

CARCINOMUL MAMAR DUCTAL INVAZIV – VIZIUNE PRIN PRISMA APOPTOZEI

Veaceslav Fulga^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,
Oxana Mazuru² – cercet. șt.,
Lucian Rudico^{1,2} – asistent,
Valeriu David^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,
Vitalie Mazuru¹ – dr. șt. med., asistent,
Lilian Șaptefrați¹ – conf. univ., dr. hab. șt. med.,

¹Catedra de histologie, citologie și embriologie, ²Laboratorul de morfologie,
IP USMF „Nicolae Testemițanu”,
tel.: +373 22205229, vmfulga@usmf.md

Rezumat

Funcțiile factorilor pro- (p53) și anti-apoptotic (Bcl2) în carcinomul de sân sunt controversate. Scopul lucrării: evaluarea comparativă a expresiei proteinei pro-apoptotice p53 și markerului anti-apoptotic Bcl2 în carcinomul mamar invaziv de tip NST (no specific type). Material și metode: În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic (tumora primară) prelevat de la 93 paciente cu vârsta cuprinsă între 33-86 ani. Toate cazurile selectate au fost evaluate histologic drept carcinom ductal invaziv de tip glandular solid. Țesuturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină neutră tamponată 10% și incluse ulterior în Paraplast HM (Leica Biosystems) după metoda clasică. Pentru studiul imunohistochimic am utilizat markeri pentru receptorul p53 (clona P53/DO-7, Leica Biosystems) și Bcl2 (clona bcl-2/100/D5, Leica Biosystems). Toate procedeele imunohistochimice au fost procesate automat pe Leica Bond-Max autostainer (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Rezultate: Am constatat, că markerul anti-apoptotic Bcl2 este mai frecvent expresat (71 cazuri/76,34%) în carcinomul ductal invaziv comparativ cu proteina pro-apoptotică p53 (41 cazuri/44,09%). În 44,09% cazuri expresia negativă pentru p53 a fost însoțită de supraexpresia Bcl2, iar în 32,26% s-a determinat supraexpresia combinată a ambelor proteine. Concluzii: Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NST exprimă cu predilecție proteina anti-apoptotică Bcl2. Expresia combinată a ambelor proteine, pro- și anti-apoptotică în circa 1/3 cazuri necesită studii suplimentare în evaluarea potențialului prognostic și predictiv a acestor markeri în carcinomul de sân. Valoarea expresiei markerilor p53 și Bcl2 nu este în funcție de gradul de diferențiere tumorală, în majoritatea cazurilor tumorile fiind slab diferențiate.

Cuvinte-cheie: carcinom mamar, apoptoză, p53, Bcl2

Summary. Ductal invasive breast carcinoma – sight through apoptosis

The functions of pro- (p53) and anti-apoptotic (Bcl2) factors in breast carcinoma are controversial. Aim: a comparative evaluation of pro- apoptotic (p53) and anti-apoptotic (Bcl2) proteins in invasive ductal breast carcinoma of NST type (no specific type). Material and methods: Were studied primary tumors taken from 93 patients 33-86 years old. All selected cases were evaluated as invasive ductal NST breast carcinoma. The biological material was fixed in 10% phosphate buffered formalin and paraffin embedded (Paraplast High Melt, Leica Biosystems). For imunohistochemical assays were used surrogate markers for p53 (clone P53/DO-7, Leica Biosystems) and Bcl2 proteins (clone bcl-2/100/D5, Leica Biosystems). Specimens were processed automatically on Leica Bond-Max autostainer (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Results: We determined that in invasive ductal breast carcinoma anti-apoptotic marker Bcl2 is expressed oftener (71 cases/76,34%) than protein p53 (41 cases/44,09%). In 44,09% of cases, a negative p53 meanwhile Bcl2 was overexpressed, and in 32,26% cases both of the proteins exerted strong expression. Conclusions: in invasive ductal NST breast carcinoma tumor cells express at higher rate anti-apoptotic Bcl2 than pro-apoptotic p53 protein. A prognostic and predictive importance of simultaneous overexpression of both proteins in 1/3 of cases should be evaluated by additional studies. The score of p53 and Bcl2 expression is not influenced by grade of differentiation, in most of the cases tumors of low grade were determined.

