



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS**

**PROFESOR PATROCINANTE:**

Dr. Carlos D. Figueroa V.  
Instituto de Anatomía, Histología y Patología  
Facultad de Medicina

**PROFESOR COPATROCINANTE:**

Dra. Maria T. Poblete  
Instituto de Anatomía, Histología y Patología  
Facultad de Medicina

**EXPRESIÓN DE ErbB2, CD10, CATEPSINA D, CALICREINA-3, Y RECEPTOR  
DE ESTRÓGENO EN LESIONES PRECURSORAS Y NEOPLÁSICAS DE LA  
VESÍCULA BILIAR.**

Tesis de grado presentada como parte de  
los requisitos para optar al grado de  
**Licenciado en Ciencias Biológicas.**

**CESAR DAVID TOLEDO BARRIENTOS**

**VALDIVIA-CHILE**

**2007**

**A mis padres, Juan y Adriana**

## **Agradecimientos**

No es necesario solamente tener infraestructura adecuada, comodidad y tecnologías de última generación para poder realizar un buen trabajo de tesis, más que eso es poder tener un grupo humano que te haga sentir bien, con pequeños gestos a veces imperceptibles. Es por esto que me gustaría agradecer a todas las personas del instituto de Patología por haberme recibido e integrado de tan buena manera. Empezando por el profe Carlos, por haberme dado la oportunidad no solo de realizar mi tesis en momentos complicados para mi, sino que también, haber tenido la posibilidad de haber conocido y compartido con todos ustedes. Agradecer a Luis, Pamela, Carola, Francisca, y Angel por su sentido de humor, compañerismo y apoyo en cada etapa de mi tesis, además agradecer al profe Miguel, la profe Alejandra, la Sra Gladys, en general a todos.

Agradecer al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital base de Valdivia, en especial a la Dra Maite y Dra Maeva por su ayuda y compromiso para el desarrollo de esta tesis. También quiero agradecer a Paula y Martina por llenarme de alegría, sonrisas y sacarme de los momentos en que me encontré desanimado y entregarme todas sus fuerzas para seguir adelante y terminar con esta tesis. Además quiero disculparme por las veces en que las dejé de lado, sacrificando momentos para los tres por el trabajo de tesis.

Finalmente quiero agradecer de manera muy especial a mis padres por haberme dado el apoyo necesario, continuo e incondicional durante mis estudios desde la escuela hasta la universidad, inclusive en los momentos en que no respondí a las expectativas.

# ÍNDICE

	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE</b>	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	IV
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
2.1. Generalidades	3
2.2. Histofisiología de la vesícula biliar	3
2.3. Carcinoma de vesícula biliar	4
2.4. Las lesiones preneoplásicas y el cáncer de vesícula biliar	6
2.5. Receptores de Estrógenos y ErbB2	10
2.6. Catepsina D	13
2.7. Antígeno prostático específico/Calicreína-3 (hk3)	14
2.8. Endopeptidasa neutra/Enkefalinasas/Antígeno CALLA/CD10	15
2.9. Hipotesis	16
2.9.1. Objetivos	16
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
3.1. Pacientes	17
3.2. Procesamiento de las muestras	17
3.3. Anticuerpos	19
3.4. Inmunohistoquímica y técnica biotina/streptavidina-peroxidasa	19

3.5. Recuperación de antígenos mediante microondas	20
3.6. Evaluación de la inmunotinción	22
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
4.1. Expresión de ErbB2	25
4.2. Expresión de CD10	31
4.3. Expresión de Catepsina D	35
4.4. Receptor de Estrógeno y Antígeno prostático específico/Calicreína-3 (hk3)	40
4.5. Distribución comparativa de los marcadores estudiados, en el epitelio normal, preneoplásico y en el carcinoma de vesícula biliar	43
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
5.1. ErbB2	50
5.2. CD10	52
5.3. Catepsina D	53
5.4. El Receptor de Estrógeno y Calicreína-3 o Antígeno prostático específico no se expresan en la vesícula biliar	59
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig 1.</b> Inmunoreactividad para ErbB2 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.	29
<b>Fig 2.</b> Inmunoreactividad para ErbB2 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.	30
<b>Fig 3.</b> Inmunoreactividad para CD10.	32
<b>Fig 4.</b> Expresión CD10 en carcinoma invasor.	33
<b>Fig 5.</b> Inmunoreactividad para CD10 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.	34
<b>Fig 6.</b> Inmunoreactividad para Catepsina D en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.	37
<b>Fig 7.</b> Inmunoreactividad de Catepsina D en epitelio no metaplasico y con metaplasia intestinal.	38
<b>Fig 8.</b> Inmunoreactividad para Catepsina D.	39
<b>Fig 9.</b> Expresión de Calicreína-3/PSA.	41
<b>Fig 10.</b> Expresión del Receptor de Estrógeno.	42
<b>Fig 11.</b> Frecuencia de inmunoreaccion para los distintos anticuerpos comparado en paralelo con Ki-67.	45
<b>Fig 12.</b> Inmunoreactividad para el antígeno Ki 67 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.	47
<b>Fig 13.</b> Inmunoreactividad para el antígeno Ki 67 en áreas de metaplasia mixta.	48

**Fig. 14.** Esquema representativo de la reacción de los distintos anticuerpos en cada una de las etapas estudiadas.

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Antecedentes clínicos.	18
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos utilizados.	21
<b>Tabla 3.</b> Interpretación de la tinción para ErbB2.	23
<b>Tabla 4.</b> Resultado inmunohistoquímico de los casos estudiados con los distintos anticuerpos.	28
<b>Tabla 5.</b> Inmunoreactividad comparativa para los diferentes marcadores según el tipo de lesión.	44



## 1. RESUMEN

El cáncer de vesícula biliar es una neoplasia de alta malignidad, que se detecta habitualmente en estadios avanzados y que afecta mayoritariamente a mujeres. Se ha propuesto que la metaplasia sería el enlace entre la irritación crónica de la vesícula biliar y la displasia. Nuestro objetivo fue analizar la presencia de marcadores tumorales conocidos, en lesiones de vesícula biliar que incluyen la secuencia metaplasia-displasia-carcinoma

Para esto se seleccionaron casos con lesiones preneoplásicas (metaplasia) y neoplásicas (carcinoma *in situ* y carcinoma invasor). La detección de cada marcador se realizó utilizando anticuerpos monoclonales (receptor ErbB2, receptor de estrógeno, CD10) y policlonales (catepsina D y calicreína-3/antígeno prostático específico) y el método biotina/streptavidina-peroxidasa.

El análisis inmunohistoquímico mostró que ErbB2 estaba ausente en el epitelio vesicular normal, pero se expresaba en casi la totalidad (91,66%) de las muestras con metaplasia intestinal y con carcinoma *in situ* (90%), disminuyendo su frecuencia en el carcinoma invasor (33%). En contraste, CD10 fue muy frecuente en el epitelio no-metaplásico (100%), pero escaso en carcinoma *in situ* (12,5%) y carcinoma invasor (8,3%). La expresión de catepsina D no sufrió grandes cambios a través de la secuencia estudiada. No se detectó presencia del receptor de estrógeno ni de calicreína-3/antígeno prostático específico en ninguna de las lesiones analizadas. ErbB2 se localizó en toda la región basolateral de las células epiteliales mientras que CD10 se concentró en la membrana celular apical. Por su parte catepsina D se observó como una reacción granular en el citoplasma apical (epitelio no-metaplásico y metaplásico) o basal (carcinoma *in situ*) de las células epiteliales.

La alta frecuencia de expresión de ErbB2 en el epitelio metaplásico y con carcinoma *in situ* sugiere que este receptor participa activamente en la proliferación del epitelio de la vesícula biliar.

Esta tesis fue financiada por el proyecto Fondecyt 1070398

## SUMMARY

Gallbladder carcinoma is a malignant neoplasia, which is usually diagnosed, in advanced stages and has a high incidence in women. It has been suggested that metaplasia is the major response to chronic inflammation that leads to dysplasia. The aim of this thesis was to use well established tumoral markers to elucidate the changes that may occur during the sequence metaplasia-dysplasia-carcinoma.

For this purpose, precursor (metaplasia) and neoplastic (*in situ* and invasive carcinoma) lesions of the gallbladder were selected. Tumoral markers were detected with the aid of monoclonal (ErbB2 receptor, estrogen receptor, CD10) and polyclonal (cathepsin D and kallikrein-3/prostatic specific antigen) antibodies and the biotin/streptavidin-peroxidase technique.

Immunohistochemistry showed that normal non-metaplastic epithelium did not stain for ErbB2, but it was highly expressed in metaplasia (91,66%) and in *in situ* (90%), carcinoma to decrease in invasive carcinoma (33%). By contrast, CD10 was frequently expressed by non-metaplastic epithelium (100%), but scarce in *in situ* (12,5%) and invasive carcinoma (8,3%). Cathepsin D did not show great differences between the distinct lesions analyzed. Both estrogen receptor and kallikrein-3/prostatic specific antigen were not detected in any of the samples included in the study. ErbB2 was localized on the basolateral plasma membrane domain of epithelial cells whereas CD10 was only observed on the apical cell membrane. Cathepsin D displayed a granular staining in the apical (non-metaplastic and metaplastic epithelia) or basal (*in situ* carcinoma) cytoplasm of epithelial cells.

The high expression of ErbB2 in the epithelium with metaplasia and *in situ* carcinoma suggests that this receptor may have a role in regulating the proliferation of gallbladder epithelial cells.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Generalidades**

En Chile, el cáncer es la segunda causa de muerte luego de las enfermedades del aparato circulatorio, siendo responsable del 22% del total de muertes. En 1999 se registraron 17.944 muertes en ambos sexos, con una tasa de mortalidad global de 119 por 100.000 habitantes. Diariamente fallecen 48 chilenos por cáncer y se producen 36.000 hospitalizaciones y se diagnostican 30.000 nuevos casos de cáncer al año (Departamento Epidemiología Ministerio de Salud, Chile). Actualmente son escasos los métodos de detección temprana para las neoplasias, existiendo sólo contados ejemplos: el antígeno prostático específico (PSA o Calicreina hK3) que permite detectar el cáncer de próstata; el método de Papanicolau que pesquisa células neoplásicas del cuello uterino, etc. No obstante, existen muchas otras neoplasias en las que aun no se puede realizar una detección temprana y se desconocen los marcadores tumorales que ellas expresan. Dentro de este grupo se encuentra el cáncer de vesícula biliar.

### **2.2. Histofisiología de la vesícula biliar**

La vesícula biliar es un saco en forma de pera, situado en una depresión de la cara posterior del hígado. Tiene 7 a 10 cm. de longitud y habitualmente cuelga del borde antero-inferior del hígado. Morfológicamente se divide en tres partes: el fondo, el cuerpo o porción central, y el cuello. Su pared consiste en mucosa, muscular y adventicia. La mucosa consta de un epitelio cilíndrico simple, y una lámina propia que esta compuesta de tejido conectivo laxo, fibras nerviosas, y vasos sanguíneos y linfáticos. En la región

proximal al conducto cístico se observan invaginaciones del epitelio en la lámina propia, formando glándulas tubuloacinares de luz amplia productoras de mucus. La muscular se compone de fibras musculares lisas separadas por tejido conectivo fibrovascular y de células fusiformes dendríticas en íntimo contacto con las células musculares. Estas células son CD117(+) y han sido interpretadas como células intersticiales de Cajal que se cree podrían regular la contracción o actuar como mediadores de la neurotransmisión. La adventicia esta compuesta por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, linfáticos, nervios y tejido adiposo. El lado abdominal de la adventicia esta recubierto por una serosa.

La vesícula biliar almacena y concentra la bilis y secreta mucinas a través de las células epiteliales y de las glándulas mucosas del cuello. Las comidas ricas en grasas y en menor grado proteínas, estimulan la contracción de la vesícula biliar principalmente por la acción de la colecistocinina, mientras que la contracción durante el periodo interdigestivo está mediada por motilina. En contraste, somatostatina, una hormona secretada desde el intestino y el páncreas, inhibe la contracción de la vesícula biliar. (Junqueira y Carneiro 2000; Macsween 2002).

### **2.3. Carcinoma de vesícula biliar**

Es una neoplasia de alta malignidad, que infiltra precozmente los tejidos vecinos y que es improbable de curar salvo cuando es encontrado como carcinoma *in situ*, situación en la que aún no hay invasión del estroma y que generalmente corresponde a un hallazgo en vesículas extirpadas debido a colecistitis aguda. En la mayoría de los pacientes, el cáncer de vesícula biliar ocasiona los primeros síntomas cuando la

enfermedad es ya invasora y por lo tanto incurable. En Chile las mujeres se afectan con una frecuencia 3 a 4 veces mayor que los hombres y su incidencia aumenta con la edad llegando a ser la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres mayores de 40 años (Medina y Kaempffer 2000; 2001), con la tasa de mortalidad (12,5%) mas alta del mundo (Lazcano y col 2001).

¿Cuáles son las causas de esta neoplasia? Aunque no puedan considerarse como factores de riesgo, en el estricto sentido epidemiológico por la falta de estudios, el sexo femenino, la edad y la presencia de litiasis acompañan la neoplasia en la mayoría de los casos. Se ha postulado que la litiasis desencadenaría una respuesta inflamatoria continua con generación de factores de crecimiento y que éstos ejercerían su efecto sobre un epitelio dañado previamente y con alteraciones en genes como *p53*, *K-ras*, *Bcl-2*, *MAPK* y otros.

Al utilizar técnicas de biología molecular, se ha observado que existen alteraciones tanto de proto-oncogenes (Mikami y col 1999; Itoi y col 2000) como de genes supresores de tumores (Itoi y col 1999; Quan y col 2001; Shi y col 2000).

Los trabajos descriptivos llevados a cabo hasta hoy muestran que, al igual que en otras neoplasias, en el cáncer de vesícula biliar se producirían alteraciones a distintos niveles de la proliferación y diferenciación celular. Estos se acumularían durante la carcinogénesis y la progresión tumoral produciendo lesiones que avanzarían secuencialmente desde el tejido normal hasta llegar a la neoplásia. A favor de este modelo se encuentra el análisis molecular de piezas de colecistectomía donde coexisten las lesiones premalignas y el cáncer invasor.

Se ha observado que las mutaciones de algunos genes tienen una alta frecuencia en el área con carcinoma, menor frecuencia en la zona de lesiones precancerosas, y no se las detecta en la región considerada normal (Arroyo 2003). Algunas de estas mutaciones, como las del gen *p53*, son más frecuentes en las neoplasias indiferenciadas respecto de las más diferenciadas, lo que sugiere que participarían no sólo en la carcinogénesis sino también en la progresión tumoral (Mikami y col 1999). Dado que las mutaciones se producen con muy baja frecuencia, el cáncer de vesícula biliar requeriría de años de carcinogénesis, siendo rarísima su presentación antes de los 35 años de edad.

#### **2.4. Las lesiones preneoplásicas y el cáncer de vesícula biliar**

Se conoce que la displasia y el carcinoma *in situ* preceden a la mayoría de los carcinomas, pero poco se ha investigado acerca de la historia natural de estas lesiones precursoras en la vesícula biliar. La mayoría de las displasias y los carcinomas *in situ* son diagnosticados luego de una colecistectomía. Generalmente, la displasia y el carcinoma *in situ* son encontrados en la mucosa, vecina a un carcinoma. Las vesículas que presentan sólo displasia y carcinoma *in situ* provienen de pacientes 15 y 5 años más jóvenes, respectivamente, que aquellos con carcinoma invasor.

Una de las lesiones que ha recibido atención recientemente es la metaplasia que aparece en algunas áreas de las vesículas con carcinoma. Inada y col. (1989) observaron una transición gradual entre metaplasia, displasia y cáncer, y una mayor frecuencia de metaplasia intestinal en las vesículas con cáncer que en aquellas con colecistitis crónica. También determinaron que la mucina CPS III, que se encuentra

preferentemente en las glándulas pilóricas, estaba en las células tumorales del 50% de los cánceres. Así, tanto metaplasia intestinal como antral, parecen ser importantes como lesión predisponente. Se ha postulado que la posible secuencia de eventos que tendría lugar hasta desarrollar un carcinoma sería la siguiente: epitelio normal + cálculos biliares → inflamación crónica → metaplasia (en respuesta al daño) → displasia → carcinoma (Mukhopadhyay y Landas 2005). Siendo esta secuencia la más aceptada, es necesario conocer los elementos que gatillan estos cambios, considerando que cuando aparece la displasia el proceso se torna irreversible. En este sentido, proteínas como lisozima están ausentes en la mucosa normal, pero se expresan en áreas de metaplasia antral y en criptas de posible naturaleza metaplásica temprana (Aroni y col. 1984). Previamente se había descrito la presencia de esta enzima en glándulas pseudopilóricas de vesículas con colecistitis crónica y su ausencia en vesícula normal o en colecistitis sin glándulas pseudopilóricas (Van den Oord y col. 1983).

Estudios recientes muestran que la mucina MUC1 se expresa en tumores originados a partir de diversos órganos humanos y podría funcionar como una molécula anti-adhesión, favoreciendo la metástasis. Varios estudios han demostrado que MUC1 está fuertemente relacionada con la progresión del tumor, no solamente en neoplasias de origen gastrointestinal, sino que también en cáncer de vesícula biliar (Ghosh y col 2003). Estos autores observaron que la expresión de MUC1 era significativamente más alta en las células tumorales de la vesícula biliar, que en células de vesícula normal o inflamada. Además, la expresión citoplasmática de MUC1 se asociaba con un mal pronóstico y estaba relacionada significativamente con la invasión linfática y metástasis

en nódulos linfáticos. En contraste, otra mucina denominada MUC2 se expresaba raramente en carcinomas de la vesícula biliar, siendo detectada únicamente en las células caliciformes presentes en el área del carcinoma (Kashiwagi y col 2001). Además, se ha visto que la frecuencia de MUC2 aumenta en paralelo a la transformación neoplásica, vesícula sin displasia (47%), displasia (75%), y carcinoma *in situ* (100%), pero disminuye en el carcinoma invasor (58%) (Sasaki y col 1999).

