la mitjana \pm error estàndard de les metàstasis pulmonars ≤ 3 mm i >3 mm per ratolina van ser: $27,50 \pm 7,50$ i $8,00 \pm 3,77$ per als tumors 435/Bcl-x_L i $22,00 \pm 4,00$ i $4,00 \pm 1,56$ per als 435/Bcl-x_L-Zeo.

Altrament, no es va detectar afectació ganglionar en les ratolines inoculades amb el transfectant antisentit, contràriament a l'observat en les inoculades amb els transfectants de Bcl-x_L i Bcl-x_L-Zeo, que van desenvolupar metàstasis ganglionars en el 25% dels casos.

V.- Discussió

Els mecanismes moleculars i cel·lulars responsables del fenotip metastàtic en el càncer de mama són poc coneguts. Això és degut en part al fet que el procés metastàtic involucra una sèrie d'esdeveniments interconnectats pels quals les cèl·lules tumorals resisteixen una pressió considerable provocada per les cèl·lules de l'hoste, capaces de produir citocines i factors de creixement i interaccionar activament amb les cèl·lules invasores (Fidler, 1997). Tanmateix, l'habilitat de les cèl·lules tumorals per resistir els senyals de mort podria contribuir a crear les condicions favorables per al desenvolupament de les metàstasis. Entre les etapes del procés metastàtic que podrien estar afavorint-se s'inclourien la supervivència en el torrent sanguini (Nikiforov *i col.*, 1997) i l'estat de *dormancy* de les micrometàstasis (Holmgren *i col.*, 1995), entre d'altres.

Conceptualment, aquesta relació entre la metàstasi i la resistència a l'apoptosi sembla òbvia donat que les cèl·lules tumorals, durant el procés metastàtic, han de ser capaces de preservar la viabilitat cel·lular sota condicions que podrien ser deletèries. De fet, Raff (1992) va proposar que la inhibició de la mort cel·lular programada de les cèl·lules depèn dels senyals de supervivència generats pel microentorn específic; aquest requeriment pot servir per evitar l'expansió aberrant i/o migració en teixits normals i permetre la regulació dinàmica de la mida dels teixits. Aquest model prediria que les cèl·lules metastàtiques han d'adquirir nous mecanismes per inhibir l'apoptosi un cop deixen el microentorn del teixit del tumor d'origen, ja sigui mitjançant interaccions específiques amb el nou microentorn, per sobrerregulació de mecanismes cel·lulars o per ambdues causes. El microentorn del teixit local de l'hoste té un paper decisiu en la metàstasi, donat que la interacció entre les cèl·lules tumorals i els diversos tipus cel·lulars de l'hoste desencadenen vies d'invasió, proliferació i supervivència (Liotta i Kohn, 2001).

Existeixen evidències que indiquen que la metàstasi pot ser incrementada per l'habilitat de les cèl·lules a resistir els estímuls inductors de mort (Shtivelman, 1997). L'ús de línies cel·lulars canceroses amb potencial metastàtic diferent ha demostrat una associació fenotípica del potencial altament metastàtic amb la resistència incrementada a l'apoptosi en un model de metàstasis experimentals de melanoma murí B16 (Glinsky *i col.*, 1996) i en cèl·lules de carcinoma de mama humana (Glinsky *i col.*, 1997). Així, les cèl·lules menys metastàtiques són més sensibles a la inducció d'apoptosi *in vitro*, indicant que les més metastàtiques adquireixen algun avantatge intrínsec de supervivència.

Els tumors organotòpics de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana amb activitat metastàtica presenten nivells d'apoptosi menors que els obtinguts amb cèl·lules no metastàtiques. Aquesta disminució de l'apoptosi pot associar-se a la sobreexpressió de les

proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en els tumors. Aquestes dades preliminars ens portaren a l'anàlisi de transferència gènica de *bcl-2* i *bcl-x_L*, utilitzant diversos models cel·lulars de carcinoma de mama essencials per establir una associació genètica entre la resistència a l'apoptosi i el fenotip metastàtic del càncer de mama.

1.- Influència de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L en el fenotip metastàtic de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana

En aquest estudi es mostra que la sobreexpressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L incrementen el potencial metastàtic de cèl·lules de carcinoma de mama. La resistència a l'apoptosi que indueixen aquestes proteïnes s'esdevé per un mecanisme a través del qual les cèl·lules poden assolir amb èxit les diferents etapes de la progressió metastàtica.

Bcl-2 i Bcl-x_L afavoreixen l'activitat metastàtica de les cèl·lules 435 en diferents etapes del procés: disminució de l'adhesió cel·lular a proteïnes de la matriu extracel·lular, inhibició de la mort cel·lular per desadhesió de la matriu extracel·lular o *anoikis* i avantatge per sobreviure en el torrent sanguini i/o en l'òrgan diana facilitant el creixement metastàtic.

La inhibició de l'apoptosi i de l'*anoikis* induïdes per la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L requereix alhora altres alteracions genètiques necessàries perquè les cèl·lules de càncer de mama esdevinguin metastàtiques. Així, Bcl-2 i Bcl-x_L no indueixen el fenotip metastàtic dels tumors obtinguts amb les cèl·lules no metastàtiques 468. Aquestes cèl·lules tumorals, tot i que presenten el gen *p53* mutat, no posseeixen els requeriments oncogènics necessaris per assolir el fenotip metastàtic, i ni Bcl-2 ni Bcl-x_L tenen la capacitat d'induir-los. En realitat, els nostres resultats recolzen la idea que existeix una base genètica i molecular lligada al fenotip metastàtic en el càncer de mama, i que l'acció de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L estaria condicionada per la dotació oncogènica de les cèl·lules, participant en l'avantatge de creixement selectiu durant la progressió tumoral.

1.1.- Relació de la cèl·lula amb el microentorn

Durant el procés metastàtic, les cèl·lules tumorals s'han de desprendre del tumor primari i, posteriorment, sobreviure sense les interaccions adients entre les seves molècules de superfície i les proteïnes de la matriu extracel·lular (Hart i Saini, 1992). Les proteïnes de la matriu extracel·lular són típicament grans glicoproteïnes, entre les quals s'inclouen el col·lagen IV, la fibronectina, la laminina, els proteoglicans i moltes altres (Mosher *i col.*, 1992). Per avaluar l'adhesió cèl·lula-matriu extracel·lular en la progressió tumoral, hem utilitzat la fibronectina per assajar l'adhesió de les cèl·lules a la matriu intersticial, mentre que la laminina i el col·lagen tipus IV s'utilitzen per representar l'adhesió de les cèl·lules a la membrana basal (Akiyama *i col.*, 1990). Els resultats obtinguts mostren que la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L redueix l'adhesió a la laminina, la fibronectina i el col·lagen IV en les cèl·lules 435. Aquest fet està en concordança amb el descrit per altres autors, que demostren que cèl·lules derivades de tumors primaris de mama de pacients amb metàstasis ganglionars

són significativament menys adhesives a proteïnes de la matriu extracel·lular que les de pacients amb ganglis limfàtics negatius (Gui *i col.*, 1997). En general, les cèl·lules de càncer de mama menys adherents a la matriu extracel·lular poden tenir més predisposició a metastatitzar.

Les interaccions cel·lulars a la matriu extracel·lular a través de la unió a llocs específics en la fibronectina, la vitronectina, la laminina i el col·lagen s'esdevenen principalment mitjançant les integrines (Hynes, 1992). En cèl·lules de càncer de mama s'ha descrit una reduïda expressió d'integrines (Zutter *i col.*, 1990; Pignatelli *i col.*, 1991; Koukoulis *i col.*, 1991). En estudis *in vitro*, diversos treballs han posat de manifest la relació entre el fenotip maligne i aquests receptors. Quan el receptor de la laminina i el col·lagen $\alpha_2\beta_1$ es sobreexpressa en carcinomes de mama pobrament diferenciats s'observa una reversió del fenotip maligne a un fenotip epitelial diferenciat (Zutter *i col.*, 1998). La transfecció de cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès amb l'ADNc del receptor de la fibronectina $\alpha_5\beta_1$ inhibeix l'habilitat d'aquestes cèl·lules per créixer i establir tumors en ratolines immunodeprimides (Giancotti i Ruoslahti, 1990). Tanmateix, una expressió disminuïda d'integrines en aquestes cèl·lules els confereix un major potencial invasiu (Schreiner *i col.*, 1991).

Malgrat això, la funció dels receptors d'adhesió cel·lular pot ser requerida per la interacció de les cèl·lules canceroses amb l'endoteli i la seva migració a través de la matriu extracel·lular en el lloc del tumor primari igual que en el secundari (Aznavorian *i col.*, 1990). De fet, és possible que l'habilitat per envair requereixi una expressió intermèdia de la capacitat adhesiva, ja que una adhesió insuficient suposaria la incapacitat de les cèl·lules tumorals circulants a quedar arrestades i envair un lloc secundari. Així, l'expressió d'integrines pot ser alterada en el procés metastàtic de cèl·lules de càncer de mama. S'ha reportat que nivells alts d'integrines α_6 s'associen amb el fenotip metastàtic de cèl·lules humanes de càncer de mama (Mukhopadhyay *i col.*, 1999). També s'ha trobat que l'expressió del receptor de la vitronectina $\alpha_v\beta_3$ augmenta en tumors de mama invasius i en metàstasis distants (Liapis *i col.*, 1996). De fet, l'anàlisi de l'expressió d'integrines en les cèl·lules del tumor primari i en les metàstasis distants proporcionarà informació de la regulació en l'expressió d'aquests receptors durant el procés metastàtic *in vivo*.

Es podria dir que la disminució de l'adhesió cel·lular a la matriu extracel·lular es necessària a les cèl·lules tumorals per desadherir-se de la massa del tumor primari i moure's sense dificultat a través de l'estroma en el procés metastàtic. Així, la reducció de l'adhesió que s'observa en les cèl·lules 435 derivaria en cèl·lules tumorals amb major predisposició a

metastatitzar. Per tant, la disminució de l'adhesió cel·lular associada a la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L induïx major independència dels senyals desencadenats per les proteïnes de la matriu extracel·lular, i afavoreix la supervivència lliure d'ancoratge.

De fet, la capacitat d'adhesió a la matriu extracel·lular de les cèl·lules no metastàtiques 468 i MCF-7 no es veu modificada per la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L. Aquestes cèl·lules no metastàtiques mostren major adhesió a proteïnes de la matriu en comparació amb les metastàtiques 435. Així, es suggereix que les cèl·lules tumorals no metastàtiques que són més adherents a substrats poden ser incapaces de començar el procés metastàtic i migrar del tumor primari. Altrament, la sobreexpressió de proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L no té efecte a disminuir aquesta major capacitat adhesiva de les cèl·lules tumorals, fet que suggereix la pèrdua de la capacitat adhesiva com a element clau en la inhabilitat per iniciar el procés metastàtic. Conseqüentment, la pèrdua d'adhesió a proteïnes de la matriu extracel·lular constitueix un guany per a la progressió metastàtica de les cèl·lules de càncer de mama, i estarà determinada per les alteracions oncogèniques que s'esdevinguin en cada tumor.

Diverses evidències assenyalen el paper de la matriu extracel·lular com a reguladora de l'apoptosi en les cèl·lules epitelials mamàries (Boudreau *i col.*, 1995). Així, es suggereix que la inducció del fenotip metastàtic podria dependre de l'oportunitat de les cèl·lules tumorals per adquirir resistència a l'*anoikis* o mort cel·lular per desadhesió de la matriu extracel·lular; procés en el qual intervindrien les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 (Frisch *i col.*, 1996) i Bcl-x_L (Rodeck *i col.*, 1997). Aquests treballs mostren que la disrupció de les interaccions cèl·lula-substrat induïx una disminució dels nivells d'ARNm i proteïna de Bcl-2 o Bcl-x_L sensibilitzant les cèl·lules a la mort independent d'ancoratge *in vitro*.

Nosaltres hem observat que les cèl·lules metastàtiques 435 presenten major capacitat de resistència a l'*anoikis* que les cèl·lules no metastàtiques 468 i MCF-7. La sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L induïx avantatge per sobreviure amb independència de l'ancoratge en les tres línies cel·lulars d'adenocarcinoma de mama humana utilitzades. Això no obstant, aquest avantatge augmenta en les cèl·lules metastàtiques al llarg del temps, rescatant un 20-40% de les cèl·lules 435 de la mort per *anoikis*, mentre que en les cèl·lules no metastàtiques aquest avantatge disminueix amb el temps, i en rescata només un 5-10%. Així, aquestes dades ens indiquen que per tal que la metàstasi s'esdevingui es requereix un nombre mínim de cèl·lules capaces de sobreviure en suspensió, que estaria determinat per les característiques intrínseques de les cèl·lules que també condicionaran l'efecte de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en la inhibició de l'*anoikis*.

Els resultats estan en concordança amb els trobats per altres autors, que demostren que la sobreexpressió de Bcl-2 protegeix les cèl·lules humanes de càncer gàstric de l'*anoikis*, incrementant la seva habilitat per la disseminació intraperitoneal (Yawata *i col.*, 1998). D'altra banda, la disminució de l'expressió de Bcl-x_L sensibilitza les cèl·lules de carcinoma d'ovari a l'*anoikis* i disminueix significativament la seva capacitat tumorigena *in vivo* (Frankel *i col.*, 2001), fet que suggereix que la sobreexpressió de Bcl-x_L pot contribuir a la resistència a la mort cel·lular per desadhesió de la matriu extracel·lular en aquestes cèl·lules. La resistència a l'*anoikis* també provoca un increment del potencial metastàtic de cèl·lules de melanoma en paral·lel amb múltiples alteracions de les seves propietats fenotípiques (Zhu *i col.*, 2001). Aquestes dades indiquen que Bcl-2 o Bcl-x_L protegeixen les cèl·lules de l'*anoikis* quan les interaccions amb la matriu extracel·lular es trenquen, permetent-los continuar proliferant.

Partint d'aquests resultats podríem dir que les proteïnes Bcl-2 i Bcl-x_L influeixen en la progressió metastàtica del càncer de mama després que les cèl·lules han perdut la dependència de la matriu extracel·lular. El procés metastàtic és avortat si les cèl·lules no han escapat del control de la matriu extracel·lular, com en les cèl·lules 468 o MCF-7, les quals mantenen l'adhesió a la matriu extracel·lular i moren en condicions no adherents, fins i tot quan les proteïnes antiapoptòtiques són sobreexpressades.