Key words: breast carcinoma, apoptosis, p53, Bcl2

Резюме. Железистый инфильтрирующий рак молочной железы – взгляд со стороны апоптоза

Данные касающиеся функции про - (p53) и анти-апоптотических факторов (Bcl2) в раке молочной железы противоречивы. Цель исследования: сравнительный анализ экспрессии про-апоптотического p53 и анти-апоптотического Bcl2 белков в железистом инфильтрирующем раке молочной железы (РМЖ). Материал и методы: были исследованы образцы РМЖ 93 пациенток в возрасте 33-86 лет. Во всех отобранных случаях был выявлен инвазивный железистый РМЖ. Биологический материал был фиксирован в 10% буферном формалине 24-48 часов и в последующем заключен в Paraplast HM (Leica Biosystems) классическим методом. Для иммуногистохимических анализов были использованы маркеры белков p53 (клон P53/DO-7, Leica Biosystems)

и Bcl2 (клон bcl-2/100/D5, Leica Biosystems). Все исследования были проведены автоматически с использованием Leica Bond-Max автостейнера (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Результаты: Было установлено, что при железистом инфильтрирующем РМЖ анти-апоптотический фактор Bcl2 экспрессируется чаще (71 случаев/76,34%) по сравнению с про-апоптотическим белком p53 (41 случаев/44,09%). В 44,09% случаев отсутствие p53 белка сопровождается высокой экспрессией Bcl2 маркера. В 32,26% случаев было выявлена положительная экспрессия обоих белков. Выводы: В железистом инфильтрирующем РМЖ преобладает анти-апоптотический фактор Bcl2. Прогностическая и предиктивная значимость комбинированной экспрессии про- и анти-апоптотических факторов в 1/3 случаев нуждается в дополнительных исследованиях. Экспрессия p53 и Bcl2 белков не зависит от степени опухолевой дифференциации, в большинстве случаев опухоли имели низкую дифференциацию.

Ключевые слова: рак молочной железы, апоптоз, p53, Bcl2

Introducere. Moartea celulară programată este esențială pentru dezvoltarea și funcționarea normală a organismului. Acest proces este codificat genetic și poate fi declanșat ca răspuns la un anumit factor extern, precum iradierea, medicamente, toxine [1, 2]. Apoptoza poate fi activată pe două căi: 1. calea extrinsecă, prin implicarea receptorilor TNF (tumor necrosis factor – factorul de necroză tumorală). 2. calea intrinsecă este controlată de genele Bcl-2 (B-cell lymphoma -2), prin implicarea mitocondriilor.

Importanța apoptozei în homeostazia tisulară a fost reflectată prin studiul genelor cu influență pro- (p53) și anti-apoptotică (Bcl2) în multiple studii pe tumori.

În carcinomul mamar s-a determinat că prezența în exces a celulelor apoptotice corelează cu expresia negativă a receptorilor pentru estrogen, progesteron, Bcl2 și grad scăzut de diferențiere a tumorii [3]. Pe de altă parte markerul Bcl2 este determinat pozitiv în circa 70% de cazuri, iar expresia acestuia corelează cu statutul hormonal pozitiv, fapt relatat de cercetători drept semn de pronostic favorabil, și invers cazurile hormon-independente asociate cu Bcl2 negativ sunt caracterizate printr-o agresivitate sporită [4, 5].