En otro estudio se evaluó la expresión fenotípica gástrica en epitelio de vesícula biliar con cáncer y epitelio vecino no neoplásico utilizando métodos inmunohistoquímicos para pepsinógeno I y II (marcadores de células glandulares pilóricas normales), encontrándose que la tinción para pepsinógenos I y/o II era mas frecuente en adenocarcinomas de tipo papilar y tubular con un 80% y 76% respectivamente, siendo en general observada mas frecuentemente la tinción para pepsinógeno II que para pepsinógeno I (Tatematsu y col 1988).

La expresión de moléculas de adhesión también parece estar alterada en adenomas, displasias, y carcinomas. Es así como se ha observado que en carcinomas existe un aumento en la expresión de ICAM-1, CEA (antígeno carcinoembrionario), y CD44v6 y una disminución de  $\alpha/\beta/\gamma$  catenina y CD99. Diversos estudios sugieren además que algunas de estas moléculas participarían en la progresión y metástasis de los carcinomas de vesícula biliar (Choi y col 2004). La expresión de CEA en la vesícula es alta en los carcinomas y baja en el tejido no tumoral, por lo que una reacción negativa determina ausencia de cáncer con un 100% de especificidad y una reacción fuerte es 81% específica para neoplasia (Roa y col. 1991).



La expresión de proteínas que participan en la regulación del ciclo celular también ha sido evaluada. Se ha observado sobre-expresión de p53 en 65.4% de los carcinomas, 44.7% de carcinomas *in situ*, y 32.4% de las displasias, mientras que ésta no se observó tanto en epitelio normal como en epitelio metaplásico de la vesícula biliar (Wistuba y col. 1996). Estudios más amplios indican que la expresión de p53, pRb (proteína de retinoblastoma), ciclina D1, el inhibidor p27, y el antígeno Ki-67 están alteradas en carcinomas y adenomas de la vesícula biliar, pero no en metaplasia (Xuan y col. 2005).

Dado que el carcinoma de vesícula biliar tiene una mayor incidencia en mujeres, también se ha analizado la presencia de receptores de estrógeno (RE) en el epitelio de la vesícula biliar. A la fecha se han definido dos tipos de receptores, RE  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo el tipo  $\alpha$  el más estudiado. En un estudio se demostró la presencia de RE- $\alpha$  en un 19.4% de los casos de colelitiasis, 33.3% de pólipos epiteliales, 53.8% de adenomas, y 22.8% de los adenocarcinomas. También se vio que la incidencia de inmunoreactividad de receptores de estrógeno en las lesiones con metaplasia (pólipo epitelial, adenoma, y carcinoma con cambios metaplásicos) fue significativamente más alta que en las lesiones sin metaplasia (pólipo epitelial, adenoma, y carcinoma sin cambios metaplásicos). Estos autores concluyeron que el RE está presente en la mucosa de la vesícula biliar en varios estadios de la enfermedad y sugieren que su presencia estaría relacionada a la metaplasia de la mucosa (Yamamoto y col. 1990).

Por último, las infecciones de la vesícula biliar se han asociado con la bacteria denominada *Helicobacter hepaticus*. Pradhan y col. (2004) asociaron los cambios histopatológicos de las vesículas con colelitiasis a infección por *H. hepaticus*.

Sorprendentemente, se encontró que el 82% de los adenocarcinomas tenía infección por *H. hepaticus*. Por otra parte, Apostolov y col. (2005) detectaron la presencia de *Helicobacter pylori* específico para las citotoxinas CagA y VacA dentro de las células epiteliales de la vesícula. Por lo que cabe la interrogante de cual sería el rol de *H. pylori* en pacientes con colecistitis crónica.

Por los antecedentes antes mencionados y dado el creciente aumento y pobre sobrevida que tiene el cáncer de vesícula biliar en Chile, es que decidimos estudiar esta neoplasia utilizando marcadores ya caracterizados en otras neoplasias para evaluar su comportamiento en el epitelio no-metaplásico (sin alteraciones metaplásicas), metaplásico, con carcinoma *in situ*, y con carcinoma invasor.

Los marcadores seleccionados fueron ErbB2, Catepsina D, Receptor de Estrógeno (RE), Calicreina-3 (PSA/hk3), Endopeptidasa neutra (CD10), los cuales se correlacionaron con el marcador de proliferación celular Ki-67.

En relación a los marcadores seleccionados, éstos están estudiados principalmente en carcinoma de mama (ErbB2, Receptor de Estrógeno y Catepsina D), próstata (PSA/hk3) y carcinoma renal de células claras (CD10).

## **2.5. Receptores de Estrógenos y ErbB2**

Los estrógenos son hormonas esteroidales que regulan el crecimiento, diferenciación, y la función en un amplio rango de tejidos blanco. Su efecto biológico esta mediado por receptores específicos para estrógenos (RE)  $\alpha$  y  $\beta$  que son miembros de una gran superfamilia de receptores nucleares (Bjornstrom y Sjoberg 2005). Cabe destacar que el RE- $\alpha$  es el más estudiado, que se descubrió primero y el que se utiliza normalmente

para el tratamiento de los pacientes con cáncer de mama, por lo que en adelante cuando se hable de receptor de estrógeno se asumirá que se trata de RE- $\alpha$ .

En el cáncer de mama se ha definido el significado de la expresión del RE y las decisiones que se tienen que tomar a continuación. La expresión del RE es un factor de buen pronóstico e indica que las funciones celulares dependen de estrógeno a pesar de la transformación neoplásica (Poblete 2001). Es así como los cánceres de mama han sido clasificados en RE (+) o (-), en donde los primeros tienen una mejor tasa de supervivencia que los que son RE (-), y así los pacientes con RE (+) son buenos candidatos para ser sometidos a terapia hormonal con el antagonista Tamoxifeno para interrumpir la función del RE (Gross y Yee 2002).

En lo que respecta a vesícula biliar existen algunos trabajos en donde se ha estudiado este receptor; es así como en un trabajo se evaluó el estado de RE y no se observó asociación con supervivencia o con manifestaciones clínicopatológicas (Malik y col 1998). De la misma forma Ko y col (1995) al analizar los RE en cáncer de vesícula biliar no encontraron ninguna asociación estadística ni tendencia en relación a sexo, etapa del tumor, o tipo histológico; solamente 3/25 especímenes se tiñeron débilmente positivos (<15% tinción nuclear) y los otros 22/25 junto con las vesículas normales no presentaron tinción. Sin embargo, en otro estudio se observó que el RE era más frecuentemente expresado en vesículas biliares con adenocarcinomas moderada y pobremente diferenciados que en aquellos bien diferenciados (Nakamura y col 1989). Además se ha visto que la presencia de RE está relacionada a la mucosa con metaplasia (Yamamoto y col 1990). Por su parte, Sumi y col (2004) estudiaron el RE  $\alpha$  y

$\beta$  en muestras de carcinoma de vesícula biliar, encontrando que el RE $\alpha$  era positivo en 3/11 regiones no cancerosas, y en 2/26 regiones cancerosas, por lo que concluyeron que no había diferencias significativas en la positividad del RE $\alpha$ . Sin embargo, observaron que la expresión del RE $\beta$  se reducía en carcinoma, respecto del epitelio normal en donde estaba altamente expresado. Debido a esto concluyen que la disminución del RE $\beta$  puede ser usado como un marcador predictivo de pacientes con pobre sobrevida.

Así como el RE es considerado un marcador de buen pronóstico en el cáncer de mama, ErbB2, es considerado de mal pronóstico. Este proto-oncogen pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa conocidos como familia ErbB que incluye a cuatro receptores homólogos: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB1/HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3), y ErbB4 (HER4) (Jost y col 2000). Estos receptores se activan por dimerización (homo o hetero) después de su unión al ligando. No obstante, su activación es muy compleja por cuanto existe un gran número de ligandos, secretados en forma autocrina, que a su vez se unen a más de un receptor. ErbB2 está sobre-expresado en un 20-30% de los carcinomas de mama y su sobre-expresión esta asociada a una mayor agresividad de la neoplasia, disminución de la expresión de RE y aumento de la resistencia a terapia endocrina (Reese y Slamon 1997; Pritchard y col 2006). A pesar de que los tumores con sobreexpresión de ErbB2 no respondían a las terapias tradicionales, se encontró que si lo hacían a la droga denominada Trastuzumab (Herceptin®, 1988). En el 2001 se aprobó el uso diagnóstico del test inmunohistoquímico Herceptest (Dako), con el cual se determina el grado de

sobre-expresión de ErbB2 en el tejido y se determina si el paciente debería recibir este tratamiento.

En los trabajos en que se ha estudiado ErbB2 en vesícula biliar, se ha encontrado tinción positiva en adenomas (40%) y en carcinomas (25%), no así en vesículas con colecistitis crónica o con carcinomas *in situ* (Chaube y col 2006). A su vez Kalekou y Miliaras (2004) encontraron expresión de ErbB2 en carcinoma *in situ* (28%), en carcinoma bien diferenciado (25%), y en carcinoma moderada y pobremente diferenciado (29%). Como conclusión Chaube y col (2006) postulan que ErbB2 podría tener un rol importante en la iniciación del tumor pudiendo ser usado como un marcador importante de las lesiones premalignas. Por su parte, Kalekou y Miliaras (2004) cree que ErbB2 podría estar implicado en la evolución del carcinoma de vesícula biliar.

## **2.6. Catepsina D**

Esta es una enzima que pertenece a la familia de las aspartil proteasas, y que se encuentra en lisosomas y diferentes vesículas pre lisosomales y endosomales de la mayoría de las células humanas; tiene por función degradar proteínas por proteólisis en grandes cantidades dentro de estos compartimentos. (Liaudet-Coopman y col 2006).

En el cáncer de mama existen resultados contradictorios en cuanto a la utilidad de catepsina D como posible marcador de agresividad. Por un lado Castiglioni y col (1994) al evaluar los niveles de catepsina D, B, y L en 80 carcinomas de mama y compararlos con indicadores del comportamiento agresivo del tumor, no observaron ningún tipo de asociación. En cambio, Roger y col (1994) sugieren que la sobre-expresión de catepsina D en cáncer de mama se correlaciona con los ensayos citosólicos y por lo

tanto, continuaría siendo una buena variable independiente para estimar el pronóstico del tumor. El papel de catepsina D en el cáncer de mama no ha sido aún dilucidado. Aunque se ha descrito que catepsina D podría ser considerado un indicador de la agresividad del tumor tanto en humanos como en ratones aún no se puede concluir si es un factor de buen o mal pronóstico. En lo que respecta a vesícula biliar existe solamente un reporte de un paciente japonés de 80 años con carcinoma adenoescamoso que mostró tinción difusa para catepsina D en las células tumorales que consistían en un epitelio columnar atípico pseudoestratificado, parecido al epitelio foveolar gástrico (Nishihara y col 1995).

### **2.7. Antígeno prostático específico/Calicreína-3 (hk3)**

El antígeno prostático específico (PSA/hk3) es una serina proteasa, considerada a la fecha el mejor marcador de cáncer de próstata, ampliamente usado en la investigación, diagnóstico y monitoreo de la progresión de la neoplasia, y de la respuesta a la terapia. Fisiológicamente PSA/hk3 tiene una función en la disolución del gel del semen recién eyaculado, a través de proteólisis específica de semenogelin y fibronectina (Peehl 1995). Recientemente, se ha identificado PSA/hk3 en la mama normal, hiperplásica y cancerosa; en este sentido se le considera un indicador pronóstico favorable en el cáncer de mama y su síntesis es generalmente menor en el tejido neoplásico que en el tejido normal o hiperplásico (Diamandis y Yu 1995; Yu y col 1995).

En lo que respecta a vesícula biliar, no existe información previa en donde se analice o demuestre la presencia de este marcador.

## **2.8. Endopeptidasa neutra/Enkefalinasas/Antígeno CALLA/CD10**

CD10 ha sido usada como una herramienta en el diagnóstico de leucemia aguda y ciertos linfomas malignos (antígeno CALLA). Recientemente, se ha demostrado que es expresado en una variedad de tumores no hematopoyéticos, incluidos el carcinoma renal, carcinomas del tracto gastrointestinal y genitourinario, y sarcoma endometrial estromal (Chu y Arber 2000). En el riñón se ha sugerido que la función de CD10 sería el clivaje de péptidos encargados en la autorregulación del metabolismo del agua y sodio, especialmente a nivel del tubo contorneado proximal. De ahí que se considere a esta enzima como un marcador específico de carcinoma celular renal o de células claras (Gafford y col 1983; Avery y col 2000).

En la vesícula biliar normal se ha detectado la expresión de CD10 en la membrana apical del epitelio vesicular (McIntosh y col 1999; Aust y col 2004; Nagata y col 2007).

## 2.9. Hipótesis

**“La Metaplasia es una lesión precursora del cáncer de Vesícula Biliar”**

### 2.9.1. Objetivos

#### A) Objetivo General

- Caracterizar inmunohistoquímicamente el cáncer de vesícula biliar y las lesiones preneoplásicas que lo preceden.

#### B) Objetivos específicos

- Determinar los patrones de inmunotinción de marcadores tumorales, que han sido considerados de valor para otras neoplasias, en vesículas normales, con lesión preneoplásica (metaplasia), carcinoma incipiente o *in situ* y carcinoma invasor.
- Determinar si existe una expresión diferencial de alguno de los marcadores utilizados en el epitelio normal, preneoplásico, y en el carcinoma de vesícula biliar.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Pacientes

Un total de 40 casos de vesículas biliares con carcinoma y lesiones preneoplásicas, diagnosticados en el período 2003-2006, fueron seleccionadas desde los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Base de Valdivia. Los casos tenían el siguiente diagnóstico fundamental o primario: (i) mucosa normal o sin metaplasia (5); (ii) metaplasia mixta (16), metaplasia pilórica o antral focal (4), metaplasia intestinal (1); (iii) carcinoma incipiente o *in situ* (2); (iv) carcinoma invasor (12). De los 40 casos estudiados, 36 correspondieron al sexo femenino y solo 4 fueron de sexo masculino, fluctuando entre 28-80 años las mujeres y 50-86 años los hombres, con un promedio de 55 y 64 años respectivamente (Tabla 1).

#### 3.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron fijadas en solución tamponada de formol al 10% y se procesaron por el método histológico corriente, que consiste en la deshidratación en alcoholes ascendentes e inclusión en parafina. Posteriormente, a partir de cada bloque de tejido se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor, que mas tarde fueron montados en portaobjetos tratados con 3-Aminopropyltrithoxysilane (Polysciences Inc. USA) para obtener una mejor adherencia del tejido. Una vez preparados los cortes, se realizó una tinción corriente con hematoxilina-eosina para analizar y verificar las características histopatológicas de cada muestra antes de realizar la técnica inmunohistoquímica.

Tabla 1. Antecedentes clínicos

<b>Casos</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Diagnostico General</b>
1	57	F	Sin metaplasia
2	59	F	Sin metaplasia
3	71	F	Sin metaplasia
4	29	F	Sin metaplasia
5	57	F	Sin metaplasia
6	49	F	Metaplasia pilorica focal
7	45	F	Metaplasia pilorica focal
8	55	F	Metaplasia pilorica focal
9	37	F	Metaplasia pilorica focal
10	59	F	Metaplasia mixta
11	41	F	Metaplasia mixta
12	42	F	Metaplasia mixta
13	80	F	Metaplasia mixta
14	31	F	Metaplasia mixta
15	55	F	Metaplasia mixta
16	32	F	Metaplasia mixta
17	59	F	Metaplasia mixta
18	41	F	Metaplasia mixta
19	60	F	Metaplasia mixta
20	51	F	Metaplasia mixta
21	69	F	Metaplasia mixta
22	28	F	Metaplasia mixta
23	64	F	Metaplasia mixta
24	74	F	Metaplasia mixta
25	57	F	Metaplasia mixta
26	33	F	Metaplasia intestinal
27	54	F	Carcinoma in situ
28	53	M	Carcinoma in situ
29	50	M	Carcinoma invasor
30	86	M	Carcinoma invasor
31	76	F	Carcinoma invasor
32	68	M	Carcinoma invasor
33	57	F	Carcinoma invasor
34	55	F	Carcinoma invasor
35	70	F	Carcinoma invasor
36	78	F	Carcinoma invasor
37	72	F	Carcinoma invasor
38	68	F	Carcinoma invasor
39	40	F	Carcinoma invasor
40	72	F	Carcinoma invasor

### **3.3. Anticuerpos**

Se utilizaron tanto anticuerpos monoclonales como policlonales obtenidos de distintos laboratorios (Tabla 2). Todos los anticuerpos fueron diluidos de la misma manera usando buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 conteniendo albúmina de bovino libre de inmunoglobulinas al 0,1%. Con el objeto de determinar las mejores condiciones para cada anticuerpo, se usaron controles positivos como riñón humano (CD10), cáncer mamario (ErbB2, receptor de estrógeno y catepsina D), y próstata (PSA/hk3). En estos tejidos se probaron diferentes diluciones de cada anticuerpo y dependiendo del anticuerpo, se realizó recuperación antigénica mediante tratamiento del tejido con microondas (Tabla 2).

### **3.4. Inmunohistoquímica y técnica biotina/streptavidina-peroxidasa**

Los cortes de tejido fueron desparafinados e hidratados usando una batería de etanol que tenía concentraciones crecientes de agua. Además fueron tratados con metanol absoluto y agua oxigenada al 5% para inhibir la actividad pseudoperoxidasa, debido a que esta puede provocar alteraciones en los resultados. Previo a la incubación con los anticuerpos para CD10, receptor de estrógeno y Ki-67, los cortes fueron tratados además con la técnica de recuperación de antígenos con microondas. La técnica utilizada fue la siguiente:

1. Desparafinado de los cortes con dos cambios de xilol (15 min c/u)
2. Lavado con etanol absoluto (6 min)
3. Inhibición de pseudoperoxidasa endógena con metanol absoluto (10 min)
4. Hidratación progresiva en etanol de 96%, 70% y 50% (6 min) y agua corriente

5. Inhibición de pseudoperoxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 5% (10 min)
6. Recuperación de antígenos con microondas en buffer Citrato 10 mM pH 6,0 (optativo, ver Tabla 2)
7. Incubación con anticuerpo primario en baño termorregulado a 22°C por 18-20 h
8. Incubación con segundo anticuerpo biotinilado (30 min)
9. Incubación con streptavidina-peroxidasa (30 min)
10. Revelado con 3,3' diaminobenzidina (5 min, Kit Dako, USA)
11. Tinción de contraste con hematoxilina de Harris
12. Deshidratación en etanol de 70 (6 min), 96 I, 96 II (10 min c/u) y 100 I, 100 II (15 min c/u).
13. Aclaramiento en xilol I y II (6 min c/u) y montaje con bálsamo de Canadá.

