

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

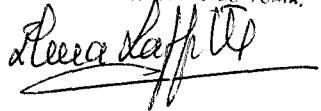
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

T.D.
R/BA

207 232

Sevilla, 20 de Julio 1995

El jefe del Departamento de Tesis,

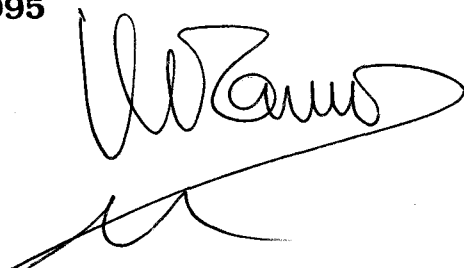


"Cáncer de mama: relación entre fracción de proliferación y marcadores inmunohistoquímicos (receptores de estrógenos, catepsina D y metalotioneína)".

Tesis Doctoral presentada por

María del Mar Ramos Martos

Julio 1995



D/D^a MARIA del MAR RAMOS MARTOS

con D.N.I. n^o 29.286.932 autora de la Tesis Doctoral titulada Cáncer de mama: relación entre fracción de proliferación y marcadores inmunohistoquímicos (receptores de estrógenos, cathepsina D, metalotioneina) autoriza la consulta de la citada Tesis según las modalidades abajo indicadas:

- Consulta en Sala
- reproducción parcial
- reproducción total
- préstamo a otras bibliotecas

Fdo.:

Sevilla, 27 de 9 de 95

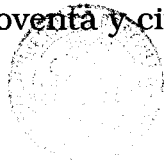
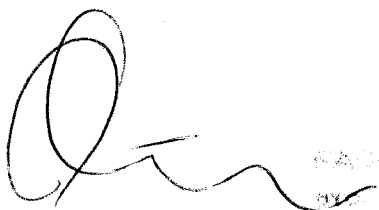
D. **RICARDO GONZALEZ-CAMPORA**, Profesor Titular del Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica y D^a **AMPARO GOMEZ PASCUAL**, Profesora Titular del Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de la Facultad de Medicina de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que bajo su dirección, y en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, ha sido realizado el trabajo titulado:

"Cáncer de mama: relación entre fracción de proliferación y marcadores inmunohistoquímicos (receptores de estrógenos, catepsina D y metalotioneína)" por D^a **María del Mar Ramos Martos**, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expido el presente certificado, en Sevilla a doce de Julio de mil novecientos noventa y cinco.



Prf. R. González-Cámpora

Prof. A. Gómez Pascual

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer, en primer lugar al Catedrático Dr. **Hugo Galera Davidson** el haberme permitido realizar el presente trabajo en su Departamento .

Al Prof. **Ricardo González-Cámpora**, por la dirección científica de este trabajo, por sus enseñanzas en el campo de la patología y por las horas que me ha dedicado.

A la Prof. **Amparo Gómez Pascual**, por la enorme ayuda que me ha prestado durante todo este tiempo, pero sobre todo por su continuo estímulo y apoyo, sin los cuales no habría llegado hasta aquí y por su sincera amistad.

Al Dr. Salguero, mi amigo **Manolo**, sin cuya genial ocurrencia nunca me hubiera metido en este lío.

Al Prof. **Hevia**, y a **Remedios y Emilia Ballesteros**, por lo que pudo ser y no fué.

A **Charo Echevarría** y **Carmen Fernández** por su colaboración técnica.

A todo el personal del Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, por haberme hecho la convivencia fácil y agradable durante estos años, y porque **todos** me han echado una mano cuando la he necesitado. Espero que nadie se sienta excluido por no encontrarse explícitamente citado.

A la Prof. **Victoria Sanmartín**, por sus enseñanzas y consejos en el terreno informático, y porque siempre lo ha hecho con paciencia y alegría.

A mis **compañeros** doctorandos, los que ya han pasado y los que quedan. En especial a Lola y Juan Angel, por todo lo que me han enseñado y ayudado, y porque compartir el trabajo con ellos lo ha hecho mucho más llevadero.

A **mi madre**, por que ella le ha dedicado a este trabajo casi tantas horas como yo.

A todos los que de una u otra forma me han ayudado y apoyado para llegar hasta el final.

A **José Luis**, por el esfuerzo que hemos compartido.

***A mis padres, a los que debo,
y agradezco lo que soy.***

INDICE

1. INTRODUCCION	1
A. MORFOPATOLOGIA DEL CARCINOMA DE MAMA	2
1. Carcinoma in situ	3
2. Carcinomainvasivo	9
2.1. Formas histológicas habituales	9
2.2. Formas histológicas poco habituales	17
2.3. Formas especiales anatómo-clínicas	25
B. FACTORES PRONOSTICOS DEL CARCINOMA DE MAMA	30
1. Estadío tumoral	32
2. Tamaño tumoral	40
3. Bilateralidad y multicentricidad	42
4. Grado histológico	43
5. Cinética tumoral	48
5.1. Marcaje con timidina tritiada	49
5.2. AgNORs	50
5.3. Citometría de flujo	52
5.4. Citometría estática	53
5.5. Inmunohistoquímica	54
5.5.1. Ki 67	54
5.5.2. PCNA	57
5.5.3. Ki S1	60
6. Tipos histológicos	61
7. Receptores de estrógenos	70

8. Marcadores tumorales	76
8.1. Catepsina D	76
8.2. Metalotioneína	79
8.3. Vimentina	81
9. Oncogenes	83
9.1. Her neu 2	83
9.2. Protooncogenes ras	85
9.3. c-myc	86
9.4. p53	86
9.5. Gen nm23	88
10. Otros	89
10.1. EGFR	89
10.2. Prot. del shock térmico	90
10.3. Ps2	90
10.4. Receptores de laminina	91
10.5. Hpr	92
2. PLANTEAMIENTO DEL TEMA	93
3. MATERIAL Y METODOS	95
A. Material	96
B. Métodos	97

1. Estudios clínicos	97
2. Estudios histológicos	97
3. Estudios inmunohistoquímicos	99
C. Análisis estadístico	104
4. RESULTADOS	107
A. Características clínicas generales	108
B. Características histológicas	110
C. Inmunohistoquímica	112
D. Análisis estadístico	124
5. DISCUSION	128
6. ICONOGRAFIA	148
7. CONCLUSIONES	164
8. BIBLIOGRAFIA	167

1. INTRODUCCION

I. MORFOPATOLOGIA DEL CARCINOMA DE MAMA

Aunque se han señalado numerosas clasificaciones morfológicas del cáncer de mama, la tendencia actual es la de considerar dos grandes categorías en base al grado de extensión de la enfermedad. Los tumores de crecimiento circunscrito o carcinomas in situ, se subdividen a su vez en función de las características citológicas y arquitecturales en carcinomas ductales in situ y carcinomas lobulillares in situ. Los términos ductal y lobulillar no implican origen histogenético, sino simplemente se utilizan para señalar el lugar de crecimiento y ciertas características nucleares.

Los carcinomas invasivos presentan una gran variedad de patrones histológicos e incluso pueden asociarse a determinadas situaciones clínicas. Una subclasificación sencilla de este grupo incluye tres categorías bien definidas: formas histológicas habituales, formas histológicas poco comunes y formas especiales anatomoclínicas (Tabla I).

1.- CARCINOMA IN SITU.

El carcinoma in situ de la mama se caracteriza por la proliferación de células de aspecto maligno exclusivamente dentro de conductos y lóbulos, sin invasión del estroma circundante. Dependiendo de su localización, características citológicas y patrones de crecimiento se distinguen las variedades ductal y lobulillar.

1.- Carcinoma in situ

- 1.1. Carcinoma ductal in situ
- 1.2. Carcinoma lobulillar in situ

2.- Carcinoma invasivo

2.1. Formas histológicas habituales

- 2.1.1. Ca. ductal infiltrante NOS
- 2.1.2. Ca. lobulillar infiltrante
- 2.1.3. Ca. tubular
- 2.1.4. Ca. medular
- 2.1.5. Ca. mucinoso o coloide
- 2.1.6. Ca. cribiforme
- 2.1.7. Ca. papilar

2.2. Formas histológicas poco habituales

- 2.2.1. Ca. con metaplasia
- 2.2.2. Ca. escamoso
- 2.2.3. Ca. adenoide quístico
- 2.2.4. Ca. con células gigantes tipo osteoclasto
- 2.2.5. Ca. secretor
- 2.2.6. Ca. quístico hipersecretor
- 2.2.7. Ca. apocrino
- 2.2.8. Ca. con hallazgos neuroendocrinos
- 2.2.9. Ca. rico en glucógeno
- 2.2.10. Ca. rico en lípidos
- 2.2.11. Mioepitelioma
- 2.2.12. Ca. intraquístico
- 2.2.13. Ca. con células en anillo de sello

2.3. Formas especiales anatómo-clínicas

- 2.3.1. Ca. en embarazo
- 2.3.2. Ca. inflamatorio
- 2.3.3. Ca. oculto presentándose con metástasis
- 2.3.4. Ca. en mama ectópica
- 2.3.5. Enf. de Paget del pezón

Tabla I.- Clasificación morfológica del carcinoma de mama.

1.1. Carcinoma ductal in situ (CDIS).

La definición de CDIS ha variado a lo largo de la historia. Haagensen¹ consideraba que esta entidad contenía elementos infiltrantes en casi todos los casos y establecía el diagnóstico si menos del 50% de la lesión contenía elementos histológicamente infiltrantes. Más recientemente varios autores²⁻⁴ han redefinido esta entidad, estableciendo el concepto actual del CDIS como "proliferación de células epiteliales malignas confinadas a los ductus mamarios sin evidencia de infiltración del estroma circundante a través de la membrana basal".

Las mayores series estudiadas han comunicado una incidencia entre el 3.2 y 5.3 % de todos los cánceres de mama⁵⁻⁶.

En la actualidad se distinguen tres formas de presentación:

- Incidental: cuando en el examen patológico de una biopsia de tejido mamario obtenido para diagnóstico de una lesión benigna se observan focos microscópicos de CDIS.

- Clínica: en la que el CDIS se presenta como una masa palpable de tamaño variable, como telorrea o telorragia, con o sin masa palpable o como enfermedad de Paget del pezón, con o sin masa subyacente. Clásicamente ésta era la forma más común de presentación^{4,7}.

- Mamográfica: el CDIS se reconoce por la presencia de racimos de microcalcificaciones en la mamografía. Es la forma más frecuente de presentación en la actualidad⁸. Debido a la extensa utilización de mamografía de screening, su incidencia ha aumentado de forma alarmante en los últimos tiempos⁷.

Aunque clásicamente el CDIS se ha dividido en 5 subtipos en relación a sus características morfológicas: comedo, sólido, cribiforme, papilar/micropapilar y adherente o clinging⁹; hoy se tiende a clasificarlo de forma más amplia en dos subtipos: comedo y no comedo. En el tipo comedo predominan las células grandes polimórficas con alto grado nuclear; existe marcada expresión de la proteína c-erb-B2, ausencia de receptores hormonales y frecuente aneuploidía, multiclonalidad y alta fracción de células en fase S. En el tipo no comedo, en cambio, predominan las células pequeñas monomórficas con bajo grado nuclear, no se expresa la proteína c-erb-B2, existe alta tasa de receptores hormonales y predominan las formas diploides y con baja fracción celular proliferativa¹⁰⁻¹³. No obstante, la línea divisoria entre ambos grupos no es absoluta^{14,15}.

Otros autores^{16,17} han clasificado el CDIS en relación a su forma de crecimiento y presentación en tres tipos:

- Crecimiento microfocal: afecta a un conducto (o sólo a unos pocos). Las lesiones son menores de 1 mm. de diámetro y suelen diagnosticarse de forma accidental.

- Crecimiento difuso: afecta a una mayor o menor parte de la mama, sin interrumpir el patrón glandular normal. Suelen tener mayor tamaño y se diagnostican generalmente al biopsiar una zona de microcalcificaciones mamográficas.

- Crecimiento formador de tumor: se caracteriza por presentar elementos glandulares densamente ordenados separados por bandas de estroma fibrótico confluyente. Las lesiones tienen más de 5 mm. de diámetro y se diagnostican

como una masa palpable bien definida, con o sin microcalcificaciones en la mamografía.

Aunque tradicionalmente el carcinoma ductal in situ ha sido considerado un proceso multicéntrico^{3,18}, estudios recientes¹⁹ han demostrado que en la mayoría de los casos el origen es unicéntrico, aunque a veces extenso, que posee una distribución segmentaria y que el pezón y/o la región subareolar están habitualmente afectadas.

El diagnóstico de esta lesión, en general, no ofrece mayores dificultades; no obstante, en algunos casos puede resultar extremadamente difícil su distinción con la hiperplasia ductal atípica o carcinoma lobular in situ^{4,7}.

La cuestión más importante, y que aún permanece sin respuesta, es su capacidad de progresión hacia una forma de carcinoma invasivo. Aunque existen varios estudios sobre este tema, no se han encontrado hasta ahora características clínicas, biológicas o morfológicas que permitan predecir la evolución natural de esta lesión en modo fiable.

La mastectomía ha sido la forma clásica de tratamiento. Los resultados de múltiples series quirúrgicas²⁰⁻²⁵, muestran altas tasas de curación con supervivencias libre de enfermedad del 98-100%. La cirugía conservadora es una opción razonable para pacientes con lesiones aparentemente localizadas pero debe realizarse siempre con inclusión de tejido subareolar adyacente. La irradiación local tras la cirugía conservadora parece reducir la tasa de recidivas²⁶. Sin embargo, estudios más recientes con seguimientos a más largo plazo²⁷⁻³⁰ parecen indicar que existe alta frecuencia de recidivas tardías (después de cinco años), lo cual hace dudar de su efecto curativo.

1.2. Carcinoma lobulillar in situ (CLIS).

El CLIS es una lesión caracterizada por la proliferación de pequeñas células dispuestas de modo compacto dentro de los lóbulos mamarios y ocasionalmente de los ductus . Las células presentan núcleos pequeños y uniformes, con forma redonda u ovalada y citoplasmas claros con límites celulares bien definidos.

El diagnóstico suele ser relativamente fácil, aunque a veces plantea problemas de difícil resolución con la hiperplasia lobular atípica o con el CDIS. Generalmente es una lesión multicéntrica que excepcionalmente se asocia con cánceres invasivos ocultos. La mayoría de las veces constituye un hallazgo microscópico accidental, ya que no posee signos clínicos ni mamográficos propios, por lo que su verdadera incidencia es desconocida.

La cuestión más importante respecto a esta entidad gravita en su consideración como lesión premaligna o simplemente como marcador de alto riesgo. La información de que disponemos hasta el momento apoya la idea de que el riesgo de padecer cáncer invasor en pacientes con CLIS es el doble del que presentan las mujeres con hiperplasia lobular atípica.

El tratamiento de elección es la vigilancia cuidadosa. La mastectomía total bilateral podría considerarse como opción profiláctica en el pequeño número de mujeres que se sienten muy incómodas por el aumento del nivel de riesgo. La radioterapia no tiene ningún papel curativo en el tratamiento del CLIS.

2.- CARCINOMA INVASIVO.

Los carcinomas invasivos constituyen un grupo histológicamente heterogéneo de lesiones. En su mayoría son adenocarcinomas que se originan en la porción terminal de los ductus.

2.1. FORMAS HISTOLOGICAS HABITUALES.

2.1.1. Carcinoma ductal infiltrante NOS (not otherwise specified).

El carcinoma ductal infiltrante sin ninguna especificación (NOS), o simplemente carcinoma ductal invasivo, representa la variedad más frecuente de carcinoma de mama (60-85%)³¹.

Se incluyen en este grupo aquellos carcinomas que no cumplen criterios para ser denominados formas especiales. Su diagnóstico se realiza, por lo tanto, por exclusión. El nombre de carcinoma ductal hace referencia a la tradicional idea de que estos tumores se desarrollan exclusivamente a partir del epitelio ductal pero no del intralobular, aunque esta afirmación no puede mantenerse actualmente de manera estricta.

Las características histológicas pueden variar dentro de un amplio rango. Así, las células pueden aparecer colocadas difusamente o en sábanas, los núcleos pueden ser bastante regulares o presentar gran pleomorfismo, puede haber un elevado índice de formación de túbulos o apenas existir éstos. Para que un tumor se considere dentro de este tipo debe presentar este patrón en más del 90% de la masa tumoral. Si este patrón representa entre el 10-90% de la superficie del mismo se incluirá dentro de los denominados grupos mixtos.

No existe un hallazgo clínico distintivo del carcinoma ductal infiltrante NOS. Las lesiones pueden presentarse en cualquier edad, aunque la mayoría lo hacen en la década de los cincuenta.

Macroscópicamente son tumores sólidos y de consistencia variable. Sus dimensiones son también extremadamente variables y presentan notable interés pronóstico^{6,32}. El contorno puede ser estrellado o circunscrito. Los tumores con borde infiltrante tienden a ser mayores y a presentar metástasis axilares más comúnmente que los tumores circunscritos^{34,35}. Las metástasis a distancia suelen localizarse en hueso, hígado, pulmón y cerebro.

2.1.2. Carcinoma lobulillar infiltrante.

El término carcinoma lobulillar fue introducido en la década de los 40 por Foote y Stewart³⁶ para referirse a una forma histológica peculiar de carcinoma de mama. Cuando se utilizan criterios restrictivos para su clasificación (crecimiento en fila india con disposición circunferencial en torno a conductos y marcada desmoplasia) su incidencia oscila entre 3-5%³⁷⁻³⁹, mientras que cuando se toman en consideración los criterios señalados por la OMS asciende a 10-14%^{40,41}.

Clínicamente, puede presentarse a cualquier edad, aunque la mayoría se diagnostican entre los 45-56 años^{40,42,43}, siendo más común en mujeres >75 años que en <35 años⁴⁴. En la mayoría de ocasiones, las mujeres consultan por una masa palpable de límites mal definidos. Generalmente no presenta microcalcificaciones en la mamografía, salvo que exista una enfermedad proliferativa benigna concomitante, ni tiene un patrón mamográfico definido.

Macroscópicamente, el cuadro típico es el de un nódulo firme de contorno irregular y dimensiones muy variables. A veces la lesión no es visible a simple vista y se palpa como pequeñas nodulaciones de aspecto arenoso.

Las características citológicas del CLI se han señalado como muy peculiares: las células tumorales son pequeñas, bastante uniformes en tamaño y forma, con núcleo redondo y nucleolo poco evidente; tienen escasa cohesión e infiltran las bandas de colágeno formando cordones muy característicos (filas indias) que tienden a disponerse en torno a los conductos. Con mucha frecuencia, además de este patrón principal, los tumores muestran otros patrones de crecimiento. El diagnóstico de variante clásica se realiza cuando al menos el 70% de la lesión presenta este patrón de crecimiento en fila india. Con frecuencia las células contienen sialomucinas, que se acumulan formando vacuolas. En casos excepcionales las vacuolas presentan considerables dimensiones y son extensas. Estas formas se denominan "en anillo de sello"³³. En algunos casos, se han descrito también células con argirofilia y gránulos de neurosecreción⁴⁵⁻⁴⁷.

Se han señalado tres variantes adicionales que tienen en común las características citológicas: sólido, túbulo-lobular y alveolar. En la variante sólida las células forman masas difusas que van infiltrando el tejido, con poco o ningún estroma, a veces en continuidad con un patrón en hileras. La variante túbulo-lobular combina la formación de túbulos y cordones con el patrón lineal característico de carcinoma lobulillar infiltrante. No existe acuerdo unánime sobre si considerar este tipo como una variante del carcinoma tubular o lobulillar. La variante alveolar viene definida por la

presencia de agregados de 20 o más células que alternan con otros patrones de carcinoma lobulillar infiltrante. La forma clásica es la variante más común, representando aproximadamente el 77% de todos los carcinomas lobulillares infiltrantes⁴³.

Excepto en la edad de presentación (la forma clásica es más común en mujeres jóvenes) no existen diferencias clínicas entre las distintas variantes de carcinoma lobulillar infiltrante.

La mayoría de estas lesiones expresan altos niveles de receptores de estrógenos y progesterona^{48,49}.

El CLI se disemina por vía linfática hacia los ganglios axilares y también por vía hemática hacia lugares poco habituales, como meninges, peritoneo, retroperitoneo y ovario⁵⁰.

2.1.3. Carcinoma tubular.

Se define como un carcinoma ductal infiltrante muy bien diferenciado y ha sido denominado también "carcinoma bien diferenciado" u "ordenado". La edad de máxima incidencia está comprendida entre los 44 y 49 años.

Suelen ser lesiones pequeñas (<2cms.) y, al corte, presentan un aspecto estrellado con retracción central. Se localizan preferentemente en áreas periféricas, de ahí que en el 15% de los casos existan signos cutáneos de retracción.

Está compuesto por células que se disponen formando túbulos bien constituidos, que se asemejan al del parénquima no tumoral, con una sola hilera de células, y que se encuentran inmersos en un estroma muy fibroso y

rico en fibras elásticas^{51.52}; los túbulos carecen de revestimiento mioepitelial y de membrana basal. Las células tumorales tienen núcleos basales y citoplasma eosinófilo con secreción apical; las mitosis son muy ocasionales y el contenido de receptores de estrógenos alto⁵³. Para el diagnóstico de carcinoma tubular en forma pura es necesario que al menos el 75% del tumor esté constituido por estos elementos.

En su forma pura representa menos del 2% de los carcinomas de mama^{54.55}; no obstante, su frecuencia va en aumento como consecuencia del diagnóstico precoz mediante mamografía. Se estima que el 8% de los tumores malignos de mama diagnosticados en campañas de diagnóstico precoz son carcinomas tubulares⁵⁶.

Se ha descrito multicentricidad en el 16.7% de los casos y bilateralidad en el 10-12%^{57.58}.

Las metástasis axilares son excepcionales y el pronóstico es considerablemente mejor que el del carcinoma ductal.

2.1.4. Carcinoma medular.

Esta lesión viene definida por una constelación muy estricta de hallazgos histológicos, referidos inicialmente por Foote y Stewart³⁶ que incluyen: buena circunscripción, marcado infiltrado linfoplasmocitario, patrón de crecimiento tumoral sincitial, grado nuclear alto y elevado índice de mitosis. Cuando falta alguno de estos constituyentes es mejor denominar a la lesión carcinoma medular atípico⁵⁹.

Representa del 5-7% de los carcinomas de mama. Las pacientes, generalmente, tienden a ser más jóvenes de lo habitual, siendo la edad media de presentación entre 46-54 años⁶⁰⁻⁶².

Radiológicamente se confunden con facilidad con fibroadenomas. Al corte, tienen superficie multinodular, coloración gris-marrón y consistencia más blanda de lo habitual. La necrosis y la hemorragia son hallazgos comunes. Aunque la bilateralidad es muy poco común, en el 10% de los casos se describe multifocalidad^{63,64}. En la cola axilar se aislan con frecuencia numerosas adenopatías, pero su agrandamiento no está en relación con siembras metastásicas sino con hiperplasia linfoplasmocitaria.

2.1.5. Carcinoma mucinoso.

También denominado mucoide, gelatinoso o coloide, se caracteriza por la presencia de pequeños islotes de células uniformes inmersas en "lagos" de mucina extracelular, reconocibles macroscópicamente⁵⁹. La proporción de mucinas extracelulares y células tumorales varía ampliamente de un caso a otro, pero su distribución es constante. Las células tumorales pueden disponerse en cordones, alveolos, papilas, masas sólidas o con patrón cribiforme. La formación de túbulos y glándulas es rara.

Aunque no todos los autores están de acuerdo, parece conveniente considerar que la presencia concomitante, en cualquier proporción, de carcinoma ductal NOS lo eliminaría de esta categoría, e incluiría al tumor dentro de la categoría de carcinomas ductales mixtos. Cuando se utilizan estos

critérios restrictivos, la incidencia no sobrepasa el 2%⁶⁵⁻⁶⁷ y su edad media de presentación es discretamente superior a la del carcinoma ductal NOS⁴⁴.

En mamografía la lesión aparece circunscrita, a veces con calcificaciones, y sólo en carcinomas grandes existe fijación a la piel o pared torácica. Aproximadamente el 60% de los carcinomas expresan receptores de estrógenos^{68,69}.

Con técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica se han identificado gránulos argirófilos que contienen serotonina, gastrina y somatostatina, en un 25-50% de los carcinomas mucinosos^{66,70,71}.