Proteina nucleară p53 este produsul unei gene localizate pe cromozomul 17 (17p13.1). Funcția acesteia, în mod normal, ține de reglarea ciclului celular și a apoptozei, demonstrând la acest capitol un efect supresiv tumoral. Această proteină este exprimată în celulele normale la un nivel foarte redus, iar la acțiunea unui factor declanșator soldat cu lezarea ADN-ului, hipoxie, blochează ciclul celular în faza G1 inducând celula în apoptoză [6]. Astfel această proteină menține stabilitatea genomului, prevenind transformările maligne, funcție caracterizată de Lane (1992) drept ”gardian al genomului” [7]. Paradoxal, însă datele privind semnificația nivelului de expresie a acestei proteine sunt contradictorii funcției obișnuite, susținând un pronostic nefavorabil la supraexpresia p53. Mai mult, s-a stabilit că această proteină este sintetizată în exces odată cu progresia neoplasmului și corelează pozitiv cu fenotipul invaziv al tumorii. Pe de altă parte, mutațiile genei p53, determinate în stadiile incipiente de dezvoltare a tumorilor, susțin

creșterea rapidă și metastazarea precoce [6, 8]. Deși, valoarea prognostică și predictivă a proteinei p53 este controversată, aceasta prezintă un interes deosebit pentru terapiile bazate pe p53. Dat fiind faptul, că p53 și Bcl2 manifestă funcție invers proporțională în celulele normale și carcinogenează, faptul că p53 își realizează funcția prin intermediul Bcl2 iar mecanismele dereglării expresiei Bcl2 sunt în corelație cu absența p53, investigația expresiei acestor markeri pe un lot omogen de tumori mamare devine incitantă.

Scopul acestui studiu a fost evaluarea comparativă a expresiei proteinei pro-apoptotice p53 și markerului anti-apoptotic Bcl2 în carcinomul mamar invaziv de tip NST (no specific type).

Material și metode. În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic (tumora primară) prelevat de la 93 paciente cu vârsta cuprinsă între 33-86 ani. Toate cazurile selectate au fost evaluate histologic drept carcinom ductal invaziv de tip glandular solid (NST-no specific type). Țesuturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină neutră tamponată 10% și incluse ulterior în Paraplast HM (Leica Biosystems) după metoda clasică. Secțiuni seriate cu grosimea 3-5 micrometri au fost etalate pe lame de sticlă pentru imunohistochimie, superadezive (S3003, Dako, Denmark) și colorate cu hematoxilină-eozină. Pentru studiul imunohistochimic am utilizat markeri pentru receptorul p53 (clona P53/DO-7, Leica Biosystems) și Bcl2 (clona bcl-2/100/D5, Leica Biosystems). Demascarea s-a efectuat cu Bond Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems), 20 minute, iar vizualizarea cu sistemul Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems), 15 minute. Toate procedeele imunohistochimice, de la deparafinare (Bond Dewax Solution nr.AR9222) și până la contracolorarea nucleelor (hematoxilina modificată după Harris, HHS32, SigmaAldrich) au fost procesate automat pe Leica Bond-Max autostainer (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Evaluarea microscopică. Gradarea histopatologică am realizat-o folosind sistemul de cuantificare Scarff-Bloom-Richardson, cu estimarea formării structurilor tubulare (ca expresie a diferențierii glan-

dulare), pleomorfismului nuclear, figurilor mitotice (media calculată în 10 câmpuri la obiectiv Plan Fluor 40x/0,75 WD-0,44) [9].

Evaluarea markerului Bcl2 a fost efectuată în corespundere cu recomandările lui Callagy și coaut. (2006), precum: 0 – absența colorării; + 1- <10% din celulele tumorale prezintă pattern citoplasmatic; + 2 – 10-50% celule colorate; + 3 >50% celule tumorale colorate. Cazurile evaluate cu 0 – 1 au fost considerate negative [10].

Scorificarea markerului nuclear p53 a fost efectuată în baza recomandărilor Yamashita și coaut. (2004): 0 - lipsa colorării nucleare; 1 - <10% din celule pozitive; 2 – 10-30% celule cu pattern nuclear specific; 3 - >30% din celulele tumorale colorate specific. Limfocitele stromale au servit în calitate de control intern pozitiv. Cazurile estimate ca 0 – 1 au fost considerate negative [11].