Después de la incubación con cada anticuerpo, los cortes fueron lavados con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 tres veces durante tres minutos cada vez.

### **3.5. Recuperación de antígenos mediante microondas**

Cuando fue necesario se realizó recuperación antigénica mediante el calentamiento de los cortes a 90°C en un horno de microondas. Como buffer de recuperación se usó buffer citrato 10 mM pH 6.0, recomendado por los fabricantes de los anticuerpos utilizados para este efecto. El buffer citrato se preparó disolviendo 2,1 gr de ácido cítrico monohidratado en 900 ml de agua destilada y luego ajustando a pH 6.0 con NaOH (aprox. 13ml de NaOH 2M). Finalmente se aforó a 1000 ml.

Para realizar la recuperación antigénica se utilizó un depósito de mayor tamaño que funciona como baño maría y que contiene a un recipiente de menor tamaño con el buffer y con una sonda de temperatura que se conecta al horno de microondas (Prolab, Santiago, Chile). Se calienta el buffer con los cortes en su interior hasta alcanzar una temperatura de 90°C (aproximadamente 5 min), y se mantiene a esa temperatura por 7 o 15 min (Tabla 2). Cumplido el tiempo de recuperación se deja enfriar la solución por aproximadamente 20-30 min antes de comenzar con la técnica inmunohistoquímica.

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Laboratorio</b>	<b>Clon</b>	<b>Microondas</b>	<b>Dilución</b>
CD10	Novocastra	56C6 (IgG)	Si (7min) (*)	1:450
Catepsina D	Dako	Policlonal (conejo)	No	1:8000
PSA/hk3	Dako	Policlonal (conejo)	No	1:4000
ErbB2/HER2neu	Novocastra	10A7 (IgG)	No	1:200
RE	Dako	1D5 (IgG)	Si (7min)	1:150
Ki-67	Dako	Policlonal (conejo)	Si (14min)	1:200

(\*) La recuperación antigénica se realizó utilizando buffer citrato 10 mM pH 6.0 a 90°C.

CD10, Endopeptidasa neutra; PSA/hk3, Antígeno prostático específico/calicleina-3; RE, Receptor de estrógeno; ErbB2/HER2neu, Receptor tirosina quinasa de la familia ErbB; Ki-67, Proteína mitótica Ki-67.

### **3.6. Evaluación de la inmunotinción**

La interpretación de la inmunotinción fue hecha por dos observadores, y se evaluó el epitelio de superficie, el epitelio metaplásico y el carcinoma in situ e invasor de la vesícula biliar.

El criterio usado para evaluar la inmunoreactividad para el anticuerpo ErbB2 en la vesícula biliar se realizó modificando el protocolo Herceptest descrito para el cáncer de mama y se describe con detalle en la Tabla 3. Para estimar el índice de proliferación celular se utilizó el anticuerpo Ki-67 y la reacción se evaluó en tres campos escogidos al azar. En cada uno de estas áreas se contaron cien células y se cuantificaron las células marcadas (núcleo de color café) y no marcadas (núcleo teñido de azul por la hematoxilina). Para todos los demás anticuerpos sólo se consideró la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de la tinción sin evaluar la intensidad de la reacción.

**Tabla 3. Interpretación de la tinción para ErbB2.**

<b>Escala de cuantificación</b>	<b>Patrón de coloración <sup>(*)</sup></b>
0	No se observa coloración
1+	Al menos el 10% de las células presentan reacción y esta se observa sólo en segmentos de la membrana basolateral
2+	Al menos el 10% de las células presentan reacción que abarca gran parte de la membrana basolateral
3+	Existe reacción en más del 10% de las células que delinea toda la membrana basolateral

<sup>(\*)</sup> La reacción para ErbB2 en el epitelio vesicular esta polarizada a la membrana basolateral y nunca incluye a la membrana apical.

## 4. RESULTADOS

Del total de 40 vesículas biliares seleccionadas desde la Histoteca del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Base de Valdivia, 36 de ellas provenían de pacientes de sexo femenino con un rango de edad entre 28 y 80 años (promedio 55 años) y sólo 4 casos eran de sexo masculino con un rango de edad entre 50 y 86 años (promedio 64 años) (Tabla 1).

A pesar de que en un principio se hizo la selección de manera de tener igual número de casos para cada una de las lesiones, con el paso del tiempo, a medida que se hicieron las pruebas inmunohistoquímicas, se vio que en la gran mayoría co-existían dos o más lesiones, como mucosa metaplásica asociada a carcinoma invasor o carcinoma *in situ*. En la práctica es difícil encontrar muestras con ausencia de metaplasia en el epitelio de superficie, debido a que en la mayoría de los casos los pacientes han sido intervenidos por procesos inflamatorios crónicos o han sufrido litiasis por un tiempo más o menos prolongado. En cuanto al carcinoma *in situ* también se hace complicado obtener muestras en que ésta sea la lesión epitelial única dado que muchos pacientes consultan cuando la neoplasia ya está avanzada y el carcinoma *in situ* esta asociado a metaplasia y/o carcinoma invasor. Por lo tanto, en las muestras seleccionadas generalmente se encontraron de manera simultánea varias lesiones. Una de estas lesiones es la metaplasia, término que se utiliza para denotar el cambio de un epitelio por otro, generalmente en respuesta a cambios del medio externo. En la vesícula biliar se ha descrito que la metaplasia puede ser de tipo intestinal o pilórica, dependiendo de



si el epitelio modificado se asemeja al epitelio intestinal o al epitelio del piloro. Cuando ambos tipos de metaplasia co-existen se le denomina metaplasia mixta.

Dentro de la secuencia de eventos que sufre el epitelio de la vesícula biliar y que conlleva a la neoplasia, se han descrito una serie de transformaciones que se iniciarían con la metaplasia y continúan con displasias de distinto grado. Por este motivo se consideró importante determinar la expresión de diferentes marcadores conocidos, siguiendo la secuencia de eventos que finalizarían en una neoplasia de tipo invasor. Dentro de esta secuencia se consideró etapas como el epitelio metaplásico, el carcinoma *in situ*, y el carcinoma invasor, teniendo como comparación de normalidad al epitelio no metaplásico. La reactividad de cada uno de estos marcadores se comparó con la presencia de Ki-67, un marcador de proliferación celular.

Como primera aproximación se analizó la reactividad para cada anticuerpo en cada uno de los 40 casos seleccionados (Tabla 4), evidenciándose más claramente la co-existencia de las distintas lesiones y la existencia de diferentes patrones de tinción en cada una de ellas. Posteriormente, se seleccionaron áreas representativas de cada lesión y se evaluó nuevamente la presencia o ausencia de reacción, el patrón de inmunotinción y se compararon con el índice de proliferación que existía en cada una de ellas.

#### **4.1. Expresión de ErbB2**

La interpretación de la inmunoreactividad presente en el tejido para este marcador se hizo de acuerdo a lo explicado anteriormente en la sección de Materiales y Métodos

(Tabla 3) y que se basó en una modificación del protocolo HercepTest aplicado en el cáncer de mama.

Cabe mencionar que en los casos en que se observó tinción, esta se localizó en la membrana de las células epiteliales, más concretamente en la membrana basolateral de las células que constituían el epitelio de superficie metaplásico o con carcinoma *in situ*. Los compartimientos basolateral y apical, en estas células epiteliales polarizadas, están delimitados por las uniones estrechas que unen a cada una de las células del epitelio de superficie. Este patrón de reacción para ErbB2, motivó que se modificara el protocolo descrito en el cáncer de mama donde se considera como positiva la reacción que se presenta en todo el perímetro de la membrana celular.

De las muestras consideradas, 27/39 presentaron inmunoreacción en un rango de 1+ a 3+ y se encontró que en los casos no metaplasicos 1/5 fue ErbB2 positivos (Tabla 4). No obstante, un análisis detallado mostró que esta reacción se presentaba en un área del epitelio de superficie con metaplasia intestinal.

En los casos con diagnóstico fundamental o primario de metaplasia mixta (es decir intestinal y antral o pilórica), metaplasia pilórica focal y metaplasia intestinal, 20/20 presentaron tinción. En estas lesiones se observó que la reacción se presentaba exclusivamente en las zonas con metaplasia intestinal y no en relación con la metaplasia pilórica (Tabla 4; Fig. 1). Para los dos casos de carcinoma *in situ* el 100% presento inmunotinción para este marcador, mientras que para carcinoma invasor, disminuyó considerablemente el número de casos positivos (4/12) (Tabla 4). Además se pudo observar que en donde co-existían carcinoma *in situ* e invasor, este último era levemente positivo en comparación con carcinoma *in situ* (Fig. 1).

Se puede concluir que la tinción se encontró principalmente en las zonas con metaplasia intestinal y con carcinoma *in situ*, mientras que en el epitelio no metaplásico y con carcinoma invasor, esta tinción estuvo ausente o disminuyó sustancialmente (Fig. 2)

**Tabla 4. Resultado inmunohistoquímico de los casos estudiados con los distintos anticuerpos.**

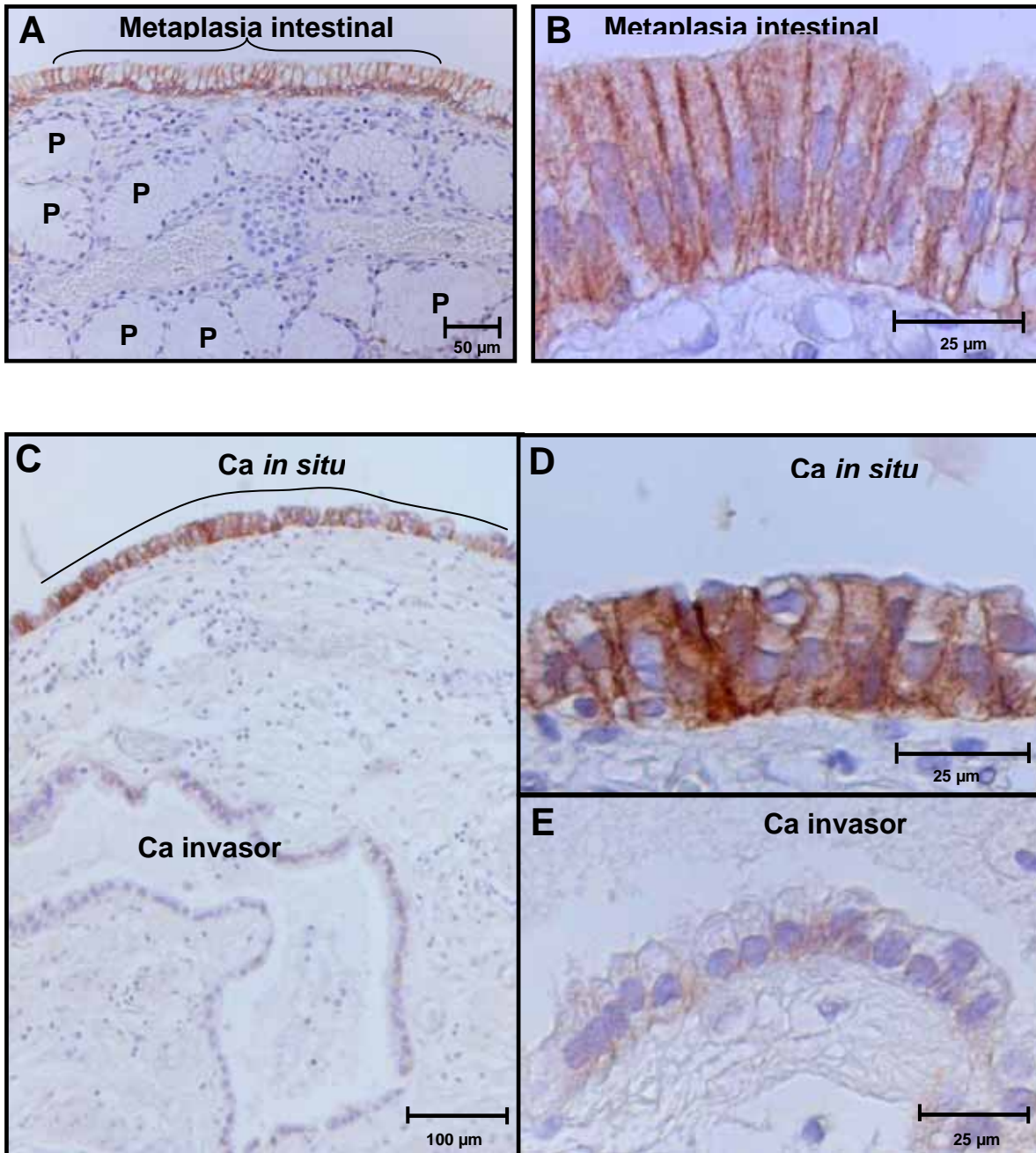
Caso	CD10	PSA/hk3	Cat D	RE	ErbB2	Diagnóstico Primario
1	+	-	ND	-	0	sin metaplasia
2	ND	-	+	-	0	sin metaplasia
3	+	-	+	-	0	sin metaplasia
4	+	-	+	-	1+ <sup>(a)</sup>	sin metaplasia
5	+	-	+	-	0	sin metaplasia
6	ND	-	+	-	1+	metaplasia pilorica focal
7	+	-	+	-	1+	metaplasia pilorica focal
8	+ <sup>(a)</sup>	-	-	-	ND	metaplasia pilorica focal
9	-	-	+ <sup>(a)</sup>	-	3+	metaplasia pilorica focal
10	+ <sup>(c)</sup>	-	+ <sup>(a)</sup>	-	1+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
11	+	-	+ <sup>(a)</sup>	-	3+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
12	-	-	+	-	3+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
13	+ <sup>(a)</sup>	-	+	-	1+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
14	+	-	+ <sup>(a)</sup>	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
15	+	-	+ <sup>(a)</sup>	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
16	+ <sup>(a)</sup>	-	+ <sup>(b)</sup>	-	3+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
17	- <sup>(b)</sup>	-	-	-	1+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
18	+	-	+ <sup>(a)</sup>	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
19	+	-	+ <sup>(a)</sup>	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
20	-	-	+ <sup>(a)</sup>	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
21	-	-	+ <sup>(a)</sup>	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
22	+	-	+	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
23	+	-	+ <sup>(a)</sup>	-	3+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
24	+ <sup>(a)</sup>	-	+ <sup>(a)</sup>	-	2+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
25	+ <sup>(a)</sup>	-	+ <sup>(a)</sup>	-	1+ <sup>(a)</sup>	metaplasia mixta
26	+ <sup>(a)</sup>	-	+	-	3+	metaplasia intestinal
27	-	-	+	-	3+	Carcinoma in situ
28	-	-	+	-	3+	Carcinoma in situ
29	-	-	+	-	0	Carcinoma invasor
30	-	-	+	-	0	Carcinoma invasor
31	-	-	+	-	1+	Carcinoma invasor
32	-	-	+	-	0	Carcinoma invasor
33	-	-	+	-	0	Carcinoma invasor
34	+ <sup>(a)</sup>	-	+	-	3+	Carcinoma invasor
35	-	-	+	-	3+	Carcinoma invasor
36	+	-	+	-	0	Carcinoma invasor
37	-	-	+	-	0	Carcinoma invasor
38	-	-	-	-	0	Carcinoma invasor
39	-	-	+	-	0	Carcinoma invasor
40	-	-	+	-	2+	Carcinoma invasor

ND, no disponible; +, presencia de tinción independiente de su intensidad; -, ausencia de tinción

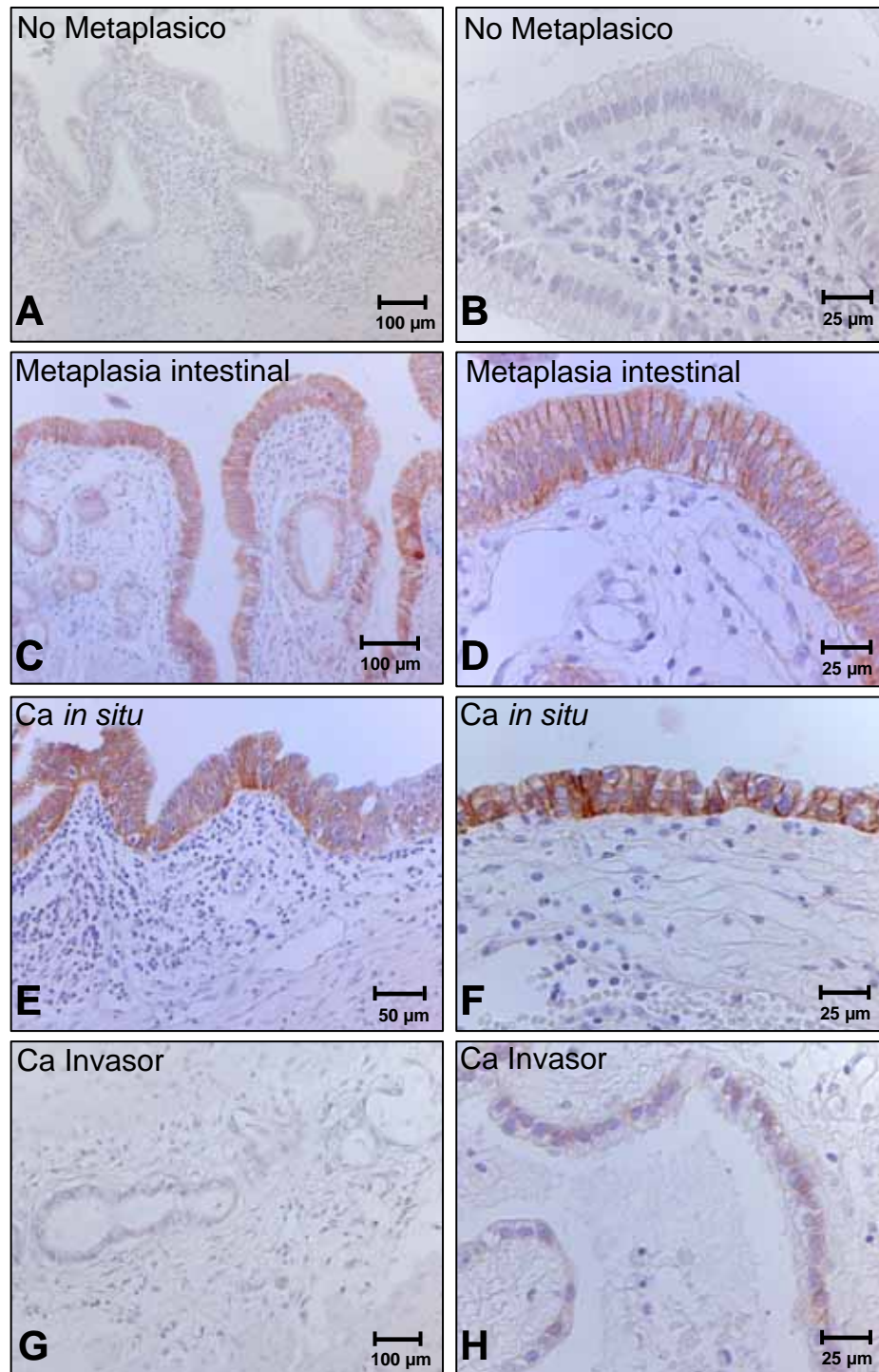
<sup>(a)</sup> tinción en zona de metaplasia intestinal

<sup>(b)</sup> tinción en zona de metaplasia pilorica

<sup>(c)</sup> tinción en zona de displasia



**Fig 1. Inmunoreactividad para ErbB2 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.** A, B. La tinción está asociada a la metaplasia intestinal y no a la metaplasia pilórica (P) adyacente. C, D. Epitelio con carcinoma *in situ* en un caso de carcinoma invasor.