El pas de les cèl·lules canceroses d'independitzar-se de la matriu és essencial perquè la sang i/o la limfa pugui vehicular-les durant el procés metastàtic. La selecció de cèl·lules tumorals amb habilitat per sobreviure en el torrent sanguini i desenvolupar metàstasis en òrgans distants pot estar condicionada per l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques. Altres treballs han reportat que la sobreexpressió de Bcl-2 deriva en un bloqueig de l'apoptosi en cèl·lules desadherides, i en una incrementada supervivència cel·lular en la circulació (Nikiforov *i col.*, 1997). Els nostres resultats també mostren que la sobreexpressió de Bcl-x_L indueix supervivència en el torrent sanguini i/o en l'òrgan diana en les cèl·lules 435. D'acord amb aquestes dades es suggereix que, en la progressió metastàtica, la sobreexpressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L podria ser important per conferir a les cèl·lules tumorals que han adquirit la capacitat d'envair i arribar al torrent sanguini la capacitat de sobreviure en la circulació.

El fet que només unes poques cèl·lules puguin ser recuperades dels pulmons a les 16 h de la injecció intravenosa i que finalment Bcl-x_L sigui detectat en les metàstasis pulmonars evidencia que la majoria de cèl·lules moren a l'inici del procés metastàtic. Recentment, s'ha confirmat que l'apoptosi de les cèl·lules tumorals en els pulmons és un esdeveniment inicial que bloqueja la formació de colònies metastàtiques. Els autors demostren que la

sobreexpressió de Bcl-2 confereix resistència a l'apoptosi en els pulmons *in vivo* després de la injecció de les cèl·lules en la circulació, incrementant les metàstasis pulmonars macroscòpiques (Wong *i col.*, 2001). Així, la inhibició de l'apoptosi induïda per Bcl-2 o Bcl-x_L pot induir la supervivència de les cèl·lules tumorals en la circulació i/o en l'òrgan diana i, finalment, promoure la metàstasi. Tanmateix, la injecció de cèl·lules de melanoma en la circulació ha documentat el fracàs de cèl·lules solitàries per iniciar el creixement en llocs metastàtics, i la necessitat de factors de creixement per crear un ambient permissiu (Luzzi *i col.*, 1998; Cameron *i col.*, 2000). Essent així, les cèl·lules tumorals poden patir un període de *dormancy*, seguit d'un ràpid creixement quan les condicions són favorables o hi ha presents factors de creixement/citocines (Holmgren *i col.*, 1995). En realitat, els resultats obtinguts en aquest treball reforcen la idea que l'acció dels inhibidors de l'apoptosi Bcl-2 i Bcl-x_L pot rescatar les cèl·lules metastàtiques de l'*anoikis* en el torrent sanguini i de l'apoptosi en òrgans específics, fins que les condicions de creixement adients s'esdevenen i permeten el desenvolupament de les metàstasis.

S'ha descrit una associació entre la supervivència cel·lular induïda per la sobreexpressió de Bcl-2 i el potencial metastàtic en cèl·lules de melanoma (Takaoka *i col.*, 1997) i en cèl·lules de càncer de bufeta (Miyake *i col.*, 1999), que es correlaciona amb l'habilitat de Bcl-2 per protegir aquestes cèl·lules de l'apoptosi. Malgrat això, aquest increment del potencial metastàtic no s'ha associat ni a l'augment de l'activitat invasiva ni a l'augment del creixement cel·lular. A més, Bcl-2 augmenta l'habilitat per sobreviure sense les interaccions cèl·lula-cèl·lula adients. També s'ha reportat que en cèl·lules de càncer de mama resistents a l'adriamicina la sobreexpressió de Bcl-2 augmenta el potencial metastàtic per increment de la invasió cel·lular i la migració, sense afectar l'adhesió a components de la matriu extracel·lular *in vitro* (Del Bufalo *i col.*, 1997). Recentment, noves dades estableixen que l'expressió incrementada de Bcl-2 es correlaciona amb resistència a l'apoptosi i amb increment del potencial metastàtic de cèl·lules de carcinoma pancreàtic (Bold *i col.*, 2001).

1.2.- Inhibició d'apoptosi induïda per factors de creixement

Tant en el creixement metastàtic com en la supervivència en el torrent sanguini, la resistència a l'apoptosi enfront de factors de creixement podria ser decisiva.

Els nostres experiments de viabilitat *in vitro* mostren que Bcl-2 i Bcl-x_L confereixen resistència a l'apoptosi induïda per TGF- β en les cèl·lules 435. Així, les cèl·lules 435/Neo són vulnerables a l'apoptosi induïda per TGF- β , efecte que desapareix en les cèl·lules 435/Bcl-2 i

435/Bcl-x_L. D'acord amb aquestes dades, en altres estudis s'ha reportat que el TGF- β juga un paper important com a inductor d'apoptosi en una gran varietat de cèl·lules canceroses (Choi *i col.*, 1998). Diverses línies cel·lulars de tumors mamaris de ratolines transgèniques MMTV-c-*myc* es tornen apoptòtiques després del tractament amb TGF- β , fet que es relaciona amb la disminució de l'expressió de l'ARNm i la proteïna de Bcl-x_L (Nass *i col.*, 1996). També en cèl·lules de càncer de mama la inducció d'apoptosi per TGF- β s'associa a la disminució dels nivells de Bcl-2, cosa que suggereix un paper per a les proteïnes antiapoptòtiques en la inhibició de l'apoptosi induïda per TGF- β (Hishikawa *i col.*, 1999). Recentment, s'ha trobat que en cèl·lules epitelials de pròstata, Bcl-x_L bloqueja l'apoptosi induïda per TGF- β inhibint l'alliberament de citocrom *c* mitocondrial (Chipuk *i col.*, 2001).

El TGF- β , en la mama normal i en les primeres etapes de la tumorigènesi, té un efecte inhibidor del creixement. En contraposició, diverses línies cel·lulars derivades de carcinomes de mama invasius són menys sensibles o són resistents a l'efecte antiproliferatiu del TGF- β (Reiss i Barcellos-Hoff, 1997). D'acord amb aquestes dades, nosaltres trobem que el TGF- β té activitat citostàtica en les cèl·lules 435/Neo, 435/Bcl-2 i 435/Bcl-x_L.

L'habilitat de les cèl·lules tumorals per resistir els senyals de mort induïts pel TGF- β poden ser important per l'èxit dels esdeveniments metastàtics. De fet, estudis recents han mostrat que en tumors mamaris el TGF- β és requerit per a la invasió i la formació de metàstasis *in vivo*. L'expressió d'un dominant negatiu del receptor de tipus II truncat disminueix l'habilitat de les cèl·lules de carcinoma mamari 4T1 per establir metàstasis pulmonars, sense afectar la seva capacitat tumorígena (McEarchern *i col.*, 2001). Aquesta observació està d'acord amb el reportat per Yin *i col.* (1999) utilitzant la línia cel·lular de càncer de mama humana MDA-MB-231, en la qual el bloqueig dominant negatiu del receptor de tipus II del TGF- β no té efecte en el creixement local del tumor, encara que disminueix significativament les metàstasis d'os. Així, l'abrogació de la resposta apoptòtica al TGF- β per la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L pot ser un element important en l'aparició de les metàstasis en el càncer de mama. D'altra banda, Bcl-2 i Bcl-x_L també inhibeixen l'apoptosi induïda per TGF- β en les cèl·lules no metastàtiques 468 i MCF-7, malgrat que aquest fet no repercuteix en la inducció del fenotip metastàtic.

En les cèl·lules 435, Bcl-2 i Bcl-x_L també poden inhibir l'apoptosi induïda per TNF- α . Els resultats mostren que la sobreexpressió d'aquestes proteïnes indueix resistència a l'apoptosi activada per aquest factor, que s'ha descrit com un factor efectiu en la inducció ràpida i directa de la mort cel·lular en línies de càncer de mama (Rosfjord i Dickson, 1999). En

concordança amb aquestes dades, Jäättelä *i col.* (1995) també troben que Bcl-2 i Bcl-x_L poden inhibir la mort cel·lular induïda per TNF- α en cèl·lules de carcinoma de mama.

En essència, s'ha proposat que existeixen dues vies diferents d'inducció d'apoptosi desencadenades pels receptors de mort, les quals poden ser distingides segons si són regulades o no per membres de la família de Bcl-2. Les cèl·lules tipus I mostren una forta activació de caspasa-8, que directament activa caspasa-3 i, en conseqüència, Bcl-2 i Bcl-x_L no són efectives per protegir de la mort en aquest context. Les cèl·lules de tipus II activen feblement caspasa-8 i amplifiquen el seu senyal de mort a través de la mitocòndria, i poden ser protegides de l'apoptosi per Bcl-2 i Bcl-x_L (Slee *i col.*, 1999).

Essent així, es suggereix que la via de tipus II és la que s'induiria en les cèl·lules de càncer de mama. Probablement, Bcl-x_L funciona inhibint l'apoptosi induïda per Fas i TNFR-1 un cop activada caspasa-8 (Srinivasan *i col.*, 1998). En cèl·lules FL5.12 s'ha observat que el TNF- α indueix ambdós tipus de vies, les quals poden ser inhibides de manera cooperativa per l'inhibidor de caspases Z-VAD-fmk i per Bcl-x_L (Johnson *i col.*, 2000) o Bcl-2 (Johnson i Boise, 1999).

Està ben establert que l'alliberament de citocines citotòxiques com TNF pot desencadenar la destrucció de les cèl·lules tumorals. Aquesta és la citocina més pleotròpica, que actua com un factor de defensa de l'hoste en la resposta immunològica i pot contribuir a la destrucció de les cèl·lules tumorals (Aggarwal *i col.*, 1996). En conseqüència, la resistència a TNF- α induïda per Bcl-2 o Bcl-x_L podria ser també important en la progressió metastàtica, conduint al creixement cel·lular en el torrent sanguini i en llocs distants.

Les cèl·lules no metastàtiques 468 i MCF-7 són resistents a l'apoptosi induïda per TNF- α . La resistència a TNF- α en cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana MCF-7 s'ha associat a la pèrdua de la funció de p53 (Cai *i col.*, 1997). Així, la presència de p53 mutada en les cèl·lules 468 podria contribuir a la resistència a TNF- α que també observem en aquestes cèl·lules. D'altra banda, existeixen discrepàncies pel que fa a la resposta apoptòtica de les cèl·lules MCF-7 al tractament amb TNF- α . Estudis amb cèl·lules MCF-7 procedents de diferents laboratoris han demostrat variabilitat en la sensibilitat a l'apoptosi induïda per TNF- α i altres agents, que evidencia diferències en l'expressió del TNFR, la generació de ceramida, l'expressió diferencial de les proteïnes de la família de Bcl-2 i l'activació de proteases (Burow *i col.*, 1998).

1.3.- Selecció del fenotip metastàtic

S'ha descrit que la inhibició de l'apoptosi condueix a la selecció de llinatges cel·lulars amb capacitat per continuar expandint-se (Harrison, 1998). De fet, s'ha demostrat que la inhibició de l'apoptosi induïda per la sobreexpressió de Bcl-2 incrementa la freqüència d'amplificació del gen de la dihidrofolat-reductasa (DHFR) en cèl·lules HeLa S3 (Yin i Schimke, 1996). A més, la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L induïx resistència a l'apoptosi després d'un estímul inductor de dany a l'ADN, acumulant mutacions addicionals en llocs d'alta freqüència (Cherbonnel-Lassere *i col.*, 1996). Així, la perllongada supervivència cel·lular pot afavorir el cúmul d'alteracions genètiques que poden contribuir a la selecció de variants cel·lulars més resistents i possiblement més agressives.

Per seleccionar cèl·lules altament metastàtiques s'han establert models experimentals de metastàsis per inoculació successiva de les cèl·lules tumorals en ratolines immunodeprimides. Quan de les cèl·lules tumorals aïllades dels *foci* metastàtics s'estableixen cultius *in vitro* i, posteriorment, s'injecten novament en l'animal d'experimentació, amb els successius implants *in vivo/in vitro*, s'aconsegueixen aïllar cèl·lules amb un fenotip metastàtic més i més agressiu (Morikawa *i col.*, 1988). Així, es suggereix que l'efecte tròfic de l'òrgan afavoreix interaccions específiques entre les cèl·lules de l'hoste i del tumor que poden crear un microentorn adient per a les cèl·lules neoplàsiques i permetre el creixement dels tumors i la inducció d'aquest fenotip metastàtic més agressiu.

Segons aquest disseny experimental, les cèl·lules derivades dels tumors organotòpics van ser exposades repetidament al microambient de la glàndula mamària per analitzar si la perllongada supervivència induïda per la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L afavoria la selecció d'un fenotip metastàtic més agressiu en els tumors 435 o si induïa el fenotip metastàtic en els tumors 468 no metastàtics.

En els tumors 435, Bcl-2 i Bcl-x_L no van induir la selecció d'un fenotip metastàtic pulmonar més agressiu després dels successius implants, considerant el temps en què la malaltia es manifesta i el nombre de metastàsis pulmonars desenvolupades, però sí que es va observar l'aparició d'un fenotip metastàtic ganglionar en els tumors derivats dels transfectants de Bcl-x_L.

Aquestes dades indiquen que Bcl-x_L afavoreix la selecció de la metastàsi ganglionar en detriment de la metastàsi pulmonar, ja que les ratolines inoculades amb les cèl·lules 435/Bcl-x_L moren per metastàsis ganglionars, abans que per metastàsis pulmonars. S'observa que un 60% de les ratolines presenten els ganglis mediastínic, cervicals i axil·lars afectats, i els pulmons pràcticament lliures de metastàsis. Aquest fenotip metastàtic ganglionar també es

manifesta en els tumors induïts amb el pool de cèl·lules 435/Bcl-x_L, i en els tumors dels transfectants de Bcl-x_L del 1^è i 2^è implant ortotòpic. Tanmateix, cap de les ratolines inoculades amb els transfectants de Bcl-2 mostren ganglis afectats, igual que les ratolines inoculades amb els transfectants Neo després dels successius implants *in vivo/in vitro*. Així, Bcl-x_L afavoreix un canvi en l'organoespecificitat de les metàstasis, facilitant una major ubiqüitat.

D'altra banda, Bcl-2 no incrementa la selecció d'un fenotip metastàtic pulmonar més agressiu a l'establert prèviament en el primer implant ortotòpic. L'increment en l'eficiència d'implantació del tumor observat no determina un major increment de la capacitat metastàtica dels tumors, ja que després del 2^è implant no es modifiquen ni el nombre de metàstasis ni el període d'aparició respecte del 1^è implant, i només després del 3^è hi ha un lleuger augment en el nombre de metàstasis pulmonars induïdes per algun dels tumors. En efecte, la perllongada supervivència induïda per Bcl-2 no indueix l'aparició d'altres localitzacions metastàtiques. D'aquesta manera, podríem concloure que Bcl-2 i Bcl-x_L influeixen de manera diferent en la selecció del fenotip metastàtic.