El carcinoma mucinoso debe diferenciarse del tumor mucocele benigno, constituido por un quiste, tapizado por epitelio cúbico-cilíndrico citológicamente benigno, con abundante mucina en su interior que no contiene células epiteliales neoplásicas⁷².

2.1.6. Carcinoma cribiforme.

Este tipo de tumor, que presenta ciertas semejanzas con el carcinoma tubular, se caracteriza por la presencia de islotes infiltrantes de células pequeñas y regulares, con núcleos generalmente densos y uniformes. Dentro de los islotes se observan puentes de células que delimitan espacios bien definidos.

Se considera una forma bien diferenciada de carcinoma de mama, en la que se combinan en el componente invasivo masas celulares anguladas y luces secundarias y formaciones tubulares que ocupan una extensión mínima del 50% de la lesión. El resto de la neoplasia puede presentar componentes de

carcinoma menos diferenciado. Algunos autores consideran la presencia de patrón adenoide quístico, con bolas de colágeno, como parte del espectro lesional del carcinoma cribiforme⁷³.

Clínica y macroscópicamente carecen de hallazgos diferenciales con el carcinoma ductal invasivo NOS.

En más del 50% de los casos existe expresión conjunta de receptores de estrógenos y progesterona^{54,55}.

2.1.7. Carcinoma papilar.

Representa del 1-2% de los carcinomas de mama⁷⁶⁻⁷⁸. La OMS lo define como un carcinoma mamario en el que predomina la formación de papilas en el componente infiltrante. Con frecuencia se reconocen focos de carcinoma papilar intraductal.

Aproximadamente el 50% de los carcinomas papilares se desarrollan en las regiones centrales de la mama, por lo que la secreción por el pezón es un hallazgo relativamente frecuente^{1,76}.

Macroscópicamente aparecen bien circunscritos, aparentemente encapsulados y de color marrón-rojizo por la frecuente hemorragia asociada.

La edad media de presentación oscila entre 63-67 años. En la mamografía son lesiones redondeadas, bien delimitadas que miden de 2-3 cms. Generalmente expresan altos niveles de receptores de estrógenos y gestágenos y bajo índice de proliiferación^{53,79,80}.

La relación entre lesión papilar benigna y carcinoma papilar ha sido ampliamente debatida en la literatura⁸¹. La mayoría de los estudios han

confirmado el escaso potencial maligno del papiloma intraductal en su variante solitaria, sin embargo, en mamas con papilomatosis múltiples el riesgo de desarrollar carcinoma es mucho mayor.

Puesto que la distinción entre papiloma y carcinoma puede ser difícil, Krauss y Neubecker⁸² señalaron una serie de criterios bien definidos que diferencian el carcinoma papilar de las lesiones papilares benignas; la presencia de un solo tipo celular epitelial, hiper cromasia nuclear, ausencia de metaplasia apocrina y patrón glandular cribiforme favorecen un diagnóstico de carcinoma.

Cuando la lesión papilar no reúne todos los criterios de malignidad precisos para el diagnóstico, y no se observan áreas de carcinoma in situ adyacente, debe utilizarse el término de proliferación papilar atípica ⁸³.

2.2.- FORMAS HISTOLOGICAS POCO HABITUALES.

2.2.1. Carcinoma con metaplasia.

Menos del 5% de los carcinomas de mama desarrollan un componente metaplásico no glandular. La extensión de éste varía ampliamente, desde focos microscópicos hasta la totalidad del tumor. La metaplasia escamosa ha sido descrita en el 3-7% de los carcinomas⁸⁴, mientras que la metaplasia heteróloga no supera el 0.2%⁸⁵. Otras formas de metaplasia como la rabdoide, adiposa o angiosarcomatosa son aún menos frecuentes. Estos tumores también han sido denominados en la literatura con los términos carcinosarcoma y tumor mixto.

Macroscópicamente, son lesiones bien delimitadas, con un diámetro medio superior al del carcinoma NOS y consistencia firme.

Suelen ser carcinomas ductales pobremente diferenciados⁸⁵, pero también se ha referido cambio metaplásico en carcinomas medulares⁶⁰, tubulares^{85,86}, lobulillar infiltrante y mucinoso⁸⁶.

Los hallazgos referidos con los métodos inmunohistoquímicos han sido muy variados, desde expresión dual de queratina y vimentina tanto en células de aspecto epitelial como mesenquimal, a sólo vimentina en el componente mesenquimal^{87,88}. Muy excepcionalmente estos tumores expresan receptores estrogénicos.

2.2.2. Carcinoma escamoso.

Forma peculiar de carcinoma metaplásico. Este término debe restringirse a tumores compuestos únicamente por células queratinizadas, con o sin componente fusocelular. En la mayoría de los casos la lesión precursora se desarrolla sobre una metaplasia escamosa madura en el epitelio ductal.

En una revisión de 20 casos, la edad media de presentación estaba por encima de los 50 años en el 40% de los casos⁸⁹.

Suelen medir >5 cms. y con frecuencia presentan degeneración quística central. Antes de realizar el diagnóstico de carcinoma escamoso primario de mama es preciso descartar una metástasis de un tumor extramamario situado en pulmón, esófago, cervix o vejiga urinaria^{89,90}.

La casi totalidad de estos tumores carecen de receptores de estrógenos^{89,91,92}.

2.2.3.- Carcinoma adenoide quístico.

Representa menos del 0.1% de los carcinomas de mama. Generalmente se presenta en mujeres entre los 50-63 años^{93,94}. No muestra tendencia a la bilateralidad pero puede coexistir con otro carcinoma en la misma o distinta mama^{95,96}. Típicamente se presenta como un nódulo pequeño palpable, pero que no suele ser evidente en la mamografía⁹⁷.

Son lesiones nodulares bien circunscritas, con diámetro medio de 1-3 cms., de color gris-amarillo, marrón o rosa y puede presentar cavidades quísticas⁹⁷⁻⁹⁹.

Histológicamente se observa abundante depósito de material tipo membrana basal en el estroma, distribuido irregularmente, habiéndose descrito gran variedad de patrones: cribiforme, sólido, glandular, trabecular, basaloide, adenomioepiteliomatoso, siringomatoso, con diferenciación sebácea y adenoescamosa^{97,100}.

La mayoría carecen de receptores estrogénicos, pero en algunos se ha descrito la presencia de receptores de progesterona^{97,101}.

2.2.4.- Carcinoma con células gigantes tipo osteoclasto.

Se han descrito alrededor de 100 casos, representando del 0.5-1.2% de todos los carcinomas^{83,102,103}. Generalmente se presentan en mujeres con edad media de 53 años^{102,104,105}.

Mamográficamente son lesiones circunscritas, fácilmente confundibles con quistes o fibroadenomas¹⁰².

Tienen un diámetro medio de 3 cms., se encuentran bien delimitadas, y tienen consistencia carnosas firme; al corte, presentan un color marrón o rojo-marrón, sugerente de melanoma metastásico.

Histológicamente son carcinomas ductales invasivos moderada o pobremente diferenciados; excepcionalmente se ha descrito en asociación a otros tipos de carcinoma. Las células gigantes se sitúan alrededor de las glándulas carcinomatosas y de las luces glandulares. Debe diferenciarse de otras lesiones mamarias que contienen células gigantes: carcinomas con células gigantes anaplásicas, carcinomas metaplásicos heterólogos, megacariocitos en focos de metaplasia mioide, inflamaciones crónicas granulomatosas, i.e. sarcoidosis.

2.2.5.- Carcinoma secretor.

Carcinoma de mama con células que muestran marcada actividad secretoria, del tipo de la encontrada en la mama durante el embarazo y lactancia. El material luminal y citoplásmico es PAS(+) y mucicarmin(+)³¹.

Estos tumores, debido a que se describieron inicialmente en niños, se denominaron carcinomas juveniles. Actualmente se prefiere el término secretor, ya que la mayoría de los casos se han presentado en adultos.

Son lesiones bien circunscritas y firmes con un diámetro inferior a 3 cms. Generalmente se manifiesta como una masa circunscrita, frecuentemente subareolar y asociada a descarga por el pezón.

En la mayoría de los tumores estudiados no se han detectado receptores de estrógenos^{106,107}.

2.2.6.- Carcinoma quístico hipersecretor.

Variante peculiar de carcinoma de mama, relacionado con la lesión benigna denominada hiperplasia quística hipersecretora^{108,109}.

Son lesiones marrones, con numerosos quistes repletos de material gelatinoso, tipo coloide tiroideo. Su diferencia con la lesión benigna homónima es la existencia de un componente invasivo asociado a la masa quística^{108,109}.

En el estudio histológico se advierten conductos dilatados llenos de un material eosinófilo, homogéneo y acelular. No existen diferencias en cuanto a las características de este material entre las lesiones hiperplásicas benignas y el carcinoma.

Inmunohistoquímicamente se ha identificado inmunopositividad para la lactoalbúmina y CEA y negatividad para la TGB.

2.2.7. Carcinoma apocrino.

Compuesto predominantemente por células con abundante citoplasma eosinófilo, que recuerda al de la metaplasia apocrina³¹, representa del 1-4% de los carcinomas de mama, aunque cuando se consideran criterios estrictos su incidencia no supera el 1%⁸³. No existen diferencias clínicas importantes con respecto a las pacientes con carcinoma ductal tipo NOS. Macroscópicamente son lesiones firmes, de contorno infiltrante, que al corte muestran color gris o blanco.

El patrón arquitectural básico es totalmente superponible al del carcinoma NOS; las diferencias estriban en las características nucleares de las células tumorales, que muestran gran pleomorfismo nuclear, aumento del

tamaño y nucleolo grande y eosinófilo; en ocasiones, los núcleos son intensamente hipercromáticos y no dejan ver el nucleolo prominente. Los citoplasmas, eosinófilos, con frecuencia muestran aclaramientos y vacuolizaciones^{110,111}.

Con técnicas inmunohistoquímicas las células expresan proteína 15 del fluido de la enfermedad fibroquística, CEA y citoqueratina¹¹². También contienen gránulos citoplásmicos PAS(+) y hemosiderina. Aproximadamente el 50% de los casos expresan receptores de estrógenos y un tercio de progesterona^{113,114}.

2.2.8. Carcinoma con hallazgos neuroendocrinos.

La capacidad para producir hormonas ectópicas se considera una forma de metaplasia endocrina. En los cánceres de mama se han identificado : HCG, calcitonina, ACTH, PTH y epinefrina¹¹⁵⁻¹¹⁸.

En algunos casos en un mismo tumor coexiste la producción hormonal con un patrón arquitectural endocrino, pero en un 15-21% de carcinomas de mama habituales se sorprenden células indistinguibles del resto de las del carcinoma que contienen alfa y beta HCG, pero no el tejido trofoblástico coriocarcinomatoso que define a este tipo de lesión¹¹⁹.

Clínicamente, no existen signos o síntomas que permitan el reconocimiento de esta entidad, aunque a veces se han descrito síntomas atribuibles a hipersecreción de ACTH¹¹⁶, PTH¹¹⁸, epinefrina¹²⁰.

Histológicamente la mayoría son carcinomas ductales infiltrantes con variable grado de diferenciación, sin hallazgos diferenciales específicos. Pueden

encontrarse células argirófilas tanto en el componente intraductal como invasivo. La mayoría de autores consideran que, en general, la presencia de células argirófilas representa simplemente una diferenciación o derepresión génica en un carcinoma de mama convencional¹²¹⁻¹²³.

2.2.9. Carcinoma rico en glucógeno.

Son tumores muy poco frecuentes, habiéndose comunicado unos 31 casos desde su descripción inicial en 1981¹²⁴⁻¹²⁹. Carece de hallazgos específicos, siendo su patrón arquitectural el típico del carcinoma ductal, en su variante in situ e infiltrante NOS. Las células son poligonales, de contornos bien definidos y citoplasma claro. El núcleo está en situación central o discretamente excéntrico, es hipercromático y con nucleolo prominente. El citoplasma se tiñe intensamente con el método del PAS, pero no resiste la digestión con diastasa. Se ha señalado que estos tumores son aneuploides y contienen una fracción de fase S alta¹²⁹.

2.2.10. Carcinoma rico en lípidos.

Variante excepcional de carcinoma cuyas células contienen abundantes lípidos¹³⁰⁻¹³². Los tumores muestran un patrón arquitectural y citológico que recuerda mucho al carcinoma de células claras de riñón. La demostración de lípidos se realiza en el tejido en fresco o bien mediante M.E.

2.2.11. Mioepitelioma.

Neoplasia muy poco común compuesta por una mezcla de células mioides y epiteliales. Generalmente presentan baja agresividad, con capacidad para dar metástasis ganglionares regionales pero no a distancia. El patrón histológico más común es el de nidos epiteliales rodeados de células fusiformes mioepiteliales, que se disponen formando fascículos que recuerdan a los de los tumores musculares.

Para la catalogación precisa de esta variedad tumoral es necesaria la ayuda del M.E. y de la IHQ¹³³⁻¹³⁵.

2.2.12. Carcinoma intraquístico.

Se considera una variante de otras formas de carcinoma en la que existe una lesión quística que destaca en el mismo. El epitelio que tapiza la cavidad presenta crecimiento infiltrativo de la pared o desarrolla nódulos de tejido tumoral⁷⁶.

Son más frecuentes en personas mayores con historia clínica de patología mamaria prolongada y raza negra. En general, se acepta que tienen mejor pronóstico que el carcinoma ductal invasivo NOS^{77.136}.

2.2.13. Carcinoma con células en anillo de sello.

Son tumores mal delimitados y con aspecto infiltrativo. Los criterios histológicos para definir esta entidad varían ampliamente según los autores: Hull y cols.¹³⁷ consideran que la presencia de 20 células con vacuolas PAS(+), diastasa resistente y mucicarmin(+) por campo de gran aumento es criterio

suficiente; en cambio, Merino y LiVolsi¹³⁸, exigen que al menos el 20% de la lesión esté compuesta por este tipo de células; con este punto de referencia, estos últimos señalan una incidencia de carcinoma con células en anillo de sello del 2%, y advierten que el 46% de sus casos contenían áreas de carcinoma lobulillar in situ.

La importancia de estos tumores radica en su confusión con las metástasis de adenocarcinomas gástricos y en su alto potencial metastatizante, pues tienen tendencia a metastatizar por vía linfática y hemática, siendo comunes las siembras en las superficies serosas y en el tubo gastrointestinal¹³⁸.

2.3.- FORMAS ESPECIALES ANATOMOCLINICAS.

2.3.1. Carcinoma en embarazo.

Aunque es una coincidencia poco habitual, cuando se presenta plantea serios problemas terapéuticos y pronósticos. En principio, se señaló mayor agresividad que en mujeres no gestantes pero la realidad es que esto está solamente en relación con el retraso de la terapéutica.

Morfológicamente es totalmente superponible al carcinoma en mujeres no embarazadas¹³⁹.

En la mayoría de las publicaciones se señala que estos tumores son RE y RP(-). Aunque no se conoce bien la causa, (ausencia de receptor, ocupación del receptor por grandes cantidades de estrógenos circulantes), sí sabemos que no responden bien a la ablación del ovario.

Las metástasis en la placenta se han presentado muy esporádicamente y no se han descrito metástasis en el feto¹⁴⁰.

2.3.2. Carcinoma inflamatorio (C.I.).

Esta variedad tumoral no se corresponde con un tipo histológico específico de carcinoma de mama. Reciben esta denominación aquellos carcinomas que se acompañan de inflamación clínica evidente. Cuando se muestra en el momento de la presentación clínica recibe el nombre de C.I. primario, mientras que cuando acompaña a la recurrencia de un tumor, se denomina C.I. secundario.

El C.I. primario se manifiesta con eritema caliente de la mama, y piel gruesa con aspecto de piel de naranja. La mama aparece difusamente engrosada siendo a veces difícil la palpación de la masa subyacente^{141,142}. Inicialmente puede confundirse con un proceso inflamatorio, debido a la aparición brusca de dolor y eritema¹⁴³. Un número importante de pacientes se presenta con adenopatías axilares o supraclaviculares. En el 62% de las pacientes, el tumor primario carece de RE y RP^{144,145}.

La mayoría de pacientes con C.I. secundario se presentan con adenopatías axilares palpables que acompañan a los cambios cutáneos señalados. Macroscópicamente la mama se encuentra uniformemente agrandada o presenta un tumor voluminoso y muestra notable engrosamiento de la piel.

Casi todos los C.I. son carcinomas ductales pobremente diferenciados, encontrándose con frecuencia émbolos tumorales por toda la mama.

El término C.I. oculto se aplica a aquellos casos con marcada permeación linfática cutánea y parenquimatosa en ausencia de los signos clínicos característicos^{146,147} y representa el 1-2% de los carcinomas invasivos¹⁴⁶.

Hasta la introducción de la quimioterapia, menos del 5% sobrevivían más de 5 años¹¹¹. Las publicaciones actuales describen una supervivencia a los 5 años del 25-48%^{148,149}. La mastectomía debe acompañarse de radioterapia y quimioterapia.

2.3.3. Carcinoma oculto con metástasis axilares linfáticas

Representan en las grandes series menos del 1% de todos los carcinomas¹⁵⁰. El número de ganglios afectados varía notablemente de un caso a otro, oscilando entre 1 y 65¹⁵¹⁻¹⁵³.

No existe edad preferencial para esta forma de presentación de carcinoma. En la mayoría de las series se demuestra carcinoma primario de mama en el 75% de los casos^{150,151} y aunque las lesiones no son clínicamente palpables se identifican fácilmente en el estudio macroscópico en el 70% de los casos. En el 30% restante las lesiones se identifican microscópicamente en cortes tomados al azar por toda la mama.

Se reconocen tres patrones histológicos de carcinoma metastásico en el ganglio linfático: 1) En el 65% de los casos, las masas celulares están compuestas por células de aspecto apocrino que infiltran difusamente el parénquima y los senos, con escasa tendencia a formar luces glandulares y poca cantidad de mucosustancias. Este cuadro induce a pensar en la

metástasis de un carcinoma renal o de un melanoma. 2) Aproximadamente el 20% de las pacientes presentan el cuadro clásico de adenocarcinoma de mama, con patrón comedo, papilar o cribiforme. 3) En el 15% restante existe un patrón mixto que combina los anteriores¹⁵⁴.

Aunque la inmunohistoquímica puede ser de gran ayuda en la elaboración del diagnóstico, la determinación de receptores, bien por el método IHQ o bioquímico, es el mejor procedimiento para adscribir el origen mamario de la lesión primaria.

Aunque se han descrito distintas variedades de carcinoma oculto primario (ductal NOS, lobulillar, medular, mucinoso, papilar)^{151,155-157}, la variante más frecuente, con mucho, es el ductal NOS.

Los datos actuales indican que las pacientes con este tipo de carcinoma tiene un pronóstico similar, e incluso mejor que las que se presentan con lesiones en estadio II y lesión primaria palpable, oscilando la mortalidad a los 5 años entre el 23%-25%^{150,152}.

2.3.4. Carcinoma en mama ectópica.

Las mamas supernumerarias pueden desarrollar el mismo tipo de tumores que la mama normal. Habiéndose descrito carcinomas a todo lo largo de la línea mamaria, tanto en axila como en vulva^{158,159}. El tratamiento de estas lesiones ectópicas debe incluir la lesión primaria y los ganglios regionales. Muchos de estos tumores tienen una evolución bastante agresiva con desarrollo de metastásis múltiples.

2.3.5. Enfermedad de Paget del pezón.

Es el resultado de la diseminación intraepitelial de un carcinoma intraductal de mama subyacente, que puede tener o no componente infiltrante^{160,164}.

No existe predilección por la edad de presentación^{163,165-167}. Los cambios iniciales incluyen descamación y eritema, con frecuencia acompañado de dolor y picor; la ulceración, costras y exudado seroso y sanguinolento aparecen en estadios muy avanzados de la enfermedad.

La enfermedad de Paget se manifiesta en el 1-2% de las pacientes con carcinoma de mama y en la mayoría de los casos hay evidencias claras de carcinoma; sólo en el 10-28% de los casos el hallazgo es accidental.

No existen características macroscópicas peculiares en el carcinoma ductal subyacente. El hallazgo histológico característico es la presencia de células aisladas en las capas superficiales de la epidermis, con tendencia a formar grupos en las capas basales, con una distribución parecida a la de los nevus de unión o melanomas. Las células de Paget pueden tener incluidas una vacuola; su citoplasma es abundante y contiene mucinas y los núcleos son grandes y con nucleolos prominentes.

Las técnicas de inmunohistoquímica son muy útiles para diferenciarlo de otros procesos cutáneos malignos, tales como enfermedad de Bowen y melanoma. Las células de Paget son CEA(+), S-100(-), HMFG(+), HMB45(-) y RE(+).

El pronóstico viene determinado por la extensión del proceso, ya que la afectación cutánea "per se" no tiene ninguna repercusión.

II. FACTORES PRONOSTICOS DEL CARCINOMA DE MAMA

La incidencia estimada del cáncer de mama en España es de 11.000 nuevos casos anuales¹⁶⁸. Cada vez se diagnostican más pacientes en estadios iniciales gracias a la mejor concienciación de la población y a la práctica de estudios de detección precoz.

Aún siendo ampliamente reconocido que el grado de extensión tumoral metastásica es el factor pronóstico más importante¹⁶⁹⁻¹⁷¹, no todas las mujeres con enfermedad metastásica local presentan la misma evolución, constituyendo un grupo heterogéneo¹⁷² cuya supervivencia oscila entre un 59-79 % a los 5 años¹⁷³. Más heterogéneo todavía es el grupo sin afectación axilar con una mortalidad del 30% a los 5 años¹⁷⁴.

Debido al infausto pronóstico de las pacientes que recidivan y a los buenos resultados obtenidos con el tratamiento sistémico adyuvante en las pacientes con cáncer de mama con afectación ganglionar axilar¹⁷⁵ se iniciaron estudios de quimioterapia y hormonoterapia adyuvante en pacientes con ganglios negativos. Los resultados de los principales ensayos han constatado que el tratamiento sistémico adyuvante reduce en una tercera parte la tasa de recidivas¹⁷⁶⁻¹⁸⁰ en este subgrupo de pacientes. Sin embargo, este tratamiento no es necesario ni eficaz en todos los casos, no está exento de toxicidad y es económicamente costoso para la sociedad. Por todo ello, ha surgido la necesidad de estratificar a las pacientes en categorías, con la finalidad de distinguir aquellas con alta probabilidad de recidiva de las que probablemente podrían estar curadas tras un tratamiento exclusivamente local^{181,182}.

Dado el creciente número de factores que están siendo propuestos e investigados, un Comité de expertos del "National Institute of Health" se reunió en Junio de 1990 para clarificar la utilidad clínica de los mismos y concluyó que para que un factor pronóstico se considere clínicamente útil debe reunir tres criterios¹⁸³⁻¹⁸⁵:

1º) El factor debe tener valor predictivo significativo e independiente y debe haber sido validado en estudios clínicos.

2º) El factor debe determinarse de forma relativamente sencilla y, a su vez, debe tener controles de calidad que garanticen su valor.

3º) El factor debe ser fácilmente interpretado por el clínico y debe presentar implicaciones terapéuticas.

Guiados por estas premisas presentamos a continuación una revisión de los factores pronósticos conocidos hasta ahora, con especial énfasis en aquellos que presentan mayor interés en el momento actual .

1. ESTADIO TUMORAL.

El establecimiento de estadios en el carcinoma de mama pretende la agrupación de pacientes según la extensión de su enfermedad. Se realizan de acuerdo con el resultado del examen físico, pruebas de laboratorio y exploraciones radiológicas. La información que proporciona es extraordinariamente útil para la elección del tratamiento, la valoración del pronóstico, y la comparación de resultados de distintos protocolos terapéuticos.

El sistema de estadiaje más ampliamente reconocido y aceptado internacionalmente es el adoptado tanto por la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) como por la AJC (American Joint Comision in Cancer Staging and End Results Reporting)¹⁸⁶. Está basado en el sistema TNM que establece diferentes estadios en función de tres parámetros:

- T : tamaño del tumor primario
- N : afectación de los ganglios axilares
- M : existencia de metástasis a distancia

Dentro de T, se distingue:

- Tx : ausencia de requisitos mínimos para definir el tumor primitivo.
- To : No hay evidencia de tumor primario.
- Tis: Carcinoma in situ: carcinoma ductal o lobular in situ, enfermedad de Paget del pezón sin tumoración objetivable.
- T1 : tumor < 2 cms. T1a: < 0.5 cms.
 T1b: 0.5 - 0.9 cms.
 T1c: 1.0 - 1.9 cms.
- T2: tumor > 2 cms y < 5 cms
- T3: tumor > 5 cms
- T4: tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica (*) o a la piel (**).