**Fig 2. Inmunoreactividad para ErbB2 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.** La reacción es intensa en el epitelio biliar con metaplasia intestinal y con Ca in situ. Ca, Carcinoma.

## 4.2. Expresión de CD10

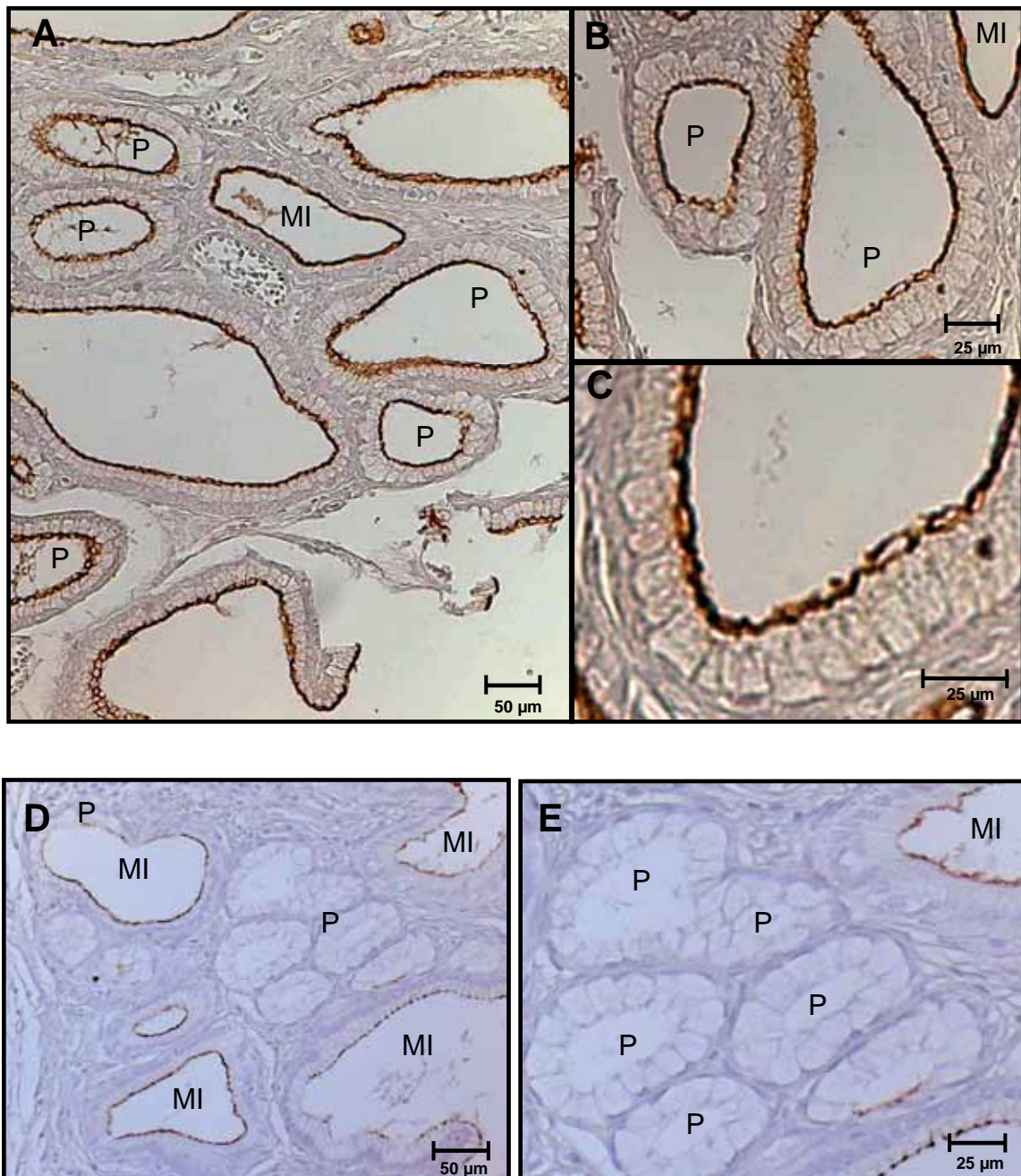
Estudios previos habían observado que CD10 (endopeptidasa neutra, encefalinasa o antígeno CALLA) se expresaba normalmente en el ribete en cepillo de los enterocitos del intestino delgado, en la membrana apical de los túbulos proximales del riñón, en precursores celulares linfoides, en el epitelio glandular de la próstata y en el epitelio de la vesícula biliar entre otros (McIntosh et al 1999).

Nuestros resultados mostraron que en la vesícula biliar la inmunoreacción para CD10 se localizó en la membrana apical de las células epiteliales, o sea en la porción de membrana que esta por sobre las uniones estrechas.

Las muestras con epitelio vesicular normal (no metaplásico) presentaron una alta proporción de tinción (4/4), mientras que en los casos de metaplasia que involucraban metaplasia mixta, metaplasia pilórica focal o metaplasia intestinal pura, 15/20 fueron CD10 positivos (Tabla 4). Para estas lesiones se volvió a observar que la reacción se presentaba mayoritariamente en zonas con metaplasia intestinal y no en las con metaplasia pilórica (Fig. 3). Sin embargo, existieron casos aislados en donde se observó tinción en zonas de metaplasia pilórica (Fig. 3).

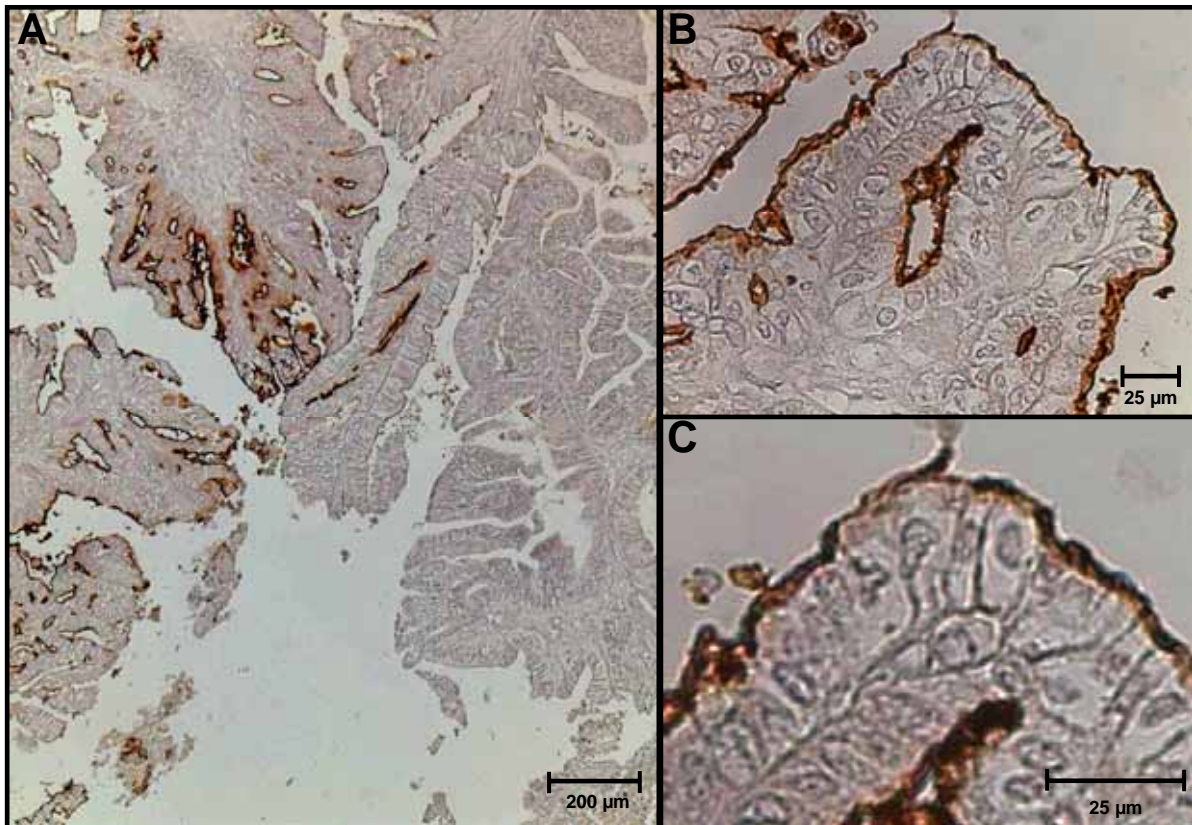
Llamó la atención la disminución drástica de reacción cuando se analizó los casos con carcinoma, ya sean *in situ* o invasores dado que sólo se observó tinción en dos casos de carcinoma invasor, correspondiendo uno de ellos a un adenocarcinoma tubulopapilar moderadamente diferenciado que presentaba reacción en algunas áreas del tejido (Tabla 4; Fig. 4).

En conclusión la tinción apical para CD10 predominó en zonas con metaplasia intestinal, y en el epitelio no metaplásico y disminuyó cuando existía neoplasia (Fig. 5).

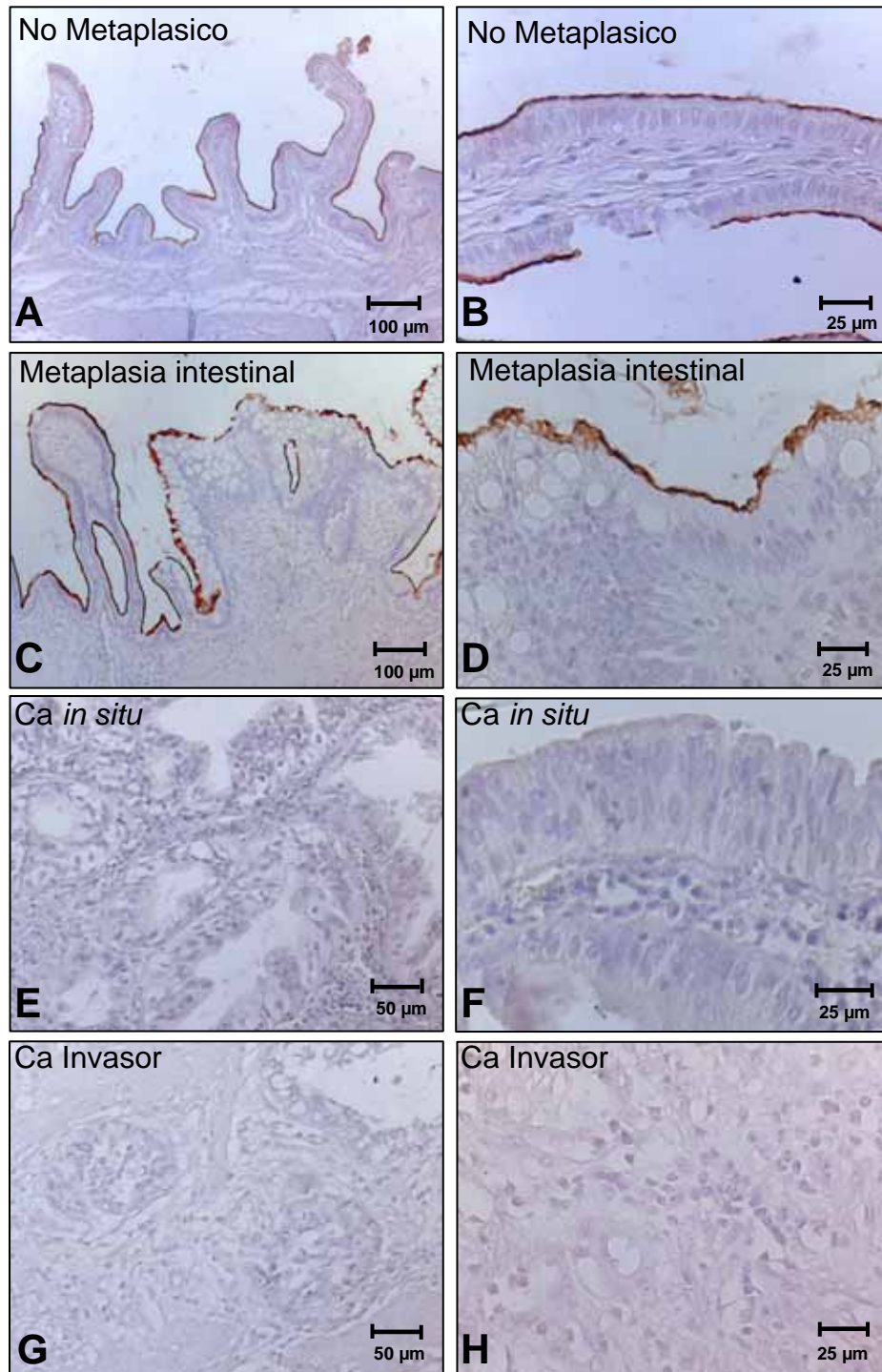


**Fig 3. Inmunoreactividad para CD10.** A-C. Reacción en zonas con metaplasia pilórica (P). D, E. Ausencia de reacción en zonas con metaplasia pilórica (P). MI, metaplasia intestinal.





**Fig 4. Expresión de CD10 en carcinoma invasor.** La muestra corresponde a adenocarcinoma túbulo-papilar, moderadamente diferenciado, focalmente positivo.



**Fig 5. Inmunoreactividad para CD10 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.** La inmunoreactividad disminuye en paralelo al avance de la transformación neoplásica. Ca, carcinoma.

### 4.3. Expresión de catepsina D

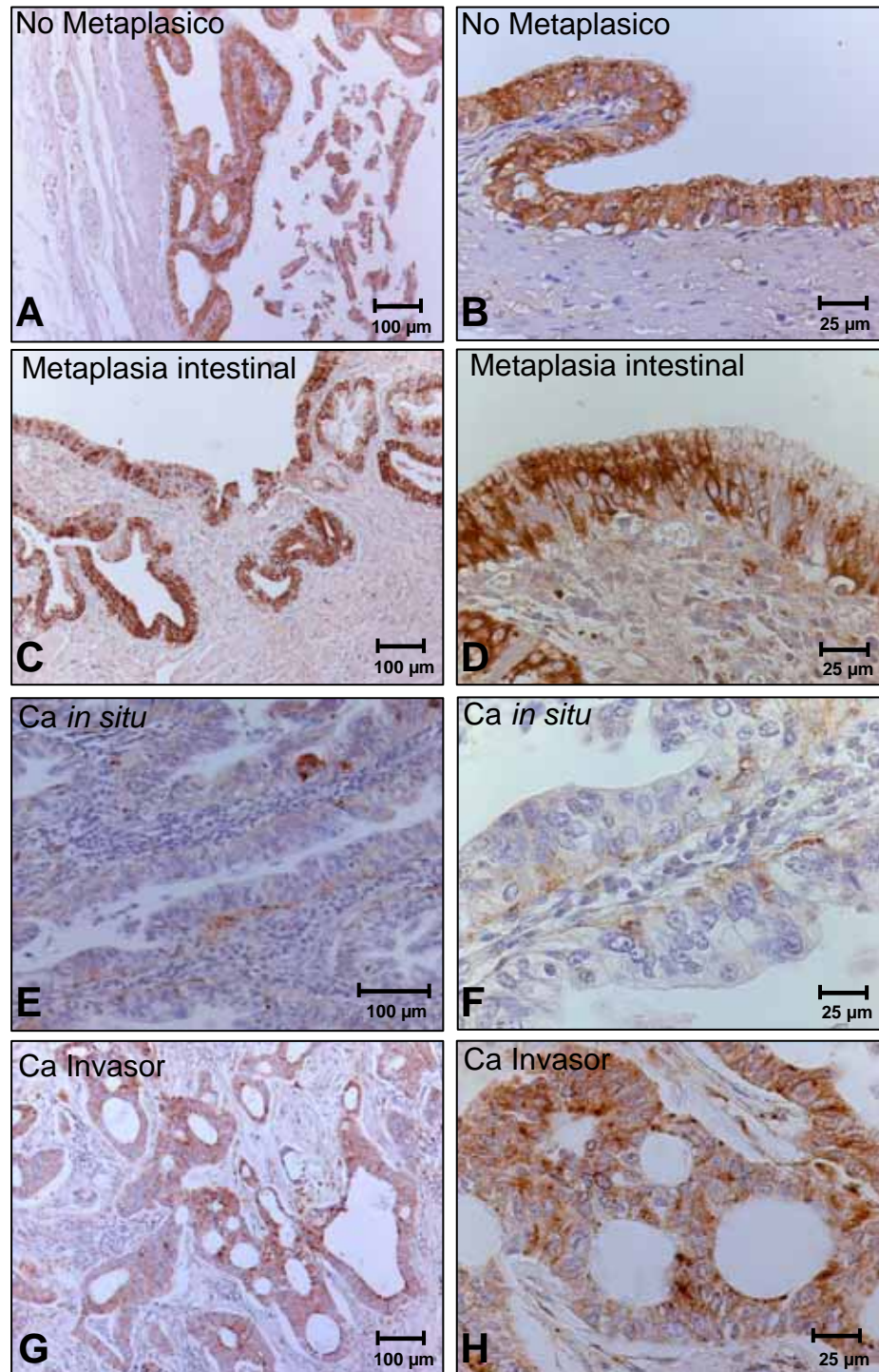
Esta proteasa ha sido localizada en lisosomas y diferentes vesículas pre lisosomales y endosomales de la mayoría de las células humanas, teniendo por función degradar proteínas en grandes cantidades dentro de estos compartimentos (Liaudet-Coopman y col 2006).