Aquestes dades suggereixen que la inhibició de l'apoptosi induïda per Bcl-2 i Bcl-x_L afavoreix la selecció de cèl·lules amb avantatge de creixement en òrgans distants i contribueixen a l'organoespecificitat de les metàstasis. Així, a més del guany en l'activitat metastàtica és evident que l'oportunitat de selecció augmenta la ubiqüitat de localitzacions metastàtiques.

L'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L podria no ser funcionalment redundant. En el càncer de mama, és probable que Bcl-2 intervingui durant les etapes inicials, donat que la seva expressió és regulada per estrògens (Teixeira *i col.*, 1995; Pratt *i col.*, 1998). Aquesta hipòtesi ha estat corroborada per anàlisis *ex vivo*, mostrant-se que l'expressió de Bcl-2 en el càncer de mama es correlaciona amb la positivitat de RE i tumors de baix GH (Sierra *i col.*, 1995), en contrast amb l'expressió de Bcl-x_L, que sembla estar associada amb tumors d'alt GH, i un incrementat nombre de metàstasis en els ganglis limfàtics (Olopade *i col.*, 1997), fet que suggereix la seva qualitat d'inhibidor de l'apoptosi durant les etapes tardanes de la progressió tumoral.

Existeixen evidències que mostren que la resistència a l'apoptosi podria ser un determinant del creixement organoespecífic de les metàstasis, ja que les cèl·lules derivades de metàstasis cerebrals de carcinoma de mama són més resistents a l'apoptosi quan s'exposen a factors de creixement d'astròcits, que les cèl·lules metastàtiques de pulmó dels mateixos tumors (Sierra *i col.*, 1997). Recentment, el nostre grup ha reportat que les cèl·lules de tumors 435/Neo i 435/Bcl-x_L assoleixen molts òrgans ràpidament, encara que el creixement de les

metàstasis s'esdevingui en els pulmons, ganglis, ossos i cervell de ratolines amb tumors 435/Bcl-x_L en comparació amb les ratolines amb tumors 435/Neo, que només mostren metàstasis en els pulmons (Rubio *i col.*, 2001). Així, el desenvolupament de metàstasis en òrgans específics pot ser determinat pel fenotip de les cèl·lules tumorals i per les interaccions entre la cèl·lula tumoral i el microentorn de l'òrgan diana (Fodstad i Kjonniksen, 1994). Tanmateix, es coneix poc sobre els factors específics de cada òrgan i la influència del microentorn en el patró d'expressió gènica.

L'anàlisi de l'expressió de factors de creixement i dels seus receptors en els òrgans diana i en les cèl·lules tumorals proporcionarà informació addicional de quins poden ser els mecanismes responsables d'aquesta organoespecificitat en les cèl·lules amb sobreexpressió de Bcl-x_L. Per exemple, s'ha postulat que la via de transducció de senyals desencadenada pel receptor del CD40 afavoreix la supervivència cel·lular dels limfomes de cèl·lules B per increment de l'expressió de la proteïna inhibidora de l'apoptosi Bcl-x_L (Fang *i col.*, 1997). Recentment, Müller *i col.* (2001) han reportat que el destí de les metàstasis en el càncer de mama pot estar influenciat pels receptors de quimiocines. Ells troben que els receptors de quimiocines CXCR4 i CCR7 són presents en cèl·lules tumorals de mama i els seus lligants són altament expressats en òrgans associats amb metàstasis de càncer de mama. L'anàlisi de l'expressió de quimiocines en els òrgans diana i dels receptors de quimiocines en les cèl·lules tumorals podria ser interessant per determinar el seu efecte en l'organoespecificitat metastàtica de les cèl·lules.

Altrament, Bcl-2 no és capaç d'induir el fenotip metastàtic a les cèl·lules 468 després dels successius implants *in vivo/in vitro*. Les cèl·lules tumorals no metastàtiques 468 no posseeixen tots els canvis genètics necessaris o propietats cel·lulars requerides per a la metàstasi, i la perllongació de l'expressió de Bcl-2 no és suficient per induir-los.

Els tumors estan limitats per la hipòxia, el suplement de nutrients i les barreres físiques (Hanahan, 1988). Superar aquestes limitacions requereix l'adquisició de múltiples alteracions genètiques que repercuteixin en vies que controlen l'angiogènesi, la invasió, l'autonomia de factors de creixement i la supervivència dins d'un microambient no fisiològic (Folkman *i col.*, 1989; Raff, 1992; Graeber *i col.*, 1996; Holmgren *i col.*, 1995). Tanmateix, l'anàlisi de subpoblacions d'una línia cel·lular derivada de càncer de pulmó amb activitats metastàtiques diferents confirma que l'increment del potencial metastàtic no s'esdevé només per la simple alteració d'un gen, sinó pel cúmul d'alteracions en l'expressió de diversos gens implicats en la disrupció de l'adhesió a la matriu extracel·lular, la degradació de la matriu extracel·lular, l'evasió de l'apoptosi i la resistència a l'efecte antiproliferatiu del TGF- β (Gemma *i col.*,

2001). Així, en els nostres resultats ja s'evidencia que en les cèl·lules 468 la sobreexpressió de Bcl-2 no facilita la modificació de l'adhesió de les cèl·lules a proteïnes de la matriu extracel·lular ni la resistència a l'*anoikis* induïda sembla suficient per al desenvolupament del fenotip metastàtic, entre altres alteracions requerides.

En conseqüència, la perllongació de la inhibició de l'apoptosi induïda per Bcl-2 o Bcl-x_L influeix en la selecció d'un fenotip metastàtic més agressiu en funció de que les característiques oncogèniques de les cèl·lules siguin les adients per desencadenar aquest procés.

La presència de Bcl-2 o Bcl-x_L en les cèl·lules tumorals reflecteix l'activitat antiapoptòtica de les proteïnes, i repercuteix juntament amb les propietats cel·lulars en diferents funcions biològiques que determinaran el seu futur. De fet, l'augment de l'activitat metastàtica pulmonar i ganglionar induïda per la sobreexpressió de Bcl-x_L es neutralitza en els tumors induïts amb cèl·lules 435/Bcl-x_L transfectades amb la construcció antisentit de *bcl-x_L*, cosa que reafirma el paper decisiu d'aquest gen en l'evolució metastàtica dels tumors.

En conclusió, tumors de càncer de mama que sobreexpressen Bcl-2 o Bcl-x_L incrementen el potencial metastàtic per disregulació de l'apoptosi, adquirint resistència a citocines i incrementant el creixement independent d'ancoratge i la supervivència en circulació, proveeixen les cèl·lules d'un mecanisme per adaptar-se a un nou ambient i influeixen en la seva organoespecificitat.

1.4.- Eficiència de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L en les cèl·lules

Les tres línies cel·lulars utilitzades basalment presenten diferents nivells d'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L i l'eficiència de transfecció varia d'una línia cel·lular a una altra. Els resultats obtinguts suggereixen que l'efecte biològic induït pels nivells de sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L en les diferents línies cel·lulars està influenciat per les característiques intrínseques de les cèl·lules, com la diferenciació cel·lular o la presència d'altres oncogens.

L'anàlisi de l'expressió proteica es va fer per western blot utilitzant diversos anticossos anti-Bcl-2 i anti-Bcl-x_L. En algun dels western blot de la proteïna Bcl-x_L s'observa clarament que aquesta migra com un doblet de proteïnes amb un pes molecular d'aproximadament 29-31 kDa. L'explicació per a aquestes aparents dues formes de la proteïna es desconeix, però la causa podria ser un processament proteolític, modificacions covalents, iniciació de la traducció en un codó AUG o CUG previ en la pauta de lectura oberta del gen *bcl-x_L* o formes addicionals derivades de l'*splicing* alternatiu de *bcl-x* (Krajewski *i col.*, 1994). Recentment,

s'han identificat en els gen de *bcl-x* de ratolí 5 promotors diferents que generen diferents transcrits per *splicing* alternatiu (Pecci *i col.*, 2001).

A més, en algun d'aquests western blot de Bcl-x_L es va detectar una segona proteïna immunoreactiva d'aproximadament 34 kDa de pes molecular en les tres línies cel·lulars. Aquesta banda va ser detectada per uns altres dos anticossos anti-Bcl-x (anti-Bcl-x_{S/L} clon M-125 i anti-Bcl-x), però la reactivitat va ser més suau que l'observada amb l'anticòs anti-Bcl-x_{S/L} clon S-18. En conseqüència, caldrien estudis addicionals per determinar si aquesta banda representa una modificació posttraduccional de Bcl-x_L o cross-reactivitat amb un altra proteïna o una isoforma endògena de *bcl-x* expressada de manera constitutiva en la cèl·lula.

Quant al fenotip metastàtic i a les propietats associades a la metàstasi, observem que la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L produeix un efecte important en les cèl·lules 435 malgrat que l'eficiència de transfecció és baixa. A més, la disminució dels nivells d'expressió de Bcl-x_L en aquestes cèl·lules redueix consistentment el fenotip metastàtic. Per tant, variacions petites dels nivells d'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L poden tenir un efecte important en el fenotip cel·lular. Tanmateix, hem observat que no hi ha un efecte dosiddependent de la concentració de Bcl-2 i Bcl-x_L en els transfectants de les cèl·lules no metastàtiques MCF-7 i 468, donat que diferents nivells d'aquestes proteïnes en aquestes cèl·lules mostren la mateixa capacitat enfront de diferents inductors d'apoptosi.

2.- Contribució de Bcl-2 i Bcl-x_L en la tumorigènesi de cèl·lules d'adenocarcinoma de mama humana

Tot i l'increment induït per Bcl-2 i Bcl-x_L en l'activitat metastàtica dels tumors 435, l'efecte d'aquestes proteïnes en el creixement tumoral ortotòpic és lleuger. La sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L no modifica la proliferació cel·lular *in vitro*, cosa que suggereix que l'augment observat en el volum dels tumors podria ser secundari a un guany en el nombre de cèl·lules per inhibició de l'apoptosi més que per augment de la proliferació. Les nostres dades són comparables amb les trobades per Yawata *i col.* (1998), en què la sobreexpressió de Bcl-2 no indueix diferències significatives en la proliferació entre els transfectants ni *in vitro* ni *in vivo*.

Això no obstant, les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L contribueixen a disminuir la tumorigènesi de les cèl·lules no metastàtiques 468, comprovant-se *in vitro* menor proliferació. A més, l'anàlisi del contingut d'ADN en les diferents fases del cicle cel·lular en els tumors 468 extirpats mostren que la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L no té efecte en el cicle cel·lular quan les cèl·lules han adquirit un creixement exponencial.

D'acord amb les nostres dades, estudis previs han reportat que Bcl-2 retarda el desenvolupament dels tumors mamaris malgrat el seu efecte antiapoptòtic (Murphy *i col.*, 1999). En realitat, l'efecte de l'expressió de Bcl-2 o Bcl-x_L actua en el cicle cel·lular en la transició de la fase G1 a S, la qual és un punt crític en la decisió entre continuar la progressió del cicle cel·lular o induir mort cel·lular programada (Mazel *i col.*, 1996; O'Really *i col.*, 1996). Recentment, s'ha reportat que Bcl-2 endarrereix l'entrada en cicle cel·lular per increment dels nivells de p27 i p130, que afavoreixen el manteniment del complex p130 amb E2F4, reprimint-se la transcripció del gen E2F1, que es codifica per una proteïna que permet l'entrada en cicle cel·lular (Vairo *i col.*, 2000).

Tal com han indicat altres autors, sembla que Bcl-2 i Bcl-x_L només poden afectar el control del cicle cel·lular en la transició de l'estat de quiescència G0 a la fase S, però no tenen efecte en les cèl·lules que estan contínuament ciclant (Huang *i col.*, 1997a). Segons això, cèl·lules tumorals proliferants activades per mutacions sinèrgiques en altres oncogens poden no manifestar l'efecte inhibidor del cicle cel·lular (Pietenpol *i col.*, 1994). Aquest podria ser el cas de les cèl·lules 435, en què coexisteixen amplifícacions d'altres oncogens com *c-myc* i *neu*. De fet, l'habilitat de Bcl-2 per accelerar la progressió tumoral s'ha correlacionat amb una pèrdua selectiva de l'activitat antiproliferativa, el mecanisme de la qual es desconeix (Furth *i col.*, 1999). Una hipòtesi és que els incrementats nivells d'expressió de proteïnes que controlen el cicle cel·lular específicament podrien superar l'activitat inhibidora de Bcl-2 (Li *i col.*, 2000).

Aquestes dades explicarien que no trobem aquest efecte antiproliferatiu en les cèl·lules 435, que són cèl·lules més proliferants que les 468.

En contraposició, l'acció antiapoptòtica de Bcl-2 persisteix al llarg de la tumorigènesi (Furth *i col.*, 1999). Les nostres dades indiquen que Bcl-2 i Bcl-x_L mantenen la seva funció inhibidora de l'apoptosi en els tumors 468. Tanmateix, no és clar si l'efecte inhibidor del cicle cel·lular està relacionat amb la funció antiapoptòtica de Bcl-2 o Bcl-x_L. S'ha demostrat que existeix un residu de tirosina conservat en la regió carboxiterminal del domini BH4 de Bcl-2 i Bcl-x_L que és requerit perquè aquestes proteïnes inhibeixin l'entrada en el cicle cel·lular, però és dispensable per la seva activitat antiapoptòtica. Aquestes observacions evidencien que els dos efectes inhibidors de Bcl-2 o Bcl-x_L poden estar genèticament separats (Huang *i col.*, 1997a). Tanmateix, l'efecte de Bcl-2 en el cicle cel·lular sembla anar lligat a la seva funció antiapoptòtica, donat que la inhibició de la funció antiapoptòtica sí que pot anul·lar l'efecte inhibidor del cicle cel·lular (O'Reilly *i col.*, 1996). Així, la funció de Bcl-2 en el control del cicle cel·lular sembla diferent, però dependent, de la seva funció antiapoptòtica.

D'acord amb aquestes dades, els nostres resultats també indiquen que la regulació de la supervivència cel·lular podria estar relacionada amb el control del creixement cel·lular en la tumorigènesi del càncer de mama, i que l'efecte de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en la tumorigènesi pot dependre de característiques intrínseques del tumor, com la diferenciació cel·lular o la presència d'altres oncogens.