Captarea imaginilor și analiza statistică. Interpretarea histologică a fost efectuată la microscop Nikon Eclipse 80i înzestrat cu camera Nikon DS-Fi1 și soft-ul de imagini Nis-elements BR 2.30 (Nikon Instruments Europe BV). Interpretarea statistică și corelarea rezultatelor a fost realizată cu soft-ul Win-Stat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Valoarea $p \leq 0.05$ a fost considerată statistic semnificativă pentru toate rezultatele.

Aspecte etice. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova (numărul de omologare 21/13 din 31.03.2014).

Rezultate. În baza rezultatelor obținute am constatat, că markerul anti-apoptotic Bcl2 este mai frecvent exprimat (71 cazuri/76,34%) în carcinomul ductal invaziv comparativ cu proteina pro-apoptotică p53 (41 cazuri/44,09%). Comparând expresia acestor receptori

pentru fiecare caz în parte am determinat, că în 44,09% cazuri expresia negativă pentru p53 a fost însoțită de supraexpresia Bcl2, iar în 32,26% s-a determinat supraexpresia combinată a ambelor proteine (Tabelul 1).

Tabelul 1

Scorul expresiei p53 în raport cu scorul determinat pentru Bcl2.

P53	Bcl2	Nr	%	
0	0	6	6,45	44,09
0	1	2	2,15	
0	2	6	6,45	
0	3	25	26,88	
1	0	2	2,15	
1	1	1	1,08	
1	2	1	1,08	
1	3	9	9,68	32,26
2	0	3	3,23	
2	1	2	2,15	
2	2	5	5,38	
2	3	13	13,98	
3	0	6	6,45	
3	2	1	1,08	
3	3	11	11,83	
Total		93	100	

Notă: cu **Bold** sunt marcate cazurile Bcl2 pozitive.

În raport cu gradul histologic nu s-a determinat o careva afinitate a expresiei markerilor apoptotici, variațiile de grad G1-G3 determinându-se în toată gama de scorificare a p53 și Bcl2 (Tabelul 2). Totuși, gradul G1 este mai frecvent întâlnit în cazurile p53 negative (4 cazuri/4,30%) față de p53 pozitive, iar în corelație cu expresia Bcl2 raportul este aproximativ același (2 cazuri/Bcl2 negativ la 3 cazuri Bcl2 pozitiv).

Corelarea după Pearson a expresiei p53, Bcl2 și gradul histologic nu a înregistrat valori semnificative statistic.

Tabelul 2

Expresia receptorilor p53 și Bcl2 în funcție de gradul histologic

p53			
Scor	Gradul	Nr	%
0	G1	4	4,30
0	G2	20	21,51
0	G3	15	16,13
1	G2	6	6,45
1	G3	7	7,53
2	G2	16	17,20
2	G3	7	7,53
3	G1	1	1,08
3	G2	8	8,60
3	G3	9	9,68
Total		93	100

Bcl2			
Scor	Gradul	Nr	%
0	G1	2	2,15
0	G2	8	8,60
0	G3	7	7,53
1	G2	1	1,08
1	G3	4	4,30
2	G2	5	5,38
2	G3	8	8,60
3	G1	3	3,23
3	G2	36	38,71
3	G3	19	20,43
Total		93	100

Discuții. Bcl2 este un marker cu funcție controversată. Conform multiplelor rezultate este cert dovedită funcția sa oncogenă. Această proteină inhibă eliminarea citocromului C mitocondrial, a factorului de inducere a apoptozei, blochează reacția de peroxidare a lipidelor în membrana mitocondrială, efecte soldate cu inhibiția apoptozei. Del Bufalo și coaut. (1997) consideră, că supraexpresia Bcl2 crește potențialul metastatic al celulelor tumorale [12]. Astfel la prima concluzie scorul Bcl2 ar putea fi complementar gradului histologic. Pe de altă parte, Rochaix și coaut. (1999) au determinat că expresia Bcl2 este asociată în 100% cu gradul G1, favorabil în pronostic și mai rar întâlnit în tumori slab diferențiate (G2 – 81%, G3 – 60%) [13]. Aceasta vine în contradicție cu rezultatele actualului studiu în care majoritatea cazurilor estimate ca Bcl2 pozitive au prezentat grad G2 și G3 de diferențiere (Tabelul II). Binder și coaut. (1995) au determinat o corelație inversă dintre gradul histologic și expresia Bcl2, confirmată recent și de Ermiah și coaut. (2013) [14, 15]. Însă în studiul nostru cazurile Bcl2 negative de asemenea prezentau în marea majoritate grad scăzut de diferențiere.