En la vesícula biliar se observó una tinción citoplasmática de tipo granular que se agrupaba en la parte apical del epitelio vesicular, posiblemente en gránulos que podrían corresponder a lisosomas o a compartimientos ácidos de la célula. Del total de casos, 36/40 resultaron ser catepsina D positivos, de estos la inmunoreacción estuvo prácticamente presente en todas las lesiones estudiadas (Tabla 4; Fig 6).

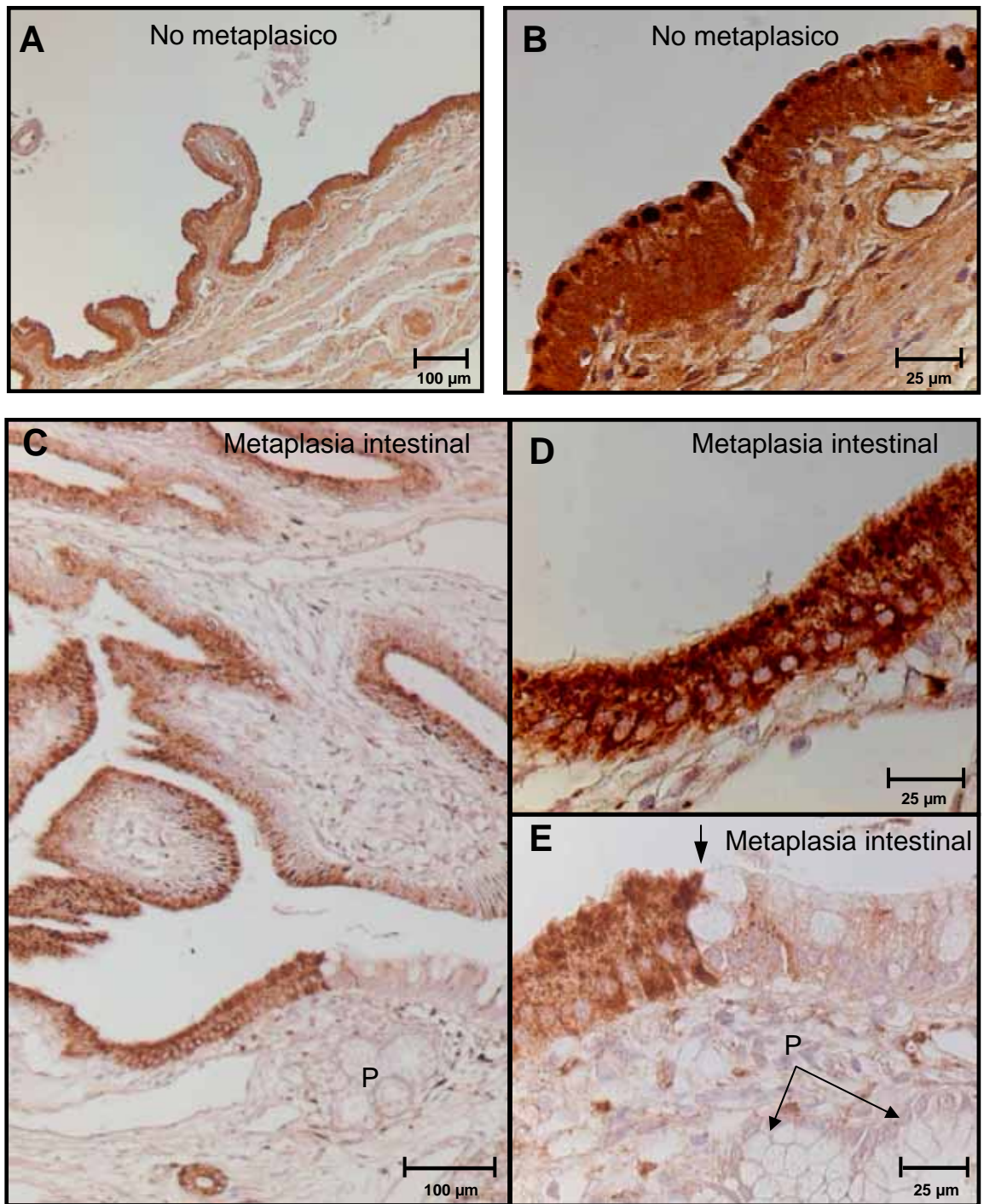
No obstante, se observaron diferencias en la distribución intracelular de catepsina D en las células epiteliales que constituían el epitelio vesicular ya sea no metaplásico, metaplásico o con carcinoma *in situ*. Cuando el epitelio era no metaplásico, catepsina D se observó formando un conglomerado bien definido en la zona apical de la célula, no así en el epitelio con metaplasia intestinal donde se localizaba también en un patrón granular, pero mas desordenado, además en algunas zonas se perdía la reacción (Fig. 7).

En los casos con metaplasia mixta, predominó la tinción en zonas con metaplasia intestinal por sobre aquellas con metaplasia pilorica (Fig. 7). Un hecho interesante fue que cuando un epitelio atípico, fuertemente positivo para Catepsina D, cambiaba a carcinoma *in situ*, la expresión de Catepsina D disminuía considerablemente y además se relocalizaba en la región basal de las células neoplásicas (Fig. 8).

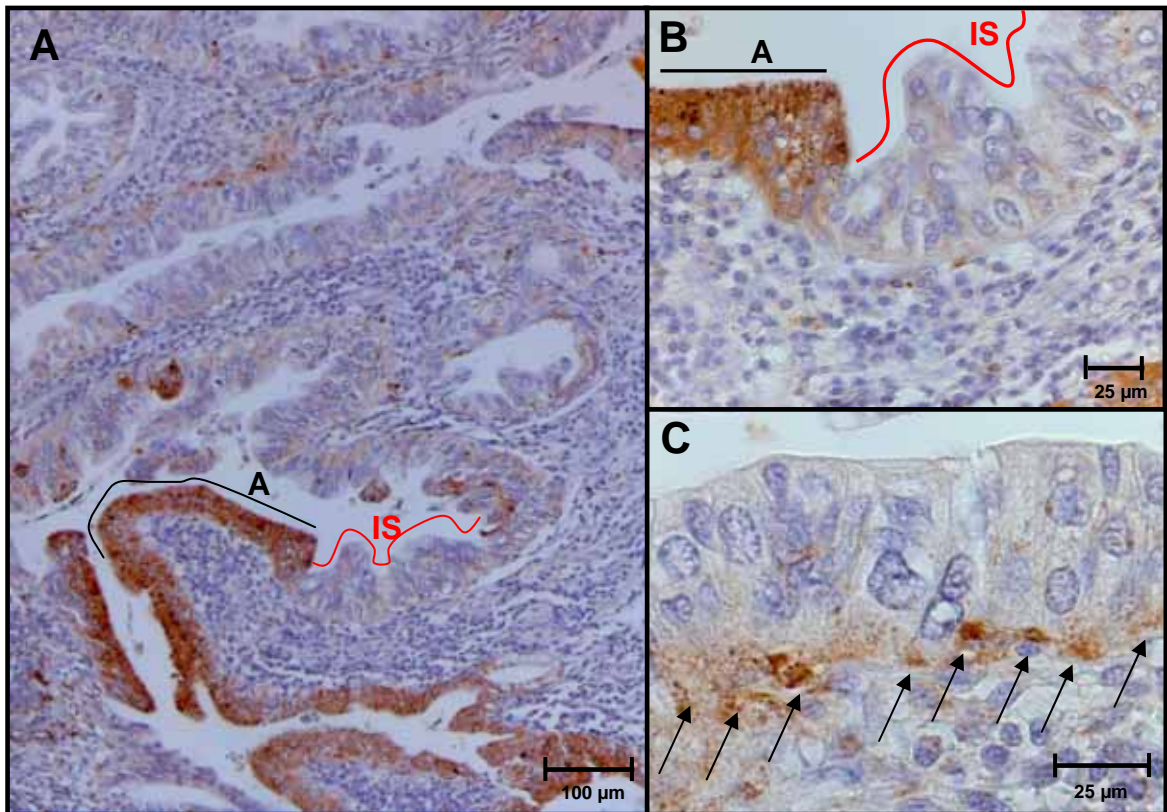
En resumen, cuando el epitelio es no metaplásico y metaplásico, Catepsina D se localiza en la región apical de las células epiteliales mientras que cuando se desarrolla un carcinoma in situ se desplaza hacia la porción basal de la célula.



**Fig 6.** Inmunoreactividad para Catepsina D en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar. Ca, Carcinoma.



**Fig 7. Inmunoreactividad para Catepsina D en epitelio no metaplasico y con metaplasia intesinal.** En E se muestra la pérdida de inmunoreacción (flecha) en un área de epitelio con metaplasia intestinal. P, Metaplasia pilorica.

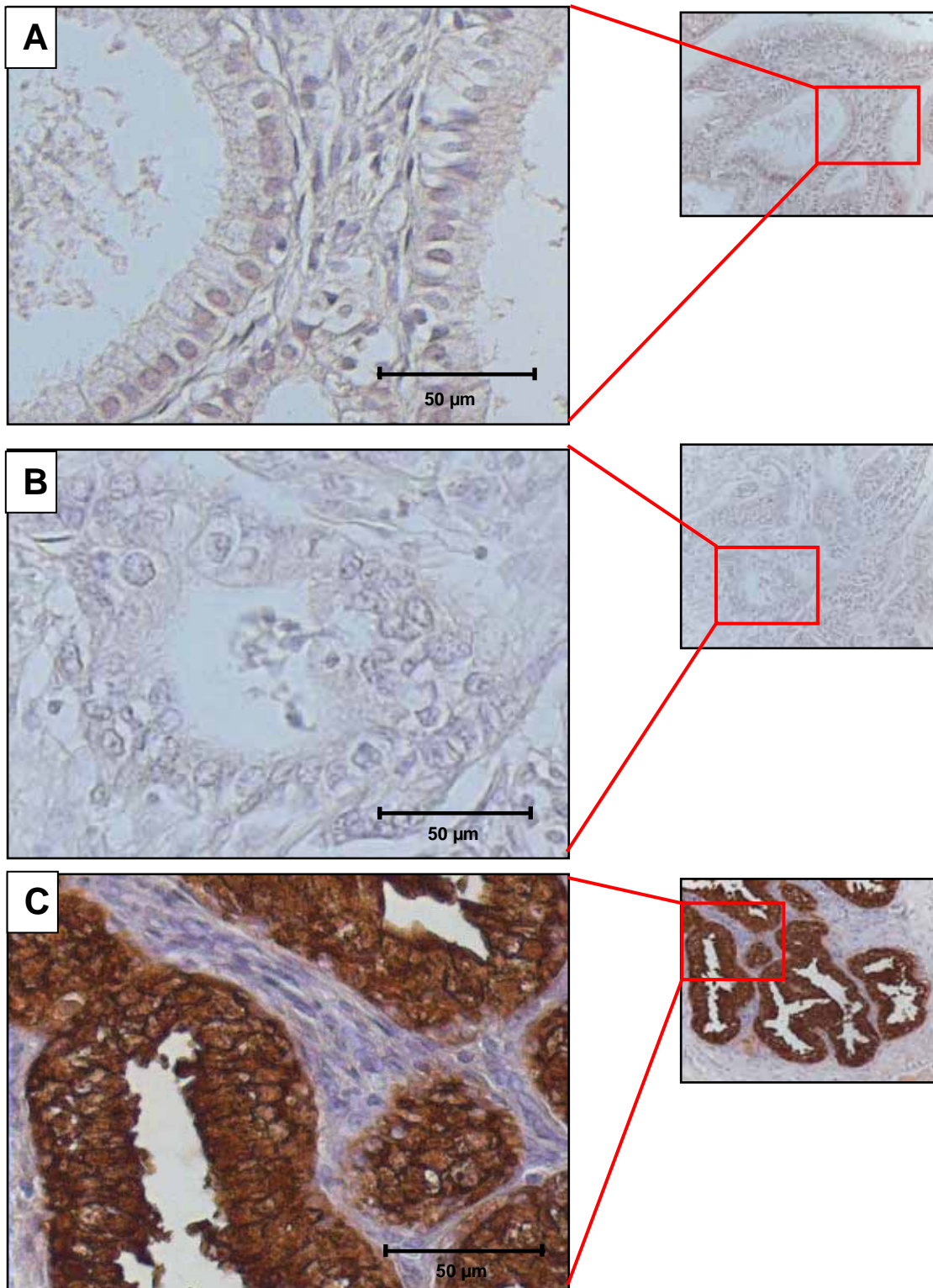


**Fig 8. Inmunoreactividad para Catepsina D.** A. Transición de un epitelio con atipias (A) de grado leve, positivo para catepsina D, a uno con carcinoma in situ (IS), con escasa inmunotinción concentrada en la región basal de las células (flechas). B y C. Mayor aumento de A.

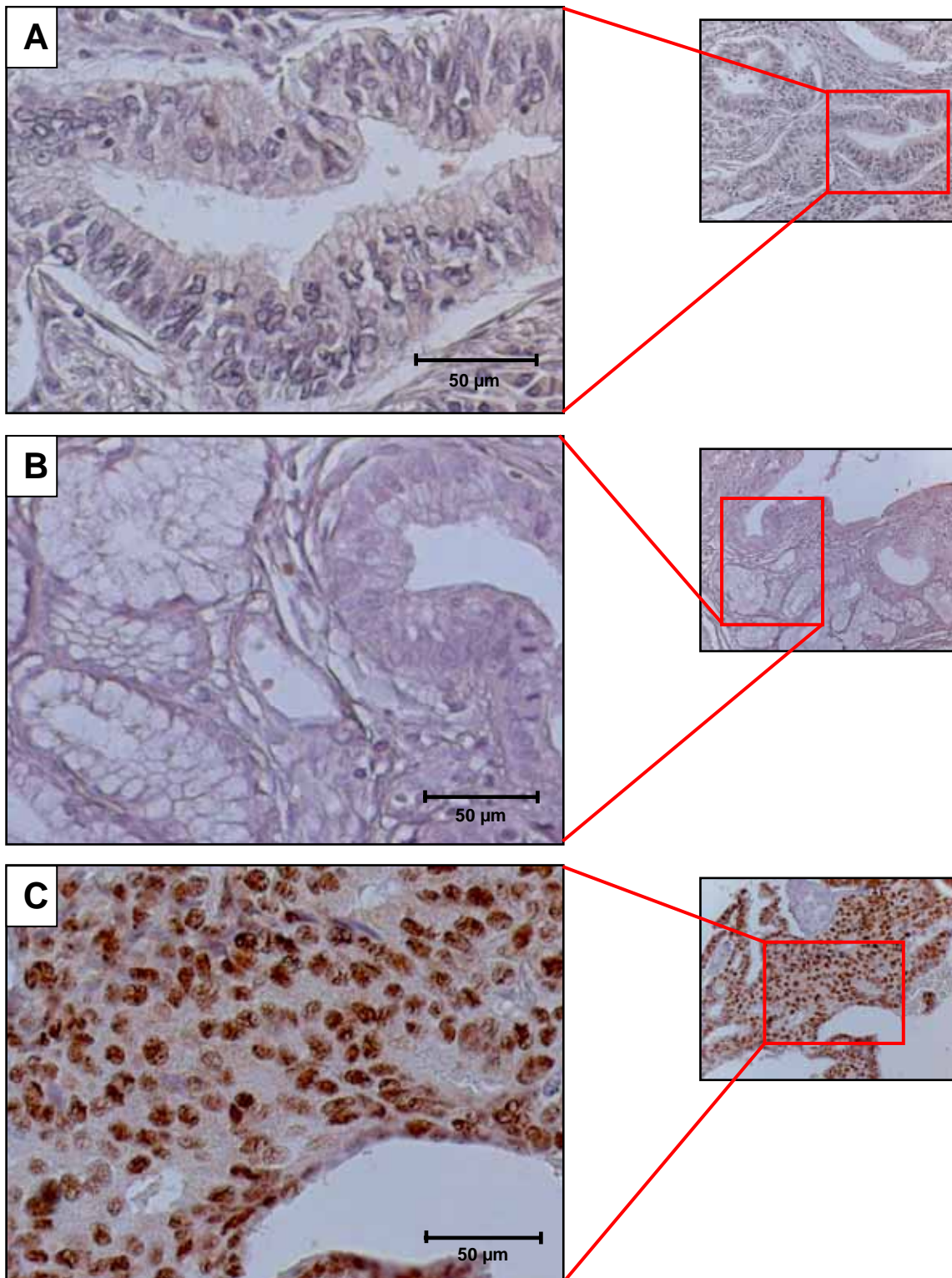
#### **4.4. Receptor de Estrógeno y Antígeno prostático específico/Calicreína-3 (hk3)**

Tanto en el epitelio no metaplásico, como en las lesiones no invasoras (metaplasia y carcinoma in situ) e invasoras existió ausencia de reacción para ambos marcadores. Los controles realizados simultáneamente en tejido prostático y en cáncer de mama presentaron tinción para antígeno prostático específico/calicreína-3 y receptor de estrógeno respectivamente (Fig. 9 y 10).





**Fig 9. Expresión de Calicreína-3/PSA.** A-C, Imágenes ampliadas de los recuadros mostrados a la derecha. A y B. Distintas zonas de la pared de la vesícula biliar. C. Cáncer de próstata (control positivo).