En realitat, es desconeix la importància de l'activitat de Bcl-2 i Bcl-x_L en el cicle cel·lular per l'oncogènesi. L'activitat antiproliferativa de Bcl-2 i Bcl-x_L pot estar implicada en el fet de modular el potencial oncogènic induït per l'excessiva supervivència cel·lular, ja que el bloqueig inferit per Bcl-2 i Bcl-x_L en el cicle cel·lular es perd selectivament al llarg de la progressió tumoral (Furth *i col.*, 1999). Això no obstant, és possible que Bcl-2 o Bcl-x_L facilitin el manteniment de les cèl·lules no només per inhibició de la mort cel·lular sinó també per retard de l'entrada en el cicle cel·lular quan les condicions són inadequades.

El fet que Bcl-2 endarrereixi l'entrada en cicle cel·lular pot tenir també implicacions en la teràpia anticancerosa. Les cèl·lules que estan ciclant són sovint més vulnerables a l'apoptosi, potser perquè sota condicions desfavorables per a la proliferació, determinats efectors del cicle cel·lular promouen l'apoptosi (Evan i Littlewood, 1998). Considerant que molts agents quimioterapèutics van dirigits a cèl·lules en divisió, les cèl·lules tumorals que expressen Bcl-2 estan doblement protegides, ja que són refractàries a l'apoptosi i presenten major probabilitat de ser quiescents. Conseqüentment, qualsevol agent que pugui superar l'efecte inhibidor de Bcl-2 en l'entrada en el cicle cel·lular hauria de provar-se juntament amb

drogues quimioterapèutiques correntment utilitzades.

D'altra banda, la inhibició de l'apoptosi induïda per la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L en els tumors afavoreix la selecció de cèl·lules 435 amb major capacitat tumorigèna, ja que s'aconsegueix un augment de la velocitat de creixement dels tumors amb els successius implants *in vivo/in vitro*.

D'acord amb aquests resultats, altres autors demostren que Bcl-2 pot facilitar la tumorigènesi de cèl·lules de melanoma per reducció del període d'aparició dels tumors i del temps de duplicació de les cèl·lules. La possibilitat que Bcl-2 i Bcl-x_L promoguin directament la proliferació cel·lular pot estar en relació amb altres gens implicats en la regulació del cicle cel·lular, com *p53* i *c-myc* (Del Bufalo *i col.*, 1997). L'activació de *c-Myc* és comuna en càncer de mama, però la seva sobreexpressió és insuficient per induir transformació. Considerant que *c-Myc* pot induir apoptosi i activar el cicle cel·lular, és probable que esdeveniments secundaris que bloquegin la mort cel·lular permetin predominar l'efecte estimulador de la proliferació. Altres treballs indiquen que la sobreexpressió de Bcl-2 accelera la tumorigènesi mamària induïda per *c-Myc*, per inhibició de la seva funció apoptòtica i promoció de la seva funció proliferativa (Jäger *i col.*, 1997). També s'ha reportat que canvis en l'expressió de Bcl-x_L poden promoure la tumorigènesi de les cèl·lules que sobreexpressen *c-Myc* (Nass *i col.*, 1996).

Determinades mutacions experimentals dins el gen de *bcl-2* poden activar una funció de Bcl-2 facilitadora de la proliferació en cèl·lules de ronyó de cries de rata (BRK) transformades amb l'adenovirus E1A, contribuint a l'oncogènesi per supressió de l'apoptosi i facilitació de la proliferació cel·lular (Uhlmann *i col.*, 1996). Així, alteracions que anul·lin l'efecte inhibidor del creixement i mantinguin la funció de supervivència cel·lular podrien influir dramàticament en el potencial transformant d'aquestes proteïnes antiapoptòtiques. Les nostres dades suggereixen que la perllongada supervivència induïda per Bcl-2 o Bcl-x_L afavoriria la inducció d'alteracions que poguessin estar afectant gens reguladors de la proliferació o bé la manifestació de les alteracions ja presents.

Recentment, s'ha demostrat que la sobreexpressió de Bcl-2 també incrementa l'angiogènesi dels tumors *in vivo* (Biroccio *i col.*, 2000). Aquest efecte podria ser degut a l'augment de l'expressió de VEGF induït per la sobreexpressió de Bcl-2 en condicions d'hipòxia.

En contraposició amb els resultat obtinguts en els tumors 435, Bcl-2 no va induir augment de la tumorigènesi en els tumors 468 amb les successius fases de selecció *in vivo/in*

vitro. Tanmateix, nosaltres trobem que Bcl-2 afavoreix la selecció de cèl·lules 468 amb capacitat tumorigena disminuïda, el fet que suggereix que la funció antiproliferativa de Bcl-2 que es manifesta en aquests tumors es manté en els implants. Es demostra que el dia 14^è de l'implant ja s'han establert les diferències en el volum dels tumors, sent durant els 14 primers dies que es manifesta la funció de Bcl-2 inhibidora del cicle cel·lular. Això no obstant, a partir del dia 14 els tumors presenten un creixement exponencial i augmenten cada dia un 4,8% el seu volum per a totes les línies i tots els implants. De fet, és sabut que l'efecte en el cicle cel·lular es perd quan les cèl·lules han adquirit creixement exponencial (Huang *i col.*, 1997a).

La perllongació del cicle de divisió cel·lular per regulació de la transició de la fase G1 a la S podria ajudar a explicar la ben documentada inhibició de l'apoptosi induïda per Bcl-2, afegint un temps addicional per preparar la cèl·lula per a la síntesi de l'ADN i/o la reparació del dany a l'ADN (Mazel *i col.*, 1996). D'acord amb això, es suggereix que l'activitat antiproliferativa de Bcl-2 podria ser necessari per reparar el major cúmul d'alteracions afavorit per la perllongada supervivència cel·lular, representant un sistema de protecció de les cèl·lules canceroses a la progressió tumoral mentre es mantingui el control en el cicle cel·lular. Estudis de la resposta d'aquestes cèl·lules a agents quimioterapèutics ajudarien a conèixer si el retard en l'entrada en cicle cel·lular pot conferir major o menor agressivitat a les cèl·lules.

La perllongació de la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L influeix en la selecció del fenotip tumorigen més agressiu de manera diferent en funció del context oncogènic present en cada model. Així, Bcl-2 i Bcl-x_L incrementen el creixement dels tumors de cèl·lules 435 i disminueixen el dels tumors de cèl·lules 468. Malgrat tot, s'observa que l'eficiència d'implantació augmenta amb els respectius implants i de manera dependent de les característiques intrínseques de les cèl·lules. En els dos models cel·lulars trobem que disminueix el període d'aparició dels tumors, sense observar-se diferències entre les línies cel·lulars. En concordança amb altres autors, es suggereix que aquest increment en el volum dels tumors induïts en les ratolines en cada implant podria ser conseqüència de l'efecte dels factors específics del microentorn de l'òrgan (Price *i col.*, 1990; Gleave *i col.*, 1991).

3.- Les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en la resposta a estratègies terapèutiques

Bcl-2 i Bcl-x_L actuen en la resistència i susceptibilitat al tractament antitumoral ja sigui inhibint diferents vies d'inducció d'apoptosi o bé perquè determinats agents quimioterapèutics poden modificar bioquímicament aquestes proteïnes antiapoptòtiques (Simonian *i col.*, 1997; Decaudin *i col.*, 1997).

Particularment, el paclitaxel és un agent efectiu en el tractament de diversos càncers, incloent el càncer de mama (Rowinsky i Donehower, 1995). Aquest actua unint-se i promovent la polimerització de la β -tubulina, proteïna majoritària dels microtúbuls que formen el fus acromàtic durant la mitosi. D'aquesta manera, el paclitaxel estabilitza els microtúbuls i evita la seva despolarització, cosa que afecta l'equilibri dinàmic de polimerització i despolimerització dels microtúbuls i produeix l'arrest mitòtic de les cèl·lules que s'estan dividint (Jordan i Wilson, 1998). A més, aquest agent quimioterapèutic té efecte en la fosforilació de serines/treonines del domini loop de Bcl-2 i Bcl-x_L, que s'ha associat amb l'abrogació de la funció antiapoptòtica d'aquestes proteïnes (Blagosklonny *i col.*, 1997; Poruchynsky *i col.*, 1998). Diversos estudis han mostrat que el Bcl-2 o Bcl-x_L fosforilat no heterodimeritza amb Bax, amb el resultat d'incrementats nivells de Bax lliure, situació que pot afavorir l'apoptosi (Halder *i col.*, 1996; Ibrado *i col.*, 1997).

En els estudis de supervivència cel·lular *in vitro* trobem que Bcl-2 i Bcl-x_L inhibeixen l'apoptosi induïda per paclitaxel en les cèl·lules MCF-7 i 468, però no exerceixen el seu efecte antiapoptòtic en les cèl·lules 435. De fet, les tres línies cel·lulars estudiades presenten diferent susceptibilitat al paclitaxel, i això pot ser conseqüència de les diferències fenotípiques i genotípiques de les cèl·lules. En relació amb aquest fet, s'ha reportat que la inactivació de p53 en absència d'altres alteracions genètiques induïx susceptibilitat a múltiples agents quimioterapèutics, inclòs el paclitaxel (Hawkins *i col.*, 1996). Els nostres resultats suggereixen que la diferent dotació oncogènica present en els tres models cel·lulars també pot condicionar l'efecte diferencial que s'observa en la funció de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en les cèl·lules MCF-7 i 468 respecte de les 435.

D'acord amb els resultats obtinguts en les cèl·lules MCF-7 i 468, en cèl·lules on Bcl-2 (Tang *i col.*, 1994) o Bcl-x_L (Ibrado *i col.*, 1997) són sobreexpressades s'ha observat una disminuïda sensibilitat a agents quimioterapèutics com el paclitaxel, presentant els transfectants nivells significativament majors de Bax heterodimeritzat amb Bcl-2 i Bcl-x_L, i nivells menors de Bax lliure. Aquestes dades suggereixen que Bcl-2 i Bcl-x_L no són fosforilats en aquests casos. Per contra, els resultats obtinguts en les cèl·lules 435 van ser conseqüents

amb els trobats per Srivastava *i col.* (1998), que mostren que la sobreexpressió de Bcl-2 no protegeix de l'apoptosi induïda per paclitaxel, induint-se la fosforilació de Bcl-2 i la reducció dels nivells d'heterodimers Bcl-2/Bax. Posteriorment, els mateixos autors troben que aquesta fosforilació permet l'alliberament de citocrom *c* de la mitocòndria al citosol (Srivastava *i col.*, 1999).

Això no obstant, altres evidències suggereixen que la fosforilació de Bcl-2 o Bcl-x_L induïda per agents desorganitzadors dels microtúbuls com el paclitaxel és requerida perquè s'esdevingui la inhibició de la mort cel·lular per aquests agents (Fang *i col.*, 1998). És a dir, s'ha observat que la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L inhibeix l'apoptosi induïda per paclitaxel, i es demostra que la fosforilació del domini loop és necessària per a la funció antiapoptòtica. En conseqüència, l'anàlisi de l'estat de fosforilació de Bcl-2 i Bcl-x_L en els nostres models cel·lulars proporcionarà informació sobre si la fosforilació d'aquestes proteïnes és requerida per a la funció inhibidora o promotora de l'apoptosi.

Altrament, un estudi recent ha demostrat que la fosforilació de Bcl-2 induïda per paclitaxel és un marcador dels esdeveniments de la fase M més que un determinant de l'apoptosi (Ling *i col.*, 1998). Essent així, la fosforilació de Bcl-2 seria una resposta suïcida a l'arrest mitòtic que podria conduir a la segregació anormal dels cromosomes. A més, s'ha mostrat que quan les cèl·lules que sobreexpressen la proteïna antiapoptòtica Bcl-x_L són tractades amb inhibidors del fus mitòtic, un percentatge significatiu reinicia la replicació de l'ADN i es tornen poliploides (Minn *i col.*, 1996). En un altre estudi es demostra que la multimininucleació associada a paclitaxel és permesa per l'atenuació o inhibició de l'activació de les caspases (Panvichian *i col.*, 1998). Així, si no s'esdevinguessin diferències en l'estat de fosforilació de Bcl-2 i Bcl-x_L en els nostres models cel·lulars, l'anàlisi del cicle cel·lular ajudaria a determinar si la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L supera l'arrest mitòtic en les cèl·lules MCF-7 i 468 en contrast amb les 435.

D'altra banda, l'antiestrogen tamoxifen és l'agent més comunament utilitzat en el tractament del càncer de mama amb resposta hormonal. Aquest actua bloquejant de manera competitiva la unió de l'estradiol al receptor estrogènic de la cèl·lula, i funciona com un agonista parcial causant una menor activació transcripcional dels gens diana dels estrògens. No obstant això, el tamoxifen és efectiu enfront d'un determinat percentatge de càncers, aquells que expressen RE, i per un període limitat (Katzenellenbogen *i col.*, 1997).

Les cèl·lules MCF-7 RE positives en presència d'estrògens incrementen la proporció intracel·lular de Bcl-2/Bax, la qual inhibeix l'apoptosi induïda per agents quimioterapèutics (Huang *i col.*, 1997b). Addicionalment, es va demostrar que alts nivells de Bcl-2 i Bcl-x_L

provoquen resistència a l'apoptosi induïda per tamoxifen en cèl·lules de càncer MCF-7 (Kumar *i col.*, 1996). D'acord amb aquests resultats, Bcl-2 i Bcl-x_L inhibeixen l'apoptosi induïda per tamoxifen en les cèl·lules MCF-7, però aquest mecanisme d'inducció de mort pot no ser rellevant en les cèl·lules 468 i 435, que no expressen RE.

En càncer de mama, l'expressió de Bcl-2 s'ha considerat un factor pronòstic predictor de la resposta a la teràpia endocrina (Gee *i col.*, 1994). Aquesta bona resposta a la teràpia endocrina en pacients amb tumors Bcl-2 positius podria ser conseqüència de la disminució dels nivells de Bcl-2 per agents antiestrògens, generant susceptibilitat a l'apoptosi. Una possible explicació per a aquestes observacions clíniques la van donar Zhang *i col.* (1999) en demostrar que el tamoxifen pot desencadenar apoptosi per disminució dels nivells d'ARNm i proteïna de Bcl-2. La disminució tant dels nivells d'ARNm com de proteïna induïda per tamoxifen suggereix que aquest actua per via d'un mecanisme transcripcional. A més, sembla que el complex estrogen-RE pot unir-se directament a un element de resposta a estrògens del promotor de *bcl-2*. Tanmateix, els nivells de Bcl-x_L també poden ser lleugerament disminuïts per antiestrògens (Kandouz *i col.*, 1999).