(*): la pared del tórax incluye costillas, músculos intercostales y músculo serrato anterior, pero no el músculo pectoral.

(**): pueden darse en los estadios T1, T2 y T3 depresiones de la piel, retracción del pezón, o cualquier otro cambio en la piel, excepto los de T4b sin afectar la clasificación.

T4a: extensión a la pared torácica

T4b: edema (incluyendo la piel de naranja), ulceración de la piel de la mama o nódulos satélites de la piel confinados a la misma mama.

T4c: ambos puntos anteriores.

T4d: carcinoma inflamatorio.

Respecto a N, se distingue:

- Nx: no puede definirse el estado de los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, han sido extirpados).
- N0: sin ganglios axilares homolaterales palpables.
- N1: ganglios homolaterales palpables y móviles.
- N2: ganglios axilares homolaterales fijos unos a otros o a otras estructuras.
- N3: metástasis ganglionares homolaterales en la mamaria interna.

En cuanto a M, se distingue:

- M0: no existe evidencia de metástasis a distancia.
- M1: metástasis a distancia, incluyendo las metástasis ganglionares supraclaviculares homolaterales.

En función de estos parámetros se establecen cuatro estadios clínicos:

- Estadio I : T1 N0 M0
- Estadio IIA : T0 N1 M0, T1 N1 M0, T2 N0 M0
IIB : T2 N1 M0, T3 N0 M0
- Estadio IIIA: T0 o T1 N2 M0, T2 N2 M0, T3 N1 o N2 M0
IIIB: T4 cualquier N M0, cualquier T N3 M0
- Estadio IV : cualquier T cualquier N M1

Otro sistema de clasificación por estadios clínicos, la "Columbia Clinical Classification", aunque no se utiliza prácticamente hoy en día, agrupa a las pacientes en cuatro estadios A, B, C y D (de menor a mayor gravedad) según la extensión de la enfermedad en el lugar del tumor primario, por áreas ganglionares y por metástasis a distancia.

En ambas clasificaciones las pacientes con Estadio I (o A) presentan el pronóstico más favorable; aquellas que se encuentran en un estadio II o III (B o C) tienen probabilidades intermedias de supervivencia a 5 y 10 años y las que presentan un estadio IV (o D) tienen enfermedad metastásica y el peor pronóstico^{187,188} (Tabla II).

	Supervivencia media a 5 años (%)	Valores extremos de supervivencia (%)
Estadio I	85	82-94
Estadio II	66	47-74
Estadio III	41	7-80
Estadio IV	10	---

Tabla II. Supervivencia de pacientes con cáncer de mama en relación con el estadio clínico(American Joint Commettee)¹⁸⁷

La valoración de la afectación ganglionar axilar mediante la exploración física tiene un alto índice de falsos positivos y negativos. Cuando los ganglios axilares son palpables, no se encuentran pruebas histológicas de afectación metastásica en aproximadamente un 25% de los casos. A la inversa, cuando los ganglios axilares no son palpables la invasión histológica se confirma hasta en un 30% de casos. Estos datos, que ponen de relieve las deficiencias de la evaluación clínica y el hecho de que la afectación ganglionar tiene relación con el pronóstico, han dado lugar a que se establezca un estadiaje patológico basado en el examen histológico de las piezas resecadas. El estadio I se corresponde con la presencia de tumor primitivo en ausencia de ganglios axilares positivos; el estadio II viene definido por la existencia de invasión ganglionar tumoral en ausencia de metastasis sistémicas. El estadio III representa la diseminación sistémica del tumor.

Como el pronóstico está claramente relacionado, no sólo con la afectación o no de los ganglios axilares, sino también con el número de ganglios afectados, dentro del estadio II se distinguen tres categorías:

- entre 1-3 ganglios positivos
- entre 4-9 ganglios positivos
- ≥ 10 ganglios positivos

En la tabla III se muestran las cifras de supervivencia a 10 años relacionadas con la invasión axilar en seis series distintas de pacientes tratadas con mastectomía radical¹⁸⁸⁻¹⁹³. En ella se pone de manifiesto que las pacientes con ganglios histológicamente negativos tienen un índice de supervivencia significativamente más alto que las pacientes con afectación histológica. De igual modo, también se pone de manifiesto la importancia del número de ganglios positivos.

	Valagussa (189)	Haagensen (190)	Spratt y Schot.(191)	Fisher (188)	Donegan (192)	Payne (193)
Est.I	72%	76%	72%	76%	68%	76%
Est.II	25%	48%	43%	24%	27%	35%
1 -3	34%	63%	---	36%	---	---
> 4	16%	27%	---	14%	---	---

Tabla III. Pronóstico relacionado con la afectación histológica de los ganglios axilares para las pacientes tratadas con mastectomía radical.

A la luz de los conocimientos actuales podemos asegurar que la afectación ganglionar axilar representa el factor pronóstico más importante para pacientes con cáncer de mama. Por ello se han dedicado muchos esfuerzos a detectar la presencia de metastásis en los ganglios axilares^{194.195} y ha habido varias comunicaciones¹⁹⁵⁻²⁰⁰ sobre la elevada incidencia de enfermedad ganglionar oculta en reexámenes tras la sección adicional del material histológico y el empleo de técnicas inmunohistoquímicas. El significado de las micro y macrometastásis ganglionares axilares ha sido objeto de estudios patológicos recientes; sin embargo, no hay unanimidad respecto al valor pronóstico de la afectación ganglionar oculta, especialmente de las micrometastásis¹⁹⁸⁻²⁰⁴.

Fisher y cols.¹⁹⁸ demostraron metástasis ocultas en ganglios regionales mediante una técnica histopatológica ampliada en un 24% de 78 casos de carcinoma de mama que habían sido considerados como estadio patológico I (sin metástasis ganglionares) tras una exploración patológica de rutina. Las pacientes cuyas metástasis medían <2 mm de diámetro mayor, micrometástasis, fueron comparadas con las que tenían lesiones >2 mm, macrometástasis (NSABP B-04). Los análisis de las tablas de supervivencia no pudieron revelar diferencias significativas entre pacientes con micrometástasis y pacientes sin metástasis ganglionares. Ambos grupos mostraron, sin embargo, una supervivencia más larga que las pacientes con macrometástasis. Estos resultados han sido recientemente confirmados en un estudio realizado en 1993 por Nasser y cols.²⁰⁵.

Por el contrario, el Ludwig Breast Cancer Study Group en un estudio con 1275 pacientes clasificadas como ganglio negativas encontraron que las enfermas con micrometástasis ganglionares ocultas en el reexamen de los ganglios (9%) presentaban menor intervalo libre de enfermedad (ILE) y menor supervivencia global (SVG) a los 5 años, constituyendo un grupo de alto riesgo dentro de las pacientes supuestamente ganglio negativas. Estos autores sugirieron que la detección de enfermedad metastásica oculta mediante técnicas inmunohistoquímicas debería considerarse parte del examen patológico de rutina. Estos datos están en concordancia con lo descrito también por Friedman y cols.²⁰⁰.

Las micrometástasis en la médula ósea de pacientes con carcinoma primario de mama pueden ser demostradas también en aproximadamente un 25% de pacientes²⁰⁶, mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando un antisuero para el antígeno de membrana epitelial (anti EMA)²⁰⁷⁻²⁰⁹. Su presencia se ha correlacionado con otros factores conocidos de mal pronóstico como tamaño del tumor, afectación ganglionar axilar e invasión vascular peritumoral del tumor primario. Algunos autores la han relacionado además, con un menor ILE²⁰⁷. Sin embargo, como ocurre con las micrometástasis ganglionares, el significado de las metástasis ocultas en médula ósea y su valor pronóstico no se ha podido establecer con claridad hasta el momento.

2. TAMAÑO TUMORAL.

El tamaño del tumor en el momento del diagnóstico es un factor pronóstico muy importante en el carcinoma de mama, pero su influencia en el mismo está relacionada con la afectación ganglionar axilar. Así, y según se observa en la tabla IV, cuando los ganglios axilares están afectados el tamaño influye notablemente en el índice de recidivas.

		Tamaño del primario		
		< 2 cms.	2-5 cms.	> 5 cms.
Ganglios axilares negativos	Fisher y cols. (210)	12%	24%	27%
	Nemoto y cols. (211)	13%	19%	25%
	Valagussa y cols. (189)	8%	24%	19%
Ganglios axilares positivos	Fisher y cols. (210)	50%	60%	79%
	Nemoto y cols. (211)	39%	50%	65%
	Valagussa y cols. (189)	37%	64%	79%

Tabla IV. Índice de recidivas a 5 a. según el tamaño del tumor primario y la afectación de los ganglios axilares.

En la publicación de Valagussa y cols.¹⁸⁹ el índice de recidivas a los 5 años era del 37% en las pacientes con ganglios positivos y tumores pequeños (de 0-2 cms.) y del 79% en las pacientes con ganglios positivos y tumores primarios grandes (>5 cms). Los otros autores muestran diferencias similares^{210,211}. Cuando los ganglios axilares son negativos, el tamaño del tumor influye en el pronóstico, pero su relación es menos llamativa. Así, por ejemplo, el pronóstico para pacientes con ganglios axilares negativos y tumores primarios pequeños (0-2 cms.) es excepcionalmente bueno, con un índice de recidivas a los 5 años de aproximadamente el 12%. En cambio, en pacientes con tumores entre 2 y 5 cms. aumenta al 24%. El pronóstico para pacientes con tumores primarios grandes (>5 cms.) y ganglios negativos no es significativamente peor que el de pacientes con tumores primarios entre 2 y 5 cms. y ganglios negativos. Estos datos implican que el estudio de las muestras axilares es muy valioso sobre todo para el diagnóstico de las pacientes con tumores primarios grandes ya que las pacientes con ganglios axilares negativos evolucionan relativamente bien sin terapéutica adicional. Los resultados a 30 años de Adair apoyan estas observaciones: para pacientes con ganglios negativos el índice de supervivencia a 30 años era del 61% cuando el tumor primario media entre 0-2 cms., del 46% para los primarios entre 2-5 cms, y del 50% para los >5 cms.³². Para pacientes con afectación de ganglios axilares el índice de supervivencia a 30 años era del 40% cuando el tumor primario era <2 cms., del 31% para los primarios entre 2-5 cms. y del 14% para los primarios >5 cms.

3. MULTICENTRICIDAD Y BILATERALIDAD.

Muchos carcinomas de mama pueden ser multicéntricos. La multicentricidad se diagnostica cuando a áreas de carcinoma in situ o invasivo se asocia un carcinoma invasivo localizado en un cuadrante diferente. La incidencia de carcinoma multicéntrico varía según las series entre 27-35% siendo más frecuente en tumores >2 cms. Aunque la multicentricidad del cáncer de mama es una realidad morfológica aceptada, su significado clínico permanece en discusión, dado el empleo cada vez más frecuente de la cirugía conservadora.

Por otro lado, la incidencia de carcinoma de mama bilateral es probablemente más elevada de lo que antes se creía^{212,213}. El riesgo es particularmente elevado en pacientes con carcinoma lobulillar y en las que tienen antecedentes familiares de cáncer de mama. Sin embargo, la aparición de tumores bilaterales sincrónicos es rara y la incidencia de un segundo tumor primario asincrónico no se aproxima a la incidencia de lesiones ocultas descubiertas por biopsias eventuales o autopsias²¹⁴. Este hecho sugiere la posibilidad de que no todos los cánceres de mama evolucionen hasta hacerse clínicamente aparentes o que incluso algunos puedan regresar espontáneamente.

4. GRADO HISTOLOGICO.

Un aspecto histopatológico fundamental en el estudio del cáncer de mama ha sido el reconocimiento de que las características morfológicas de los tumores pueden relacionarse con el grado de malignidad de los mismos. Aunque el grado histológico de diferenciación ha demostrado ser un factor pronóstico útil en numerosos estudios, no ha sido aceptado como procedimiento de rutina hasta muy recientemente debido fundamentalmente a los problemas de reproducibilidad y consistencia²¹⁵⁻²¹⁷.

El primer intento de sistematizar la relación entre grado de diferenciación histológica y supervivencia en el cáncer de mama fue realizada por Greenough en 1925²¹⁸. Su clasificación se basaba en la valoración de tres características:

- Grado de disposición de las células alrededor de una luz glandular abierta.
- Uniformidad en el tamaño de las células y núcleos.
- Grado de hiperchromatismo y actividad mitótica.

El pequeño tamaño de la muestra (73 casos) y la falta de datos para definir lo que Greenough refería como "curación" hicieron que el método propuesto consiguiera más disuasores que adeptos.

El 1950, Bloom^{219,220} estableció otro sistema de clasificación en grados histológicos basado en la valoración de la formación de túbulos y de las alteraciones nucleares. Este sistema fue posteriormente mejorado, en 1957, por Bloom y Richardson²²¹, añadiendo al mismo una puntuación numérica. Así, distinguieron tres grados histológicos:

- grado I: tumores bien diferenciados
- grado II: tumores moderadamente diferenciados
- grado III: tumores pobremente diferenciados.

Sin embargo, su trabajo carecía de información respecto a la forma de cuantificar estas características y se basaba en valoraciones plenamente subjetivas como "bien diferenciado", "moderadamente bien formado" o "grado ligero". A pesar de estas objeciones, encontraron un estrecho paralelismo entre el grado histológico y la supervivencia en 470 casos.

En 1955, Black y cols.²²² consideraron que la valoración de la formación de túbulos es un factor poco importante para establecer el grado de diferenciación tumoral y propusieron una clasificación basada en las características de los núcleos (forma, tamaño, mitosis, nucleolos, cromatina). Con ello pretendían eliminar las diferencias y artificios debidos a la fragilidad del citoplasma. Esta clasificación, que establecía 5 grados, fué simplificada a 3 grados en 1980 por Fisher y cols.²²³ manteniendo los mismos criterios. Así, el grado 1 (3 y 4 de Black) correspondería a los tumores más anaplásicos, el grado 2 (2 en la clasificación de Black) a tumores con una diferenciación intermedia y el grado 3 (0 y 1 de Black) a los bien diferenciados. Tanto Black como Fisher demostraron en sus estudios que el grado nuclear es una variable independiente en relación con el pronóstico, aunque esta relación no es lineal.

En 1968, la OMS²²⁴ estableció un sistema de grados histológicos basado en el sistema de Bloom y Richardson que valoraba:

- el grado de formación de túbulos: 1.- extensa
 - 2.- moderada
 - 3.- ligera o inexistente

- el pleomorfismo nuclear: 1.- ligero
 - 2.- moderado
 - 3.- intenso

- el número de mitosis contadas en 10 campos de gran aumento, considerándose:
 - 1.- < 10 mitosis/10 campos
 - 2.- 10 - 19 "
 - 3.- \geq 20 "

Sumando las puntuaciones de estos tres parámetros los tumores se clasifican en tres grados histológicos:

- Grado I (3-5 puntos), tumores bien diferenciados.
- Grado II (6-7 puntos), tumores moderadamente diferenciados.
- Grado III,(8-9) tumores pobremente diferenciados, con un alto grado de malignidad.

Más recientemente, Elston y Ellis²²⁵ han propuesto una serie de modificaciones a este sistema con el fin de conseguir una mayor objetividad en la valoración de los parámetros, y así manteniendo éstos, establecen unos criterios a seguir para cuantificarlos.

Respecto a la formación de túbulos conceden:

- 1 punto, cuando >75% de toda la superficie del tumor presenta estructuras tubulares bien definidas.
- 2 puntos, cuando la formación de túbulos ocupa entre el 10 y el 75 %.
- 3 puntos, cuando los túbulos ocupan menos del 10% de la superficie tumoral.

La evaluación del pleomorfismo nuclear es siempre el elemento menos satisfactorio en cualquier sistema de gradación y para introducir un cierto grado de objetividad ellos sugieren comparar las características de las células tumorales con las células epiteliales normales del tejido adyacente, valorando con un 1 las células relativamente similares en tamaño y con cromatina uniforme, con un 3 cuando existe una marcada diferencia en el tamaño y forma de las células y con un 2 las situaciones intermedias.

En cuanto al número de mitosis, la modificación más importante que proponen es la de estandarizar el contaje respecto a un área definida del campo, en función del aumento del objetivo y el tipo de lente. En su trabajo consideran un 1 cuando hay entre 1-9 mitosis/10 campos, un 2 entre 10-19 y un 3 cuando hay >20.

Sumando las puntuaciones de los tres parámetros se obtiene una puntuación entre 3 y 9 que se corresponderían, con los grados del sistema anterior.

Mediante una fórmula matemática que combina el grado histológico, el tamaño tumoral y el estadio de los ganglios linfáticos, los autores han elaborado un índice pronóstico cuya validez ha sido confirmada en varios trabajos²²⁵⁻²²⁷.

$$\text{Índice pronóstico de Nottingham} = 0.2 \times \text{tamaño tumoral} + \text{estadio ganglionar (1-3)} + \text{grado histológico (1-3)}.$$

El pronóstico empeora conforme aumenta el índice pronóstico, distinguiéndose tres grupos, <3.4, entre 3.4-5.4 y >5.4 de buen, moderado y mal pronóstico²²⁷.

Aunque algunos autores han cuestionado el valor pronóstico del grado histológico debido a las considerables variaciones entre los distintos sistemas de gradación, estudios recientes en largas series de pacientes, entre ellos el de Elston y Ellis que incluye 2200 pacientes con un seguimiento de 16 años²²⁵, coinciden en considerar al grado de malignidad como un factor pronóstico útil para predecir la supervivencia total, aunque no las recurrencias del tumor. Así mismo, también se ha podido demostrar que existe relación significativa entre el grado histológico y otros parámetros objetivos de diferenciación y proliferación tumoral como el contenido en DNA²²⁸⁻²³¹, marcaje nuclear con el anticuerpo Ki67²³²⁻²³⁴, y receptores para factores de crecimiento, i.e. c-erbB-2²³⁵.

El grado nuclear y el grado histológico presentan una estrecha correlación, y ambos se relacionan con el índice de recurrencias, muerte y período libre de enfermedad^{221,236-241}.

5. CINETICA TUMORAL.

Desde un punto de vista cinético los tumores malignos están representados por una población celular en expansión constante, con ausencia o deficiencia permanente de la sensibilidad a los controles sobre la multiplicación. El crecimiento tumoral depende de tres factores:

- la velocidad de proliferación de las células en división
- la fracción de crecimiento (fracción proliferativa de toda la población celular)
- el grado de pérdida celular del tumor.

Desde hace mucho tiempo, la fracción de proliferación de un tumor ha sido considerada un parámetro que tiene relación con el curso clínico del mismo. Muchos han sido los trabajos dedicados a encontrar variables medibles que reflejen esta fracción tumoral y que puedan ser relacionadas con el potencial metastásico, las recurrencias del tumor y/o la supervivencia global.

Uno de estos, el tiempo de doblamiento tumoral, fué valorado inicialmente en el carcinoma de mama mediante mediciones seriadas del tamaño de las masas mamarias palpables^{1,242} y posteriormente en mamografías repetidas^{243,244}. La mayoría de estos trabajos, realizados en los años setenta (Pearlman²⁴⁵, Spratt²⁴⁶, Fournier²⁴⁷), señalan que existe un amplio rango, desde varios días hasta más de un año, en el tiempo que necesitan los tumores de mama para doblar su volumen y que las pacientes con tumores de crecimiento más rápido parecen tener una mayor frecuencia de afectación metastásica ganglionar²⁴⁸ y una menor supervivencia tras la mastectomía^{242,244,245}.

Recientemente se han desarrollado otras técnicas más exactas para la cuantificación del índice de proliferación celular.

5.1. El marcaje con timidina tritiada se realiza mediante la incubación "in vitro" de tejido tumoral fresco en un medio con timidina tritiada. La timidina se incorpora al DNA exclusivamente en las células que están en fase S (fase de síntesis). Posteriormente, la autorradiografía de cortes finos de tejido permite identificar las células que están sintetizando DNA. Las células marcadas aparecen con gránulos negros en sus núcleos. Mediante esta técnica se pueden obtener dos parámetros cinéticos:

- el índice de marcado (timidine labelling index) que representa la relación entre las células en fase S (marcadas) y las células totales. Sus valores dan una idea aproximada de la actividad proliferativa de la población celular.
- el porcentaje de mitosis marcadas.

Relacionando estos dos parámetros a través de diversas ecuaciones matemáticas puede calcularse el tiempo de doblamiento tumoral. Desde que esta técnica fué aplicada por primera vez por Johnson²⁴⁹ al tejido mamario, han sido muchos los trabajos dedicados a esclarecer el valor pronóstico del índice de marcado con timidina en el carcinoma de mama.

Algunos grupos han encontrado relación significativa entre elevado índice de marcado y recurrencia temprana tras la mastectomía²⁵⁰⁻²⁵⁴. Hery y cols.²⁵⁵ consideraron que es el mejor indicador pronóstico en pacientes con carcinoma de mama y ganglios negativos, mientras que otros autores han sugerido que puede ser utilizado para identificar pacientes de alto riesgo subsidiarias de terapia médica coadyuvante^{252,255}. Los niveles de índice de

marcado con timidina parecen también relacionarse con el tipo histológico. En un estudio realizado por Meyer en 1986²⁵⁶ encontraron que los carcinomas mucinosos, que conllevan un buen pronóstico, suelen tener bajos IMT.

Sin embargo, este procedimiento, a pesar de sus ventajas, conlleva una serie de limitaciones técnicas que impiden su uso rutinario.

Este mismo método puede realizarse empleando bromodeoxiuridina, un análogo de la pirimidina que se incorpora a las células durante la fase de síntesis de DNA. Recientemente se han desarrollado diversos anticuerpos monoclonales contra bromodeoxiuridina²⁵⁷⁻²⁶⁰. Así, los tumores que han sido expuestos a esta sustancia se tiñen con el anticuerpo utilizando una técnica inmunoperoxidásica después de la desnaturalización del DNA. Las células teñidas se cuentan utilizando un microscopio de fase, expresándose su número como un porcentaje en relación a 500 o 1000 células tumorales. Aunque este método muestra también algunos inconvenientes, comunes al del marcaje con timidina, presenta la gran ventaja de que al ser la bromodeoxiuridina un agente terapéutico ampliamente utilizado en el tratamiento radioterápico de tumores malignos humanos²⁶¹, permite la realización de estudios cinéticos "in vivo".

5.2. AgNORs.

Los NORs (nucleolar organizer regions), son anillos de DNA que transcriben RNA ribosómico. Su existencia se identificó hace aproximadamente una década y actualmente sabemos que están asociados a determinadas

proteínas entre las que se incluyen la RNA polimerasa 1, C23 y B23^{262,263}. Estas proteínas son las que se conocen como AgNORs, y aunque su función no está del todo clara se piensa que tienen algún papel en la transcripción del RNA.

En 1975 pudieron demostrar los NORs merced a la argirofilia de sus proteínas asociadas, utilizando un sencillo método de tinción con plata²⁶⁴. La técnica, modificada posteriormente, se conoce como técnica de AgNOR y puede aplicarse a cortes de tejido incluidos en parafina²⁶⁵. Los AgNORs se ven como puntos negros dentro del nucleolo y lo que se cuenta habitualmente es el número de puntos que hay en 50-100 células, tomándose como resultado el valor de la media aritmética.

Como las moléculas de RNA ribosómico son el principal lugar de síntesis de proteínas celulares, se ha sugerido que un número aumentado de NORs dentro del núcleo de las células hiperplásicas o malignas podría reflejar un incremento de la actividad metabólica o sintética²⁶⁶. Si esto fuera así, sería lógico esperar que el número de AgNORs se relacione con otros marcadores de proliferación. Guiados por esta idea, Smith y Crocker realizaron un estudio en 1988²⁶⁷ en el que encontraron que el número de AgNORs era significativamente mayor en lesiones malignas de mama que en benignas. Estos datos han sido confirmados posteriormente por los trabajos de Raymond²⁶⁸ y Dervan²⁶⁹. Este último encontró también relación entre los valores de AgNORs y el índice de marcaje con el anticuerpo Ki67.

Un estudio posterior de Sivridis y Sims²⁷⁰, publicado en 1990, relacionó el número de AgNORs con el número de ganglios linfáticos axilares positivos.

Los resultados obtenidos señalaron que los carcinomas de mama con ganglios negativos o con menos de 4 ganglios afectados presentaban valores de AgNORs significativamente más bajos que aquellos tumores con 4 o más ganglios afectados. Estos datos no han sido confirmados por estudios posteriores.