Deși, multiple cercetări confirmă funcția anti-apoptotică, pro-tumorală a Bcl2, există date ce susțin corelația dintre expresia înaltă și pronosticul pozitiv. Ermiah și coaut. (2013) consideră, că pacienții la care tumorile exprimă Bcl2 au un risc de recurențe mai mic în comparație cu cazurile Bcl2 negative, date contradictorii cu cele prezentate de Yang și coaut. (2013), care au demonstrat corelații semnificative între lipsa expresiei Bcl2 și pronosticul pozitiv [15, 16].

Supresorul tumoral p53 are un rol cheie în homeostazia tisulară, iar inactivarea acestuia la nivel de genă sau proteină stimulează progresia tumorală. În carcinomul de sân mutațiile p53 sunt raportate a avea un impact nefavorabil asupra pronosticului, sporind rata recidivelor și rezistenței medicamentoase [17, 18]. Conform datelor lui Shan M. și coaut. (2013) tumorile p53 pozitive sunt mai agresive decât cele p53 negative [19]. Este paradoxal, că la prezența în abundență a proteinei cu funcție supresiv tumorală aceasta în evoluție să fie mai agresivă. Explicația plauzibilă este mutația genetică la nivel de genă TP53 cu sinteza unei proteine p53 defectuoase. Aceste date sunt similare cu rezultatele studiului nostru, în care majoritatea cazurilor p53 pozitive au fost evaluate cu grad histologic G2 și G3. De menționat, că și tumorile p53 negative au avut în majoritate un grad de diferențiere scăzut. Explicația posibilă ține tot de gena TP53, dar mutația este soldată cu blocarea sintezei de proteină p53 [20]. Intrigant este faptul, că p53 își realizează funcția prin intermediul genelor din familia Bcl2: stimulează apoptoza prin activarea transcripției genelor

proapoptotice Bax, Bak, Noxa și PUMA, antagonizând acțiunea proteinelor Bcl2 antiapoptotice, precum Bcl2 și Bcl-xl. În cadrul studiului nostru din cele 55,91% cazuri evaluate ca p53 negative, 44,09% au supraexpresat Bcl2. De asemenea, în majoritatea cazurilor p53 pozitive (32,26% din 44,09%) Bcl2 a fost considerat pozitiv (Tabelul I). Însă în baza rezultatelor prezentate de Rolland și coaut. (2007), combinația p53pozitiv-Bcl2 negativ duce la diminuarea drastică a ratei de supraviețuire, în comparație cu cazurile în care ambii markeri sunt pozitivi [21]. Creșterea ratei de supraviețuire pe termen lung (10 ani) a raportat de asemeni Lee și coaut. (2007) la combinația paradox p53negativ-Bcl2 pozitiv [22]. Deși în studiul nostru p53 a fost evaluat negativ în 55,91% cazuri, expresia Bcl2 a fost raportată net superior – în 76,34%, ceea ce în baza literaturii ne permite de a presupune un pronostic mai favorabil a pacientelor cu cancer mamar de tip NST (Tabelul 1).

Concluzii: Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NST exprimă cu predilecție proteina anti-apoptotică Bcl2. Expresia combinată a ambelor proteine, pro- și anti-apoptotică în circa 1/3 cazuri necesită studii suplimentare în evaluarea potențialului prognostic și predictiv a acestor markeri în carcinomul de sân. Valoarea expresiei markerilor p53 și Bcl2 nu este în funcție de gradul de diferențiere tumorală, în majoritatea cazurilor tumorile fiind slab diferențiate.