En alguns estudis, l'efecte anticancerós del tamoxifen ha estat atribuït a l'activació indirecta de la via del TGF- β i a la inducció d'apoptosi per TGF- β . Aquest efecte és independent de l'estat dels RE i pot ser el resultat d'un efecte regulador directe del tamoxifen en la transcripció del TGF- β (Perry *i col.*, 1995). Això pot reflectir les complexes interaccions entre diverses vies de mort cel·lular durant la inducció d'apoptosi per antiestrògens, i explicar l'efecte que s'observa en cèl·lules RE negatives.

Tanmateix, la disregulació de les vies apoptòtiques per increment de l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 o Bcl-x_L en cèl·lules de càncer de mama pot constituir un dels mecanismes potencials de resistència a teràpia endocrina en cèl·lules de càncer de mama RE positives i influir en la progressió del càncer de mama.

Considerant que la progressió metastàtica també depèn de la resposta cel·lular a la teràpia, la disregulació de les vies apoptòtiques per increment de l'expressió de les proteïnes Bcl-2 i/o Bcl-x_L en cèl·lules de càncer de mama pot esdevenir un mecanisme important de la sensibilitat i resistència a drogues quimioterapèutiques, i també de resistència a teràpia endocrina en cèl·lules RE positives, influint en la progressió del càncer de mama.

Nosaltres trobem que l'habilitat de Bcl-2 i Bcl-x_L per inhibir l'apoptosi induïda per factors de creixement o agents quimioterapèutics o hormonoterapèutics és dependent de l'estímul apoptòtic i del tipus cel·lular. No tots els llinatges cel·lulars responen a un estímul apoptòtic de la mateixa manera, i un mateix gen pot tenir diferents efectes en funció de les

característiques cel·lulars. En conseqüència, la dotació oncogènica de les cèl·lules condiciona la funció de Bcl-2 i Bcl-x_L inhibint diferents vies d'inducció d'apoptosi.

D'altra banda, no trobem diferències entre les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L quant a la inhibició d'apoptosi induïda pels diferents estímuls, cosa que suggereix que elles podrien estar utilitzant el mateix mecanisme per inhibir la mort cel·lular. Així, *in vitro* Bcl-2 i Bcl-x_L poden substituir-se l'una per l'altra, però és clar que durant la progressió del càncer de mama *in vivo* són diferencialment expressades. De fet, s'ha reportat que en tumors de mama humana, Bcl-x_L s'expressa més en tumors indiferenciats de GH-III que en els de GH-I i -II, en els quals l'expressió de Bcl-2 és predominant (Olopade *i col.*, 1997; Sierra *i col.*, 1998). Els nostres resultats indiquen que els tumors MCF-7 incrementen l'expressió de Bcl-2 i disminueixen la de Bcl-x_L *in vivo*. S'ha especulat que l'augment de l'expressió de Bcl-x_L pot estar associada amb la supervivència cel·lular en absència de senyals de creixement. L'augment de l'expressió de Bcl-x_L en absència de senyals proliferatius podria servir per assegurar la supervivència cel·lular en aquestes condicions. En presència d'estradiol, el mecanisme de supervivència pot ser inactivat, i esdevenir-se la disminució de l'expressió de Bcl-x_L. En contrast, la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 pot ser associada amb respostes proliferatives i així les cèl·lules poden evitar l'apoptosi i prendre avantatges dels senyals proliferatius induïts per l'estradiol (Leung i Wang, 1999). Tanmateix, nosaltres trobem que els tumors 435 incrementen l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L *in vivo*. Donat que la proteïna antiapoptòtica Bcl-x_L es relaciona amb els tumors d'alt GH, es suggereix la seva influència en la disminució de l'apoptosi observada en els tumors 435. En aquests tumors l'augment de l'expressió de Bcl-2 podria estar relacionat amb nivells incrementats de c-Myc, donat que s'ha suggerit una cooperació sinèrgica entre Bcl-2 i c-Myc en carcinomes de mama humans (Sierra *i col.*, 1999). Per tant, es suggereix que la pèrdua o el guany d'apoptosi estan fortament regulats en les cèl·lules de càncer de mama.

Per altra banda, precisar el paper de l'apoptosi en la progressió metastàtica obre noves línies d'investigació en estratègies basades en l'abolició dels efectes de Bcl-2 o Bcl-x_L mitjançant estratègies de teràpia gènica amb seqüències antisentit dels gens antiapoptòtics *bcl-2* i/o *bcl-x_L*.

Així, nosaltres vam cotransfectar estabament la línia 435/Bcl-x_L amb el vector d'expressió ZeoSV2 (+) contenint una seqüència de 0,6 kb de l'ADNc del gen antiapoptòtic *bcl-x_L* en orientació antisentit, de manera que l'ARNm antisentit de *bcl-x_L* s'expressa constitutivament en la cèl·lula i s'uneix a l'ARNm complementari, formant-se un híbrid de

doble cadena tipus ARNm sentit-ARNm antisentit de *bcl-x_L* que provoca l'aturament de la traducció. Aquest disseny experimental ens garanteix uns nivells reduïts de proteïna Bcl-x_L al llarg de tots els experiments *in vitro* i *in vivo* realitzats. Els resultats obtinguts demostren que la seqüència antisentit de *bcl-x_L* indueix la reversió de la modificació del fenotip metastàtic induït per Bcl-x_L en les cèl·lules 435, augmentant l'apoptosi i l'adhesió a proteïnes de la matriu extracel·lular. Així, es suggereix que el bloqueig de l'expressió de *bcl-x_L* i/o *bcl-2* podria servir com a estratègia terapèutica potencialment efectiva en pacients amb tumors que expressin nivells alts de Bcl-x_L i/o Bcl-2, ja que podrien presentar major risc de desenvolupar metàstasis.

Per tal que aquestes estratègies antisentit utilitzades per reduir l'expressió gènica en les cèl·lules del tumor siguin clínicament aplicables es fan servir oligodesoxinucleòtids (ODN) antisentit, donat que la seva administració sistèmica és més adient comparada amb molts altres tipus de teràpia gènica. En aquest context, determinats estudis han demostrat que la utilització d'ODN antisentit de *bcl-2* redueixen efectivament la viabilitat de línies de càncer de pulmó Bcl-2 positives *in vitro* per reducció dels nivells de Bcl-2 i inducció d'apoptosi (Ziegler *i col.*, 1997). Recentment, s'ha demostrat que la inhibició de la funció de Bcl-2 utilitzant ODN antisentit de *bcl-2* més paclitaxel indueix retard en la progressió a la independència d'andrògens, igual que inhibició del creixement de tumors independents d'andrògens en càncer de pròstata (Miyake *i col.*, 2000). Addicionalment, altres estudis mostren que en cèl·lules Shionogi el tractament combinat amb oligonucleòtids antisentit de *bcl-2* i *bcl-x_L* incrementa significativament la quimiosensibilitat al taxol (Miyake *i col.*, 2000). Aquestes dades ens suggereixen que un tractament combinat amb ODN antisentit de *bcl-2* o *bcl-x_L* i paclitaxel podria sensibilitzar les cèl·lules 468 i MCF-7 a aquest agent quimioterapèutic.

Teràpies antisentit per reduir els nivells d'expressió de Bcl-2 o Bcl-x_L podrien incrementar l'efecte del tamoxifen en tumors de mama RE positius i Bcl-2 o Bcl-x_L positius. En concordança amb aquest fet, s'ha demostrat que l'ODN antisentit de *bcl-2* G3139 indueix apoptosi en cèl·lules de càncer de mama i contribueix a un efecte citotòxic additiu amb altres agents terapèutics *in vitro* (Chi *i col.*, 2000). Així, la capacitat per modular la funció i/o expressió de Bcl-2 o Bcl-x_L pot representar un esdeveniment crític per regular la quimiosensibilitat de les cèl·lules tumorals.

Actualment s'està desenvolupant un assaig clínic en fase I utilitzant l'ODN antisentit de *bcl-2* G3139 en combinació amb docetaxel per a pacients amb càncers de mama avançats i altres tumors sòlids, i en aquest punt els règims de toxicitat han estat ben tolerats. A més, en dues de les pacients amb càncer de mama es va observar resposta del tumor (Lebedeva i Stein,

2001).

Altres dades també corroboren que la utilització d'ODN antisentit dirigits a *bcl-x_L* indueixen sensibilització a l'apoptosi en cèl·lules de càncer gàstric MKN-45 (Kondo *i col.*, 1998), en cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó (Leech *i col.*, 2000) i en línies de carcinoma de mama humana dependents i independents d'estrògens (Simoes-Wüst *i col.*, 2000).

Recentment, s'ha dissenyat un ODN antisentit biespecífic dirigit a una regió comuna de *bcl-2* i *bcl-x_L* que inhibeix l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L i indueix apoptosi *in vitro* i *in vivo* en cèl·lules tumorals de diversos orígens histològics, incloent cèl·lules de carcinoma de mama (Gautschi *i col.*, 2001). Conseqüentment, el desenvolupament d'aquest antagonista capaç d'inhibir tots els homòlegs funcionals de Bcl-2 i incrementar així la sensibilitat a l'apoptosi representa una gran promesa per al tractament de la malaltia neoplàsica, particularment en combinació amb altres règims terapèutics.

L'increment del potencial metastàtic de les cèl·lules de càncer de mama 435 per sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L revela una funció important per a l'activitat antiapoptòtica d'aquestes proteïnes durant el desenvolupament de la progressió metastàtica del càncer de mama. A més, la sobreexpressió d'aquestes proteïnes pot constituir un mecanisme regulador de la resistència a drogues quimioterapèutiques o hormonoterapèutiques. Addicionalment, el fet que Bcl-2 i Bcl-x_L endarrereixin l'entrada en el cicle cel·lular també podria tenir implicacions en la teràpia anticancerosa, donat que aquestes cèl·lules estan doblement protegides perquè són refractàries a l'apoptosi i presenten major probabilitat de ser quiescents.

Així, la disregulació de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L afavoreix la selecció de cèl·lules de càncer de mama amb un fenotip més agressiu. I, conseqüentment, la capacitat per modular la funció i/o expressió de Bcl-2 o Bcl-x_L en tumors de mama amb sobreexpressió d'aquestes proteïnes pot representar un esdeveniment crític per induir la reversió del fenotip metastàtic i regular la sensibilitat de les cèl·lules tumorals a drogues terapèutiques, millorant la resposta als mètodes tradicionals de tractament del càncer.

VI.- Conclusions

1^a.- La sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L augmenta l'activitat metastàtica dels tumors induïts per les cèl·lules d'adenocarcinoma de mama 435, però no indueix el fenotip metastàtic dels tumors de cèl·lules 468 no metastàtiques.

2^a.- En les cèl·lules d'adenocarcinoma de mama metastàtiques i no metastàtiques analitzades la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L actua inhibint l'apoptosi i l'*anoikis* cel·lular.

3^a.- Dins de les diferents etapes del procés metastàtic, la independència d'adhesió a proteïnes de la matriu extracel·lular i la inhibició de l'*anoikis* poden ésser les funcions més críticament afectades per la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L.

4^a.- Existeix una base genètica lligada al fenotip metastàtic en el càncer de mama, i l'efecte de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x_L en el procés metastàtic estaria condicionat per la dotació oncogènica de les cèl·lules. Aquest efecte es manifesta en:

- la inhibició de l'*anoikis* i independència d'ancoratge en cèl·lules 435, però no en les cèl·lules 468 i MCF-7

- la resistència a l'apoptosi induïda per agents quimioterapèutics en les cèl·lules no metastàtiques 468 i MCF-7, però no en les cèl·lules 435

- l'increment del creixement dels tumors induïts amb cèl·lules 435, i en la disminució dels induïts per cèl·lules 468.

5^a.- La sobreexpressió de Bcl-x_L en cèl·lules 435 afavoreix la ubiqüitat de les metàstasis, induint metàstasis ganglionars i pulmonars.

6^a.- La selecció cel·lular que s'esdevé amb la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-x_L pot no ser redundant, ja que Bcl-2 afavoreix la metàstasi pulmonar i Bcl-x_L promou un avantatge organoespecífic de la metàstasi ganglionar.

7^a.- Durant el procés metastàtic la sobreexpressió de Bcl-x_L afavoreix la vehiculació de les cèl·lules pel torrent sanguini i disminueix el període de latència de les metàstasis.

8^a.- La seqüència antisentit de *bcl-x_L* indueix la reversió de l'augment del fenotip metastàtic desencadenat per Bcl-x_L en les cèl·lules 435 i restableix l'apoptosi induïda per factors de creixement i l'*anoikis*.

9^a.- La inhibició de l'expressió dels gens antiapoptòtics *bcl-2* i/o *bcl-x_L* amb seqüències antisentit podria utilitzar-se com a teràpia adjuvant per a la prevenció de la metastasi del càncer de mama.

VII.- Bibliografia

- Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE (1996). Specific p53 mutations are associated with *de novo* resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 2(7):811-4.
- Adnane J, Gaudray P, Simon MP, Simony-Lafontaine J, Jeanteur P, Theillet C (1989). Proto-oncogene amplification and human breast tumor phenotype. *Oncogene* 4(11):1389-95.
- Aggarwal BB, Natarajan K (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 7(2):93-124.
- Akiyama SK, Nagata K, Yamada KM (1990). Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochim Biophys Acta* 1031(1):91-110.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48(3):589-601.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2):171.
- Amado M, Carneiro F, Seixas M, Clausen H, Sobrinho-Simoes M (1998). Dimeric sialyl-Le(x) expression in gastric carcinoma correlates with venous invasion and poor outcome. *Gastroenterology* 114(3):462-70.
- Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57(1):25-40.
- Antonsson B, Martinou JC (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256(1):50-7.
- Arrick BA, Lopez AR, Elfman F, Ebner R, Damsky CH, Derynck R (1992). Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta 1. *J Cell Biol* 118(3):715-26.
- Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT (1993). Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest* 92(6):2569-76.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381):1305-8.
- Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E, Liotta LA (1990). Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J Cell Biol* 110(4):1427-38.
- Barnes DM (1997). Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J Pathol* 181(3):267-9.
- Barnes DM, Gillett CE (1998). Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52(1-3):1-15.