5.3. Citometría de flujo.

Es una técnica automática, rápida y sencilla que cuantifica el contenido en DNA celular y analiza la distribución de las células en función de la fase del ciclo celular. Su fundamento es el marcaje del DNA mediante colorantes fluorescentes. La imagen que se obtiene es un histograma de DNA a partir del cual pueden obtenerse una serie de medidas.

El parámetro que proporciona mayor información sobre el contenido de DNA se denomina índice de DNA y tiene valor 1 para las células diploides (células en fase G1) y valor 2 para las células tetraploides (fases G2 y M). Las células que se encuentran en fase S tienen un índice intermedio y las células con un índice de DNA mayor de 2 son aneuploides o poliploides. Uno de los principales problemas de esta técnica es que las células no proliferantes (fase G0) son indistinguibles de las células en reposo (fase G1) ya que su contenido en DNA es el mismo.

La técnica puede ser aplicada a material incluido en parafina así como a tejido fresco. Numerosos estudios han señalado que el estado de ploidia de un tumor guarda relación con el pronóstico. Diversos autores^{229,271-273} han encontrado que hasta el 90% de los tumores de mama son aneuploides, y que

existe relación significativa entre el incremento de la ploidia del tumor y una recurrencia precoz tras la cirugía²⁷⁴⁻²⁷⁶. La aneuploidia se relaciona también con una disminución de la supervivencia global^{277,278}.

Algunos trabajos han señalado una asociación directa con el nivel del receptores de estrógeno, de modo que la existencia de receptores hormonales se asocia a un índice de proliferación bajo^{272,279-282} y a un patrón diploide^{229,271,280,281,283}.

5.4. Citometría estática.

Es una técnica alternativa para el estudio del contenido en DNA de núcleos de células tumorales. Puede aplicarse a preparaciones citológicas e histológicas de material fijado en formol, que se tiñen con un colorante del DNA, fundamentalmente Feulgen²⁸⁴. El hecho de poder utilizar preparaciones histológicas supone algunas ventajas sobre la cuantificación con citómetro de flujo, como analizar áreas concretas de interés y correlacionar los hallazgos con la morfología. Además, permite estudios retrospectivos ya que la reacción de Feulgen no se modifica con el paso del tiempo²⁸⁵. Presenta, sin embargo, algunos inconvenientes técnicos como la presencia de núcleos seccionados que hace que se produzcan dientes de sierra en las gráficas y se enmascaren poblaciones polipoides²⁸⁶.

5.5. Inmunohistoquímica.

Recientemente se han desarrollado técnicas de inmunohistoquímica, que utilizan anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos nucleares que aparecen exclusivamente durante la fase de división celular. Estas técnicas ofrecen las ventajas, sobre los métodos descritos anteriormente, de que son sencillas de realizar, presentan marcada sensibilidad, se realizan en corto espacio de tiempo y son accesibles para la mayoría de los laboratorios. Además, la arquitectura del tejido se mantiene intacta y las células proliferantes pueden ser observadas en relación a otras características histológicas.

Hasta el momento actual los anticuerpos que más comúnmente se han utilizado para este fin son:

- Ki 67
- PCNA (proliferating cell nuclear antigen)
- KiS1

5.5.1. Ki67.

Ki67 es un anticuerpo monoclonal de ratón producido por Gerdes y cols. en 1983²⁸⁷. Este anticuerpo reconoce un antígeno nuclear presente sólo en las células proliferantes (su expresión aumenta desde G1 y S a G2, para alcanzar el máximo durante la mitosis); por consiguiente, no se expresa en células en reposo (fase G0).

Hasta la fecha, sigue sin conocerse la naturaleza, composición exacta, y peso molecular de dicho antígeno nuclear; estudios recientes han sugerido que podría ser un componente de la matriz nuclear^{288,289}. Su función exacta es también desconocida aunque se sabe que juega un importante papel en la regulación de la proliferación celular.

El anticuerpo Ki67 se ha utilizado en cortes de tejido congelado mediante técnicas habituales de inmunohistoquímica. Recientemente Gerdes y cols. han introducido una modificación en la técnica que permite el uso del anticuerpo en cortes incluidos en parafina. El número de células que se tiñen representa el número de células que están en fase proliferativa en un momento determinado.

Se sabe que existe fuerte correlación entre el índice de proliferación de los tumores (determinado por este método) y sus resultados clínicos²⁹⁰⁻²⁹³. Este aspecto ha sido revisado recientemente por Tubiana y Courdi²⁹⁴.

Otros autores han comprobado que existe también buena correlación entre los valores de Ki67 y los datos sobre proliferación celular obtenidos mediante otras técnicas²⁹⁵⁻²⁹⁹.

Respecto al carcinoma de mama, son muchos los estudios que han intentado buscar relaciones entre la fracción de crecimiento (medidas mediante Ki67) y el pronóstico. Así, se ha encontrado relación clara y significativa entre índice de marcado con Ki67 y contaje de mitosis^{233,300,301}, diámetro del tumor³⁰², grado histológico^{233,300-306}, afectación ganglionar linfática^{304,306} e invasión vascular³⁰⁶. En cambio, se ha encontrado relación inversa con la expresión de receptores de estrógeno^{301,302,305-310}.

Otros estudios, sin embargo, no han encontrado correlación con alguna de estas variables, como la afectación ganglionar^{233,300,305,311} y el tamaño tumoral³¹². El único trabajo realizado hasta el momento que incluye un seguimiento clínico adecuado es el que Bouzubar realizó en 1989²³³ con 124 pacientes que fueron controladas durante 30 meses tras la mastectomía, encontrando que niveles de Ki67 >20% se asociaban a un incremento del riesgo de recurrencia precoz.

Otros factores, de introducción más reciente y que han sido propuestos como factores pronósticos para el carcinoma de mama también han sido relacionados con el índice de marcado con este anticuerpo. Entre ellos caben citar, la expresión de proteína p53 anómala que se asocia a los carcinomas de alto grado de malignidad^{307,312}.

Se ha intentado utilizar el anticuerpo Ki67 con el fin de distinguir entre lesiones benignas y malignas de la mama. Y, aunque los resultados encontrados señalan diferencias significativas en los valores medios de este parámetro entre ambos grupos^{233,301,303-305,313-317}, existe considerable solapamiento entre ambos, por lo que a efectos prácticos no es posible su utilización en el diagnóstico de procesos de dudosa interpretación^{315,317}.

Es importante señalar que existen ciertos problemas prácticos que pueden limitar la eficacia de Ki67 como indicador pronóstico, especialmente en las biopsias pequeñas.

1.- La expresión del antígeno parece estar influenciada por el aporte nutricional a las células. Por lo que, una muestra de tejido tomada del área

central de un gran tumor puede proporcionar erróneamente valores muy bajos erróneos para la fracción de crecimiento.

2.- La mayoría de los tumores están constituidos por una población celular heterogénea dentro de la cual pueden existir diferentes velocidades de proliferación. Por lo que la tinción con Ki67 dentro de una biopsia pequeña puede no reflejar la velocidad de proliferación predominante en el tumor.

De todas formas estas dos consideraciones prácticas pueden aplicarse igualmente a otros métodos como el marcado con timidina tritiada o bromodeoxiuridina.

Además de estos aspectos prácticos existe otra consideración teórica importante: la expresión del Ki67 solamente proporciona información acerca de si una célula se encuentra en fase proliferativa o no, pero no proporciona ningún dato sobre la duración del ciclo celular ni sobre su capacidad metastatizante.

5.5.2. PCNA (proliferating cell nuclear antigen).

El antígeno nuclear de proliferación celular, también conocido como ciclina, es un antígeno nuclear de 36 kD recientemente identificado como proteína auxiliar de la delta DNA polimerasa³¹⁸. Parece que es esencial para la replicación del DNA y proliferación celular; además se sabe que alcanza niveles máximos durante la fase S del ciclo celular, aunque también se encuentran niveles detectables, pero más bajos, en las fases M, G1 y G2³¹⁹⁻³²¹.

El anticuerpo contra PCNA fué descrito de manera independiente por Miyachi³²² y Celis³²³ en sus estudios de pacientes con lupus eritematoso y cultivos celulares, respectivamente.

Estudios realizados en pacientes con leucemia sugieren que el incremento de PCNA podría estar relacionado con la resistencia a la quimioterapia de las células cancerígenas³²⁴.

Respecto al carcinoma de mama, los datos de que se dispone son limitados y contradictorios³²⁵⁻³²⁷. Aaltoma y cols.^{328,329}, en un estudio realizado en 175 mujeres con cáncer de mama, encontraron resultados comparables entre el índice de marcado con PCNA y Ki 67 y una relación estadísticamente significativa entre índices de PCNA y otros parámetros de proliferación celular, como conteo de mitosis, ploidia del DNA y fracción de fase S. También encontraron asociación positiva entre tinción con PCNA, grado y tipo histológico de los tumores. En cambio, no existía asociación con el tamaño tumoral ni con la afectación de ganglios axilares.

Leonardi y cols.³¹² en un trabajo comparativo entre índice de marcaje con PCNA y Ki 67 con otras variables pronósticas (tamaño tumoral, receptores de estrógeno, conteo de mitosis) observaron que la tinción con PCNA no se relacionaba con el marcaje con Ki 67 ni con ninguna otra de las variables examinadas y concluyeron que el PCNA no parece ser un buen sustituto de Ki 67 para la evaluación de la fracción de crecimiento en el carcinoma de mama. En un reciente trabajo de Frierson³³¹, no se encuentra relación significativa entre marcaje con PCNA y la afectación ganglionar, ploidía, estado de los

receptores de estrógeno y progesterona, pero sí con el tamaño tumoral, el grado histológico y el número de mitosis.

Algunos autores han sugerido que las diferencias encontradas en los distintos estudios pueden deberse a diferencias biológicas (se ha demostrado gran variabilidad intratumoral con respecto a la tinción con el anticuerpo antiPCNA^{328,329,332,333}, a variaciones en el método (las diferencias en la fijación y procesamiento de las muestras puede causar importantes alteraciones en los resultados de la tinción³³⁴, o al hecho de que se utilicen anticuerpos diferentes que, aunque reconozcan la misma proteína, pueden presentar características muy distintas.

Respecto a la correlación entre los valores de PCNA y Ki67 los datos son conflictivos, y aunque algunos autores encuentran valores similares de ambos parámetros^{325,330,335}, en muchos casos la inmunoreactividad para PCNA es mucho más numerosa que para Ki67³¹². Se han sugerido diversas razones para explicar estas diferencias, entre ellas, la larga vida media de PCNA (aproximadamente 20 horas) que haría que aparecieran como positivas muchas células que pueden haber terminado ya su ciclo celular y no estar, por lo tanto, en fase proliferativa^{336,337}, el que PCNA puede expresarse también asociado a la reparación del DNA, no sólo a la proliferación celular; por otro lado, la vida media de Ki67 es muy corta (media hora o menos) y se ha demostrado que la expresión del antígeno puede desaparecer en las células privadas nutricionalmente, aunque estén todavía en fase proliferativa.

En resumen, para poder establecer conclusiones más definitivas sobre el valor pronóstico de PCNA en el carcinoma de mama son necesarios estudios adicionales que valoren la relación entre tinción con PCNA, intervalo libre de enfermedad y supervivencia general.

5.5.3. Ki S1.

Es un anticuerpo monoclonal de ratón recientemente desarrollado en la Universidad de Kiel por Kreipe y cols.³³⁸ contra una proteína nuclear de 160 kD que se expresa en las células proliferantes, incrementándose su expresión de forma lineal desde la fase S para alcanzar el pico máximo durante la mitosis³³⁹. Puede utilizarse en material fijado y procesado de rutina, así como en cortes de congelación.

Los estudios llevados a cabo hasta el momento en carcinomas mamarios^{340.341} parecen encontrar correlación entre la expresión de KiS1 y el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global, asociándose una mayor inmunorreactividad con un peor pronóstico.

6. TIPOS HISTOLOGICOS.

La mayoría de los carcinomas invasivos de mama son de tipo ductal sin otra especificación y su grado de agresividad puede evaluarse mediante la determinación del grado histológico de malignidad ya señalado. Sin embargo, como ya sugirió John A. Dossett en 1967³⁴² conviene diferenciar ciertas formas histológicas particulares que conllevan información pronóstica de gran utilidad a la hora de tomar decisiones terapéuticas individuales.

Carcinoma ductal infiltrante NOS.

Es el tipo más común de carcinoma invasivo de la mama, oscilando su supervivencia entre el 50%-60%³⁴³.

El valor pronóstico del infiltrado linfoplasmocitario en el estroma tumoral ha sido objeto de gran interés y controversia. La mayoría de los carcinomas ductales NOS con marcado componente linfoide tienden a presentar un borde de crecimiento circunscrito e histológicamente son pobremente diferenciados^{237,344}. Los estudios de tipificación del infiltrado linfoide indican que corresponden preferentemente a linfocitos T maduros³⁴⁵⁻³⁴⁷.

La presencia de émbolos tumorales linfáticos en el tejido mamario periférico al tumor es un signo de mal pronóstico ya que se asocian generalmente a metástasis ganglionares axilares. Además, varias publicaciones^{240,348-350} han puesto de manifiesto el carácter adverso de este hallazgo en pacientes con ganglios negativos en el estadio I (T1 N0 M0). En cambio, su significado en el seno de la masa tumoral aún no ha sido determinado.

Formas de mal pronóstico:

- Ca. ductal
- Ca. lobulillar sólido
- Ca. medular
- Ca. escamoso
- Ca. quístico hipersecretor
- Ca. apocrino
- Ca. con hallazgos neuroendocrinos
- Ca. rico en glucógeno
- Ca. rico en lípidos

Formas de pronóstico intermedio:

- Ca. lobulillar mixto
- Ca. papilar
- Ca. con metaplasia
- Ca. con células gigantes tipo osteoclasto

Formas de "buen" pronóstico:

- Ca. lobulillar variante clásica
- Ca. lobulillar tubulo-alveolar
- Ca. tubular
- Ca. mucinoso
- Ca. cribiforme
- Ca. adenoide quístico
- Ca. secretor

Tabla V. Formas especiales de tumores de bajo y alto potencial de malignidad.

La invasión vascular sanguínea se define como la presencia de émbolos tumorales en el interior de una arteria o vena. La frecuencia de invasión tumoral sanguínea varía ampliamente entre el 4.7-47.2%^{73,240,351-355} y su significado ha sido muy discutido: mientras que unos lo refieren como factor adverso en pacientes con ganglios positivos³⁴⁷⁻³⁴⁹, otros le atribuyen este valor exclusivamente cuando no existen metástasis ganglionares axilares³⁵². En un estudio de pacientes T1 N0 M0, tratadas con mastectomía y con 10 años de seguimiento²⁴⁰, la recurrencia fue más frecuente en aquellos con invasión vascular (26%) que en su ausencia (16%) y la muerte por enfermedad se presentó más a menudo, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística.

La invasión perineural se identifica generalmente en tumores de alto grado de malignidad, careciendo de significado pronóstico independiente.

La presencia de abundante tejido elástico se ha relacionado con positividad a receptores de estrógenos pero su significado pronóstico como variable independiente continúa siendo muy controvertido³⁵⁶⁻³⁶⁰.

El patrón y la cantidad de componente intraductal del carcinoma también ha sido evaluado como factor pronóstico en el carcinoma ductal invasivo NOS. Silverberg y Chitale³⁶¹ han señalado relación indirecta entre extensión del componente intraductal e invasión ganglionar axilar; otros autores⁷³, en cambio, han advertido que en los tumores con mayor componente intraductal existe mayor probabilidad de afectación a distancia en otros cuadrantes de la mama, con el consiguiente incremento de riesgo de recurrencia local tras tumorectomía^{362,363}.

Carcinoma lobulillar infiltrante:

Considerados el carcinoma lobulillar y sus variantes como un único grupo, constituyen el tipo especial más frecuente dentro de los carcinomas de mama y muestra una ventaja significativa en supervivencia respecto al carcinoma ductal invasivo NOS. Sin embargo, hay diferencias importantes en el comportamiento de los distintos subtipos y conviene considerarlos de forma independiente en cuanto a su valor pronóstico. Así, un reciente estudio de Ellis y cols.³⁶⁴ confirma los datos ya sugeridos por Dixon y cols.⁴⁰ referente al buen pronóstico de la forma clásica y túbulo-lobular, el pronóstico intermedio de la variante mixta, y el mal pronóstico del carcinoma lobular sólido, similar a la del carcinoma ductal NOS.

Toit et al.⁴⁸ también encontraron un pronóstico más favorable entre las pacientes con la variante clásica cuando se comparaba con las variantes sólida y alveolar. En el trabajo realizado por Di Cortanzo et al.⁴³ en pacientes en estadio I y II no se advirtieron diferencias en la supervivencia entre las distintas variedades de carcinoma lobulillar, pero sí respecto al carcinoma ductal infiltrante NOS.

En las formas de mejor pronóstico, la supervivencia a los 5 años es del 100% y 77% en pacientes sin ganglios afectados y con ganglios afectados, respectivamente³⁶⁵.

Carcinoma tubular:

Probablemente es el tipo histológico especial más importante. Todos los estudios realizados hasta el momento^{55,57,366-368} confirman el excelente pronóstico de este tipo de cáncer de mama. Aunque pueden llegar a alcanzar grandes dimensiones en el momento del diagnóstico, cuando se presentan en forma pura podemos asegurar que es muy improbable que se produzcan metastásis a distancia³⁶⁹. La supervivencia a los 10 años es del 90% aproximadamente, significativamente mejor que la del carcinoma ductal NOS.

En una revisión reciente³⁷⁰ sobre pautas de tratamiento se afirma que "si se realiza un diagnóstico de carcinoma tubular puro debe practicarse una biopsia con 1-2 cms. de margen de tejido normal. Si no hay evidencia de tumor en el tejido marginal no es necesario realizar la mastectomía... El empleo de radiación no es necesario, así como tampoco la disección de los ganglios linfáticos axilares".

El pronóstico es favorable cuando el 75% de la tumoración presenta el patrón tubular^{51,54,57}, siendo la frecuencia de compromiso ganglionar en estos casos del 8%. En pacientes con tumores mixtos la frecuencia de metástasis axilares alcanza el 29%.

Carcinoma medular:

Aunque ha sido ampliamente aceptado que el carcinoma medular tiene buen pronóstico^{60,61,371-372}, otros estudios no confirman que la supervivencia sea mayor respecto al carcinoma ductal NOS^{373,374}. Estas diferencias podrían deberse a la falta de acuerdo respecto a los criterios histológicos diagnósticos.

En el estudio de Ellis y cols.³⁶⁴ en el que estos criterios han sido aplicados de forma rigurosa no se han encontrado diferencias en la supervivencia entre el carcinoma medular y el carcinoma medular atípico ni entre estos dos grupos y el carcinoma ductal NOS, por lo que estos autores consideran que este tipo debe ser contemplado como de pronóstico intermedio más que como de buen pronóstico.

La incidencia de metástasis axilares en pacientes con carcinoma medular es notablemente inferior a la encontrada en el carcinoma ductal infiltrante NOS^{61,372}. El tamaño es también un factor determinante importante, ya que el pronóstico es especialmente favorable si el diámetro del tumor es inferior a 3 cms.^{60,375}.

Seguimientos prolongados revelan una supervivencia del 95% a los 20 años para mujeres en estadio I y del 61% para el estadio II³⁷¹.

Carcinoma mucinoso:

Su pronóstico, confirmado en diferentes estudios^{66,364,376,377}, es excelente respecto al del carcinoma ductal NOS. La supervivencia tras mastectomía, a los 5 años oscila entre el 84-100%^{377,378}, a los 10 años es del 90% y a los 15 del 85%³⁷⁹.

Las formas puras tienden a ser menores y tienen menor incidencia de afectación ganglionar metastásica^{66,67,377,378,380}. Se han descrito en el carcinoma mucinoso puro recurrencias tardías^{376,381,382} de hasta 25-30 años^{382,383}. En una serie con seguimiento medio de 16 años, el 27% de las pacientes murieron de carcinoma después de 12 años de la intervención primaria³⁸¹.

Carcinoma cribiforme:

Aunque su frecuencia dentro del total de los carcinomas de mama es muy pequeña (0.8% aproximadamente), representan un tipo importante ya que pueden ser fácilmente reconocidos y presentan un excelente pronóstico^{74,369}, a pesar de que suelen ser muy grandes en el momento del diagnóstico.

Las pacientes con formas puras tienen menor tendencia a presentar invasión ganglionar axilar que las portadoras de formas mixtas⁷⁴ o de carcinoma ductal invasivo NOS⁷⁵. En una serie de 34 pacientes con seguimiento comprendido entre 10-21 años no se presentaron muertes en las portadoras de formas clásicas. En las mujeres con la variante mixta se ha descrito una supervivencia a los 12.8 años del 62%⁷⁴.

Carcinoma papilar:

En este tipo de carcinoma las metástasis axilares son poco frecuentes; en general, están en consonancia con el grado histológico y, cuando se presentan, no interesan a más de 3 ganglios³⁸⁴. El pronóstico por lo general es más favorable que el del carcinoma ductal infiltrante NOS. Las recurrencias, cuando se presentan, suelen hacerlo después de los 5 años.

Carcinoma con metaplasia:

Las recidivas locales tras tumorectomía son frecuentes, particularmente en tumores con componente heterólogo, presentándose en 2 de cada 3 pacientes⁸⁵. Se desconoce el valor pronóstico del tipo específico de metaplasia, debido a la escasez de las muestras.

Carcinoma escamoso:

El pronóstico tras mastectomía y linfadenectomía es similar al del carcinoma ductal NOS. La mayoría de las pacientes no presentan metástasis axilares. Entre las mujeres con ganglios negativos menos del 40% mueren por la enfermedad. La mayoría se encuentran vivas y libres de enfermedad⁸³.

Carcinoma adenoide quístico:

En la mayoría de casos descritos la mastectomía ha sido curativa, siendo muy escasas las recidivas locales y metástasis sistémicas^{98,385-387}.

La diseminación tumoral suele ser tardía y sin compromiso ganglionar axilar^{98,386,388}.

Las recurrencias locales se han presentado en pacientes tratadas con tumorectomía, siendo el intervalo de recurrencia muy variable^{389,390}.

Carcinoma con células gigantes tipo osteoclasto:

Se han descrito metástasis axilares en 1/3 de los casos. Las células osteoclásticas pueden estar ausentes en las metástasis¹⁰⁴. Aproximadamente, 2/3 de los casos descritos se encuentran libres de enfermedad en el momento de su descripción, pero los seguimientos rara vez superan los 5 años.

Carcinoma secretor:

En la mayoría de las pacientes, el curso biológico después del tratamiento ha sido favorable. La mayoría de mujeres libres de enfermedad han sido tratadas con mastectomía, pero también se ha encontrado una alta tasa

de curación con la tumorectomía^{58,391}. Las metástasis axilares son poco frecuentes, siendo el riesgo de compromiso ganglionar igual en la niña que en la mujer adulta³⁹².

Carcinoma quístico hipersecretor:

Se conoce muy poco acerca de esta variante excepcional de carcinoma de mama. El curso clínico de la enfermedad es totalmente superponible al carcinoma ductal infiltrante NOS¹⁰⁸.

Carcinoma apocrino:

El cambio apocrino puede sorprenderse localmente en la mayoría de los principales tipos de carcinoma y su presencia no tiene ninguna repercusión pronóstica.

Carcinoma con hallazgos neuroendocrinos:

Existe muy poca información acerca del pronóstico de estos tumores. Casi el 50% de las pacientes presentaban metástasis axilares en el momento del diagnóstico^{12,393,394}.

Carcinoma rico en glucógeno:

Más del 50% de las mujeres presentaban metástasis axilares en el momento del diagnóstico. El pronóstico general parece ser más desfavorable que el del carcinoma ductal NOS cuando se comparan lesiones por estadios¹²⁵.

7. RECEPTORES DE ESTROGENOS

A partir de los trabajos de Jensen y Jacobson que demostraron por primera vez la presencia de receptores de estrógenos (RE) en tejido estrogénico diana³⁹⁵, numerosos autores han comprobado que la distribución de hormonas esteroideas marcadas con materiales radioactivos seguía, en los animales de experimentación, patrones desiguales, concentrándose de forma selectiva en aquellos órganos que fisiológicamente respondían a estímulos esteroideos: útero, vagina y glándulas mamarias de la especie humana³⁹⁶. En 1961, Folca³⁹⁷ demostró que también algunos cánceres de mama humanos captaban estrógenos marcados cuando se administraban por vía intravenosa. Diversos autores³⁹⁵⁻³⁹⁸ demostraron in vitro que el material radioactivo captado por las células tumorales quedaba localizado en el interior del núcleo celular y que su transporte hacia él requería la presencia de proteínas citoplásmicas específicas denominadas receptores de estrógenos.