**Fig 10. Expresión del Receptor de Estrógeno.** A-C. Imágenes ampliadas de los recuadros mostrados a la derecha. A, carcinoma invasor, B, metaplasia mixta, C, cáncer de mama (control positivo).

#### **4.5. Distribución comparativa de los marcadores estudiados, en el epitelio normal, preneoplásico y en el carcinoma de vesícula biliar**

Dado que en la mayor parte de los casos co-existía más de una lesión, se seleccionaron áreas representativas de cada una de ellas, a saber metaplasia intestinal, carcinoma *in situ* y carcinoma invasor. Luego se volvió a evaluar la presencia o ausencia de cada uno de los marcadores utilizados y se les comparó con el antígeno de proliferación celular Ki-67 en zonas equivalentes (Tabla 5). La inmunohistoquímica ha sido además usada como una herramienta importante para la cuantificación de la proliferación celular existente en un tejido. Entre las proteínas características destaca el antígeno nuclear Ki-67 que se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y mitosis) pero no en G<sub>0</sub>. Por lo tanto, su expresión proporciona una medida directa de la proliferación existente en un tejido. (Ross y col 1995).

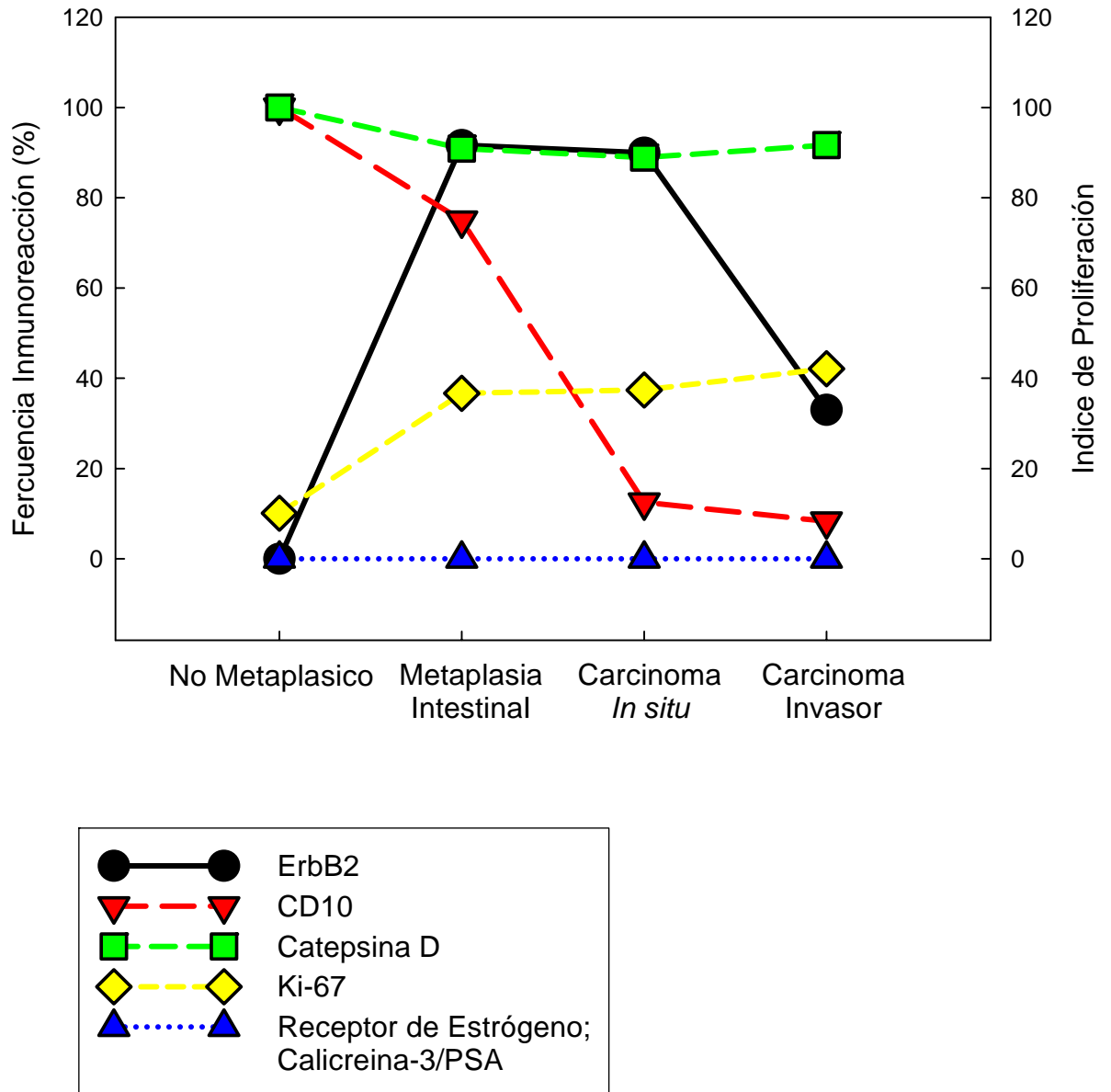
Se comprobó que ErbB2 se expresaba esencialmente en el epitelio vesicular con metaplasia intestinal (92%) y con carcinoma *in situ* (90%) para disminuir su frecuencia en el carcinoma invasor (33%). La alta expresión de ErbB2 durante las etapas de metaplasia y carcinoma *in situ* sugieren que este receptor participaría en el proceso de proliferación celular. El alto número de células marcadas para el antígeno Ki-67, en estas dos lesiones, parecen reafirmar esta idea (Tabla 5; Fig. 11). En contraste, la expresión de CD10 disminuyó en paralelo con el proceso de malignización, siendo muy frecuente en el epitelio no-metaplásico (100%), pero escaso en el carcinoma *in situ* (12,5%) e invasor (8,3%). En cambio, catepsina D presentó un alto nivel de expresión en prácticamente todas las lesiones analizadas. En ninguno de los estadios analizados se detectó PSA/calicleína-3 o receptor de estrógeno (Tabla 5; Fig. 11).

**Tabla 5. Inmunoreactividad comparativa para los diferentes marcadores según el tipo de lesión**

Marcador	Lesión			
	No Metaplásico	Metaplasia Intestinal	Ca <i>In situ</i>	Ca Invasor
<b>ErbB2</b>	0/5 (0%)	22/24 (91,66%)	9/10 (90%)	4/12 (33%)
<b>CD10</b>	4/4 (100%)	15/20 (75%)	1/8 (12,5%)	1/12 (8,3%)
<b>Cat D</b>	4/4 (100%)	20/22 (90,90%)	8/9 (88,88%)	11/12 (91,66%)
<b>RE</b>	0/5 (0%)	0/24 (0%)	0/10 (0%)	0/12 (0%)
<b>PSA/hk3</b>	0/5 (0%)	0/24 (0%)	0/10 (0%)	0/12 (0%)
<b>Ki-67(%)</b>	0,10 (10,11%)*	0,37 (36,65%)*	0,37 (37,4%)*	0,42 (42,12%)*

Cat D, Catepsina D, CD10, Endopeptidasa neutra; PSA/hk3, Antígeno prostático específico; RE, Receptor de Estrógeno; ErbB2, Receptor perteneciente a la familia ErbB; Ki-67, Proteína mitótica Ki-67.

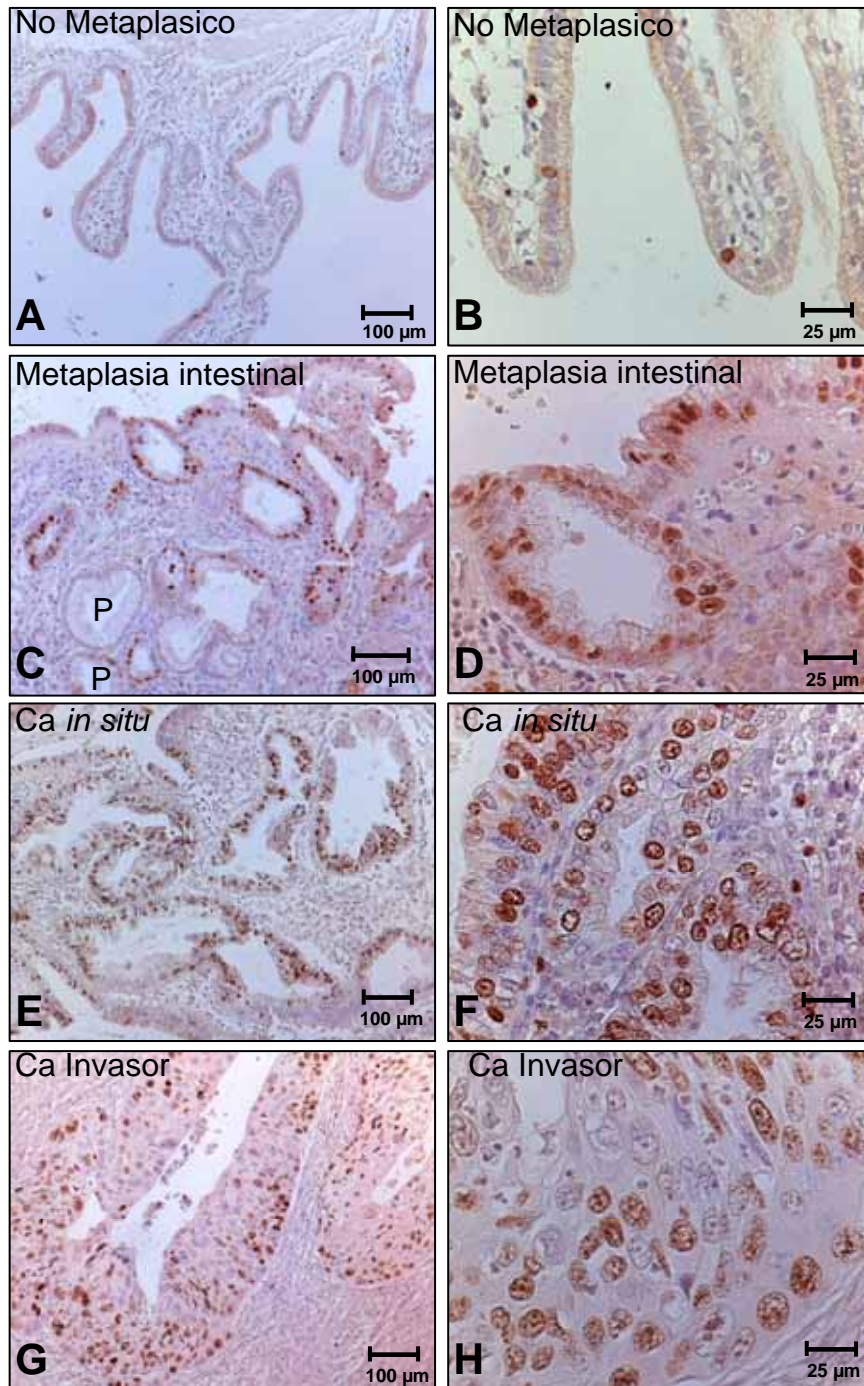
( )\* Porcentaje de células positivas en campos de 100 células (40X), cada valor representa el porcentaje promedio de los casos positivos para cada lesión. Ca=Carcinoma.



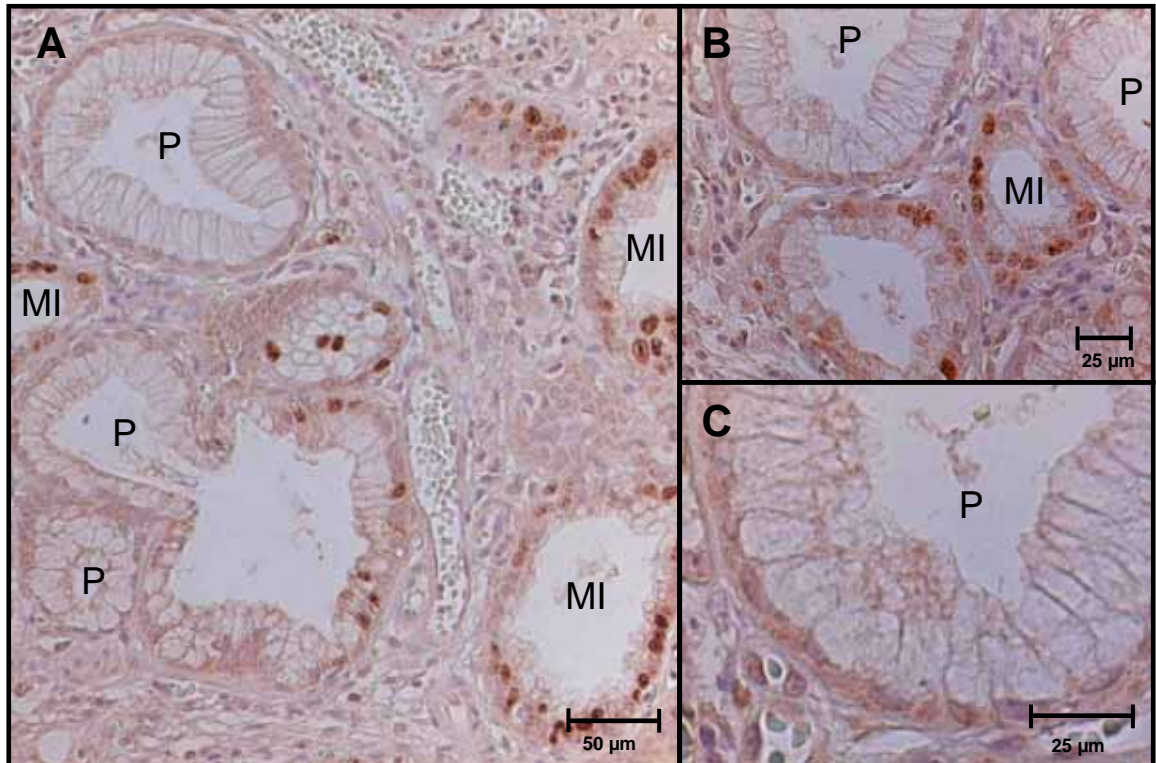
**Fig. 11. Frecuencia de inmunoreaccion para los distintos anticuerpos comparado en paralelo con Ki-67.**

En la figura 12 se puede observar la inmunoreactividad para Ki-67 en las lesiones estudiadas y se aprecia claramente el aumento de células marcadas junto con la progresión de la lesión; también se observó que las zonas con metaplasia intestinal eran positivas mientras que no lo eran las áreas con metaplasia pilórica (Fig. 13).

Finalmente, a modo de resumen se presenta un esquema representativo de la inmunoreacción para catepsina D, CD10, y ErbB2 en las lesiones estudiadas (Fig. 14).



**Fig 12.** Inmunoreactividad para el antígeno Ki 67 en lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar. P, Metaplasia pilórica; Ca, Carcinoma.



**Fig 13. Inmunoreactividad para el antígeno Ki 67 en áreas de metaplasia mixta.**  
MI, Metaplasia intestinal; P, Metaplasia pilórica.



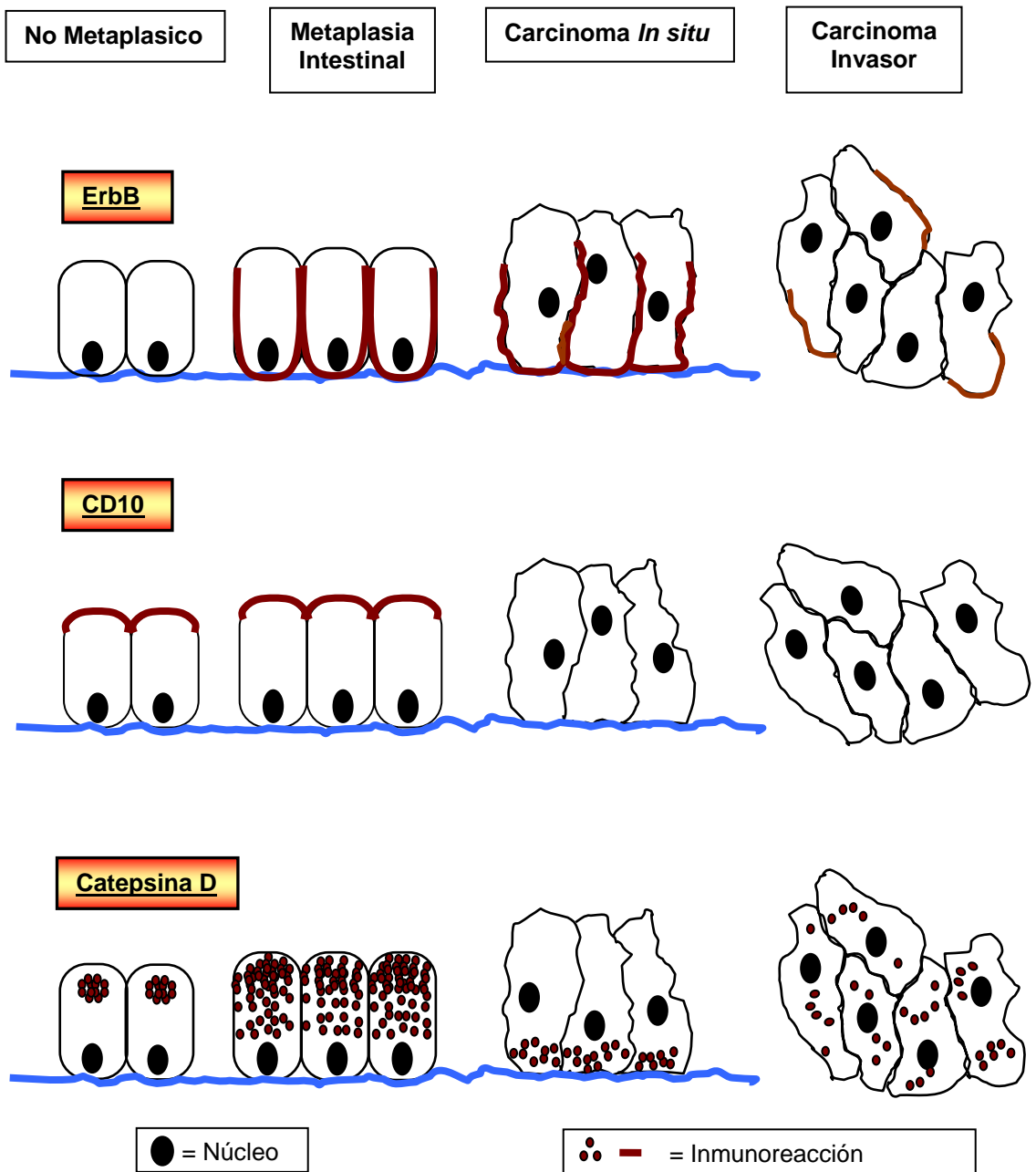


Fig. 14. Esquema representativo de la reacción de los distintos anticuerpos en cada una de las etapas estudiadas.