- Baselga J, Seidman AD, Rosen PP, Norton L (1997). HER2 overexpression and paclitaxel sensitivity in breast cancer: therapeutic implications. *Oncology (Huntingt)* 11(3 Suppl 2):43-8.
- Bates S, Vousden KH (1999). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55(1):28-37.
- Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 75(6):429-39.
- Beham A, Marin MC, Fernandez A, Herrmann J, Brisbay S, Tari AM, Lopez-Berestein G, Lozano G, Sarkiss M, McDonnell TJ (1997). Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* 15(23):2767-72.
- Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1998). Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer* 82(7):1296-302.
- Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA (1992). *c-myc* amplification is a better prognostic factor than *HER2/neu* amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 52(5):1107-13.
- Berns EM, Klijn JG, Smid M, van Staveren IL, Look MP, van Putten WL, Foekens JA (1996). *TP53* and *MYC* gene alterations independently predict poor prognosis in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 16(3):170-9.
- Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, de Witte HH, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Willman K, Portengen H, Benraad TJ, Foekens JA (1998). p53 protein accumulation predicts poor response to tamoxifen therapy of patients with recurrent breast cancer. *J Clin Oncol* 16(1):121-7.
- Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ (1998). *c-erbB-2*, *p53*, and *nm23* gene product expression in breast cancer in young women: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 29(4):323-9.
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 13(9):1919-25.
- Bièche I, Lidereau R (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 14(4):227-51.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6):1513-23.
- Biroccio A, Candiloro A, Mottolese M, Saporita O, Albini A, Zupi G, Del Bufalo D (2000). Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and *in vivo* angiogenesis in a breast carcinoma line. *Faseb J* 14(5):652-60.
- Blagosklonny MV, Giannakakou P, el-Deiry WS, Kingston DG, Higgs PI, Neckers L, Fojo T (1997). Raf-1/Bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 57(1):130-5.

- Bodian CA, Perzin KH, Lattes R (1996). Lobular neoplasia. Long term risk of breast cancer and relation to other factors. *Cancer* 78(5):1024-34.
- Bodmer JL, Burns K, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Thome M, Bornand T, Hahne M, Schroter M, Becker K, Wilson A, French LE, Browning JL, MacDonald HR, Tschopp J (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 6(1):79-88.
- Böhle AS, Kalthoff H (1999). Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbecks Arch Surg* 384(2):133-40.
- Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ (2001). Bcl-2 expression correlates with metastatic potential in pancreatic cancer cell lines. *Cancer* 92(5):1122-9.
- Bolufer P, Molina R, Ruiz A, Hernandez M, Vazquez C, Lluch A (1994). Estradiol receptors in combination with *neu* or *myc* oncogene amplifications might define new subtypes of breast cancer. *Clin Chim Acta* 229(1-2):107-22.
- Bonetti A, Zaninelli M, Leone R, Cetto GL, Pelosi G, Biolo S, Menghi A, Manfrin E, Bonetti F, Piubello Q (1998). Bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 4(10):2331-6.
- Bouck N, Stellmach V, Hsu SC (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69:135-74.
- Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ (1995). Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267(5199):891-3.
- Bourhis XL, Toillon RA, Boilly B, Hondermarck H (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 60(3):251-8.
- Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM (1996). The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 213((Pt 1)):123-61.
- Brenner C, Kroemer G (2000). Apoptosis. Mitochondria –the death signal integrators. *Science* 289(5482):1150-1.
- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79(7):1157-64.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85(5):683-93.
- Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112(Pt 11):1743-53.

Bueso-Ramos CE, Manshouri T, Haidar MA, Yang Y, McCown P, Ordonez N, Glassman A, Sneige N, Albitar M (1996). Abnormal expression of Mdm-2 in breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 37(2):179-88.

Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed JC, Hammond TG, Clejan S, Beckman BS (1998). Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res* 58(21):4940-6.

Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen AK, Paillerets BB, Chouaib S (1997). Resistance of MCF-7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 15(23):2817-26.

Cailleau R, Olive M, Cruciger QV (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14(11):911-5.

Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60(9):2541-6.

Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S (1996). c-erbB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14(10):2702-8.

Carty NJ, Foggitt A, Hamilton CR, Royle GT, Taylor I (1995). Patterns of clinical metastasis in breast cancer: an analysis of 100 patients. *Eur J Surg Oncol* 21(6):607-8.

Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Taffurelli M, Marrano D, Mancini AM (1995). Multiple expression patterns of biopathological markers in primary invasive breast carcinoma: a useful tool for elucidating its biological behaviour. *Ann Oncol* 6(3):275-82.

CGHFBC (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347(9017):1713-27.

CGHFBC (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 350(9084):1047-59.

Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC (2000). Clinical targets for anti-metastasis therapy. *Adv Cancer Res* 79(91-121).

Chang BS, Kelekar A, Harris MH, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB (1999). The BH3 domain of Bcl-x_s is required for inhibition of the antiapoptotic function of Bcl-x_L. *Mol Cell Biol* 19(10):6673-81.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7(6):821-30.

- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278(5345):1966-8.
- Cherbonnel-Lasserre C, Gauny S, Kronenberg A (1996). Suppression of apoptosis by Bcl-2 or Bcl-x_L promotes susceptibility to mutagenesis. *Oncogene* 13(7):1489-97.
- Chi, KN, Wallis AE, Lee CH, De Menezes DL, Sartor J, Dragowska WH, Mayer LD (2000). Effects of Bcl-2 modulation with G3139 antisense oligonucleotide on human breast cancer cells are independent of inherent Bcl-2 protein expression. *Breast Cancer Res Treat* 63(3):199-212.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4):505-12.
- Chipuk JE, Bhat M, Hsing AY, Ma J, Danielpour D (2001). Bcl-x_L blocks transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis by inhibiting cytochrome *c* release and not by directly antagonizing Apaf-1-dependent caspase activation in prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 276(28):26614-21.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14(22):5589-96.
- Choi KS, Lim IK, Brady JN, Kim SJ (1998). ICE-like protease (caspase) is involved in transforming growth factor beta 1-mediated apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology* 27(2):415-21.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9.
- Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, van den Broek L, Sahmoud TM, van de Vijver MJ (1998). p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J Clin Oncol* 16(2):470-9.
- Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Veluona MA, Hardwick JM (1998). Modulation of cell death by Bcl-x_L through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2):554-9.
- Compagni A, Christofori G (2000). Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 83(1):1-5.
- Conus S, Kaufmann T, Fellay I, Otter I, Rosse T, Borner C (2000). Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *Embo J* 19(7):1534-44.
- Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH (1993). Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 143(2):381-9.

- Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M, Marchetti P, Macho A, Kofler R, Kroemer G (1997). Bcl-2 and Bcl-x_L antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 57(1):62-7.
- Del Bufalo D, Biroccio A, Leonetti C, Zupi G (1997). Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *Faseb J* 11(12):947-53.
- Del Peso L (2000). Apoptosis and cancer. *Rev oncologia* 2(180-190).
- Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ (2000). c-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 83(12):1688-95.
- Desagher S, Martinou JC (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10(9):369-77.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68(383-424).
- Elledge RM, Green S, Howes L, Clark GM, Berardo M, Allred DC, Pugh R, Ciocca D, Ravdin P, O'Sullivan J, Rivkin S, Martino S, Osborne CK (1997). Bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 15(5):1916-22.
- Ellis LM, Fidler IJ (1996). Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 32A(14):2451-60.
- Ellisen LW, Haber DA (1998). Hereditary breast cancer. *Annu Rev Med* 49(425-36).
- Engers R, Gabbert HE (2000). Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126(12):682-92.
- Ethier SP (1995). Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 87(13):964-73.
- Evan G, Littlewood T (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281(5381):1317-22.
- Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S (1999). All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *Faseb J* 13(13):1647-57.
- Falette N, Paperin MP, Treilleux I, Gratadour AC, Peloux N, Mignotte H, Tooke N, Lofman E, Inganas M, Bremond A, Ozturk M, Puisieux A (1998). Prognostic value of p53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 58(7):1451-5.
- Fang G, Chang BS, Kim CN, Perkins C, Thompson CB, Bhalla KN (1998). "Loop" domain is necessary for taxol-induced mobility shift and phosphorylation of Bcl-2 as well as for inhibiting taxol-induced cytosolic accumulation of cytochrome c and apoptosis. *Cancer Res* 58(15):3202-8.
- Fang W, Nath KA, Mackey MF, Noelle RJ, Mueller DL, Behrens TW (1997). CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating Bcl-x_L expression and blocking oxidant accumulation. *Am J Physiol* 272(3 Pt 1):C950-6.

- Fanidi A, Harrington EA, Evan GI (1992). Cooperative interaction between *c-myc* and *bcl-2* proto-oncogenes. *Nature* 359(6395):554-6.
- Fantl V, Richards MA, Smith R, Lammie GA, Johnstone G, Allen D, Gregory W, Peters G, Dickson C, Barnes DM (1990). Gene amplification on chromosome band 11q13 and oestrogen receptor status in breast cancer. *Eur J Cancer* 26(4):423-9.
- Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R (1995). Cloning of a *bcl-2* homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374(6524):731-3.
- Fidler IJ (1997). Molecular biology of cancer. A: Cancer: Principles and Practice of Oncology. VT DeVita, S Hellman and A Rosemberg. 5^a edició. Lippincott-Raven.
- Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome *c* release from mitochondria is inhibitable by Bcl-x_L. *J Biol Chem* 274(4):2225-33.
- Fodstad O, Kjonniksen I (1994). Microenvironment revisited: time for reappraisal of some prevailing concepts of cancer metastasis. *J Cell Biochem* 56(1):23-8.
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339(6219):58-61.
- Fox SB, Harris AL (1997). The epidermal growth factor receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2(2):131-41.
- Frankel A, Rosen K, Filmus J, Kerbel RS (2001). Induction of *anoikis* and suppression of human ovarian tumor growth *in vivo* by down-regulation of Bcl-x_L. *Cancer Res* 61(12):4837-41.
- Frisch SM, Vuori K, Kelaita D, Sicks S (1996). A role for Jun-N-terminal kinase in *anoikis*; suppression by Bcl-2 and CrmA. *J Cell Biol* 135(5):1377-82.
- Fuhlbrigge RC, Fine SM, Unanue ER, Chaplin DD (1988). Expression of membrane interleukin 1 by fibroblasts transfected with murine pro-interleukin 1 alpha cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(15):5649-53.
- Furth PA, Bar-Peled U, Li M, Lewis A, Laucirica R, Jager R, Weiher H, Russell RG (1999). Loss of anti-mitotic effects of Bcl-2 with retention of anti-apoptotic activity during tumor progression in a mouse model. *Oncogene* 18(47):6589-96.
- Gaffey MJ, Frierson HF, Jr., Williams ME (1993). Chromosome 11q13, *c-erbB2*, and *c-myc* amplification in invasive breast carcinoma: clinicopathologic correlations. *Mod Pathol* 6(6):654-9.
- Gautschi O, Tschopp S, Olie RA, Leech SH, Simoes-Wust AP, Ziegler A, Baumann B, Odermatt B, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2001). Activity of a novel *bcl-2/bcl-x_L*-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 93(6):463-71.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3):493-501.

Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Willsher P, McClelland RA, Hoyle HB, Kyme SR, Finlay P, Blamey RW, Nicholson RI (1994). Immunocytochemical localization of Bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 59(5):619-28.

Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto F, Ono Y, Uematsu K, Takeda Y, Hibino S, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S (2001). Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer* 37(12):1554-61.

Giancotti FG, Ruoslahti E (1990). Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* 60(5):849-59.

Giani C, D'Amore E, Delarue JC, Mouriesse H, May-Levin F, Sancho-Garnier H, Breccia M, Contesso G (1986). Estrogen and progesterone receptors in benign breast tumors and lesions: relationship with histological and cytological features. *Int J Cancer* 37(1):7-10.

Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, Barnes D (1996). Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 69(2):92-9.

Gleave M, Hsieh JT, Gao CA, von Eschenbach AC, Chung LW (1991). Acceleration of human prostate cancer growth *in vivo* by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res* 51(14):3753-61.

Glinsky GV, Glinsky VV (1996). Apoptosis and metastasis: a superior resistance of metastatic cancer cells to programmed cell death. *Cancer Lett* 101(1):43-51.

Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ (1997). Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett* 115(2):185-93.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(2):111-22.

Gómez J, Curiel DT (1998). Biología de las metástasis. A: Oncología clínica. Fundamentos y patología general. M Gonzalez, A Ordoñez, J Feliu, P Zamora, E Espinosa and J de Castro. 2^a edición. McGraw-Hill Interamericana: 35-62.

Gómez L, González M (1998). Genes supresores de tumores. A: Oncología clínica. Fundamentos y patología general. M González, M Ordoñez, J Feliu, P Zamora, E Espinosa and J de Castro. 2^a edición. McGraw-Hill-Interamericana: 71-79.

Gonzalez-Campora R, Galera Ruiz MR, Vazquez Ramirez F, Rios Martin JJ, Fernandez Santos JM, Ramos Martos MM, Gomez Pascual A (2000). Apoptosis in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 196(3):167-74.

- Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA (1992). Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52(24):6949-52.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379(6560):88-91.
- Gray-Bablin J, Zalvide J, Fox MP, Knickerbocker CJ, DeCaprio JA, Keyomarsi K (1996). Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26):15215-20.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M (2001). Cancer Statistics 2001. *CA Cancer J Clin* 51:15-36.
- Groshong SD, Owen GI, Grimison B, Schauer IE, Todd MC, Langan TA, Sclafani RA, Lange CA, Horwitz KB (1997). Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol Endocrinol* 11(11):1593-607.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13(15):1899-911.
- Gui GP, Puddefoot JR, Vinson GP, Wells CA, Carpenter R (1997). Altered cell-matrix contact: a prerequisite for breast cancer metastasis? *Br J Cancer* 75(5):623-33.
- Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, Powles TJ, Elliott C, Ashley S, Monaghan P, Harrison S (1988). c-erbB2 expression in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 58(4):453-7.
- Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, et al. (1992). Prognostic importance of c-erbB2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10(7):1049-56.
- Hainaut P, Hollstein M (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77(1):81-137.
- Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM (1994). Down-regulation of Bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54(8):2095-7.
- Haldar S, Chintapalli J, Croce CM (1996). Taxol induces Bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* 56(6):1253-5.
- Haldar S, Basu A, Croce CM (1997). Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 57(2):229-33.
- Hanahan D (1988). Dissecting multistep tumorigenesis in transgenic mice. *Annu Rev Genet* 22:479-519.