Cuando ocurre una transformación neoplásica, las células diana pueden retener total o parcialmente los mecanismos de acción hormonal. Si las células conservan los receptores esteroideos, como ocurre en los tumores hormono-dependientes, su crecimiento podrá ser controlado mediante manipulaciones endocrinas. Pero si no los conserva, no será reconocido por las hormonas circulantes, en cuyo caso, desaparece el control hormonal.

Se sabe que existen al menos, dos tipos de RE con distinta afinidad por los estrógenos^{399,400}. El tipo I, "verdadero" receptor, es el que suele determinarse habitualmente en las muestras, con una gran afinidad por los estrógenos y el

tipo II o receptor de "baja afinidad", que se encuentra en el citoplasma y en el núcleo y que representa un grupo diferente de proteínas descritas por primera vez en el útero de la rata en 1978⁴⁰¹, cuyo significado funcional no está muy claro todavía.

Durante todos estos años se han ido desarrollando distintos métodos para la medición del nivel de receptores proteicos intracelulares⁴⁰²⁻⁴⁰⁵, con técnicas basadas en la demostración de alguna de sus características fisicoquímicas.

Las técnicas bioquímicas fueron las primeras en desarrollarse y actualmente se consideran el "standard" para comparar otros métodos. Se fundamentan en la demostración de afinidad y especificidad de la unión hormona-receptor mediante la utilización de trazadores radioactivos, mediante incubaciones paralelas de extractos del tumor con el esteroide marcado, con y sin adición de un extracto de hormona fría, a fin de valorar la unión no específica. La separación de fracciones de hormona libre y unida al receptor se realiza mediante absorción en carbón dextrano (la más utilizada)^{406,407} o en un gradiente de densidad de sacarosa. Posteriormente, se mide los niveles de hormona unida y se calcula la cantidad de receptor para la misma.

Este método presenta, sin embargo, unas limitaciones intrínsecas importantes⁴⁰⁷⁻⁴¹³ que pueden influir en los resultados, como disociación del enlace no covalente del marcador, contaminación por metales pesados o degradación del receptor durante el almacenamiento y/o procesamiento. Además, requieren el uso de radioligandos, por lo que se necesita una

sofisticada instrumentación y personal altamente especializado. Son además, caros, difíciles de realizar e interpretar, y necesitan de cantidades considerables de tejido; al realizarse con extractos hísticos, suponen un muestreo inseguro, pues el homogenado puede incluir componente epitelial, tanto tumoral como benigno, y no permite la realización de estudios retrospectivos.

Estas consideraciones prácticas hicieron que surgieran los métodos morfológicos, fundamentalmente el histoquímico y el inmunocitoquímico, que además de su fácil aplicación, permitían la visualización exacta de la fuente de receptores y, por tanto, una estimación del grado de heterogeneidad tumoral⁴¹⁴⁻⁴²¹. De ellos, el método introducido por Lee en 1978⁴¹⁷, basado en el empleo de conjugados de estrógenos fluoresceinados, se ha utilizado extensamente, pero ha sido objeto de numerosas críticas basadas en sus fundamentos bioquímicos^{399,419,422-424}.

La producción de anticuerpos monoclonales altamente específicos para los RE por Greene y cols.^{415,425,426} y el paralelo desarrollo de la técnica inmunoperoxidásica para su localización proporcionó un innovador método histológico, el método inmunohistoquímico, que puede ser realizado en un laboratorio hospitalario "normal". Esta técnica está libre de la mayoría de los inconvenientes asociados a los métodos anteriores y puede aplicarse a cortes de congelación^{412,427-430}, tejido incluido en parafina⁴³¹⁻⁴³⁴ o preparaciones citológicas, encontrándose una excelente correlación entre este método y los estudios bioquímicos.

La principal aplicación de la determinación de los RE ha sido la selección de pacientes que se van a beneficiar de un tratamiento endocrino. La primera referencia sobre la terapia hormonal en el carcinoma de mama apareció en 1896, cuando Beatson⁴³⁵ publicó la remisión de un cáncer de mama metastásico tras ooforectomía. El interés por esta forma de tratamiento fue aumentando a raíz de las publicaciones de Huggins y Bergenstal⁴³⁶ en 1952 y Luft y cols.⁴³⁷ en 1958 sobre la eficacia de la adrenalectomía y la hipofisectomía en el tratamiento de las metástasis de carcinomas mamarios.

A raíz de la descripción de los RE en los tumores de mama humanos por Jensen⁴³⁸ la correlación entre contenido en RE y respuesta clínica a la terapia endocrina ha sido sólidamente establecida por numerosos autores⁴³⁹⁻⁴⁴².

Así, se sabe que aproximadamente un 45-55% de los tumores primarios de mama son RE(+)⁴⁴³⁻⁴⁴⁵ y que de ellos un 55-70% responderá a la terapia endocrina⁴⁴⁶, al igual que un 5-10% de los tumores RE(-)⁴⁴⁷. Los motivos de la respuesta de estas pacientes RE(-) a la terapia hormonal (o por qué algunos tumores hormonodependientes no expresan RE) pueden ser muy diversos: heterogeneidad del tumor en el contenido de RE, labilidad de los receptores, producción de mutaciones genéticas⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰. La explicación de por qué un subgrupo de pacientes con RE(+) no responden a la terapia hormonal podría ser que en el proceso de desdiferenciación algunas células tumorales, aunque posean receptores estrogénicos, éstos hayan perdido la capacidad de respuesta al estímulo hormonal.

Por otro lado, se ha demostrado que la síntesis de receptores de progesterona (RPg) es un proceso estrógeno-dependiente y que la presencia de RPg puede considerarse reflejo de un mecanismo de RE funcionalmente activo, por lo que parece lógico asumir que la determinación de ambos receptores permite predecir mejor la respuesta al tratamiento endocrino. De hecho, numerosos ensayos clínicos han confirmado esta hipótesis, y en los tumores que poseen ambos tipos de receptores, la respuesta a los tratamientos hormonales es del 75-80%^{446.451}.

Sin embargo, la utilidad de las determinaciones de receptores no se limita a la predicción de la respuesta del cáncer de mama a la terapia endocrina. Se ha demostrado también que la presencia o ausencia de los mismos en el tumor primario es un factor pronóstico de gran valor.

Así, se ha asociado la presencia de RE con diferentes características histológicas y celulares indicadoras de pronóstico favorable. Los tumores positivos para RE suelen tener bajo grado histológico de malignidad, ausencia de necrosis tumoral y buen grado nuclear^{172.452-454}. Respecto a la velocidad de proliferación tumoral, se ha observado que los tumores RE(+) tienden a tener índices de marcaje con timidina más bajos, menor fracción de fase S^{455.456}, niveles más bajos de Ki 67^{457.458} y suelen ser diploides más que aneuploides⁴⁵⁶. Se ha relacionado también la presencia de RE con un menor tamaño del tumor⁴⁵⁹⁻⁴⁶³; no obstante, no se ha podido demostrar relación significativa entre contenido en RE y afectación ganglionar linfática^{453.457.460.461.464.465} o estadio clínico TNM⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶.

Otro dato que apoya el carácter favorable de los RE como factor pronóstico es el hecho de que dos variantes histológicas de carcinoma de mama, consideradas como de buen pronóstico (los carcinomas tubulares y mucinosos) suelen ser predominantemente RE(+)^{464,467}.

Respecto a su influencia en la supervivencia se ha observado que las mujeres con tumores RE(+) tienen un mayor intervalo libre de enfermedad y mayor supervivencia global que aquellas con tumores que carecen de los mismos. Valagussa⁴⁶⁸ demostró que pacientes con ganglios negativos y RE(-) tienen un intervalo libre de enfermedad semejante al de las mujeres con ganglios linfáticos positivos, por lo que este dato puede servir de base para seleccionar subgrupos de pacientes con ganglios negativos que puedan tener una evolución más desfavorable y podrían beneficiarse de una terapéutica adyuvante.

La presencia de Rpg también se ha mostrado como factor de buen pronóstico^{469,470} y, aunque algunos autores han sugerido que su determinación tiene mayor valor pronóstico que la de los RE⁴⁵¹, la mayoría de los investigadores coinciden en que el estado de los RPg no mejora significativamente el valor predictivo de los niveles de RE aisladamente⁴⁷¹⁻⁴⁷⁴, por lo que se requieren estudios a más largo plazo para definir con claridad la superioridad de uno sobre otro, en cuanto a su influencia en el pronóstico de esta enfermedad.

8. MARCADORES TUMORALES

8.1. Catepsina D:

La catepsina D es una proteasa lisosomal, descrita en 1979 por Westley y Rochefort. Se sintetiza en las células como una proenzima de 52 Kd, que posteriormente se transforma en una molécula de 48 Kd que sufre un desdoblamiento en dos moléculas de 34 y 14 Kd. En las células mamarias normales la mayor parte de la procatepsina se procesa hacia la forma madura del enzima en los lisosomas y sólo se excreta una pequeña cantidad de procatepsina D. En las líneas celulares de carcinoma de mama, por el contrario, el procesamiento de la proenzima está retardado, por lo que ésta se acumula en la célula y es secretada al menos en un 45%⁴⁵⁷.

Tanto la proenzima como las formas procesadas de 48 y 34 Kd son activas enzimáticamente a pH ácido, con un pH óptimo de 3.5, sin embargo, se ha demostrado que tienen poca o ninguna actividad enzimática a pH fisiológico. Dos acciones han sido demostradas en cultivos celulares: una actividad proteolítica sobre varios sustratos, incluyendo la membrana basal y proteoglicanos después de su autoactivación y una actividad mitógena autocrina. Ambas acciones sugieren que la catepsina D debe jugar un papel importante en la invasión tumoral y desarrollo de metástasis a distancia, degradando el estroma que envuelve al tumor y favoreciendo la diseminación de las células tumorales, aunque el mecanismo exacto in vivo sigue siendo desconocido.

Aunque en un principio se observó que la producción de catepsina D aumentaba en presencia de estrógenos, se ha demostrado recientemente que

líneas celulares de carcinoma de mama RE(-) también inducen su síntesis por lo que la idea original de que los niveles de catepsina D podrían ser útiles para identificar tumores hormonodependientes no es del todo correcta^{476,477}. Hoy se sabe que el control de la expresión de catepsina D es muy complejo, ya que otros mitógenos (i.e. EGF) han demostrado también incrementar los niveles de catepsina D *in vitro*⁴⁷⁸. Por otro lado, estudios realizados en cultivos de tejidos, sugieren que la catepsina D en sí misma puede actuar directamente como factor de crecimiento polipeptídico.

Se han realizado diversos estudios encaminados a determinar la relación entre niveles de catepsina D en el tejido tumoral y el pronóstico de las pacientes. Estos estudios están realizados con 4 métodos diferentes, tres de los cuales miden los niveles de catepsina D en el citosol de las células y otro se basa en la determinación inmunohistoquímica de los niveles de catepsina en cortes de tejido fijado en formol e incluido en parafina.

Ya que cada uno de estos cuatro tipos de ensayos miden aspectos distintos de la expresión de catepsina D, que pueden también variar en el significado pronóstico, los resultados de los estudios clínicos deben ser revisados y comparados en relación al método empleado.

De los tres métodos que miden los niveles citosólicos de catepsina D el más utilizado es el desarrollado en la Universidad de Montpellier, que se realiza generalmente mediante una técnica ELISA y que cuantifica la suma de la forma activa del enzima (34 Kd) y sus precursores (52 Kd y 48 Kd). Este método ha sido el empleado por Thorpe⁴⁷⁹, Spyratos⁴⁸⁰, Pujol⁴⁸¹ y otros⁴⁸²⁻⁴⁸⁴.

Un segundo método, el utilizado por Tandom et al.⁴⁸⁵, se basa en la técnica Western blot y mide sólo la cantidad de enzima activo (34 Kd) excluyendo las formas de proenzima.

El tercer método es el desarrollado por Kute et al.⁴⁸⁶ que mide la actividad proteolítica de la catepsina D contra un sustrato proteico y que ha proporcionado valores que se relacionan con los obtenidos con la técnica ELISA.

La técnica inmunohistoquímica fue empleada en primer lugar por Henry et al.⁴⁸⁷, utilizando un anticuerpo policlonal para identificar las células tumorales catepsina D(+) en cortes de material incluido en parafina.

Aunque la catepsina D ha sido ampliamente invocada como un marcador de pobre pronóstico en el cáncer de mama, la literatura no apoya de forma inequívoca esta idea. Así, aunque los estudios inmunoenzimáticos, que miden los niveles de catepsina D en el citosol de las células tumorales, han encontrado que concentraciones elevadas se asocian con mal pronóstico e incremento del riesgo de metástasis⁴⁷⁹⁻⁴⁸¹, el estudio inmunohistoquímico de Henry⁴⁸⁷ señala que la positividad en la tinción para catepsina D se asocia a mejor pronóstico en las pacientes con metástasis ganglionares, así como a una supervivencia más prolongada en el subgrupo de pacientes con tumores RE(+) y cat.D(+).

Sin embargo, los resultados publicados por Domagala et al.⁴⁸⁸ con método inmunohistoquímico no muestran una relación significativa entre la expresión de catepsina D en las células tumorales y la supervivencia a 60 y 90 meses, tanto en pacientes considerados como un único grupo, como cuando

se subdividen en función del estadio ganglionar. A la vista de las diferencias en los resultados entre el trabajo de Henry⁴⁸⁷ y el suyo, Domagala et al. sugieren que no sería la expresión de catepsina "per se" la que se asociaría a mayor o menor supervivencia, sino que el valor pronóstico de la catepsina D dependería de la vía de síntesis de ésta. Así, si la expresión de catepsina D es debida a una regulación directa activada por los estrógenos en tumores RE(+) se relacionaría con pronóstico favorable, mientras que si la expresión de catepsina D es debida a la estimulación de su producción por factores de crecimiento autocrinos, nos encontraríamos con un grupo de tumores RE(-), Cat.D(+) en los que la expresión de catepsina D supondría un peor pronóstico.

Como conclusión, parece que de momento, la catepsina D por sí sola no es un marcador pronóstico útil, pero podría ayudar a clasificar las pacientes con otros factores pronósticos (como RE, vimentina) conocidos⁴⁸⁸.

8.2. Metalotioneína:

La metalotioneína es una proteína intracelular de bajo peso molecular, con alto contenido en restos cistina, que se une al zinc, cobre y cadmio⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹. Aunque su papel biológico específico es desconocido, se sabe que interviene en gran número de procesos fisiológicos, como la detoxificación de cadmio y otros metales pesados, la regulación del metabolismo del zinc y cobre y, en especial, en el almacenamiento de metales esenciales para la síntesis de apoenzimas⁴⁹²⁻⁴⁹⁵. Otras funciones sugeridas incluyen la participación en el desarrollo embrionario, la diferenciación y proliferación celular y la carcinogénesis.

Se sabe que se encuentra en un gran número de células normales, como los hepatocitos, especialmente durante el desarrollo fetal y las primeras etapas del desarrollo postnatal, y que sus niveles van disminuyendo paulatinamente hasta llegar a concentraciones muy bajas en la vida adulta⁴⁹⁶⁻⁴⁹⁸.

Su síntesis en los tejidos animales puede ser inducida por diferentes vías, incluyendo la exposición a iones metálicos y factores endógenos (glucocorticoides, interferon, interleukina-1 y vitamina D3), así como en relación con situaciones fisiológicas de stress y cambios endocrinos.

Se ha sugerido que el perfil de desarrollo de la metalotioneína es similar al de otros productos de genes oncofetales y que, por lo tanto, podría ser utilizado como un marcador de agresividad tumoral. Además se ha señalado que la producción de metalotioneína por las células tumorales podría ser un factor importante en la resistencia a drogas quimioterápicas que contienen metales en sus moléculas⁴⁹⁹.

Diversos autores han conseguido identificar metalotioneína en las células tumorales de algunas neoplasias humanas, entre ellas el carcinoma embrionario testicular⁵⁰⁰ y tumores tiroideos⁵⁰¹. Más recientemente Schmidt et al. en 1993⁵⁰² han demostrado inmunohistoquímicamente la presencia de metalotioneína en el cáncer de mama y han encontrado una relación estadísticamente significativa entre hiperexpresión de metalotioneína y desarrollo de metástasis en carcinomas ductales invasivos RE(-), pero no en los RE(+). Aunque los trabajos realizados hasta la fecha sobre expresión de metalotioneína en carcinomas de mama son muy escasos, los resultados de los mismos coinciden básicamente. Así, tanto Fresno⁵⁰³ como Bier⁵⁰⁴ encuentran

porcentajes similares de positividad para metalotioneína, 47% y 50% respectivamente, principalmente en el grupo de carcinomas ductales invasivos. Por otro lado, Fresno demuestra también una relación inversa entre la expresión de metalotioneína y el estado de los RE y una relación directa entre tinción de metalotioneína y grado histológico de malignidad. Respecto al significado pronóstico, todos los autores que han investigado en este sentido^{502-503,505}, coinciden en considerar la expresión de metalotioneína como un factor de mal pronóstico, ya que todos han encontrado relación estadísticamente significativa entre hiperexpresión de metalotioneína y acortamiento de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad.

Como conclusión, parece que la expresión de metalotioneína podría utilizarse como marcador biológico en el cáncer de mama de tumores agresivos y poco diferenciados. Sin embargo, se requieren investigaciones futuras para aclarar los complejos mecanismos que contribuyen a la hiperexpresión de metalotioneína en las células tumorales y su posible implicación en los mecanismos de resistencia a las drogas.

8.3. Vimentina:

La expresión de filamentos intermedios ha sido utilizada para clasificar las neoplasias humanas. En general, las células neoplásicas conservan el tipo de filamento intermedio característico de la célula de la que proceden⁵⁰⁶, pero también se han descrito casos de tumores que expresan tipos adicionales de filamentos intermedios. La expresión de vimentina, tradicionalmente

considerada como marcador de las células de origen mesodérmico⁵⁰⁷, ha sido descrita en algunos tumores epiteliales⁵⁰⁸, atribuyéndose a este cambio una interpretación regresiva o más primitiva en la diferenciación celular⁵⁰⁹.

Aunque hasta el momento el número de estudios que han intentado establecer la utilidad de la expresión de vimentina como factor pronóstico en el cáncer de mama es muy limitado, los resultados son bastante concordantes. Así, se ha encontrado relación positiva entre expresión de vimentina y elevado índice de proliferación celular (medido mediante Ki67)^{510,511}, positividad para EGFR⁵¹² y alto grado histológico de malignidad^{511,513}.

En cambio, se ha señalado relación inversa entre expresión de vimentina y estado de los RE, de manera que los tumores que expresan vimentina son siempre RE(-)⁵¹⁰⁻⁵¹². Este dato concuerda también con los resultados obtenidos en los cultivos de líneas celulares^{514,515}.

De esta forma, la expresión de vimentina aparece asociada a indicadores de mal pronóstico bien conocidos^{306,516-520}, por lo que podríamos estar ante un nuevo marcador para los tumores de mama que, independientemente del estadio ganglionar y del grado histológico, identificaría tumores con un comportamiento más agresivo, que podrían beneficiarse de una terapia coadyuvante precoz. El valor del análisis de vimentina reside, además, en su sencilla utilización en material incluido en parafina, permitiendo estudios retrospectivos en pacientes con resultados clínicos conocidos. Sin embargo, son necesarios estudios con seguimientos a largo plazo para poder establecer el valor definitivo de este parámetro como factor pronóstico en el cáncer de mama.

9.- ONCOGENES Y ANTIONCOGENES.

9.1. HER - 2 / neu:

También conocido como c-erbB-2, es un oncogen que pertenece a la familia c-erbB-2 like y ha sido el oncogen más estudiado en el carcinoma de mama. La proteína producto de este protooncogen es un receptor molecular de membrana, de 185 kD con actividad tirosina quinasa. Su estructura es en parte similar a la del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pero su gen ha sido localizado en un cromosoma diferente⁵²¹.

Slamon y cols.⁵²² y Tandom y cols.⁵²³ observaron que la expresión o amplificación de este oncogen presentaba valor pronóstico independiente, en términos de intervalo libre de enfermedad y supervivencia global, en pacientes con carcinoma de mama con ganglios axilares positivos pero no en pacientes con ganglios negativos. Otros trabajos de diversos autores confirman esta observación⁵²³⁻⁵²⁸.

Recientemente, Borg y cols.⁵²⁷ han determinado simultáneamente la amplificación y expresión del oncogen HER-2 en más de 300 pacientes con carcinoma de mama en diferentes estadios. De forma similar a los estudios precedentes, en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos, ni la amplificación ni la hiperexpresión del oncogen se asociaron con evolución de la enfermedad. A la luz de estos datos, parece prudente concluir que, aunque probablemente existe alguna relación entre la hiperexpresión de c-erbB-2 y un peor pronóstico, ésta es mucho menos importante de lo que se pensó en un principio.

Un aspecto al parecer más prometedor que su valor pronóstico, sugerido recientemente por De Potter⁵²⁹ es la posibilidad de que la proteína producto de este oncogen (p185) juegue un importante papel en la movilidad celular, facilitando la diseminación de las células tumorales entre el tejido normal y el desarrollo de metástasis.

Esta idea viene apoyada por el hecho de que sólo se ha podido demostrar la hiperexpresión de este oncogen mediante técnicas inmunohistoquímicas en las células malignas (nunca en lesiones premalignas, como la hiperplasia, ni en las células normales)⁵³⁰. Sin embargo, técnicas de M.E. han conseguido demostrar que existe una expresión "normal" de p185 en la membrana de las células del epitelio glandular normal y que ésta se produce exclusivamente en las organelas celulares relacionadas con la motilidad como los microvillis y pseudopodos⁵³¹.

De Potter^{529,532} observa también hiperexpresión de este oncogen en casi un 100% de los casos de enfermedad de Paget y en aproximadamente un 50% de los carcinomas ductales in situ, sugiriendo que los queratinocitos liberarían una molécula capaz de atraer por quimiotaxis a las células tumorales con neu-hiperexpresión, lo que explicaría la diseminación a la epidermis que ocurre en la enfermedad de Paget y porqué algunos tipos de carcinoma ductal in situ tienden a extenderse más rápidamente y recurrir con más frecuencia que otros.

A la luz de estos datos, el papel del HER-2 en el manejo clínico del carcinoma de mama permanece confuso en el momento actual. Aunque existe acuerdo general en que niveles elevados de HER-2 en mujeres con axila

positiva suponen un peor pronóstico, esta información tiene sólo importancia relativa ya que estas pacientes son siempre candidatas a la terapia adyuvante.

Por otro lado, la relación entre la proteína p185 y la motilidad representa una importante e innovadora posibilidad terapéutica, mediante el empleo de antagonistas con afinidad para el receptor, que por el momento permanece sin resolver hasta que se realicen más estudios a nivel de patología molecular sobre este fenómeno.

9.2. Proto-oncogenes ras.

La familia de proto-oncogenes ras (Ha-ras, Ki-ras y N-ras) codifican una proteína de 21 kD (p21) localizada en la superficie interna de la membrana plasmática. Esta proteína posee actividad GTPasa intrínseca y se cree que funciona como transductor de señales intracitoplásmicas.

Aunque se sabe que los carcinomas de mama expresan productos del oncogen ras, han sido muy pocos los estudios que han intentado correlacionar esta expresión con el pronóstico de las pacientes. Querzoli y cols.⁵³³ evaluaron la hiperexpresión de esta oncoproteína en 142 carcinomas primarios de mama y encontraron una fuerte correlación con la presencia de metástasis ganglionares .

Otros dos estudios independientes han mostrado que la expresión de p21 en los tumores de mama se asocia con la existencia de afectación ganglionar en el momento del diagnóstico y con acortamiento del tiempo de recurrencias y de supervivencia global^{534,535}.

Estos datos preliminares sugieren cierto valor de las ras oncoproteínas en la predicción de la agresividad biológica de los tumores mamarios.