## 5. DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue evaluar en la vesícula biliar, marcadores utilizados de manera rutinaria en neoplasias de otras localizaciones. Estos marcadores se ocupan para determinar estrategias a seguir en cuanto a tratamiento, pronóstico, agresividad o seguimiento de la enfermedad. De esta manera, se estudió su expresión en las lesiones precursoras y neoplásicas de la vesícula biliar.

### 5.1. ErbB2

*ErbB2* o *HER2/neu* es un proto-oncogene que codifica una proteína de membrana con actividad tirosina kinasa y que pertenece a la familia de receptores ErbB (Jost y col 2000). Estos receptores son muy importantes dado que regulan la proliferación, diferenciación y sobrevivencia, de las células normales. La amplificación del gen *ErbB2* se ha relacionado con un curso agresivo del cáncer de mama, y recientemente su correspondiente receptor es un blanco terapéutico para aquellos pacientes en los que éste se sobreexpresa (Hatanaka y col 2001).

En la vesícula biliar con metaplasia y carcinoma *in situ* la reacción para ErbB2 se localizó como ha sido descrito en otros tejidos en la membrana celular de las células epiteliales, pero estuvo restringida al dominio basolateral de la célula. La localización basolateral de los receptores ErbB permitiría que estos medien señales entre el mesenquima y el epitelio para la proliferación celular.

Lo interesante de este receptor fue que estaba ausente en el epitelio no metaplásico (normal), pero aparecía con gran intensidad en el epitelio con metaplasia intestinal y

con carcinoma *in situ*. Extrañamente, su expresión se redujo considerablemente o desapareció en las vesículas biliares con carcinoma invasor. En general, estos resultados están de acuerdo con lo descrito en la mama donde la expresión de ErbB2 está restringida al carcinoma ductal *in situ*, mientras que en el tejido mamario normal o en las lesiones benignas, incluyendo hiperplasia no existe expresión de este receptor (Pavelic y col 1992). De igual modo, la frecuencia de ErbB2 en el cáncer invasor también se reduce casi a la mitad de la existente en el carcinoma *in situ* (Martinis y col 2006). La expresión de ErbB2 en carcinomas ductales *in situ* de la mama se ha asociado a una rápida proliferación (Van de Vijver y col 1988). Estudios previos con este marcador, realizados siguiendo el protocolo Herceptest, concluyeron que ErbB2 era raramente expresado en el cáncer de vesícula biliar, una observación similar a la de esta tesis. No obstante, el trabajo de estos autores estuvo restringido al carcinoma sin análisis de la metaplasia y del carcinoma *in situ* (Matsuyama y col 2004). La tasa de inmunoreacción descrita por ellos está posiblemente disminuida debido a que en el protocolo Herceptest un valor de 1+ se considera negativo, sin embargo cabe recordar que en la vesícula biliar con metaplasia intestinal y con carcinoma *in situ* la reacción se observó polarizada a la zona basolateral, por lo que utilizar en este tejido el mismo protocolo que en la mama no parece adecuado.

Concluimos que este marcador está sobre-expresado en las etapas de metaplasia intestinal y carcinoma *in situ* del cáncer de vesícula biliar, un hallazgo que podría ser de importancia para realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad.

## 5.2. CD10

CD10, neprilisina o antígeno de leucemia linfoblástica común aguda (CALLA), es una endopeptidasa neutra de la superficie celular que inactiva péptidos bioactivos como glucagón, encefalinas, sustancia P, neurotensina, oxitocina, y bradicinina entre otros (Gafford y col 1983).

El estudio inmunohistoquímico mostró que, a diferencia de ErbB2, que se localizó en la zona basolateral de las células del epitelio vesicular, CD10 se observó sólo en la membrana apical de las células epiteliales. Además se encontró mayoritariamente presente en el epitelio normal y con metaplasia intestinal, disminuyendo notoriamente en el carcinoma *in situ* y en el carcinoma invasor, en donde prácticamente desapareció su expresión.

CD10 es una enzima que se expresa en un amplio rango de órganos, en este sentido se ha demostrado con anterioridad que está presente en diferentes tejidos normales como precursores linfoides, ribete en cepillo de los enterocitos, glomérulo y túbulo proximal, células mioepiteliales de mama, células estromales de endometrio, y epitelio glandular de la próstata, membrana apical del epitelio vesicular y también en neoplasias no hematopoyéticas (McIntosh y col 1999; Chu y Arber 2000).

En este trabajo CD10 se expresa intensamente en el epitelio normal, de la vesícula biliar, pero desaparece paulatinamente a medida que este se transforma hacia la malignidad. Fue interesante constatar que a pesar de no existir tinción en el carcinoma *in situ* e invasor, se observó reacción focal en un caso de adenocarcinoma tubulopapilar moderadamente diferenciado. La reacción para CD10 estaba asociada a las áreas más diferenciadas mientras que las zonas adyacentes menos diferenciadas permanecían sin

tinción. Este hecho parece afirmar que la expresión de CD10 está relacionada a la normalidad del epitelio y desaparece gradualmente cuando el epitelio se transforma.

### **5.3. Catepsina D**

Catepsina D es una aspartil-proteasa que tiene otras funciones aparte de la enzimática propiamente tal. Estudios previos señalan que catepsina D tiene actividad mitogénica tanto en células normales como neoplásicas y que además actúa en forma paracrina regulando la actividad de fibroblastos y células endoteliales en las que estimula la respuesta angiogénica (Berchem y col 2002; Liaudet-Coopman y col 2006). Por otra parte, catepsina D tiene un efecto dual en la apoptosis dado que puede bajo determinadas circunstancias prevenir o actuar como un mediador clave de la apoptosis inducida (Berchem y col 2002; Liaudet-Coopman y col 2006).

Nuestros resultados mostraron que la frecuencia de inmunoreacción para esta enzima fue prácticamente similar en los distintos tipos de alteraciones preneoplásicas y neoplásicas que se estudiaron. En otras palabras la enzima estuvo siempre presente en las células epiteliales, independiente de si el epitelio era no-metaplásico (normal), metaplásico, con carcinoma *in situ* o existía invasión de la lámina propia. Esta observación sugiere que la presencia de la enzima no estaría relacionada a la lesión existente independiente de si la célula es normal o tumoral. En este sentido, sería completamente diferente a CD10 la cual es abundante en el epitelio no-metaplásico (normal), pero disminuye gradualmente hasta desaparecer en el carcinoma invasor.

Por su parte Saku y col (1990) al estudiar la incidencia de catepsina D en el cáncer gástrico encontraron que esta enzima se expresaba en todas las muestra de mucosa

normal analizadas (21/21), disminuía en la mucosa con metaplasia intestinal (7/20) y aparecía nuevamente en todos los casos de adenocarcinoma pobremente diferenciado (4/4) o de carcinoma de células en anillo de sello (2/2) y en el 50% de adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado (3/6). En cambio, displasia, adenocarcinoma papilar, tubular bien diferenciado y mucinoso eran negativos para catepsina D. En este sentido asumieron que la ausencia de catepsinas D y E en lesiones precancerosas y adenocarcinomas bien diferenciados podía deberse a que los procesos intracelulares de algunas proteínas estaría suprimido durante las etapas tempranas de transformación maligna. Sin embargo, Ikeguchi y col (2001) al evaluar catepsina D en adenocarcinoma gástrico encontraron que los tumores con alto porcentaje de expresión de catepsina D en las células del estroma era significativamente mas alto en tumores bien diferenciados (25.5%) que en moderadamente diferenciados (12.8%) o que en pobremente diferenciados (19.1%).

En la mama, Lah y col (2000) observaron que catepsina D estaba presente en células epiteliales normales, malignas y en células de carcinoma ductal *in situ*, pero no en células mioepiteliales. Roger y col (1994), también en la mama encontraron mayor tinción en carcinomas ductales invasores que en lobulillares. Además, observaron que las células tumorales se teñían más consistente e intensamente que las células ductales normales dentro de la misma sección de tejido. No obstante, el papel de catepsina D en esta neoplasia, en que ha sido extensamente estudiada, no es aún dilucidado. Aunque se ha descrito que catepsina D podría ser considerada un indicador de la agresividad del tumor tanto en humanos como en ratones aún no se puede concluir si es un factor de buen o mal pronóstico.

Catepsina D no solo se ha estudiado en cáncer de mama y cáncer gástrico, sino que también en otras neoplasias humanas como carcinoma de vejiga (Tokyo y col 2006), adenocarcinoma de pulmón (Higashiyama y col 1997) y cáncer de endometrio (Falcon y col 1999; Dvalishvili y col 2005).

Tanto en el carcinoma gástrico (Matsuo y col 1996; Ikeguchi y col 2001) como en el cáncer de vejiga (Tokyo y col 2006) se ha propuesto que catepsina D jugaría un rol importante en la invasión, subsiguiente metástasis y/o en la progresión del tumor. En el adenocarcinoma de pulmón se ha postulado que la expresión de catepsina D podría ser un posible indicador de supervivencia postoperatoria en pacientes potencialmente curados (Higashiyama y col 1997). Por otro lado en cultivo de células epiteliales bronquiales Lou y col (2007) sugirieron que esta enzima podría estar involucrada en tumorigénesis, posiblemente en metástasis, mientras que en el endometrio Dvalishvili y col (2005) indicaron que la expresión de catepsina D se asociaría con el alto grado histológico del adenocarcinoma endometrial, profundidad de invasión miometrial y positividad de nódulo linfático. Además, plantean que la invasión local y la diseminación metastásica del tumor podría estar precedida por la expresión de catepsina D en células del estroma. Sin embargo, Falcon y col (1999) encontraron que catepsina D parecería ser un factor pronóstico favorable en el cáncer endometrial. Es probable que la disparidad en muchos de estos resultados se deba al análisis de neoplasias invasoras de distinto grado y a que no se ha evaluado la expresión de la enzima en las alteraciones preneoplásicas y preinvasoras de cada neoplasia, un aspecto que hay que destacar en nuestro estudio de la vesícula biliar.

Respecto de la distribución intracelular de la enzima, las distintas etapas en que se estudió mostraron una reacción de aspecto granular. En este sentido hay trabajos en donde se describe el mismo tipo de reacción por lo que esta observación estaría en concordancia con lo descrito por otros autores y que señalan que catepsina D es una enzima lisosomal (Saku y col 1990; Roger y col 1994; Métayé y col 1997; Lah y col 2000). Por tanto se puede sugerir que los gránulos que observamos en nuestros epitelios corresponderían a lisosomas o a una acumulación de ellos en la región apical, a pesar de que no utilizamos una técnica que identifique este organelo en las células del epitelio vesicular. Se pudo distinguir tres tipos de reacción: *i*) apical cuando el epitelio era normal, *ii*) citoplasmático difuso en la metaplasia intestinal, y *iii*) basal en el carcinoma *in situ*. El cambio en el patrón observado en el epitelio normal y metaplásico se puede explicar porque los gránulos (lisosomas) cambian su distribución dentro de la célula y pasan de estar polarizados en la parte apical, a reubicarse desordenadamente en el citoplasma por alguna alteración que se desconoce. Otra posibilidad quizás más compleja es que catepsina D sea liberada desde los lisosomas al citoplasma. Existen trabajos en donde se describe la translocación de catepsina D al citosol, en cardiomiocitos (Roberg y col 1998) y fibroblastos (Roberg y col 1999) expuestos a estrés oxidativo, fenómeno capaz de activar la muerte celular programada o apoptosis. En cardiomiocitos y usando microscopia electrónica se encontró que la translocación de catepsina D al citosol era un efecto temprano de la exposición a radicales libres. Mientras que en fibroblastos y mediante inmunofluorescencia se observó que la catepsina D presente en los lisosomas se hacía difusa al tratar los fibroblastos con naphthazarin por 30 a 60 min. En general se concluye que durante la apoptosis inducida



por estrés oxidativo, la liberación de catepsina D desde los lisosomas al citosol precede a la liberación de citocromo c y a la disminución del potencial de membrana en la mitocondria. Johansson y col (2003) al evaluar la importancia de catepsina D en fibroblastos humanos de prepucio que sufren apoptosis inducida por staurosporina, observaron que células expuestas a staurosporina por una hora exhibían una tinción mas difusa de catepsina D que la tinción granular que se veía en los fibroblastos controles, lo que implicaba la translocación de esta enzima al citosol. Además, observaron que la actividad de catepsina D contribuía a la liberación de citocromo c desde la mitocondria en fibroblastos tratados con staurosporina; y que la inhibición de la actividad de catepsina D prevenía la activación de caspasas-9 y -3, lo cual resulta en el retraso de la apoptosis; por lo que finalmente concluyen que catepsina D es un componente clave en apoptosis de fibroblastos humanos inducidos por staurosporina. Por su parte, Beaujouin y col (2006) demostraron que la contribución de catepsina D al inicio de la apoptosis sería independiente de su actividad catalítica. Estos autores observaron que tanto catepsina D nativa (*wild type*) como mutada, inactiva catalíticamente, eran translocadas al citosol, aumentando la liberación de citocromo c, la activación de caspasas-9 y -3 y la inducción de apoptosis dependiente de caspasas. Más aun, al inhibir la catepsina D nativa con pepstatina A no disminuyó el aumento de apoptosis inducido por esta enzima.

En base a toda esta información sobre catepsina D se podría sugerir que en las células epiteliales de la vesícula biliar que se trasforman de normales a metaplásicas podría ocurrir un fenómeno similar que gatillaría la liberación de catepsina D desde los

lisosomas hacia el citosol; sin embargo, este estudio no permite validar esta hipótesis y se requieren investigaciones con un enfoque diferente para poder dilucidar este punto.

En cuanto a la redistribución de catepsina D hacia la zona basal en las células del epitelio con carcinoma *in situ*, podría explicarse dada su función como proteasa, como tal, podría participar en la degradación de la membrana basal y matriz extracelular facilitando la invasión local de las células tumorales. En relación a esta función existen trabajos donde se vio la capacidad de esta enzima para degradar la matriz extracelular. Briozzo y col (1988) evaluaron el rol de catepsina D (pro-cat D,  $M_r$  52 kDa) en la invasión tumoral, probando su capacidad para degradar la matriz extracelular *in vitro*. Ellos demostraron que catepsina D  $M_r$  52 kDa purificada de células de cáncer de mama MCF-7 y medio condicionado preparado a partir de diferentes líneas celulares de cáncer de mama eran capaces de degradar la matriz extracelular. Dos años mas tarde Montcourrier y col (1990) utilizando la línea de cáncer de mama MCF-7, encontraron a catepsina D en estructuras distintas de lisosomas, a éstas las denominaron *large acidic vesicles* (LAVs), las cuales tenían un pH ácido por lo que catepsina D era activa en este ambiente, finalmente determinaron que catepsina D era capaz de degradar la matriz extracelular que se endocitaba dentro de estos nuevos compartimentos ácidos. Finalmente en el año 2007 se observó que maspin (serpina mamaria) una inhibidora de las serina proteasas (*serpin*) tenía la capacidad de modular la actividad de catepsina D en la degradación de la matriz extracelular depositada por células epiteliales mamarias normales, en definitiva sus estudios mostraron que maspin secretada, era incorporada en una matriz depositada por células epiteliales mamarias humanas y en una artificial de colágeno, de ésta manera jugaría un papel importante en la remodelación de la

matriz. Mas aún vieron que la presencia de maspin en la matriz de colágeno disuade la incorporación de catepsina D por parte de la matriz, por lo cual se reduciría la degradación de la misma (Khalkhali-Ellis y Hendrix 2007).

#### **5.4. El Receptor de Estrógeno y Calicreina-3 o Antígeno prostático específico no se expresan en la vesícula biliar**

Los estrógenos son hormonas esteroidales que regulan el crecimiento, diferenciación, y la función en un amplio rango de tejidos blanco. El efecto biológico de los estrógenos esta mediado a través del receptor de estrógeno, el cual es miembro de una gran superfamilia de receptores nucleares (Bjornstrom y Sjoberg 2005).

Entre un 50% a un 80% de los cánceres de mama expresan receptores de estrógeno, éste ha sido utilizado y estudiado ampliamente como un indicador de pronóstico del cáncer de mama y como objetivo de la terapia hormonal antitumoral (Poblete 2001). La presencia del receptor de estrógeno implica que los mecanismos celulares normales para procesar esta hormona se encuentran conservados a pesar de la transformación neoplásica.

En trabajos anteriores, en vesícula biliar, el estado del receptor de estrógeno no ha sido asociado con sobrevida o con características clínicopatológicas (Malik y col 1998). No obstante, se ha observado expresión de este receptor en adenocarcinomas moderada y pobremente diferenciados (Nakamura y col 1989). En otro trabajo Yamamoto y col (1990) relacionaron la presencia del receptor de estrógeno a la mucosa con metaplasia. Sin embargo, otros autores no han encontrado ninguna asociación estadística ni tendencia en relación a sexo, etapa del tumor, o tipo histológico (Ko y col 1995). Debido

a estos resultados contradictorios el rol preciso de este receptor (RE- $\alpha$ ) en la vesícula biliar aún es incierto.

Por su parte calicreína-3 o antígeno prostático específico es una glicoproteína de aproximadamente 34 kDa, perteneciente a la familia de las calicreínas humanas (hk) con actividad quimiotripsina serina proteasa. Al igual que ellas; participa en la ruptura del gel proveniente de los tubos seminíferos, por lo que es muy importante para la espermatogénesis y función espermática. Se han publicado miles de estudios sobre este indisputable marcador identificado en la actualidad como el biomarcador más útil para detectar el cáncer de próstata en etapas tempranas, para evaluar la progresión de la enfermedad y para asesorar la repuesta terapéutica, así como para identificar la recurrencia del tumor (Peehl 1995).