- Hansen RK, Bissell MJ (2000). Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer* 7(2):95-113.
- Harrison DJ (1998). Life and death in the genesis of the tumour cell. *Toxicol Lett* 102-103:115-9.
- Hart IR, Saini A (1992). Biology of tumour metastasis. *Lancet* 339(8807):1453-7.
- Hart IR (1999). Perspective: tumour spread –the problems of latency. *J Pathol* 187(1):91-4.
- Hartmann A, Blaszyk H, Kovach JS, Sommer SS (1997). The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet* 13(1):27-33.
- Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA (1996). Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 56(4):892-8.
- Heimann R, Ferguson DJ, Hellman S (1998). The relationship between Nm23, angiogenesis, and the metastatic proclivity of node-negative breast cancer. *Cancer Res* 58(13):2766-71.
- Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P, Van Marck E (1995). Prognostic value of Bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 72(2):354-60.
- Henderson BE, Feigelson HS (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21(3):427-33.
- Hengartner MO (1998). Apoptosis. Death cycle and Swiss army knives. *Nature* 391(6666):441-2.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-6.
- Hetts SW (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* 279(4):300-7.
- Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Luscher TF, Fujii T (1999). Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7. *J Biol Chem* 274(52):37461-6.
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22(5):155-6.
- Holly SP, Larson MK, Parise LV (2000). Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res* 261(1):69-74.
- Holmes MD, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Hankinson SE, Speizer FE, Rosner B, Willett WC (1999). Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *Jama* 281(10):914-20.
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995). *Dormancy* of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1(2):149-53.

- Howard BA, Gusterson BA (2000). Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2):119-37.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4):495-504.
- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-x_L during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8):3668-72.
- Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, Cory S (1997a). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *Embo J* 16(15):4628-38.
- Huang DC, Adams JM, Cory S (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *Embo J* 17(4):1029-39.
- Huang Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A, Bhalla K (1997b). Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 42(1):73-81.
- Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR, et al. (1996). Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer – a pooled analysis. *N Engl J Med* 334(6):356-61.
- Hutchinson JN, Muller WJ (2000). Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* 19(53):6130-7.
- Hynes RO (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1):11-25.
- Ibrado AM, Liu L, Bhalla K (1997). Bcl-x_L overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Cancer Res* 57(6):1109-15.
- Ingvarsson S (1999). Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol* 9(4):277-88.
- Ito T, Deng X, Carr B, May WS (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* 272(18):11671-3.
- Jäättelä M, Benedict M, Tewari M, Shayman JA, Dixit VM (1995). Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* 10(12):2297-305.
- Jäättelä M (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248(1):30-43.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88(3):347-54.

Jager R, Herzer U, Schenkel J, Weiher H (1997). Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-Myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene* 15(15):1787-95.

Johnson BW, Boise LH (1999). Bcl-2 and caspase inhibition cooperate to inhibit tumor necrosis factor- α -induced cell death in a Bcl-2 cleavage-independent fashion. *J Biol Chem* 274(26):18552-8.

Johnson BW, Cepero E, Boise LH (2000). Bcl-x_L inhibits cytochrome *c* release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 275(40):31546-53.

Jordan MA, Wilson L (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* 10(1):123-30.

Kandouz M, Lombet A, Perrot JY, Jacob D, Carvajal S, Kazem A, Rostene W, Therwath A, Gompel A (1999). Proapoptotic effects of antiestrogens, progestins and androgen in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6):463-71.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, McInerney EM (1997). William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 44(1):23-38.

Kelekar A, Thompson CB (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8(8):324-30.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54(2):380-5.

King RJ (1993). William L. McGuire Memorial Symposium. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 27(1-2):3-15.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25(2):312-8.

Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD (1997). The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275(5303):1132-6.

Kondo S, Shinomura Y, Kanayama S, Higashimoto Y, Kiyohara T, Zushi S, Kitamura S, Ueyama H, Matsuzawa Y (1998). Modulation of apoptosis by endogenous Bcl-x_L expression in MKN-45 human gastric cancer cells. *Oncogene* 17(20):2585-91.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278(5336):294-8.

Koukoulis GK, Virtanen I, Korhonen M, Laitinen L, Quaranta V, Gould VE (1991). Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. Correlations with their functions as receptors and cell adhesion molecules. *Am J Pathol*

139(4):787-99.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC (1993). Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53(19):4701-14.

Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC (1994). Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-x expression. *Cancer Res* 54(21):5501-7.

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

Kroemer G (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3(6):614-20.

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18(1):44-51.

Kroemer G, Reed JC (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6(5):513-9.

Kumar R, Mandal M, Lipton A, Harvey H, Thompson CB (1996). Overexpression of HER2 modulates Bcl-2, Bcl-x_L, and tamoxifen-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2(7):1215-9.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-5.

Lebedeva I, Stein CA (2001). Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:403-19.

Leech SH, Olie RA, Gautschi O, Simoes-Wust AP, Tschopp S, Haner R, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2000). Induction of apoptosis in lung-cancer cells following Bcl-x_L anti-sense treatment. *Int J Cancer* 86(4):570-6.

Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL (1994). Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and *in situ* cancer. *Br J Cancer* 69(1):135-9.

Lema BE, Maciel A (1998). Patología de los carcinomas no invasores de la mama. A: Cáncer de mama. G Hernández, ETL Bernardello and JA Pinotti. McGraw-Hill Interamericana de Venezuela, S. A.: 77-118.

Leung LK, Wang TT (1999). Paradoxical regulation of Bcl-2 family proteins by 17beta-oestradiol in human breast cancer cells MCF-7. *Br J Cancer* 81(3):387-92.

Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3):323-31.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4):491-501.

Li H, Yuan J (1999). Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 11(2):261-6.

Li M, Lewis B, Capuco AV, Laucirica R, Furth PA (2000). WAP-TAg transgenic mice and the study of dysregulated cell survival, proliferation, and mutation during breast carcinogenesis. *Oncogene* 19(8):1010-9.

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

Liapis H, Flath A, Kitazawa S (1996). Integrin alpha v beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. *Diagn Mol Pathol* 5(2):127-35.

Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: Bcl-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9545-52.

Ling YH, Tornos C, Perez-Soler R (1998). Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. *J Biol Chem* 273(30):18984-91.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34(5):997-1004.

Liotta LA, Kohn EC (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411(6835):375-9.

Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjanen K (1995). Apoptosis suppressing protein Bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 177(1):49-55.

Lipponen P (1999). Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr Relat Cancer* 6(1):13-6.

Lizard-Nacol S, Lidereau R, Collin F, Arnal M, Hahnel L, Roignot P, Cuisenier J, Guerrin J (1995). Benign breast disease: absence of genetic alterations at several loci implicated in breast cancer malignancy. *Cancer Res* 55(19):4416-9.

Loeffler M, Kroemer G (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256(1):19-26.

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T (1994). p53 status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*. *Science* 266(5186):807-10.

Lundberg AS, Weinberg RA (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18(2):753-61.

- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4):481-90.
- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: *dormancy* of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153(3):865-73.
- Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B (2000). The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2):139-63.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 140(6):1485-95.
- Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L (1994). Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 74(1 Suppl):381-400.
- Marches R, Scheuermann RH, Uhr JW (1998). Cancer *dormancy*: role of cyclin-dependent kinase inhibitors in induction of cell cycle arrest mediated via membrane IgM. *Cancer Res* 58(4):691-7.
- Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, Kroemer G (1996). Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157(11):4830-6.
- Mareel M, Boterberg T, Noe V, Van Hoorde L, Vermeulen S, Bruyneel E, Bracke M (1997). E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J Cell Physiol* 173(2):271-4.
- Markopoulos C, Berger U, Wilson P, Gazet JC, Coombes RC (1988). Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296(6633):1349-51.
- Marshall E (1993). Epidemiology. Search for a killer: focus shifts from fat to hormones. *Science* 259(5095):618-21.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281(5385):2027-31.
- Mazel S, Burtrum D, Petrie HT (1996). Regulation of cell division cycle progression by Bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med* 183(5):2219-26.
- McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136(1):215-27.

Bibliografia

- McConkey DJ (1998). Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 99(3):157-68.
- McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M, Andersen MM, Lo P (1996). Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia* 52(10-11):1008-17.
- McEarchern JA, Kobie JJ, Mack V, Wu RS, Meade-Tollin L, Arteaga CL, Dumont N, Besselsen D, Seftor E, Hendrix MJ, Katsanis E, Akporiaye ET (2001). Invasion and metastasis of a mammary tumor involves TGF-beta signaling. *Int J Cancer* 91(1):76-82.
- McGuire WL (1978). Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Semin Oncol* 5(4):428-33.
- McGuire WL, Clark GM (1992). Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 326(26):1756-61.
- Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM (2000). Role of *HER2* gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 182(2):150-62.
- Mettlin C (1999). Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin* 49(3):138-44.
- Miayake H, Tolcher A, Gleave ME (2000). Chemosensitization and delayed androgen-independent recurrence of prostate cancer with the use of antisense *bcl-2* oligodeoxynucleotides. *J Natl Cancer Inst* 92(1):34-41.
- Minn AJ, Boise LH, Thompson CB (1996). Expression of Bcl-x_L and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev* 10(20):2621-31.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB (1997). Bcl-x_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385(6614):353-7.
- Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S (1999). Overexpression of Bcl-2 enhances metastatic potential of human bladder cancer cells. *Br J Cancer* 79(11-12):1651-6.
- Miyake H, Monia BP, Gleave ME (2000). Inhibition of progression to androgen-independence by combined adjuvant treatment with antisense Bcl-x_L and antisense Bcl-2 oligonucleotides plus taxol after castration in the Shionogi tumor model. *Int J Cancer* 86(6):855-62.
- Moreno V, Sanchez V, Galceran J, Borrás JM, Borrás J, Bosch FX (1998). Risk of developing and dying from cancer in Catalonia. *Med Clin (Barc)* 110(3):86-93.
- Morikawa K, Walker SM, Jessup JM, Fidler IJ (1988). *In vivo* selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res* 48(7):1943-8.
- Mosher DF, Sottile J, Wu C, McDonald JA (1992). Assembly of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 4(5):810-8.

- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381(6580):335-41.
- Mukhopadhyay R, Theriault RL, Price JE (1999). Increased levels of alpha 6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17(4):325-32.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824):50-6.
- Murphy KL, Kittrell FS, Gay JP, Jager R, Medina D, Rosen JM (1999). Bcl-2 expression delays mammary tumor development in dimethylbenz(a)anthracene-treated transgenic mice. *Oncogene* 18(47):6597-604.
- Nagata S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3):355-65.
- Nagata S (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256(1):12-8.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25):14681-6.
- Nass SJ, Li M, Amundadottir LT, Furth PA, Dickson RB (1996). Role for Bcl-x_L in the regulation of apoptosis by EGF and TGF beta 1 in c-Myc overexpressing mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227(1):248-56.
- Nass SJ, Dickson RB (1997). Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 44(1):1-22.
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8):299-306.
- Nicholson RI, McClelland RA, Gee JM, Manning DL, Cannon P, Robertson JF, Ellis IO, Blamey RW (1994). Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat* 29(1):117-25.
- Nicholson S, Richard J, Sainsbury C, Halcrow P, Kelly P, Angus B, Wright C, Henry J, Farndon JR, Harris AL (1991). Epidermal growth factor receptor (EGFR); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. *Br J Cancer* 63(1):146-50.
- Nicolson GL (1998). Breast cancer metastasis-associated genes: role in tumour progression to the metastatic state. *Biochem Soc Symp* 63(6):231-43.
- Nielsen NH, Arnerlov C, Emdin SO, Landberg G (1996). Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. *Br J Cancer* 74(6):874-80.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342(6250):705-8.

Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI, Gudkov AV (1996). p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 13(8):1709-19.

Nikiforov MA, Kwek SS, Mehta R, Artwohl JE, Lowe SW, Gupta TD, Deichman GI, Gudkov AV (1997). Suppression of apoptosis by Bcl-2 does not prevent p53-mediated control of experimental metastasis and anchorage dependence. *Oncogene* 15(25):3007-12.

Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17(25):3237-45.

O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SA, Osborne CK, Clark GM, Allred DC (1998). Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* 90(9):697-703.

O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ, Kohn KW (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57(19):4285-300.

Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, Recant WM (1997). Overexpression of Bcl-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 3(4):230-7.

O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *Embo J* 15(24):6979-90.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79(2):315-28.

Paget S (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* i:571-573.

Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N (1998). erbB2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90(18):1361-70.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276(5309):111-3.

Pan G, O'Rourke K, Dixit VM (1998). Caspase-9, Bcl-x_L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273(10):5841-5.

- Panvichian R, Orth K, Day ML, Day KC, Pilat MJ, Pienta KJ (1998). Paclitaxel-associated multiminucleation is permitted by the inhibition of caspase activation: a potential early step in drug resistance. *Cancer Res* 58(20):4667-72.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49(1):33-64, 1.
- Pathak S, Siciliano MJ, Cailleau R, Wiseman CL, Hsu TC (1979). A human breast adenocarcinoma with chromosome and isoenzyme markers similar to those of the HeLa line. *J Natl Cancer Inst* 62(2):263-71.
- Pecci A, Viegas LR, Baranao JL, Beato M (2001). Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse *bcl-x* gene. *J Biol Chem* 276(24):21062-9.
- Perry RR, Kang Y, Greaves BR (1995). Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 72(6):1441-6.
- Persons DL, Borelli KA, Hsu PH (1997). Quantitation of *HER2/neu* and *c-myc* gene amplification in breast carcinoma using fluorescence *in situ* hybridization. *Mod Pathol* 10(7):720-7.
- Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* 396(1):7-13.
- Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994). Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by Bcl-2. *Cancer Res* 54(14):3714-7.
- Pignatelli M, Hanby AM, Stamp GW (1991). Low expression of beta 1, alpha 2 and alpha 3 subunits of VLA integrins in malignant mammary tumours. *J Pathol* 165(1):25-32.
- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J (1999). Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83(1):18-29.
- Poller DN, Hutchings CE, Galea M, Bell JA, Nicholson RA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO (1992). p53 protein expression in human breast carcinoma: relationship to expression of epidermal growth factor receptor, c-erbB2 protein overexpression, and oestrogen receptor. *Br J Cancer* 66(3):583-8.
- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM (1997). Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and Cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3(2):222-5.
- Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV, Fojo T (1998). Bcl-x_L is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 58(15):3331-8.
- Powell DE (1995). La mama normal: estructura, función y epidemiología. A: Enfermedades de la mama: diagnóstico y detección. DE Powell and CB Stealling. Mosby/Doyma Libros: 3-20.