9.3. c-myc:

El producto del proto oncogen c-myc es una fosfoproteína nuclear que interviene de algún modo en la proliferación celular. Varios autores han observado amplificación de c-myc en tumores primarios de mama. La mayor de estas series, encuentra amplificación de este gen en el 31% de los tumores analizados⁵³⁶. Varley y cols. han publicado un estudio en el que se señala asociación entre alteraciones genéticas en c-myc y un empeoramiento del pronóstico a corto plazo; no obstante, estos hallazgos no han podido ser corroborados por otros grupos^{525,537,538}. En el momento actual no está claro si la amplificación de c-myc está específicamente implicada en la patogénesis del cáncer de mama o sólo es un reflejo de la aneuploidia, por lo que su utilidad como factor pronóstico requiere investigaciones futuras.

9.4. p53:

El gen supresor de tumor p53 (también conocido como TP53) codifica una fosfoproteína nuclear que interviene en la regulación de la proliferación de células normales.

Aunque el mecanismo de supresión tumoral del p53 es desconocido, datos recientes sugieren que puede inhibir la proliferación celular indirectamente, mediante la regulación de la transcripción de otros genes no identificados⁵³⁹⁻⁵⁴². La existencia de mutaciones en este gen es el defecto

genético encontrado más frecuentemente en el cáncer humano. La mayoría de estas mutaciones acaban produciendo una proteína no funcional que se acumula en el núcleo de las células tumorales, alcanzando concentraciones que permiten su detección mediante las técnicas standard de inmunohistoquímica.

De esta forma, la IHQ ha sido utilizada para medir los niveles de proteína p53 mutante en muchos tipos de tumores⁵⁴³⁻⁵⁴⁷, considerándose que la demostración de inmunorreactividad para la misma es indicativo de alteración en el gen y de proliferación celular incontrolada^{548,549}.

Este gen fue asociado por primera vez al carcinoma de mama humano en 1982, cuando Crawford y cols.⁵⁵⁰ publicaron que el 9% de las pacientes con carcinoma mamario, en especial aquellas con metástasis viscerales tenían anticuerpos circulantes para la proteína humana p53.

Aunque son pocos los trabajos realizados hasta el momento^{546,551-555}, que hayan investigado directamente la relación entre mutaciones del gen p53 y evolución clínica de los tumores, los resultados son muy conflictivos; la mayoría de los autores coinciden en asociar las mutaciones del gen con un peor pronóstico así como con otros factores pronósticos del mismo signo.

Cattoretti en 1988⁵⁴⁶, publicó la asociación entre la inmunopositividad al p53 y alto grado histológico de malignidad, negatividad para RE y positividad para EGFR. Davidoff⁵⁵¹ ha demostrado la asociación entre las mutaciones de p53 y un estadio avanzado de la enfermedad y negatividad para los receptores de progesterona.

Los trabajos más recientes sobre este aspecto apoyan también estos datos. Thor y cols.⁵⁵⁶ en un estudio publicado en 1992, encontraron una asociación estadísticamente significativa entre acumulación de proteína p53, negatividad a RE, alto grado nuclear de malignidad, acortamiento en el tiempo de aparición de las metástasis y menor supervivencia general.

Craig y cols.⁵⁵⁷, en un trabajo publicado en 1993, realizado en 700 pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos observaron que la expresión de la proteína mutante p53 se asociaba a velocidad de proliferación celular elevada, menor intervalo libre de enfermedad y disminución de la supervivencia general. Barnes y cols. encuentran también una relación inversa entre la expresión de p53 y la supervivencia global e intervalo libre de enfermedad, tanto en pacientes ganglio negativas como en las ganglio positivas⁵⁵⁸.

9.5. Gen nm23:

Este gen fué identificado en 1988 por Steeg en una línea celular de melanoma⁵⁵⁹ con menor potencial metastásico.

En el carcinoma de mama se ha encontrado también relación inversa entre los niveles de nm23 y metástasis ganglionares^{560,561}, así como relación directa entre la hiperexpresión de este gen y mayor intervalo libre de enfermedad y mayor supervivencia global en pacientes sin afectación ganglionar⁵⁶⁰.

10.-OTROS FACTORES.

10.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico:

El factor de crecimiento epidérmico es una hormona polipeptídica que estimula la proliferación celular (mitógeno) mediante su unión específica a un receptor localizado en la membrana celular, conocido como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, epidermal growth factor receptor). El receptor es una glicoproteína de 170 kD⁵⁶² con actividad tirosina quinasa⁵⁶³ y un importante parecido estructural con el producto del oncogen erbB-2⁵⁶⁴.

Parece que los estrógenos pueden estimular la liberación de estos factores de crecimiento en líneas celulares de carcinoma de mama y estos a su vez mediar el crecimiento del tumor mediante su unión al receptor⁵⁶⁵, por lo que se propuso que la cantidad de receptores expresada por un tumor podría reflejar su potencial de crecimiento y por ello su agresividad clínica. Diversos estudios han investigado esta posible relación. La mayoría de los autores coinciden en señalar que existe relación inversa entre niveles de EGFR y de RE, de manera que los tumores EGFR(+) tienden a ser RE(-)⁵⁶⁶⁻⁵⁷⁰. Otros autores han encontrado también relación entre positividad del EGFR e invasión linfática⁵⁶⁶ y también con un grado histológico alto⁵⁶⁷. Así mismo , también se ha señalado relación significativa entre niveles de EGFR y acortamiento del intervalo libre de enfermedad y disminución de la supervivencia global^{565,567}.

Las mujeres con tumores RE(-) pueden separarse en dos subgrupos: las que tienen EGFR(+) con un pronóstico relativamente peor, y las que son EGFR(-) cuyo pronóstico es similar a las pacientes positivas para RE.

Nicholson⁵⁷¹ ha sugerido que el estado del EGFR puede ser útil también para predecir la respuesta a la terapia endocrina, ya que el 30% de las mujeres con tumores EGFR(-) responden al tratamiento con tamoxifeno, mientras que sólo lo hacen el 8% de las que presentan EGFR(+).

10.2. Proteínas del shock térmico (HSP 27, HSP 70, HSP 90):

Del inglés "heat shock proteins", son un grupo heterogéneo de proteínas cuya síntesis se induce cuando las células están sometidas a diversos tipos de stress. Estas sustancias parece que pueden contribuir a la supervivencia celular cuando las células se exponen a la acción del calor, toxinas, hipoxia o deprivación de nutrientes.

Se han encontrado niveles elevados en las células del carcinoma de mama y su presencia se ha relacionado con un mayor riesgo de recurrencia^{529,572-574}. No obstante, a pesar de estos hallazgos, su valor como factor pronóstico no está confirmado y sigue siendo tema para futuras investigaciones.

10.3. Ps2:

Es una proteína regulada por los estrógenos, cuya función no ha sido aún aclarada⁵⁷⁵ y cuya expresión se relaciona con un estado de RE(+). Su presencia se ha asociado con un intervalo libre de enfermedad mayor y supervivencia general más prolongada, tanto en pacientes con ganglios

linfáticos positivos como en las que no presentan afectación ganglionar⁵⁷⁶.

Se ha observado también que su valor pronóstico en las pacientes con RE(+) es mayor si coexiste un estado positivo de los receptores de progesterona, identificando dentro de esta categoría un subgrupo de pacientes pS2(+) con mayor supervivencia, por lo que se cree que la expresión de esta proteína podría ser el reflejo de unos receptores de estrógeno funcionalmente intactos. Otros autores han encontrado que podría servir también para identificar un subgrupo de tumores RE(+) con mayores probabilidades de responder a la terapia endocrina⁵⁷⁷.

La proteína pS2 es un factor pronóstico de reciente introducción que merece ser estudiado más extensamente dada su fácil determinación, valor pronóstico en estudios iniciales y posibles repercusiones terapéuticas⁵⁷⁶.

10.4. Receptores de laminina:

Son moléculas de adhesión que interaccionan con el componente laminina de la membrana basal. Se ha señalado que su expresión en las células tumorales podría estar implicada en la capacidad para penetrar e invadir la membrana basal y, por tanto, ser un reflejo de la capacidad metastásica.

Sin embargo, se ha observado inexplicablemente que las pacientes con carcinoma de mama que presentan receptores de laminina tienen un 40% menos de recurrencia a los 36 meses, pero no una diferencia significativa en la supervivencia global⁵⁷⁸.

10.5. La expresión de la proteína relacionada con la haptoglobina (Hpr) es frecuente en el embarazo y en el carcinoma de mama por razones desconocidas. En estudios realizados en pequeñas series, niveles elevados de Hpr se han asociado a una recurrencia precoz en tumores en estadio I y II⁵⁷⁹.

El valor predictivo de este parámetro se incrementa cuando se combina con el estado de los receptores de progesterona. Una potencial ventaja de este marcador es que puede ser medido en el suero.

10.6. Diversos autores han publicado también que las pacientes con tumores que contienen receptores para somatostatina presentan un intervalo libre de enfermedad significativamente más largo que las pacientes con receptores negativos ⁵⁸⁰.

2. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en la mujer. A pesar de los continuos trabajos de investigación y de los esfuerzos dedicados al diagnóstico precoz, aún no se ha conseguido mejorar, de forma significativa, la supervivencia global de estas mujeres.

El estadio ganglionar, el grado histológico, el tamaño tumoral y el estado de los receptores hormonales esteroideos son factores pronósticos útiles pero insuficientes, ya que los resultados obtenidos aplicando protocolos oncológicos de tratamiento son muy heterogéneos. La tasa de recidivas y/o metástasis en pacientes con ganglios negativos alcanza hasta el 30%. La existencia de micrometástasis axilares, no diagnosticadas en el estudio rutinario de las adenopatías, y la posible existencia de subpoblaciones tumorales debida a la inestabilidad genética de los tumores son algunas de las causas que pueden explicar estos fracasos del tratamiento, por lo que en la actualidad es necesario investigar factores pronósticos adicionales que permitan identificar subgrupos de pacientes con enfermedad más agresiva.

Guiados por esta idea, hemos investigado en el presente trabajo la expresión tisular de algunos de los "nuevos" factores pronósticos propuestos, tales como metalotioneína, catepsina D y vimentina, y su relación con los factores "clásicos", con el objetivo de evaluar su utilidad práctica.

3. MATERIAL Y METODOS

A. MATERIAL

En el presente trabajo se han recogido 115 casos de carcinoma de mama, diagnosticados entre los años 1988 y 1993. De los 115 casos, se rechazaron 5 por carecer de material adecuado para su estudio o por la imposibilidad de obtener la evolución clínica del enfermo. Los 110 casos restantes constituyen el material objeto del presente trabajo.

Todos los tumores procedían de piezas quirúrgicas de mastectomías y fueron debidamente fijadas en formol, tras lo cual se procedió a su tallado, descripción macroscópica e inclusión en bloques de parafina según la técnica de rutina.

De cada caso se seleccionó retrospectivamente el bloque más representativo.

B. METODOS

Se han realizado estudios clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos.

1. Estudios clínicos:

Se han revisado las historias clínicas de todas las enfermas, recogiendo en cada caso los siguientes datos:

- edad
- estado menopaúsico
- tamaño del tumor
- existencia de afectación ganglionar linfática en el momento del diagnóstico y número de ganglios afectados (estadío ganglionar).
- evolución clínica, distinguiendo entre intervalo libre de enfermedad (aparición de recidivas o metástasis) y supervivencia global (exitus). El seguimiento se cuantificó en meses.

2. Estudios histológicos

En cada bloque seleccionado se realizaron nuevos cortes, uno de los cuales se tiñó con hematoxilina-eosina. El resto de las secciones se reservaron para la realización de técnicas inmunohistoquímicas.

Varios cortes se recogieron en cristales silanizados, necesarios para las técnicas que requerían tratamiento previo con microondas.

El tipo histológico y el grado de diferenciación se evaluaron en el corte teñido con hematoxilina-eosina.

Las variedades histológicas se clasificaron según los criterios establecidos por la OMS³¹.

El grado histológico se estableció mediante el sistema recomendado por la OMS en 1968²²⁴ que valora numéricamente, de 1 a 3, la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y el número de mitosis/10 campos de gran aumento (CGA) (40X). Los intervalos para evaluar el número de mitosis fueron los siguientes:

1: tumores con < 10 mitosis /10 CGA,

2: tumores con ≥ 10 y < 20 ,

3: tumores con ≥ 20 mitosis/10 CGA.

La suma de estos tres parámetros da lugar a tres grados diferenciación con los siguientes intervalos:

- grado 1 (3-5)

- grado 2 (6-7)

- grado 3 (8-9)

3. Estudios inmunohistoquímicos

Los estudios inmunohistoquímicos se han realizado aplicando la técnica inmunoperoxidásica, método ABC (complejo estreptavidina-biotina), para material incluido en parafina, con distintos anticuerpos primarios. En la tabla A aparecen relacionados los anticuerpos primarios con la dilución utilizada y casa de referencia.

En 2 casos no pudo realizarse la determinación de RE en por carecer de material adecuado.

Método ABC (estreptavidina - biotina) ⁵⁸¹

- 1.- Desparafinar los cortes mediante dos baños de xileno de 15 minutos cada uno.
- 2.- Hidratar mediante pases de 5 minutos en una serie de alcoholes a concentraciones decrecientes.
- 3.- Lavar en agua destilada durante 5 minutos.
- 4.- Inhibir la peroxidasa endógena, con peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Lavar en agua destilada durante 5 minutos.
- 6.- Lavar en PBS , 3 pases de 5 minutos cada uno.
- 7.- Inhibir la tinción inespecífica de fondo, con suero normal de cerdo, diluido 1:10 en PBS, durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

- 8.- Posteriormente, y sin lavado intermedio, incubación con el anticuerpo primario específico a 4°C, durante 18-24 horas en cámara húmeda.
 - 9.- Al terminar la incubación, se espera a que los cortes estén a temperatura ambiente y se lavan en PBS (3 X 5 min.).
 - 10.- Incubar con el anticuerpo secundario biotinado (según concentración indicada por la casa suministradora), en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.
 - 11.- Lavado en PBS (3 cambios de 5 minutos).
 - 12.- Incubar con el complejo estreptavidina-biotina, preparado al menos 30 minutos antes de su uso, durante 20-30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
 - 13.- Lavar en PBS e introducir los cortes en un vaso de Coplin con este mismo tampón mientras se prepara el revelador.
 - 14.- Revelado con una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB) al 0,3%, a la que, tras ser filtrada, se le añade una gota de peróxido de hidrógeno 30%. El revelado se realiza bajo control microscópico, en un microscopio con sólo dos objetivos (4X y 10X).
- Cuando los anticuerpos primarios utilizados fueron RE y Ki67, la DAB se utilizó a doble concentración para aumentar la intensidad de la reacción.
- 15.- La reacción se detiene introduciendo los cortes en agua destilada, donde reciben varios lavados.
 - 16.- Contrateñir con hematoxilina diluida, deshidratar y montar en la forma habitual con DPX.

- Cuando se utilizaron RE y Ki67 como anticuerpos primarios se realizó tratamiento con microondas previo a la inhibición de la peroxidasa endógena, sumergiendo los cortes en un Coplin con tampón citrato 10 mM, pH 6 e introduciendo éste al baño María (en una cubeta de cristal con agua) en el microondas (3 veces durante 5 minutos, con un descanso de 1 minuto entre cada uno de ellos). Al terminar, se dejan los cortes en un Coplin con agua destilada, previamente calentada, hasta que se enfrían.

- En todos los casos se llevó un control negativo, en el que se sustituyó el anticuerpo primario por suero no inmune y un control positivo, previamente contrastado para garantizar la fiabilidad de la técnica.

En el caso de la vimentina, la no tinción de las células epiteliales benignas y la positividad de los fibroblastos y células endoteliales se consideró como control negativo y positivo interno respectivamente.

- En todos los casos, la dilución óptima de los anticuerpos fue establecida para cada uno de ellos en ensayos previos.

- En 55 casos se realizaron determinaciones de RE en cortes de congelación.

Vimentina	Monocl.	Predil.	Biomeda	Foster City U.S.A.
Catepsina D	Policl.	1:300	Dakopatts	Carpinteria U.S.A.
Metalotion.	Monocl.	1:50	Dakopatts	Carpinteria U.S.A.
Rec.estrog.	Monocl.	1:100	Dako A/S	Glostrup Dinamarca
PCNA	Monocl.	1:100	Dako A/S	Glostrup Dinamarca
Ki 67	Monocl.	1:50	Dako A/S	Glostrup Dinamarca
Suero normal de cerdo		1:10	Operon S.A.	Zaragoza España
Eq. estrept. biotina			Dako A/S	Glostrup Dinamarca

Tabla A. Relación de anticuerpos y reactivos utilizados

Cuantificación de los resultados inmunohistoquímicos

Las reacciones para catepsina D, metalotioneína y receptores estrogénicos se han clasificado en cuatro categorías en función de:

- La intensidad de la tinción, que se ha valorado con un 0 cuando ésta no existía, con un 1 cuando era débil, con un 2 cuando era de intensidad moderada y con 3 cuando la reacción era fuertemente positiva.

- La extensión de la misma, que se ha considerado
 - 0 cuando no existía tinción
 - 1 cuando < 25% de las células estaban teñidas
 - 2 cuando eran positivas entre 25 - 50% de las células
 - 3 cuando lo hacían entre 50 - 75%
 - 4 cuando reaccionaban > 75% de las células tumorales.

Sumando los valores de ambos parámetros se ha obtenido una cifra que se corresponde con la valoración considerada:

- 0-1 casos negativos (0)
- 2-3 reacción débil (1)
- 4-5 reacción moderada (2)
- 6-7 reacción intensa (3)

La inmunoreacción para vimentina se ha considerado positiva cuando el número de células positivas excedía el 10%.

Las inmunoreacciones a los anticuerpos Ki67 y PCNA se han valorado contando el número de células tumorales positivas en 10 campos de gran aumento (40X) eligiendo las zonas de mayor celularidad y marcaje.

En todos los casos se han realizado dos valoraciones independientes de cada caso, por tres observadores simultáneos distintos. Las cifras finales son el resultado de la media aritmética de todas las observaciones, ya que la variabilidad interobservador fué de $p < 0.05$.

C. ANALISIS ESTADISTICO

Para la realización de los análisis estadísticos se clasificaron los parámetros en 4 tipos de variables:

1.- Variables no evolutivas:

A. Discretas: estado menopáusico, estadio ganglionar, túbulos, pleomorfismo, mitosis, grado histológico, tipo histológico, vimentina, metalotioneína, catepsina D celular, receptores de estrógeno.

B. Continuas: tamaño tumoral, edad, número de mitosis, Ki67 , PCNA.

2.- Variables evolutivas:

A. Discretas: ocurrencia o no de metástasis, recidiva, muerte o morbilidad (recidiva o metástasis).

B. Continuas: intervalo libre de metástasis, intervalo libre de recidivas, intervalo libre de enfermedad (aparición de recidiva o metástasis) y supervivencia global.

Así mismo, las puntuaciones con que se han valorado las reacciones inmunohistoquímicas, se han clasificado, a efectos estadísticos, en sólo dos categorías:

0 = casos negativos y con reacción débil

1 = casos positivos con reacción moderada o intensa.

Los valores de PCNA y Ki67 se han considerado elevados cuando se encontraban por encima de 900 y 700 células por 10 CGA, respectivamente.

Se ha aceptado un nivel de confianza de $p < 0.05$.

Estudios realizados:

1.- Análisis de medidas de asociación:

La influencia de los diferentes factores en el desarrollo de metástasis, aparición de recidivas y ocurrencia de muerte se ha valorado mediante el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis (para las variables no evolutivas continuas) y mediante tablas de contingencia aplicando el test de la "chi cuadrada" con la corrección de Yates (para las variables no evolutivas discretas).

Análisis multivariante de regresión logística paso a paso entre todas las variables no evolutivas y cada una de las variables evolutivas discretas.

2.- Análisis de supervivencia:

Análisis de supervivencia de las variables evolutivas continuas según cada una de las variables no evolutivas, para comprobar si dichas variables evolutivas se ven afectadas por los valores que toman las variables no evolutivas.

Análisis de supervivencia paso a paso según el modelo de Cox, para seleccionar de entre todas las variables no evolutivas, cuál es el conjunto mínimo de variables que mejor podrían predecir las variables evolutivas continuas.

3.- Análisis de asociación entre todas las variables no evolutivas mediante tablas de contingencia.

4. RESULTADOS

1.CARACTERISTICAS CLINICAS GENERALES

Edad: La edad de las pacientes oscilaba entre 24 y 83 años, con una media de 56 años. La mediana fué de 58 años. Quince mujeres tenían menos de 40 años (sólo se diagnosticó un caso en una mujer < 30 años), 45 tenían entre 40 y 60 y 50 eran mayores de 60 años.

Estado menopáusico:: Treinta y cuatro mujeres se encontraban en estado premenopáusico y 76 en estado posmenopáusico.

Tamaño tumoral: El tamaño de los tumores osciló entre 1 y 12 cms. con una media de 3.42 cms. La mediana fué de 3 cms. Cuarenta y tres tumores median menos de 3 cms. y 67 presentaban un tamaño \geq 3 cms.

Estadio ganglionar: En el momento del diagnóstico 54 pacientes (49%) tenían tumores con ganglios linfáticos negativos y las 56 restantes (51%) presentaban afectación axilar metastásica. En 27 de ellas (24.6%) se aislaron entre 1-3 ganglios, 10 (9%) tenían entre 4 y 9 adenopatías y 19 (17.4%) presentaban \geq 10 ganglios positivos.

La relación entre afectación ganglionar, tamaño tumoral y fallecimientos durante el tiempo de seguimiento del estudio se expresan en la tabla 1.

	Tamaño tumor	Nº muertes (%)
Ganglios (-)	<3 cms. (n=24)	3 (12.5%)
	≥3 cms. (n=30)	5 (16.6%)
Ganglios (+)	<3 cms. (n=19)	4 (21%)
	≥3 cms. (n=37)	16 (43.5%)

Tabla 1. Relación entre tamaño tumoral, afectación ganglionar y número de muertes

Tiempo de seguimiento y evolución: El tiempo de seguimiento osciló entre 8 y 76 meses, con una media de 34 meses y una mediana de 23.5 meses. Tan sólo una paciente presentaba metástasis a distancia en el momento del diagnóstico; se trataba de un tumor de gran tamaño, alto grado de malignidad y tipo quístico. En 30 pacientes (27.3%) se desarrollaron metástasis durante el período de seguimiento y 13 (11.8%) presentaron recidivas locales del carcinoma. Veintiocho (25.4%) pacientes fallecieron a causa del tumor durante el tiempo que duró el estudio y 82 (74.5%) seguían vivas al concluir el mismo.

De las 28 pacientes que fallecieron, 20 (71.4%) presentaban afectación ganglionar en el momento del diagnóstico; 22 (78.6%) eran de tipo ductal NOS, 4 del ductal mixto, 1 quístico y 1 lobulillar. Respecto al grado histológico, 6 (21.4%) tenían un grado I, 9 (32.4%) un grado II y 13 (46.2%) un grado III.

2. CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS

Grado histológico: Respecto al grado histológico de malignidad 49 de los tumores estudiados (44.5%) presentaban características histológicas correspondientes a un grado I, 30 (27.3%) al grado II y 31 (28.2%) al grado III.

Tipos histológicos: se encontró la siguiente distribución de tipos histológicos: 74 tumores (67.3%) fueron de tipo Ductal NOS, 16 (14.4%) de tipo ductal mixto, 11 de tipo lobulillar (10%), 2 (1.8%) tipo tubular, 2 tipo tubular mixto (1.8%), 3 tipo papilar (2.7%), 1 cribiforme (1%) y 1 quístico (1%).

El estadio ganglionar y grado histológico de los tumores encuadrados en "otros tipos", así como los casos de muerte, metástasis y recidivas dentro de este grupo se refiere en la tabla 2.

	Est.gang	Gr.hist.	Muerte	Metast.	Recid.
Papilares	0	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
Lobulillares	1	1	no	no	no
	1	1	no	no	no
	1	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
	0	1	no	sí	no
	0	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
	3	1	sí	sí	no
	0	1	no	no	no
Tubulares	0	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
Tub. mixtos	0	1	no	no	no
	0	1	no	no	no
Cribiforme	0	1	no	no	no
Quístico	1	3	sí	sí	sí

Tabla 2. Relación de "otros tipos histológicos" con estadio ganglionar, grado histológico y evolución (incidencia de muerte, metástasis y recidiva).