Bibliografie

1. Thompson C. B. *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science (Washington DC), 1995; 267:1456-1462.
2. Yang E., Korsmeyer S. K., *Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl-2 family and cell death*. Blood, 1996; 88:386-401.
3. Lipponen P., Aaltomaa S., Kosma V-M., Syrjänen K., *Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis*. Eur. J. Cancer, 1994; 30A: 2068-2073.
4. Bhargava V., Kell D. L., van de Rijn M., Warnke R.A., *Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity*. Am. J. Pathol., 1994; 145:535-540.
5. Basu A, Haldar S., *The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death*. Mol. Hum. Reprod., 1998; 4(12):1099-1109.
6. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G., *p53 and breast cancer, an update*. Endocr. Relat. Cancer., 2006; 13: 293-325.
7. Lane DP., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992; 358(6381): 15-16.
8. Gasco M, Shami S, Crook T., *The p53 pathway in breast cancer*. Breast. Cancer. Res., 2002; 4: 70-76.
9. Elston C.W., Ellis I.O., *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade*

in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 2002; 41(3A):154-61.

10. Callagy G.M., Pharoah P.D., Pinder S.E., Hsu F.D., Nielsen T.O., Ragaz J., Ellis I.O., Huntsman D., Caldas C., *Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index*. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(8):2468–2475.

11. Yamashita H., Nishio M., Toyama T., Sugiura H., Zhang Z., Kobayashi S., Iwase H., *Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer*. *Breast Cancer Res.*, 2004, 6:R24-30.

12. Del Bufalo D., Biroccio A., Leonetti C., Zupi G., *Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line*. *FASEB J.*, 1997;11(12):947-53.

13. Rochaix P., Krajewski S., Reed J.C., Bonnet F., Voigt J.J., Brousset P., *In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis*. *J. Pathol.*, 1999; 187(4):410-5.

14. Binder C., Marx D., Overhoff R., Binder L., Schauer A., Hiddemann W., *Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables*. *Ann. Oncol.*, 1995; 6(10):1005-10.

15. Ermiah E., Buhmeida A., Khaled B.R., Abdalla F., Salem N., Pyrhönen S., Collan Y., *Prognostic value of bcl-2 expression among women with breast cancer in Libya*. *Tumour Biol.*, 2013; 34(3):1569-78.

16. Yang D., Chen M.B., Wang L.Q., Yang L., Liu C.Y., Lu P.H., *Bcl-2 expression predicts sensitivity to che-*

motherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Exp. Clin. Cancer Res.*, 2013; 32:105.

17. Geisler S., Børresen-Dale A.L., Johnsen H., Aas T., Geisler J., Akslen L.A., Anker G., Lønning P.E., *TP53 gene mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer*. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9(15):5582-8.

18. Shapochka D.O., Zaletok S.P., Gnidyuk M.I., *Relationship between NF-κB, ER, PR, Her2/neu, Ki67, p53 expression in human breast cancer*. *Exp. Oncol.*, 2012; 34(4):358-63.

19. Shan M., Zhang X., Liu X., Qin Y., Liu T., Liu Y., Wang J., Zhong Z., Zhang Y., Geng J., Pang D., *P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer*. *PLoS One.*, 2013;8(10):e76408.

20. Walerych D., Napoli M., Collavin L., Del Sal G., *The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer*. *Carcinogenesis.*, 2012; 33(11):2007-17.

21. Rolland P., Spendlove I., Madjd Z., Rakha E.A., Patel P., Ellis I.O., Durrant L., *The p53 positive Bcl-2 negative phenotype is an independent marker of prognosis in breast cancer*. *Int. J. Cancer*. 2007 Mar 15;120(6):1311-7. Erratum in: *Int. J. Cancer.*, 2007 Aug 15;121(4):928. Madjid, Zahra [corrected to Madjd, Zahra].

22. Lee K.H., Im S.A., Oh D.Y., Lee S.H., Chie E.K., Han W., Kim D.W., Kim T.Y., Park I.A., Noh D.Y., Heo D.S., Ha S.W., Bang Y.J., *Prognostic significance of bcl-2 expression in stage III breast cancer patients who had received doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel as adjuvant chemotherapy*. *BMC Cancer.*, 2007; 7:63.