- Powell DE, Stelling CB (1995). Carcinoma de mama. A: Enfermedades de la mama: diagnóstico y detección. DE Powell and CB Stelling. Mosby/Doyma Libros: 272-343.
- Pratt MA, Krajewski S, Menard M, Krajewska M, Macleod H, Reed JC (1998). Estrogen withdrawal-induced human breast cancer tumour regression in nude mice is prevented by Bcl-2. *FEBS Lett* 440(3):403-8.
- Price JE, Polyzos A, Zhang RD, Daniels LM (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* 50(3):717-21.
- Raff MC (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356(6368):397-400.
- Rao L, Perez D, White E (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135(6 Pt 1):1441-55.
- Ratner A, Clark WR (1993). Role of TNF-alpha in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J Immunol* 150(10):4303-14.
- Ravdin PM, De Laurentiis M, Vendely T, Clark GM (1994). Prediction of axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst* 86(23):1771-5.
- Reed JC (1997). Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. A: Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. San Diego: Academic Press: 501-532.
- Reed JC (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17(25):3225-36.
- Reiss M, Barcellos-Hoff MH (1997). Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis. *Breast Cancer Res Treat* 45(1):81-95.
- Rodeck U, Jost M, DuHadaway J, Kari C, Jensen PJ, Risse B, Ewert DL (1997). Regulation of Bcl-x_L expression in human keratinocytes by cell-substratum adhesion and the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10):5067-72.
- Rosfjord EC, Dickson RB (1999). Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2):229-37.
- Roux-Dosseto M, Romain S, Dussault N, Desideri C, Piana L, Bonnier P, Tubiana N, Martin PM (1992). *c-myc* gene amplification in selected node-negative breast cancer patients correlates with high rate of early relapse. *Eur J Cancer* 10(4):1600-4.
- Rowinsky EK, Donehower RC (1995). Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 332(15):1004-14.
- Rubio N, Espana L, Fernandez Y, Blanco J, Sierra A (2001). Metastatic behavior of human breast carcinomas overexpressing the Bcl-x_L gene: a role in dormancy and organospecificity. *Lab Invest* 81(5):725-34.
- Rudel T, Bokoch GM (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276(5318):1571-4.

- Ruiz A, Guillem V (1998). Cáncer de mama. A: Guía de prescripción. Oncología médica. E Diaz-Rubio and V Guillem Porta. 2^a edició. I.M.&C.: 135-146.
- Ruiz E (1993a). Recuerdo anatómico e histológico de la mama. A: Manual de patología mamaria. E Ruiz. Editorial JIMS: 1-13.
- Ruiz E (1993b). Patología maligna. A: Manual de patología mamaria. E Ruiz. Editorial JIMS: 161-193.
- Russo IH, Russo J (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3(1):49-61.
- Saambrok J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2^a edició. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, EUA.
- Saiki I, Murata J, Iida J, Sakurai T, Nishi N, Matsuno K, Azuma I (1989). Antimetastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures of the cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequences. *Br J Cancer* 60(5):722-8.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662):96-9.
- Sakorafas GH, Tsiotou AG (2000). Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the breast: evolving perspectives. *Cancer Treat Rev* 26(2):103-25.
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10):5113-8.
- Schendel SL, Montal M, Reed JC (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* 5(5):372-80.
- Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC (1999). Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* 274(31):21932-6.
- Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21):11357-62.
- Schreiner C, Fisher M, Hussein S, Juliano RL (1991). Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient Chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res* 51(6):1738-40.
- Scorilas A, Trangas T, Yotis J, Pateras C, Talieri M (1999). Determination of *c-myc* amplification and overexpression in breast cancer patients: evaluation of its prognostic value against *c-erbB2*, cathepsin-D and clinicopathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *Br J Cancer* 81(8):1385-91.
- Scott KA, Walker RA (1997). Lack of Cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br J Cancer* 76(10):1288-92.

Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17):7834-8.

Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D (1999). Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp* 65(233-43).

Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F (1997). Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 386(6626):728-31.

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y (1996). Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 13(1):21-9.

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998). Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4):1455-9.

Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3100-5.

Shoker BS, Sloane JP (1999). DCIS grading schemes and clinical implications. *Histopathology* 35(5):393-400.

Shtivelman E (1997). A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene* 14(18):2167-73.

Sierra A, Lloveras B, Castellsague X, Moreno L, Garcia-Ramirez M, Fabra A (1995). Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. *Int J Cancer* 60(1):54-60.

Sierra A, Castellsague X, Tortola S, Escobedo A, Lloveras B, Peinado MA, Moreno A, Fabra A (1996). Apoptosis loss and Bcl-2 expression: key determinants of lymph node metastases in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* 2(11):1887-94.

Sierra A, Price JE, Garcia-Ramirez M, Mendez O, Lopez L, Fabra A (1997). Astrocyte-derived cytokines contribute to the metastatic brain specificity of breast cancer cells. *Lab Invest* 77(4):357-68.

Sierra A, Castellsague X, Coll T, Manas S, Escobedo A, Moreno A, Fabra A (1998). Expression of death-related genes and their relationship to loss of apoptosis in T1 ductal breast carcinomas. *Int J Cancer* 79(2):103-10.

Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Moreno A, Drudis T, Fabra A (1999). Synergistic cooperation between c-Myc and Bcl-2 in lymph node progression of T1 human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 54(1):39-45.

- Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U (1994). The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 86(7):499-504.
- Silvestrini R, Daidone MG, Benini E, Faranda A, Tomasic G, Boracchi P, Salvadori B, Veronesi U (1996). Validation of p53 accumulation as a predictor of distant metastasis at 10 years of follow-up in 1400 node-negative breast cancers. *Clin Cancer Res* 2(12):2007-13.
- Silvestrini R, Veneroni S, Benini E, Daidone MG, Luisi A, Leutner M, Maucione A, Kenda R, Zucali R, Veronesi U (1997). Expression of p53, glutathione S-transferase-pi, and Bcl-2 proteins and benefit from adjuvant radiotherapy in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 89(9):639-45.
- Simoës-Wüst AP, Olie RA, Gautschi O, Leech SH, Haner R, Hall J, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2000). Bcl-x_L antisense treatment induces apoptosis in breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 87(4):582-90.
- Simonian PL, Grillot DA, Nunez G (1997). Bcl-2 and Bcl-x_L can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 90(3):1208-16.
- Singh Y, Nambu H, Yoshizawa K, Hatano T, Hioki K, Tsubura A (1998). Factors related to axillary lymph node metastasis in T1 breast carcinoma. *Oncol Rep* 5(2):459-62.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER2/neu* oncogene. *Science* 235(4785):177-82.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6(11):1067-74.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76(6):959-62.
- Smith RA (2000). Breast cancer screening among women younger than age 50: a current assessment of the issues. *CA Cancer J Clin* 50(5):312-36.
- 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 (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *Jama* 279(7):535-40.
- Sobin LH, Hermanek P, Hutter RV (1988). TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new (1987) and the old editions. *Cancer* 61(11):2310-4.
- Sonnenberg A, Linders CJ, Modderman PW, Damsky CH, Aumailley M, Timpl R (1990). Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that alpha 6 beta 1 but not alpha 6 beta 4 functions as a major receptor for fragment E8. *J Cell Biol* 110(6):2145-55.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51(5):1409-16.

Srinivasan A, Li F, Wong A, Kodandapani L, Smidt R, Krebs JF, Fritz LC, Wu JC, Tomaselli KJ (1998). Bcl-x_L functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF-7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 273(8):4523-9.

Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL (1998). Involvement of microtubules in the regulation of Bcl-2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 18(6):3509-17.

Srivastava RK, Mi QS, Hardwick JM, Longo DL (1999). Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7):3775-80.

Stal O, Stenmark Askmalm M, Wingren S, Rutqvist LE, Skoog L, Ferraud L, Sullivan S, Carstensen J, Nordenskjold B (1995). p53 expression and the result of adjuvant therapy of breast cancer. *Acta Oncol* 34(6):767-70.

Stamenkovic I (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10(6):415-33.

Stanta G, Bonin S, Losi L, Eusebi V (1998). Molecular characterization of intraductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 432(2):107-11.

Steeg PS, de la Rosa A, Flatow U, MacDonald NJ, Benedict M, Leone A (1993). Nm23 and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 25(2):175-87.

Steller H (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267(5203):1445-9.

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184(4):1331-41.

Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2):151-65.

Sweeney TM, Kibbey MC, Zain M, Fridman R, Kleinman HK (1991). Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases. *Cancer Metastasis Rev* 10(3):245-54.

Takaoka A, Adachi M, Okuda H, Sato S, Yawata A, Hinoda Y, Takayama S, Reed JC, Imai K (1997). Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene* 14(24):2971-7.

Tang C, Willingham MC, Reed JC, Miyashita T, Ray S, Ponnathpur V, Huang Y, Mahoney ME, Bullock G, Bhalla K (1994). High levels of p26Bcl-2 oncoprotein retard taxol-induced apoptosis in human pre-B leukemia cells. *Leukemia* 8(11):1960-9.

- Tavassoli M, Quirke P, Farzaneh F, Lock NJ, Mayne LV, Kirkham N (1989). *c-erbB2/c-erbA* co-amplification indicative of lymph node metastasis, and *c-myc* amplification of high tumour grade, in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 60(4):505-10.
- Teixeira C, Reed JC, Pratt MA (1995). Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 55(17):3902-7.
- Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203):1456-62.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281(5381):1312-6.
- Toi M, Tominaga T, Osaki A, Toge T (1994). Role of epidermal growth factor receptor expression in primary breast cancer: results of a biochemical study and an immunocytochemical study. *Breast Cancer Res Treat* 29(1):51-8.
- Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H (1992). Prognostic significance of HER2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 10(7):1044-8.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985). Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma. *Science* 228(4706):1440-3.
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 466(1):6-10.
- Turnay J, Olmo N, Lopez-Conejo MT, Lizarbe MA (1994). Matrix components and behavior of human adenocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A(10):643-7.
- Uhlmann EJ, D'Sa-Eipper C, Subramanian T, Wagner AJ, Hay N, Chinnadurai G (1996). Deletion of a nonconserved region of Bcl-2 confers a novel gain of function: suppression of apoptosis with concomitant cell proliferation. *Cancer Res* 56(11):2506-9.
- Vairo G, Innes KM, Adams JM (1996). Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 13(7):1511-9.
- Vairo G, Soos TJ, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen ME, Koff A, Adams JM (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* 20(13):4745-53.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB (1999). Bcl-x_L prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 3(2):159-67.
- Vaquero C (1982). Estudio histológico de la piel y de sus anejos. Glándula mamaria. A: Fundamentos de histología. C Vaquero. Editora Importecnica, S. A.: 410-419.

Viladiu P, Izquierdo À, Beltràn M, Bosch FX, Moreno V (1996). Càncer de mama. A: Epidemiologia del càncer ginecològic i de mama a l'àrea sanitària de Girona. Registre del càncer de Girona. AECC: 151-159.

Vogel VG (2000). Breast cancer prevention: a review of current evidence. *CA Cancer J Clin* 50(3):156-70.

Vos CB, Cleton-Jansen AM, Berx G, de Leeuw WJ, ter Haar NT, van Roy F, Cornelisse CJ, Peterse JL, van de Vijver MJ (1997). E-cadherin inactivation in lobular carcinoma *in situ* of the breast: an early event in tumorigenesis. *Br J Cancer* 76(9):1131-3.

Wang HG, Miyashita T, Takayama S, Sato T, Torigoe T, Krajewski S, Tanaka S, Hovey L, Troppmair J, Rapp UR, et al. (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9(9):2751-6.

Watson PH, Safneck JR, Le K, Dubik D, Shiu RP (1993). Relationship of *c-myc* amplification to progression of breast cancer from *in situ* to invasive tumor and lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst* 85(11):902-7.

Welch DR, Fabra A, Nakajima M (1990). Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19):7678-82.

Welch DR, Wei LL (1998). Genetic and epigenetic regulation of human breast cancer progression and metastasis. *Endocrine-Related Cancer* 5:155-197.

Welch DR, Rinker-Schaeffer CW (1999). What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst* 91(16):1351-3.

Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385(6613):265-9.

White R, Parker MG (1998). Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine-Related Cancer* 5:1-14.

Whittemore AS (1999). The Eighth AACR American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. Genetically tailored preventive strategies: an effective plan for the twenty-first century? American Association for Cancer Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(8):649-58.

Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G, Al-Mehdi AB, Bernhard EJ, Muschel RJ (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 61(1):333-8.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80(8 Suppl):1529-37.

Wyllie A, Donahue V, Fischer B, Hill D, Manzow S (1998). Apoptosis and cell proliferation. 2^a edició Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica: 2-4.

- Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756):555-6.
- Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ (1996). Bax-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14559-63.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80(2):285-91.
- Yang E, Korsmeyer SJ (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 88(2):386-401.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303):1129-32.
- Yawata A, Adachi M, Okuda H, Naishiro Y, Takamura T, Hareyama M, Takayama S, Reed JC, Imai K (1998). Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene* 16(20):2681-6.
- Yeatman TJ, Bland KI (2000). Evaluación y estadificación del cáncer de mama. A: La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. KI Bland and EM Copeland III. 2^a edició. Editorial Médica Panamericana, S. A.: 407-424.
- Yin DX, Schimke RT (1996). Inhibition of apoptosis by overexpressing Bcl-2 enhances gene amplification by a mechanism independent of aphidicolin pretreatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8):3394-8.
- Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103(2):197-206.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369(6478):321-3.
- Yu D, Hung MC (2000). Role of erbB2 in breast cancer chemosensitivity. *Bioessays* 22(7):673-80.
- Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16(17):2265-82.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996). Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x_L. *Cell* 87(4):619-28.
- Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, Kanno M, Katagata N, Hara K, Watanabe T, Tsuchiya A (1997). Correlation between the expression of apoptosis-related Bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 3(12 Pt 1):2329-35.

Zhang GJ, Kimijima I, Tsuchiya A, Abe R (1998). The role of Bcl-2 expression in breast carcinomas (Review). *Oncol Rep* 5(5):1211-6.

Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S (1999). Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of Bcl-2, but not Bax and Bcl-x_L, without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res* 5(10):2971-7.

Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *Embo J* 15(16):4130-41.

Zhu Z, Sanchez-Sweetman O, Huang X, Wiltout R, Khokha R, Zhao Q, Gorelik E (2001). *Anoikis* and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells. *Cancer Res* 61(4):1707-16.

Ziegler A, Luedke GH, Fabbro D, Altmann KH, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (1997). Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. *J Natl Cancer Inst* 89(14):1027-36.

Zutter MM, Mazoujian G, Santoro SA (1990). Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am J Pathol* 137(4):863-70.

Zutter MM, Sun H, Santoro SA (1998). Altered integrin expression and the malignant phenotype: the contribution of multiple integrated integrin receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3(2):191-200.