3. INMUNOHISTOQUIMICA

Ki67: la reactividad para Ki67 se reconoció como una tinción nuclear de las células tumorales; en general la tinción era más intensa en el nucleolo, aunque también se observó con frecuencia tinción nuclear difusa. La heterogeneidad, tanto en la intensidad como en la distribución de la tinción era un dato constante, encontrándose en algunos tumores grupos de células positivas entre áreas negativas, mientras que en otros los núcleos positivos se distribuían por todo el tumor.

En 3 de los casos estudiados la reacción para Ki67 se consideró no valorable. En los 107 casos restantes el número de células positivas por 10 CGA osciló entre 16 y 2957, con una media de 462. Ochenta y ocho tumores (82.2%) presentaron cifras de Ki 67 < 700 y en los 19 restantes se observaron ≥ 700 células X10 CGA.

De las pacientes que fueron exitus durante el estudio, 28 en total, 12 (42.9%) tenían valores de Ki67 > 700 células positivas X10CGA. De las 30 que desarrollaron metástasis durante el tiempo de seguimientos, 9 (30%) presentaron altos niveles de Ki 67 y en 5 de las 13 (38.4%) que tuvieron recidiva se observó esta misma circunstancia.

De los tumores con índices elevados de Ki 67, 14 (73.6%) presentaban un grado histológico 3, mientras que sólo 1 tenía un bajo grado de malignidad.

Todos los tumores con índice de Ki 67 \geq 700 pertenecían al tipo ductal o ductal mixto.

La relación entre los niveles de Ki 67 y otros factores estudiados se expresan en la tabla 3.

		Ki67<700/10CGA (n = 88)	Ki67>700/10CGA (n = 19)
Tam.tumor	< 3 cms.	35 (39.7%)	6 (31.6%)
	\geq 3 cms.	53 (60.3%)	13 (68.4%)
Est.gang.	0	44 (50%)	9 (47.4%)
	1	24 (27.3%)	2 (10.5%)
	2	6 (6.8%)	3 (15.8%)
	3	14 (15.9%)	5 (26.3%)
Gr.histol.	1	48 (54.5%)	1 (5.2%)
	2	26 (29.6%)	4 (21%)
	3	14 (15.9%)	14 (73.8%)
Tipo hist.	NOS+mixtos	70 (79.6%)	19 (100%)
	Otros	18 (20.4%)	--
R.estrog.	negativo	39 (44.4%)	13 (68.4%)
	positivo	44 (50%)	6 (31.6%)
	no valor.	3 (3.4%)	---
	no tiene	2 (2.2%)	---

Tabla 3. Relación entre índice de Ki 67 y otros factores.

PCNA: la positividad para PCNA se identificó como una tinción nuclear de las células tumorales, de patrón granular o difuso e intensidad variable. Se consideró positivo cualquier grado de tinción nuclear. En algunas ocasiones se observó una tinción citoplásmica difusa, sobre todo en los casos con mayor número de núcleos teñidos.

En nuestro trabajo, todos los tumores estudiados mostraron algunas células positivas para PCNA, oscilando el número de células positivas por 10 CGA entre 20 y 3052, con una media de 580,5. En un caso la reacción se consideró no valorable. Ochenta y siete de los tumores estudiados (79.7%) presentaban valores de PCNA <900 cels. X10 CGA, mientras que en los 22 restantes (20:3%) se contaban ≥ 900 cels. teñidas.

De las 28 pacientes que fallecieron durante el estudio a causa del tumor 15 (53.6%) presentaban > 900 células X10CGA positivas para PCNA. De las 30 que desarrollaron metástasis 10 (33.3%) tenían valores de PCNA superiores a 900 y en 5 de las 13 (38.3%) que presentaron recidiva se observaron también altos índices de positividad para PCNA.

Respecto al grado histológico, de los 22 tumores con niveles elevados de PCNA, 16 (72.8%) pertenecían al grado histológico 3, mientras que sólo 1 presentaba un bajo grado de malignidad. Por el contrario, 48 de los 49 tumores con grado histológico 1 tenían valores de PCNA inferiores a 900.

Todos los tumores incluidos histológicamente en "otros tipos" tenían <900 cels. positivas para PCNA, excepto un carcinoma lobulillar que presentó 1032 cels.

La relación entre niveles de PCNA y otras características clínico patológicas se describen en la tabla 4.

		PCNA <900/10CGA (n = 87)	PCNA >900/10CGA (n = 22)
Tam.tumor	< 3 cms.	37 (42.6%)	6 (27.3%)
	≥ 3 cms.	50 (57.4%)	16 (72.7%)
Est.gang.	0	41 (47.1%)	12 (54.5%)
	1	24 (27.6%)	3 (13.6%)
	2	6 (6.9%)	4 (18.3%)
	3	16 (18.4%)	3 (13.6%)
Gr.histol.	1	48 (55.2%)	1 (4.6%)
	2	25 (28.8%)	5 (22.6%)
	3	14 (16%)	16 (72.8%)
Tipo hist.	NOS+mixtos	69 (79.3%)	21 (95.4%)
	Otros	18 (20.7%)	1 (4.6%)
R.estrog.	negativo	42 (48.2%)	10 (45.4%)
	positivo	40 (45.8%)	11 (50%)
	no valor.	4 (4.6%)	---
	no tiene	1 (1.4%)	1 (4.6%)

Tabla 4. Relación entre índice de PCNA y otros factores.

Receptores de estrógeno: La presencia de RE en las células tumorales se puso de manifiesto con una tinción nuclear de color pardo de diferentes intensidades.

De los 108 casos en los que se realizó la técnica en parafina, 4 fueron no valorables. En las restantes, 28 fueron negativos y 76 presentaron algún grado de inmunotinción, siendo ésta leve en 24 tumores, moderada en 36 e intensa en 16.

Considerando negativos los tumores con reacción negativa o débil (52 en total), 43 de ellos (82.7%) pertenecían al tipo ductal NOS, 4 eran ductales mixtos y 5 pertenecían a otros tipos.

Respecto al grado histológico, 28 de los tumores que no poseían RE presentaban un grado III de malignidad (53,8%), 16 un grado II y 8 un grado I. Por el contrario entre las pacientes RE(+), 37 (71%) mostraban un bajo grado histológico, 12 (23%) un grado intermedio y sólo 3 (6%) un alto grado.

De las 28 pacientes que fallecieron durante el tiempo de seguimiento del estudio 19 (61%) eran RE(-); 19 de las 30 (63.3%) que desarrollaron metástasis se encontraban también dentro de este grupo, así como 8 de las 13 (61.5%) que presentaron recidivas.

De los 55 casos en los que se realizó la técnica en cortes de congelación 31 (56.4%) presentaron reacción moderada o intensa y 24 (43.6%) se consideraron negativos (reacción negativa o débil).

Catepsina D: La inmunopositividad para catepsina D en las células tumorales se identificó como una tinción citoplásmica granular o difusa, de color marrón y variable intensidad. El anticuerpo teñía también los fibroblastos y macrófagos normales del tejido estromal que rodeaba al tumor.

De los 110 tumores estudiados, 5 no presentaron reactividad para catepsina D en las células tumorales; en los 105 restantes se observó algún grado de tinción, siendo ésta de intensidad leve en 33 casos, moderada en 40 e intensa en 32.

Respecto al estroma circundante, en 106 casos se encontró positividad: leve, en 52 de ellos; moderada, en 28 e intensa en 28. En sólo 4 tumores el estroma fué negativo para este anticuerpo.

Los 5 casos con células tumorales catepsina D negativas presentaban un grado histológico III y RE negativos .

La relación entre la tinción para catepsina D y otros factores se muestra en la tabla 5.

En la tabla 6 se muestran los datos referentes a la relación entre la tinción para catepsina D y RE y la evolución de las pacientes (muerte, metástasis y recidiva), observándose como las pacientes con catepsina(-) y RE(-) presentan una peor evolución (mayor porcentaje de muerte, metástasis y recidivas) que las pacientes con catepsina(+) y RE(+).

		Catepsina (-) (n = 38)	Catepsina (+) (n = 72)
Tam.tumor	< 3 cms.	13 (32.4%)	30 (41.7%)
	≥ 3 cms.	25 (65.8%)	42 (58.3%)
Est.gang.	0	18 (47.4%)	36 (50%)
	1	8 (21%)	19 (26.4%)
	2	4 (10.6%)	6 (8.3%)
	3	8 (21%)	11 (15.3%)
Gr.histol.	1	14 (36.8%)	35 (48.6%)
	2	12 (31.6%)	18 (25%)
	3	12 (31.6%)	19 (26.4%)
Tipo hist.	NOS+mixtos	30 (78.9%)	60 (83.3%)
	Otros	8 (21.1%)	12 (16.7%)
R.estrog.	negativo	23 (60.5%)	29 (40.3%)
	positivo	13 (34.2%)	39 (54.2%)
	no valor.	---	4 (5.5%)
	no tiene	2 (5.3%)	---

Tabla 5. Relación entre inmunotinción para catepsina D y otros factores.

	Muerte	Metástasis	Recidiva
Cat.D(-) RE(-) (n = 23)	9 (37.5%)	11 (47.8%)	4 (17.4%)
Cat.D(+) RE(-) (n = 29)	10 (34.5%)	10 (34.5%)	5 (17.2%)
Cat.D(-) RE(+) (n = 13)	3 (23%)	4 (30.7%)	1 (7.7%)
Cat.D(+) RE(+) (n = 39)	6 (15.3%)	5 (12.8%)	3 (7.7%)

Tabla 6. Relación entre catepsina D - receptores de estrógenos y evolución.

Metalotioneína: En las células mioepiteliales no neoplásicas se observó una fuerte tinción nuclear y citoplásmica. También se tiñeron los fibroblastos e histiocitos del estroma. En las células tumorales la tinción fue citoplásmica y nuclear en la mayoría de los casos, aunque en algunos se observó sólo tinción nuclear o citoplásmica. La intensidad de la misma fue variable y la distribución de las células teñidas muy irregular dentro de un mismo tumor.

De los 110 casos estudiados, 37 fueron negativos y 73 positivos. De los positivos, 31 casos presentaron una reacción leve, 36 moderada y 6 intensa.

La relación entre la tinción para metalotioneína y otros factores pronósticos se detalla en la tabla 7.

		Metalotioneína (-)	Metalotioneína (+)
Tam.tumor	< 3 cms.	30 (44.1%)	13 (30.9%)
	≥ 3 cms.	38 (55.9%)	29 (69.1%)
Est.gang.	0	39 (57.3%)	15 (35.7%)
	1	14 (20.6%)	13 (30.9%)
	2	6 (8.8%)	4 (5.8%)
	3	9 (13.3%)	10 (27.6%)
Gr.histol.	1	34 (50%)	15 (35.7%)
	2	14 (20.6%)	16 (38%)
	3	20 (29.4%)	11 (26.3%)
Tipo hist.	NOS+mixtos	54 (79.4%)	36 (85.7%)
	Otros	14 (20.6%)	6 (14.3%)
R.estrog.	negativo	31 (45.6%)	21 (50%)
	positivo	32 (47.1%)	20 (47.4%)
	no valor.	4	---
	no tiene	1	1

Tabla 7. Relación entre tinción para metalotioneína y otros factores.

La relación entre la tinción para metalotioneína y los RE y la evolución (aparición de recidivas, metástasis y exitus) se expresa en la tabla 8.

	Exitus	Metástasis	Recidiva
Metalo(+) RE(-) (n = 21)	11 (52.4%)	11 (52.4%)	4 (19.1%)
Metalo(+) RE(+) (n = 20)	6 (30%)	6 (30%)	3 (15%)
Metalo(-) RE(-) (n = 31)	5 (16.1%)	7 (22.5%)	4 (12.8%)
Metalo(-) RE(+) (n = 32)	4 (12.5%)	6 (18.7%)	2 (6.2%)

Tabla 8. Relación entre metalotioneína, RE y evolución.

Vimentina: El anticuerpo reacciona con las proteínas de los filamentos intermedios presentes en las células de origen mesenquimal. En las células tumorales la positividad se observó como una tinción citoplásmica, especialmente perinuclear y de intensidad variable.

Quince de los 110 carcinomas estudiados (13.7%) presentaron positividad para vimentina en las células tumorales, 14 de ellos (93.3%) eran de tipo ductal NOS y 1 era ductal mixto.

De los casos positivos, 2 presentaron recidivas, 4 desarrollaron metástasis a distancia y 5 fallecieron durante el período de seguimiento.

Ocho de los tumores vimentina positivos (53.4%) poseían un alto grado histológico de malignidad y 7 un grado intermedio. Ninguno de los tumores positivos presentaba un bajo grado.

Nueve de los 15 casos positivos (60%) eran negativos para los RE.

Respecto a la afectación ganglionar, 8 casos presentaban ganglios negativos, 3 tenían entre 1-3 ganglios positivos y 4 entre 4-9.

La relación entre inmunotinción para vimentina y otros factores estudiados se expresa en la tabla 9.

		Vimentina (+) (n = 15)	Vimentina (-) (n = 95)
Tam.tumor	< 3 cms.	5 (33.3%)	38 (40%)
	≥ 3 cms.	10 (66.7%)	57 (60%)
Est.gang.	0	8 (53.3%)	46 (48.4%)
	1	3 (20%)	24 (25.3%)
	2	4 (26.7%)	6 (6.3%)
	3	---	19 (20%)
Gr.histol.	1	---	49 (51.6%)
	2	7 (46.6%)	23 (24.2%)
	3	8 (53.4%)	23 (24.2%)
Tipo hist.	NOS+mixtos	15 (100%)	75 (78.9%)
	Otros	---	19 (20%)
R.estrog.	negativo	9 (60%)	43 (45.3%)
	positivo	6 (40%)	46 (48.4%)
	no valor.	---	4 (4.2%)
	no tiene	---	2 (2.1%)

Tabla 9. Relación entre tinción para vimentina y otros factores.

3. ANALISIS ESTADISTICOS

1.- Análisis de medidas de asociación.

En la tabla 10 aparecen recogidas todas las variables que han presentado asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de metástasis, aparición de recidivas y ocurrencia de muerte.

En la misma puede observarse como el estadio ganglionar, el número de mitosis y el grado histológico han mostrado relación significativa en todos los casos, mientras que metalotioneína, Ki 67 y PCNA se han asociado de manera significativa con la ocurrencia de muerte y la morbilidad.

Muerte	Recidiva	Metástasis	Morbilidad
est.gang. túbulos pleomorf. mitosis gr.histolog. metalotion. Ki 67 PCNA	est.gang. mitosis gr.histolog.	est.gang. pleomorf. mitosis gr.histolog. metalotion. Ki 67	est.gang. túbulos pleomorf. mitosis gr.histolog. metalotion. Ki 67 PCNA

Tabla 10. Análisis univariante de asociación entre los distintos factores y evolución clínica.

En el análisis de regresión logística paso a paso para cada una de las variables evolutivas discretas, se concluyó que las siguientes variables no evolutivas, en orden decreciente de importancia, son suficientes para explicarlas:

- Muerte: metalotioneína, estadio ganglionar, pleomorfismo, Ki67, tipo histológico.
- Recidiva: mitosis, estadio ganglionar.
- Metástasis: estadio ganglionar, pleomorfismo, Ki67, PCNA.
- Morbilidad: metalotioneína, pleomorfismo, estadio ganglionar, Ki67, PCNA.

2.- Análisis de supervivencia.

Con respecto a la ocurrencia de recidiva, metástasis y/o muerte de la paciente, el análisis de supervivencia detectó diferente probabilidad de supervivencia tras cualquier período de tiempo entre las variables significativas que se relacionan en la tabla 11.

Muerte	Recidiva	Metástasis	Morbilidad
edad	est.gang.	est.gang.	est.gang.
est.gang.	pleomorf.	tipo histol.	pleomorf.
pleomorf.	mitosis	Ki 67	mitosis
mitosis	gr.histolog.	PCNA	gr.histolog.
gr.histolog.	metalotion.		metalotion.
metalotion.	R.estrógenos		R.estrógenos
R.estrógenos	Ki 67		Ki 67
Ki 67			

Tabla 11. Análisis univariante de supervivencia.

En un análisis paso a paso, realizado según el modelo de Cox, sobre cuáles son las variables que más relación guardan con la probabilidad de seguir vivo tras cierto período de tiempo, se detectaron los siguientes resultados:

- Muerte: estadio ganglionar, RE , metalotioneína.
- Recidiva: mitosis, estadio ganglionar.
- Metástasis: estadio ganglionar, pleomorfismo, metalotioneína, RE.
- Morbilidad: estadio ganglionar, RE, metalotioneína, PCNA.

3.- Análisis de asociación entre variables.

Respecto a la asociación de unas variables con otras, se han encontrado las relaciones estadísticamente significativas que se observan en la tabla 12.

	Tt	Eg	Tu	Pl	Mi	GH	TH	Ca	Me	Vi	RE	PC	Ki
Tt		1			3	1					1		
Eg	1												
Tu				3	3	3	2	3			3	3	
Pl			3		3	3	3				3	2	1
Mi			3	3		3	2	2			3	2	1
GH	1		3	3	3		3	3			3	2	1
TH			2	3	3	3						3	3
Ca			3		2	3					1		
Me		1											
Vi			2	2	2	2							
RE	1		3	3	3	3		1					
PC			3	2	2	2	3						3
Ki				1	1	1	3					3	

Tabla 12. Análisis univariante de asociación entre variables.

Tt:tamaño tumoral; Eg:estadio ganglionar; Tu:túbulos; Pl:pleomorfismo;
 Mi:nºmitosis; GH:grado histológico; TH:tipo histológico; Ca:catepsina D;
 Me:metalotioneína; Vi:vimentina; RE:receptores de estrógenos;PC:PCNA; Ki:Ki 67.

1 = 0.05 > p ≥ 0.01; 2 = 0.01 > p ≥ 0.005; 3 = p < 0.005.

5. DISCUSSION

A. FACTORES PRONOSTICOS MORFOLOGICOS CLASICOS

Tamaño tumoral:

El tamaño del tumor en el momento del diagnóstico ha sido considerado como un factor pronóstico importante en el carcinoma de mama, pero su valor como tal está muy relacionado con la afectación ganglionar linfática^{32,189,210,211}.

En nuestro trabajo, el tamaño tumoral no ha tenido significación estadística como factor pronóstico independiente. No obstante, cuando se considera esta variable en relación con el número de ganglios sí se advierten diferencias significativas de supervivencia (tabla 1).

Por otro lado, existe relación entre tamaño tumoral y las siguientes variables: estadio ganglionar, número de mitosis, grado histológico de malignidad y estado de los RE; de tal forma que los tumores más grandes tienden a tener afectación ganglionar metastásica, mayor número de mitosis, un grado más alto de malignidad y a ser negativos para los RE, lo que contribuye a explicar y reforzar su valor como factor de mal pronóstico.

Estadio ganglionar:

Se acepta desde hace años que el grado de afectación ganglionar axilar representa el factor pronóstico aislado más importante en pacientes con cáncer de mama¹⁸⁸⁻¹⁹³. Es decir, las pacientes con ganglios histológicamente

negativos tienen un índice de supervivencia significativamente más alto que las que presentan metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. Dentro de este último grupo, el número de ganglios positivos influye también de manera significativa en el pronóstico.

Los resultados de nuestro trabajo vienen a confirmar, una vez más, esta teoría, ya que la variable "estadio ganglionar" aparece como significativa en todos los análisis estadísticos, tanto univariantes como multivariantes (tabla 10 y 11). En el análisis paso a paso, según el modelo de Cox, el estadio ganglionar aparece como primera variable en orden de importancia, tanto en la valoración de la supervivencia global como en el intervalo libre de enfermedad (morbilidad).

Del mismo modo, el número de ganglios influye directamente en el pronóstico y en las Fig. 1 y 2 se puede observar como la supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad se acortan de manera significativa en relación al número de ganglios afectados.

Grado histológico:

El grado histológico de diferenciación constituye desde hace tiempo un aspecto fundamental en el estudio de los tumores de mama, aunque su valor como factor pronóstico no se ha reconocido hasta hace poco, debido a la ausencia de un método que garantizase la reproducibilidad de los resultados.

Desde que la OMS en 1968²²⁴ introdujo algunas modificaciones al sistema de grados propuesto por Bloom y Richardson²²¹ este problema parece haberse solucionado. Este método es el utilizado en la actualidad por la mayoría de los autores, y desde entonces han sido muy numerosos los estudios dedicados a demostrar la importancia del grado de diferenciación histológica como marcador pronóstico en los carcinomas de mama, relacionándolo con otros factores de mal pronóstico.

En nuestro trabajo, se confirma esta relación, ya que el grado histológico de los tumores se asocia de manera significativa con el tamaño del tumor, el marcaje nuclear con Ki 67^{232-234,303-306}, con PCNA^{328,329,331} y con el estado de los receptores de estrógenos⁴⁵⁹⁻⁴⁶³, de forma que los tumores con bajo grado de malignidad tienden a ser RE(+) y a presentar índices de Ki67 y PCNA más bajos.

Sin embargo, no hemos encontrado asociación con el grado de afectación ganglionar linfática.

Respecto a la influencia de este parámetro en la evolución clínica de la enfermedad, hemos observado que el grado histológico se asocia de manera significativa a la ocurrencia de muerte, metástasis y recidiva y que en los análisis univariantes de supervivencia (Figs. 3 y 4) tiene valor para predecir el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global, como ya habían sugerido otros autores^{225,236-241}.

Tipo histológico:

La distribución de tipos histológicos encontrados en nuestro estudio coincide, en términos generales, con la referida en la literatura.

Así, mientras que en nuestra serie observamos un 81.8% de carcinomas ductales NOS (incluidos los ductales mixtos) el porcentaje de referencia es del 60-85%³¹. Los carcinomas lobulillares se supone que representan del 10-14% de todos los carcinomas de mama; en nuestra serie, un 10% de los casos pertenecen a este tipo. En cuanto a los carcinomas tubulares y papilares, la incidencia referida en la literatura es <2%^{54,55} y aproximadamente 2%⁷⁶⁻⁷⁸ respectivamente, mientras que nosotros encontramos un 1.8% de tubulares y un 2.8% de papilares.

La importancia del tipo histológico como factor pronóstico reside en que, aunque la mayoría de los carcinomas invasivos de la mama pertenecen al tipo ductal NOS y se sabe que esta es una forma de "mal" pronóstico con una supervivencia a 5 años del 50-60%³⁴³, se conoce también desde hace tiempo que existen ciertas formas histológicas que conllevan un especial buen pronóstico, como la variante lobulillar clásica^{40,48,364}, cribiforme⁷⁴, tubular^{55,57,366-368} y papilar³⁸⁴, presentando estos tumores unos índices de supervivencia significativamente más altos que los carcinomas ductales NOS y unas tasas de recurrencia significativamente inferiores.

En los análisis estadísticos realizados en el presente trabajo, la variable "tipo histológico" sólo se ha mostrado como factor independiente en el análisis de regresión respecto a la ocurrencia de muerte y en la predicción del intervalo

libre de metástasis. A pesar de no haber mostrado significación estadística, los carcinomas incluidos en "otros tipos histológicos" se asocian de manera clara a un bajo grado histológico y a un estadio ganglionar 0/1 (tabla 2), así como a bajos índices de Ki 67 y PCNA. Dentro de este grupo sólo fallecieron dos pacientes durante el tiempo de seguimiento del estudio. Una de ellas presentaba un tumor tipo quístico, considerado como de mal pronóstico y en el otro caso se trataba de un carcinoma lobulillar sólido, de 5.5 cms de diámetro, con estadio ganglionar 3 y negatividad para receptores de estrógenos.

A la vista de estos resultados, creemos que el tipo histológico del tumor es un factor pronóstico importante, aunque sólo sea útil en un limitado número de casos, ya que si bien la incidencia de tumores de "otra histología" es relativamente baja, su conocimiento e identificación permite asignar un relativo mejor pronóstico a las pacientes portadoras de los mismos. Además, este es un dato que hay que establecer rutinariamente en el diagnóstico de todos los carcinomas, por lo que merece la pena ser tenido en cuenta.

B. FACTORES PRONOSTICOS INMUNOHISTOQUIMICOS

Ki 67:

Todos los trabajos revisados valoran la positividad para Ki 67 mediante una estimación subjetiva del porcentaje de células tumorales teñidas y establece un valor de corte (entre 5% y 20%, según los autores) para considerar un alto o bajo índice de Ki 67.

Nosotros hemos realizado la valoración de la positividad para Ki 67 (así como para PCNA) contando el número de células positivas por 10 CGA, con la idea fundamental de ver si podíamos establecer tres grupos que se relacionaran con las tres categorías, ya aceptadas, en que se agrupan el número de mitosis para determinar el grado histológico (<9 , $10-19$, ≥ 20). Sin embargo, y a pesar de que hemos encontrado relación significativa entre Ki 67 y número de mitosis no hemos podido encontrar valores de Ki 67 que nos permitiesen establecer, con significación estadística, estos tres grupos.