A pesar de lo interesante que habría sido tener alguna reacción de parte de alguno de estos dos marcadores, quizás de manera más importante el receptor de estrógenos, ya que el cáncer de vesícula afecta mucho más al sexo femenino que al masculino, no se encontró expresión para ninguno de ellos. En todas las etapas hubo ausencia de reacción lo que sugiere que tanto estrógeno o calicreína-3/PSA no jugarían un rol importante en el proceso de transformación neoplásica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Apostolov, E., Al-Soud, W. A., Nilsson, I., Kornilovska, I., Usenko, V., Lyzogubov, V., Gaydar, Y., Wadstrom, T., and Ljungh, A. (2005). "Helicobacter pylori and other Helicobacter species in gallbladder and liver of patients with chronic cholecystitis detected by immunological and molecular methods." *Scand. J. Gastroenterol.*, 40(1), 96-102.
- Aroni, K., Kittas, C., Papadimitriou, C. S., and Papacharalampous, N. X. (1984). "An immunocytochemical study of the distribution of lysozyme, a1-antitrypsin and a1-antichymotrypsin in the normal and pathological gall bladder." *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 403(3), 281-289.
- Arroyo, G. F. (2003). "Cáncer de la Vesícula Biliar." *Revista Oncologia Clinica*, 8(1), 831-837.
- Aust, S., Obrist, P., Jaeger, W., Klimpfinger, M., Tucek, G., Wrba, F., Penner, E., and Thalhammer, T. (2004). "Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium." *Lab Invest*, 84(8), 1024-1036.
- Avery, A. K., Beckstead, J., Renshaw, A. A., and Corless, C. L. (2000). "Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms." *Am. J. Surg. Pathol.*, 24(2), 203-210.
- Beaujouin, M., Baghdiguan, S., Glondu-Lassis, M., Berchem, G., and Liaudet-Coopman, E. (2006). "Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity." *Oncogene*, 25(13), 1967-1973.
- Berchem, G., Glondu, M., Gleizes, M., Brouillet, J. P., Vignon, F., Garcia, M., and Liaudet-Coopman, E. (2002). "Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis." *Oncogene*, 21(38), 5951-5955.
- Bjornstrom, L., and Sjoberg, M. (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." *Mol. Endocrinol.*, 19(4), 833-842.
- Briozzo, P., Morisset, M., Capony, F., Rougeot, C., and Rochefort, H. (1988). "In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells." *Cancer Res.*, 48(13), 3688-3692.

- Castiglioni, T., Merino, M. J., Elsner, B., Lah, T. T., Sloane, B. F., and Emmert-Buck, M. R. (1994). "Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B, and L in human breast cancer." *Hum. Pathol.*, 25(9), 857-862.
- Chaube, A., Tewari, M., Garbyal, R. S., Singh, U., and Shukla, H. S. (2006). "Preliminary study of p53 and c-erbB-2 expression in gallbladder cancer in Indian patients manuscript id: 8962091628764582." *BMC. Cancer*, 6, 126.
- Choi, Y. L., Xuan, Y. H., Shin, Y. K., Chae, S. W., Kook, M. C., Sung, R. H., Youn, S. J., Choi, J. W., and Kim, S. H. (2004). "An immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in gallbladder lesions." *J. Histochem. Cytochem.*, 52(5), 591-601.
- Chu, P., and Arber, D. A. (2000). "Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma." *Am. J. Clin. Pathol.*, 113(3), 374-382.
- Departamento Epidemiología Ministerio de Salud Chile. Direccion electronica [http://epi.minsal.cl/epi/html/presenta/Taller2001/Regpobcan\(Clelia%20Balleвуona\).ppt](http://epi.minsal.cl/epi/html/presenta/Taller2001/Regpobcan(Clelia%20Balleвуona).ppt).
- Diamandis, E. P., and Yu, H. (1995). "New biological functions of prostate-specific antigen?" *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 80(5), 1515-1517.
- Dvalishvili, I., Charkviani, L., Charkviani, T., Turashvili, G., and Burkadze, G. (2005). "Clinical prognostic factors and expression of cathepsin D in endometrioid adenocarcinoma." *Georgian. Med. News*,(126), 27-31.
- Falcon, O., Chirino, R., Leon, L., Lopez-Bonilla, A., Torres, S., Fernandez, L., Garcia-Hernandez, J. A., Valeron, P. F., and az-Chico, J. C. (1999). "Low levels of cathepsin D are associated with a poor prognosis in endometrial cancer." *Br. J. Cancer*, 79(3-4), 570-576.
- Gafford, J. T., Skidgel, R. A., Erdos, E. G., and Hersh, L. B. (1983). "Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides." *Biochemistry*, 22(13), 3265-3271.
- Ghosh, M., Kawamoto, T., Kamma, H., Koike, N., Miwa, M., Kapoor, VK., Krishnani, N., Agrawal, S., Okouchi, N., and Todoroki, T. (2003). "Different Expression of MUC1 in the Gallbladder Disease." *The Internet Journal of Surgery*, 4(2).
- Gross, J. M., and Yee, D. (2002). "How does the estrogen receptor work?" *Breast Cancer Res.*, 4(2), 62-64.

- Hatanaka, Y., Hashizume, K., Kamihara, Y., Itoh, H., Tsuda, H., Osamura, R. Y., and Tani, Y. (2001). "Quantitative immunohistochemical evaluation of HER2/neu expression with HercepTest™ in breast carcinoma by image analysis." *Pathol. Int.*, 51(1), 33-36.
- Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H., Kasugai, T., and Ishiguro, S. (1997). "Influence of cathepsin D expression in lung adenocarcinoma on prognosis: possible importance of its expression in tumor cells and stromal cells, and its intracellular polarization in tumor cells." *J. Surg. Oncol.*, 65(1), 10-19.
- Ikeguchi, M., Fukuda, K., Oka, S., Yamaguchi, K., Hisamitsu, K., Tsujitani, S., Sakatani, T., Ueda, T., and Kaibara, N. (2001). "Clinicopathological significance of cathepsin D expression in gastric adenocarcinoma." *Oncology*, 61(1), 71-78.
- Inada, A., Konishi, F., Yamamichi, N., and Ito, H. (1989). "[Histogenesis of gallbladder cancer with special reference to metaplastic changes and distribution of various mucins and CEA]." *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 90(6), 894-906.
- Itoi, T., Shinohara, Y., Takeda, K., Nakamura, K., Takei, K., Sanada, J., Horibe, T., Saito, T., Kasuya, K., and Ebihara, Y. (2000). "Nuclear cyclin D1 overexpression is a critical event associated with cell proliferation and invasive growth in gallbladder carcinogenesis." *J. Gastroenterol.*, 35(2), 142-149.
- Itoi, T., Takei, K., Shinohara, Y., Takeda, K., Nakamura, K., Horibe, T., Sanada, A., Ohno, H., Matsubayashi, H., Saito, T., and Watanabe, H. (1999). "K-ras codon 12 and p53 mutations in biopsy specimens and bile from biliary tract cancers." *Pathol. Int.*, 49(1), 30-37.
- Johansson, A. C., Steen, H., Ollinger, K., and Roberg, K. (2003). "Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine." *Cell Death. Differ.*, 10(11), 1253-1259.
- Jost, M., Kari, C., and Rodeck, U. (2000). "The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions." *Eur. J. Dermatol.*, 10(7), 505-510.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2002). Glándulas anexas del tubo digestivo. En: *Histología básica* (5° Ed), pg 327-330. Masson.
- Kalekou, H., and Miliaras, D. (2004). "Immunohistochemical study of microvessel density, CD44 (standard form), p53 protein and c-erbB2 in gallbladder carcinoma." *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 19(7), 812-818.
- Kashiwagi, H., Kijima, H., Dowaki, S., Ohtani, Y., Tobita, K., Yamazaki, H., Nakamura, M., Ueyama, Y., Tanaka, M., Inokuchi, S., and Makuuchi, H. (2001). "MUC1 and MUC2 expression in human gallbladder carcinoma: a clinicopathological study and relationship with prognosis." *Oncol. Rep.*, 8(3), 485-489.

- Khalkhali-Ellis, Z., and Hendrix, M. J. (2007). "Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation." *Cancer Res.*, 67(8), 3535-3539.
- Ko, C. Y., Schmit, P., Cheng, L., and Thompson, J. E. (1995). "Estrogen receptors in gallbladder cancer: detection by an improved immunohistochemical assay." *Am. Surg.*, 61(10), 930-933.
- Lah, T. T., Kalman, E., Najjar, D., Gorodetsky, E., Brennan, P., Somers, R., and Daskal, I. (2000). "Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis." *Hum. Pathol.*, 31(2), 149-160.
- Lazcano-Ponce, E. C., Miquel, J. F., Munoz, N., Herrero, R., Ferrecio, C., Wistuba, I. I., onso de, R. P., Aristi, U. G., and Nervi, F. (2001). "Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer." *CA Cancer J. Clin.*, 51(6), 349-364.
- Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondu-Lassis, M., Laurent-Matha, V., Prebois, C., Rochefort, H., and Vignon, F. (2006). "Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis." *Cancer Lett.*, 237(2), 167-179.
- Lou, X., Xiao, T., Zhao, K., Wang, H., Zheng, H., Lin, D., Lu, Y., Gao, Y., Cheng, S., Liu, S., and Xu, N. (2007). "Cathepsin D is secreted from M-BE cells: its potential role as a biomarker of lung cancer." *J. Proteome. Res.*, 6(3), 1083-1092.
- Macswen, R. N. M., Burt, A. D., Portmann, B. C., Ishak, K. G., Scheuer, P. J., Anthony, P. P. (2002). Diseases of the Gallbladder. En: Pathology of the Liver de (4° Ed), pg 508-517. Churchill Livingstone, London.
- Malik, I. A., Abbas, Z., Shamsi, Z., Daudi, I., Shah, H. A., Moid, I., Khan, Z. K., and Shaikh, H. (1998). "Immuno-histochemical analysis of estrogen receptors on the malignant gallbladder tissue." *J. Pak. Med. Assoc.*, 48(5), 123-126.
- Matsuo, K., Kobayashi, I., Tsukuba, T., Kiyoshima, T., Ishibashi, Y., Miyoshi, A., Yamamoto, K., and Sakai, H. (1996). "Immunohistochemical localization of cathepsins D and E in human gastric cancer: a possible correlation with local invasive and metastatic activities of carcinoma cells." *Hum. Pathol.*, 27(2), 184-190.
- Matsuyama, S., Kitajima, Y., Sumi, K., Mori, D., Satoh, T., and Miyazaki, K. (2004). "Gallbladder cancers rarely overexpress HER-2/neu, demonstrated by Hercep test." *Oncol. Rep.*, 11(4), 815-819.
- McIntosh, G. G., Lodge, A. J., Watson, P., Hall, A. G., Wood, K., Anderson, J. J., Angus, B., Horne, C. H., and Milton, I. D. (1999). "NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue." *Am. J. Pathol.*, 154(1), 77-82.



- Medina, E., and Kaempffer, A. M. (2000). "[Adult mortality in Chile]." *Rev. Med. Chil.*, 128(10), 1144-1149.
- Medina, E., and Kaempffer, A. M. (2001). "[Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations]." *Rev. Med. Chil.*, 129(10), 1195-1202.
- Mikami, T., Yanagisawa, N., Baba, H., Koike, M., and Okayasu, I. (1999). "Association of Bcl-2 protein expression with gallbladder carcinoma differentiation and progression and its relation to apoptosis." *Cancer*, 85(2), 318-325.
- Montcourrier, P., Mangeat, P. H., Salazar, G., Morisset, M., Sahuquet, A., and Rochefort, H. (1990). "Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles." *Cancer Res.*, 50(18), 6045-6054.
- Mukhopadhyay, S., and Landas, S. K. (2005). "Putative precursors of gallbladder dysplasia: a review of 400 routinely resected specimens." *Arch. Pathol. Lab Med.*, 129(3), 386-390.
- Nagata, S., Ajioka, Y., Nishikura, K., Watanabe, G., Inoue, T., Yamaguchi, K., Watanabe, H., Tanaka, M., and Tsuneyoshi, M. (2007). "Co-expression of gastric and biliary phenotype in pyloric-gland type adenoma of the gallbladder: immunohistochemical analysis of mucin profile and CD10." *Oncol. Rep.*, 17(4), 721-729.
- Nakamura, S., Muro, H., and Suzuki, S. (1989). "Estrogen and progesterone receptors in gallbladder cancer." *Jpn. J. Surg.*, 19(2), 189-194.
- Nishihara, K., Takashima, M., Furuta, T., Haraguchi, M., and Tsuneyoshi, M. (1995). "Adenosquamous carcinoma of the gall-bladder with gastric foveolar-type epithelium." *Pathol. Int.*, 45(3), 250-256.
- Pavelic, Z. P., Pavelic, L., Lower, E. E., Gapany, M., Gapany, S., Barker, E. A., and Preisler, H. D. (1992). "c-myc, c-erbB-2, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma." *Cancer Res.*, 52(9), 2597-2602.
- Peehl, D. M. (1995). "Prostate-specific antigen: role and function." *Cancer*, 75, 2021-2026.
- Poblete, M. T. (2001). "Marcadores de utilidad en cáncer mamario." *Cuad Cir*, 15, 74-79.
- Pradhan, S. B., and Dali, S. (2004). "Relation between gallbladder neoplasm and Helicobacter hepaticus infection." *Kathmandu. Univ Med. J. (KUMJ.)*, 2(4), 331-335.

- Pritchard, K. I., Shepherd, L. E., O'Malley, F. P., Andrulis, I. L., Tu, D., Bramwell, V. H., and Levine, M. N. (2006). "HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy." *N. Engl. J. Med.*, 354(20), 2103-2111.
- Quan, Z. W., Wu, K., Wang, J., Shi, W., Zhang, Z., and Merrell, R. C. (2001). "Association of p53, p16, and vascular endothelial growth factor protein expressions with the prognosis and metastasis of gallbladder cancer." *J. Am. Coll. Surg.*, 193(4), 380-383.
- Reese, D. M., and Slamon, D. J. (1997). "HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer." *Stem Cells*, 15(1), 1-8.
- Roa, I., Araya, J. C., Wistuba, I., de, A., X, Salinas, C., Mauriz, A., and Villaseca, M. (1991). "[Immunohistochemical expression of the carcinoembryonic antigen in gallbladder cancer]." *Rev. Med. Chil.*, 119(2), 129-136.
- Roberg, K., and Ollinger, K. (1998). "Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes." *Am. J. Pathol.*, 152(5), 1151-1156.
- Roberg, K., Johansson, U., and Ollinger, K. (1999). "Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress." *Free Radic. Biol. Med.*, 27(11-12), 1228-1237.
- Roger, P., Montcourrier, P., Maudelonde, T., Brouillet, J. P., Pages, A., Laffargue, F., and Rochefort, H. (1994). "Cathepsin D immunostaining in paraffin-embedded breast cancer cells and macrophages: correlation with cytosolic assay." *Hum. Pathol.*, 25(9), 863-871.
- Ross, W., and Hall, P. A. (1995). "Ki67: from antibody to molecule to understanding?" *Clin. Mol. Pathol.*, 48(3), M113-M117.
- Saku, T., Sakai, H., Tsuda, N., Okabe, H., Kato, Y., and Yamamoto, K. (1990). "Cathepsins D and E in normal, metaplastic, dysplastic, and carcinomatous gastric tissue: an immunohistochemical study." *Gut*, 31(11), 1250-1255.
- Sasaki, M., Yamato, T., Nakanuma, Y., Ho, S. B., and Kim, Y. S. (1999). "Expression of MUC2, MUC5AC and MUC6 apomucins in carcinoma, dysplasia and non-dysplastic epithelia of the gallbladder." *Pathol. Int.*, 49(1), 38-44.
- Shi, Y. Z., Hui, A. M., Li, X., Takayama, T., and Makuuchi, M. (2000). "Overexpression of retinoblastoma protein predicts decreased survival and correlates with loss of p16INK4 protein in gallbladder carcinomas." *Clin. Cancer Res.*, 6(10), 4096-4100.

- Sumi, K., Matsuyama, S., Kitajima, Y., and Miyazaki, K. (2004). "Loss of estrogen receptor beta expression at cancer front correlates with tumor progression and poor prognosis of gallbladder cancer." *Oncol. Rep.*, 12(5), 979-984.
- Tatematsu, M., Ichinose, M., Miki, K., Tatematsu, K., Kishikawa, H., and Ito, N. (1988). "Gastric phenotypic expression in human gallbladder cancers revealed by pepsinogen immunohistochemistry and mucin histochemistry." *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 413(1), 25-32.
- Tokyol, C., Koken, T., Demirbas, M., Dilek, F. H., Yorukoglu, K., Mungan, U., and Kirkali, Z. (2006). "Expression of cathepsin D in bladder carcinoma: correlation with pathological features and serum cystatin C levels." *Tumori*, 92(3), 230-235.
- van den Oord, J. J., Geboes, K., De Wolf-Peeters, C., and Desmet, V. J. (1983). "Immunohistochemical demonstration of lysozyme in pseudopyloric glands in chronic cholecystitis." *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 399(3), 317-323.
- van, d., V, Peterse, J. L., Mooi, W. J., Wisman, P., Lomans, J., Dalesio, O., and Nusse, R. (1988). "Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer." *N. Engl. J. Med.*, 319(19), 1239-1245.
- Wistuba, I. I., Gazdar, A. F., Roa, I., and bores-Saavedra, J. (1996). "p53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study." *Hum. Pathol.*, 27(4), 360-365.
- Xuan, Y. H., Choi, Y. L., Shin, Y. K., Kook, M. C., Chae, S. W., Park, S. M., Chae, H. B., and Kim, S. H. (2005). "An immunohistochemical study of the expression of cell-cycle-regulated proteins p53, cyclin D1, RB, p27, Ki67 and MSH2 in gallbladder carcinoma and its precursor lesions." *Histol. Histopathol.*, 20(1), 59-66.
- Yamamoto, M., Nakajo, S., and Tahara, E. (1990). "Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in human gallbladder." *Acta Pathol. Jpn.*, 40(1), 14-21.
- Yu, H., Giai, M., Diamandis, E. P., Katsaros, D., Sutherland, D. J., Levesque, M. A., Roagna, R., Ponzzone, R., and Sismondi, P. (1995). "Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer." *Cancer Res.*, 55(10), 2104-2110.