La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento sobre Ki67 y carcinomas mamarios están dedicados fundamentalmente a investigar posibles diferencias entre lesiones benignas y malignas y a estudiar su relación con otros índices de proliferación celular así como con otros factores pronósticos.

En la bibliografía revisada sólo hemos encontrado un trabajo, el de Bouzubar²³³ que incluya datos de evolución clínica de la enfermedad con un seguimiento medio de 30 meses. Dicho autor encuentra que los niveles altos de Ki 67 ($>20\%$ de células tumorales positivas) se asocian con una mayor probabilidad de recurrencia precoz tras la mastectomía.

Estos resultados coinciden con los nuestros, pues hemos advertido que las cifras elevadas de Ki 67 se asocian de manera significativa en los análisis de supervivencia (Figs. 5 y 6) con un menor intervalo libre de enfermedad (mayor riesgo de aparición precoz de metástasis y recidivas) y una menor supervivencia global.

Respecto a la asociación entre índice de Ki 67 y otros factores pronósticos, como el grado histológico y el conteo de mitosis, la mayoría de los autores^{300,301,303-306} coinciden al señalar que existe relación significativa entre ellos. Nuestros resultados también confirman esta relación, de forma que los tumores con mayor grado de malignidad y mayor número de mitosis tienen cifras más elevadas de Ki 67.

Respecto al estadio ganglionar y el tamaño tumoral los datos de que disponemos no son tan coincidentes. Y así, aunque algunos de los estudios asocian significativamente estos factores con los niveles de Ki 67^{302,304,306}, otros^{233,300,305,311,312}, entre ellos el nuestro, no confirman este punto.

Algunos autores³⁰⁵⁻³¹⁰ refieren haber encontrado una relación inversa entre los valores de Ki 67 y el estado de los RE. Nosotros no hemos comprobado esta relación ya que aunque el 68.4% de los tumores con alto índice de Ki 67 (13 de 19) eran negativos para los RE, la distribución de tumores RE(-) y RE(+) dentro del grupo de tumores con bajos niveles de Ki67 era muy similar.

A la luz de estos resultados pensamos que Ki 67 puede ser considerado un buen indicador de la actividad proliferativa de los carcinomas de mama. Este método presenta, además, grandes ventajas sobre otros, tradicionalmente

empleados para medir este parámetro, como el marcaje con timidina tritiada o la citometría de flujo, debido a la sencillez de la técnica inmunohistoquímica, a la posibilidad de realizarla en cualquier laboratorio "normal" de Anatomía Patológica (pues no precisa medios técnicos especiales) y de realizar estudios retrospectivos utilizando material de archivo incluido en parafina.

Creemos también que puede tener un importante papel como factor pronóstico ya que, de confirmarse su influencia en la aparición precoz de recidivas y metástasis y su clara relación con el grado histológico y el número de mitosis, podría llegar a considerarse un marcador de mal pronóstico, independientemente de la afectación ganglionar y del estado de los receptores de estrógenos. Sin embargo, estos datos deben ser confirmados por más estudios con seguimiento clínico adecuado. Así como del establecimiento de criterios uniformes para la valoración del marcaje, con objeto de que los resultados publicados sean realmente comparables.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen):

En los análisis univariantes de nuestro estudio (Tablas 10 y 11) los índices de PCNA se han asociado de manera significativa con la ocurrencia de muerte y morbilidad, aunque en los análisis de supervivencia han tenido valor para predecir el intervalo libre de metástasis, pero no la supervivencia global.

En los análisis multivariantes, el índice de PCNA se ha mostrado como factor independiente en el desarrollo de metástasis y en la predicción del intervalo libre de enfermedad.

Estos resultados concuerdan, en parte, con los de los distintos trabajos consultados sobre tinción con PCNA y evolución clínica, que encuentran relación entre altos valores de PCNA y una disminución de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad³²⁸⁻³³⁰, ya que en nuestro estudio PCNA sólo muestra utilidad para predecir el intervalo libre de enfermedad, pero no la supervivencia global.

Sin embargo, Aaltoma³²⁸ en su trabajo realizado con 175 carcinomas de mama y utilizando el mismo anticuerpo que nosotros (a dilución 1:30) observa que el valor pronóstico de la tinción con PCNA es mucho menor en relación a la supervivencia global que en relación al intervalo libre de enfermedad. Este dato estaría en línea con los resultados de nuestro estudio y podría justificarse pensando que PCNA es un marcador eficiente para predecir las recurrencias de la enfermedad, lo que no significa, necesariamente que influya en la supervivencia global.

Respecto a la asociación con otros factores considerados, hemos encontrado correlación significativa entre índices de PCNA y grado histológico (también con el conteo de mitosis, el pleomorfismo y la formación de túbulos), de forma que en los carcinomas de grado 1 se observaban muy pocos núcleos positivos para PCNA, mientras que en los tumores con alto grado de malignidad la mayoría de los núcleos eran positivos para este anticuerpo. Estos resultados coinciden con los referidos en la mayoría de las publicaciones^{328,329,331}.

Estos datos podrían sugerir que el valor pronóstico del grado histológico de los tumores se podría explicar en función de sus diferentes índices de proliferación.

La relación entre el tipo histológico y grado de tinción para PCNA puede tener una explicación semejante, ya que en nuestro trabajo todos los tumores considerados como de "mejor" pronóstico (3 papilares, 1 cribiforme y 2 tubulares) tenían menos de 900 células positivas para PCNA.

En nuestro estudio, la cantidad de núcleos PCNA positivos no se ha relacionado de forma significativa con el grado de afectación ganglionar ni con el tamaño del tumor, confirmando también los resultados publicados por Aaltoma y Leonardi^{312,328,329}. No obstante, Frierson³³¹ no coincide en este punto, aunque su trabajo sólo incluye 39 tumores y la relación entre tamaño tumoral y PCNA se muestra significativa únicamente en los tumores < 2cms y en los > 4 cms. pero no en el grupo intermedio).

Respecto a la comparación entre PCNA y Ki67 hemos advertido un excelente nivel de correlación entre los valores de ambos parámetros con un $p = 0.0001$. Aunque como se ha comentado en el apartado anterior parece que el índice de Ki67 tiene mayor valor pronóstico, ya que aparece como factor pronóstico independiente en un mayor número de análisis. En este sentido la opinión de los autores que han realizado ensayos sobre esta cuestión son discordantes. Así, mientras que Magno y Aaltoma³²⁸⁻³³⁰ consideran que los resultados de ambas técnicas son comparables y que ambos pueden ser igualmente válidos, Leonardi no encuentra relación entre ellos y opina que

PCNA no puede sustituir a Ki67 (el trabajo de éste ha sido realizado con una dilución 1:400 y 1:800 y en muestras fijadas en formol y Methacarnoy, lo que podría influir en la diferencia en los resultados).

Sin embargo, hay que hacer hincapié en que, en general, la tinción con PCNA presenta algunas desventajas importantes, ya que debido a la larga vida media del antígeno pueden aparecer como positivas muchas células que ya hayan terminado su ciclo celular; además dicho antígeno parece estar implicado, no sólo en los procesos de proliferación celular, sino también en la reparación del DNA, por lo que el número de células teñidas podría no reflejar con exactitud el número de células en fase proliferativa.

Por lo tanto, y a pesar de que los índices de PCNA muestran una buena correlación con otros índices de actividad proliferativa (como el conteo de mitosis y el índice de Ki67), es necesaria la realización de más estudios que incluyan un seguimiento clínico adecuado, así como unificar los criterios técnicos (fijación, procesamiento...) y de valoración, que permitan establecer el valor de este parámetro como factor pronóstico.

Receptores de estrógenos:

El porcentaje de tumores positivos para RE (50%) encontrados en el presente trabajo coincide con los datos publicados hasta el momento a este respecto⁴⁴³⁻⁴⁴⁵ que afirman que aproximadamente un 45-55% de los tumores primarios de mama son RE positivos.

No hemos podido confirmar el valor pronóstico de los mismos en cuanto a la respuesta al tratamiento endocrino ya que los distintos tratamientos a que han sido sometidas las pacientes no se ha incluido como variable en nuestro estudio.

Aunque la mayoría de los autores parecen estar de acuerdo en que existe buena correlación entre los métodos clásicos para la determinación de los RE y las nuevas técnicas inmunohistoquímicas, esta correspondencia no está tan clara cuando se comparan los resultados de estas últimas en cortes de congelación y parafina. Así, algunos autores^{434,582} refieren encontrar porcentajes más bajos, entre 34-36%, de células RE(+) en parafina; mientras que otros^{431,433} publican cifras más altas, entre 58-63%.

En nuestro trabajo hemos realizado la determinación de RE en cortes de congelación y parafina conjuntamente en 55 casos, encontrando un 56% de casos positivos en congelación y un 50% de positividad cuando la técnica se realizó en parafina, con una relación significativa entre ambas de $p < 0.01$. Esta "mejora" en la relación entre ambos porcentajes no creemos que pueda deberse, como sugiere Sirvent en su publicación⁵⁸², a la utilización de un histoscore más bajo en unos estudios o en otros, ya que en nuestro caso ambas técnicas han sido valoradas con los mismos criterios y por las mismas personas. Pensamos, más bien, que esta mejoría en los resultados puede atribuirse a ciertas modificaciones introducidas en el procedimiento, ya que nosotros no hemos utilizado tratamiento enzimático previo en ninguno de los dos casos, pero hemos sometido los cortes de parafina a tratamiento previo con microondas, que parece puede contribuir a desenmascarar los RE.

Por otro lado, el presente trabajo confirma el valor de los RE como factor pronóstico independiente, al margen de su influencia en la respuesta al tratamiento, ya que su positividad se relaciona de forma significativa, como ya han referido desde hace tiempo otros autores^{463,583,584}, con un mayor intervalo libre de enfermedad y una mayor supervivencia global.

Así mismo hemos observado asociación significativa entre positividad para RE y otros indicadores de pronóstico favorable como un menor tamaño tumoral y bajo grado histológico (también referida en los artículos⁴⁵⁹⁻⁴⁶³). Sin embargo, y al igual que la mayoría de autores que hacen referencia a este aspecto^{453,460,461,464,465}, no hemos podido demostrar relación significativa con la afectación ganglionar linfática.

Aunque algunas publicaciones han relacionado los niveles de RE con distintos índices de proliferación tumoral, y más concretamente con las cifras de Ki67⁴⁵⁸, nuestro trabajo no permite confirmar este dato (tampoco con PCNA). Sin embargo, sí existe relación inversa del estado de los RE con el número de mitosis (otro índice de proliferación tumoral), lo que reforzaría su papel como factor de buen pronóstico. Las diferencias entre el trabajo de Hanna y el nuestro podrían deberse a los distintos sistemas de valoración utilizados para medir el índice de Ki 67 y los puntos de corte establecidos.

Catepsina D:

Debido a que existen 4 métodos diferentes para la determinación de catepsina D en los tejidos, los resultados del presente trabajo se compararán sólo con los de los trabajos realizados con el mismo método, la técnica inmunohistoquímica.

En nuestro estudio, el porcentaje de células tumorales positivas para catepsina D (65.4%) ha sido prácticamente idéntico a los publicados por Domagala⁴⁸⁸ y Henry⁴⁸⁷, 60% y 65% respectivamente.

Respecto a la utilidad de este marcador como factor pronóstico, el análisis estadístico no nos mostró ninguna correlación significativa entre la tinción para catepsina D y la evolución clínica de las pacientes. En este sentido, los resultados de otros autores son discordantes y así, mientras Domagala no encuentra relación entre expresión de catepsina D y supervivencia a 60 y 90 meses, Henry observa que la positividad para catepsina D conlleva un incremento significativo de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad.

Así mismo, hemos encontrado, al igual que Henry, relación significativa entre la expresión de catepsina D y el estado positivo de los RE. Aunque esta asociación no ha mostrado en el análisis estadístico un incremento significativo de la supervivencia global, ni del intervalo libre de enfermedad como refiere Henry, creemos que a la vista de los datos referidos en la tabla 6 estas pacientes con cat.(+) y RE(+) pueden constituir un subgrupo con mejor

pronóstico, ya que los porcentajes de muerte, metástasis y recidiva son considerablemente más bajos que en el resto de los grupos, siendo el peor de ellos el de las pacientes que presentan tumores RE(-) y catepsina D(-).

En nuestro estudio hemos hallado también asociación significativa entre catepsina D y grado histológico, dato que no ha sido confirmado en los estudios anteriormente citados que consideran a la catepsina D un factor pronóstico independiente de la edad, tamaño tumoral y el grado de malignidad.

Esta posible consideración de la catepsina D como un factor de buen pronóstico iría en contra de la actividad como enzima proteolítica de la misma que favorecería la diseminación del tumor (aunque hay que tener también en cuenta que esta actividad sólo ha podido demostrarse "in vitro" a pH 3.5, muy lejos del pH fisiológico). Este hecho podría explicarse pensando que el valor pronóstico de la catepsina D no dependería de su presencia "per se", sino de la vía por la que se estimule su producción.

Esto explicaría además el hecho de que los tumores RE(+) catepsina D(+) tengan un pronóstico más favorable (en este caso el incremento de la catepsina sería estimulado por lo estrógenos y reflejaría un estado funcionante de los receptores) y que los tumores catepsina D(+) RE(-) tengan un pronóstico más desfavorable (en este caso aunque la catepsina D esté aumentada su expresión podría ser inducida por otros factores de crecimiento autocrino relacionados con un mal pronóstico).

Metalotioneína:

Los resultados de nuestro trabajo confirman la idea, ya sugerida por Schmidt⁵⁰², Fresno⁵⁰³ y Haerslev⁵⁰⁵, de que la hiperexpresión de metalotioneína en los carcinomas ductales primarios de mama se asocia de manera significativa a un peor pronóstico, y en concreto, a una menor supervivencia global y un menor intervalo libre de enfermedad (Figs. 7 y 8).

Así mismo, apoyan la hipótesis sugerida por Schmidt de que la hiperexpresión de metalotioneína puede estar ya presente en los carcinomas mamarios en el momento del diagnóstico y/o mastectomía (con la consiguiente posibilidad de resistencia a agentes quimioterápicos) o bien puede aparecer a posteriori, en tumores primariamente negativos para metalotioneína que desarrollen resistencia a los fármacos anticancerosos (metástasis metalo(+)) de tumores primariamente metalo(-)). En estos casos la expresión de metalotioneína puede ser inducida, entre otros factores, por los propios agentes terapéuticos como el interferon o los esteroides.

Ambos autores encuentran también que los tumores con hiperexpresión de metalotioneína y RE(-) constituyen un grupo de especial mal pronóstico. Esta asociación también se cumple en nuestro estudio, ya que como se observa en la tabla 8 la tasa de recidiva y sobre todo, de metástasis y muerte, es notablemente superior en las pacientes con hiperexpresión de metalotioneína y RE(-) que en el resto de los grupos. Y por el contrario, las pacientes con metalotioneína (-) y RE (+) presentan porcentajes sensiblemente inferiores.

En el análisis estadístico de asociación, el grupo de pacientes (met(+) RE(-)) se ha relacionado de manera significativa con la ocurrencia de muerte y el desarrollo de metástasis y en el análisis de supervivencia (Figs. 9 y 10) se ha encontrado acortamiento de la supervivencia global y menor intervalo libre de enfermedad. Esta peor evolución podría explicarse por un doble fracaso terapéutico. Por un lado, la negatividad para los RE justificaría una falta de respuesta a la terapia hormonal; por otro, la positividad de la metalotioneína podría implicar una menor eficacia de los agentes quimioterápicos relacionados con mecanismos de resistencia a los mismos.

Este subgrupo de tumores puede identificar un grupo de pacientes de mayor riesgo que podrían requerir una terapia más agresiva o en las que se podrían investigar otras posibilidades terapéuticas, como agentes capaces de disminuir la expresión de metalotioneína, que puedan contribuir a neutralizar o prevenir la actividad de la misma en los mecanismos de resistencia a las drogas anticancerosas.

Respecto a la asociación con otros factores pronósticos, aunque Fresno⁵⁰³ refiere una relación significativa directa entre metalotioneína y grado histológico e inversa con los RE, nosotros no hemos encontrado asociación con ningún otro de los factores considerados.

Vimentina:

Respecto a la tinción para vimentina, nuestros datos concuerdan en general con los resultados de los escasos trabajos publicados sobre este marcador en los carcinomas mamarios^{510,511,585}.

Así nosotros hemos encontrado un 13.7% de tumores vimentina(+), mientras que Raymond y Leong⁵¹⁰ refieren un 11.5% y Domagala^{511,585} un 19%.

Respecto al tipo histológico, aunque Domagala⁵⁸⁵ en uno de sus artículos refiere un 5% de tumores positivos para vimentina dentro del grupo de los carcinomas lobulillares, nosotros hemos observado, al igual que Raymond que todos nuestros casos vimentina(+) eran del tipo ductal NOS o ductal mixto.

Respecto a la relación con otros factores, ambos autores encuentran relación significativa inversa entre el grado histológico y la positividad para vimentina. Esta asociación también se muestra significativa en nuestro estudio, de forma que los tumores con tinción positiva para vimentina presentaban un grado histológico 2 ó 3, pero ningún tumor con bajo grado de malignidad era vimentina positivo.

No hemos observado, como tampoco Domagala y Raymond, asociación con otros parámetros como tamaño tumoral o estadio ganglionar.

No hemos encontrado relación inversa entre tinción para vimentina y niveles de Ki 67, ni entre vimentina y estado de los receptores de estrógeno, hallazgos referidos por otros autores. En nuestra serie aunque el 60% de los tumores vimentina(+) eran RE(-) esta asociación no mostró significación estadística.

Respecto a la influencia en la evolución clínica de la enfermedad, ninguno de los trabajos referidos incluye datos de seguimiento clínico de las pacientes. En nuestro estudio, la tinción para vimentina no ha mostrado valor como factor pronóstico independiente en ninguno de los análisis estadísticos realizados en relación a la evolución.

A la vista de estos resultados, pensamos que aunque la aparición de tinción para vimentina en los carcinomas de mama pueda considerarse un signo de mal pronóstico y quizás un reflejo de disferenciación celular como han sugerido algunos autores, no añade, al menos de momento, información pronóstica a los datos de que disponemos en la actualidad, por lo que sería necesario que estudios con seguimiento clínico adecuado confirmen o desmientan este punto.

6. ICONOGRAFIA

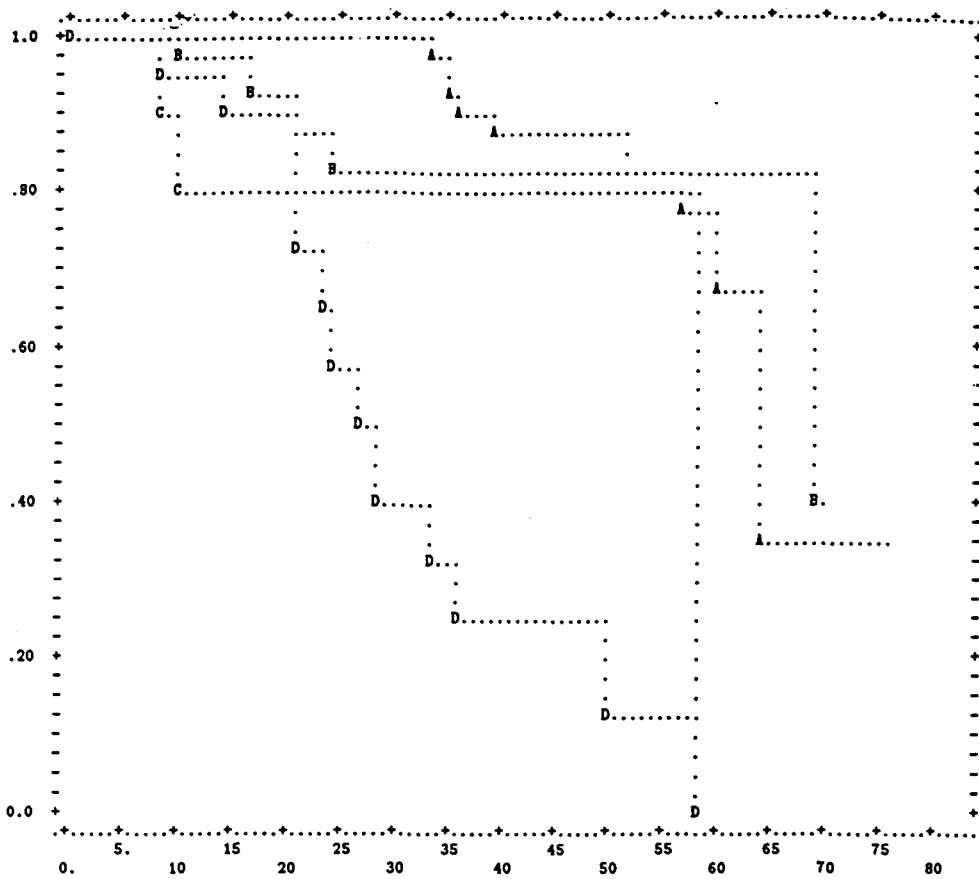


Fig. 1. Análisis de supervivencia para est.ganglionar en relación con muerte (p=0.0001)
 A:sin ganglios; B:1-3 ganglios; C:4-9 ganglios; D>9 ganglios.

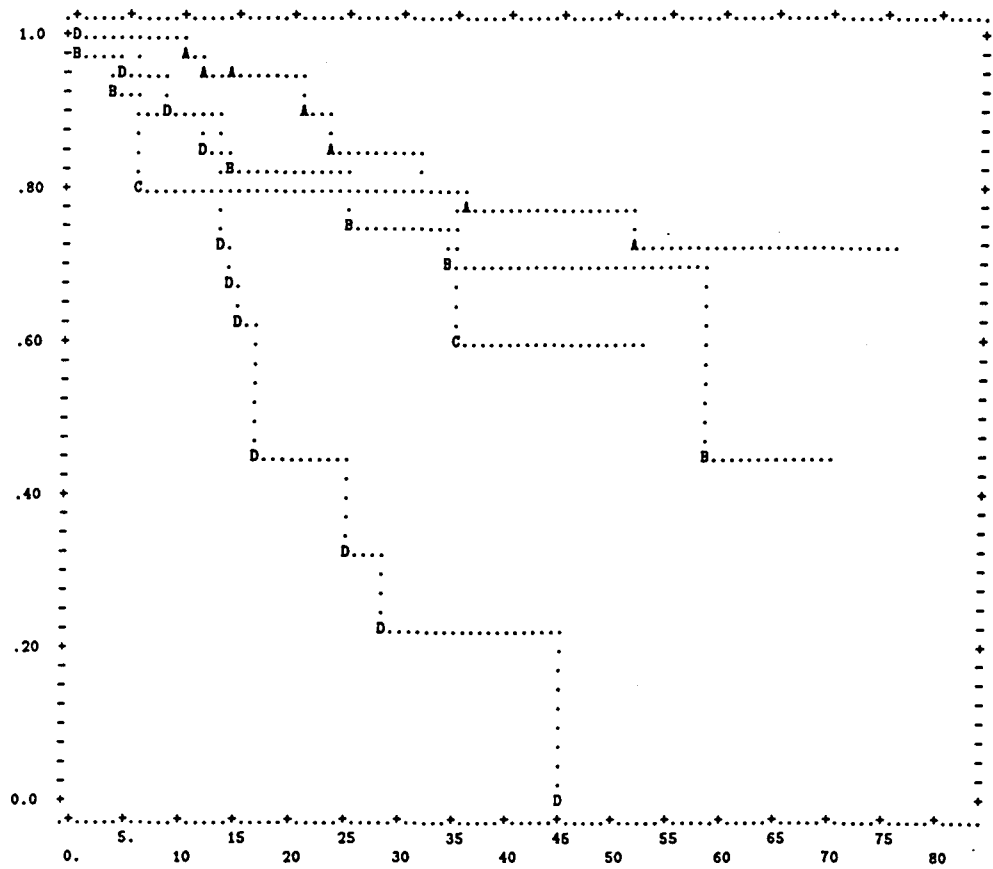


Fig.2. Análisis de supervivencia para est.ganglionar en relación con morbilidad (p=0.0012)
 A:sin ganglios; B:1-3 ganglios; C:4-9 ganglios; D>9 ganglios.

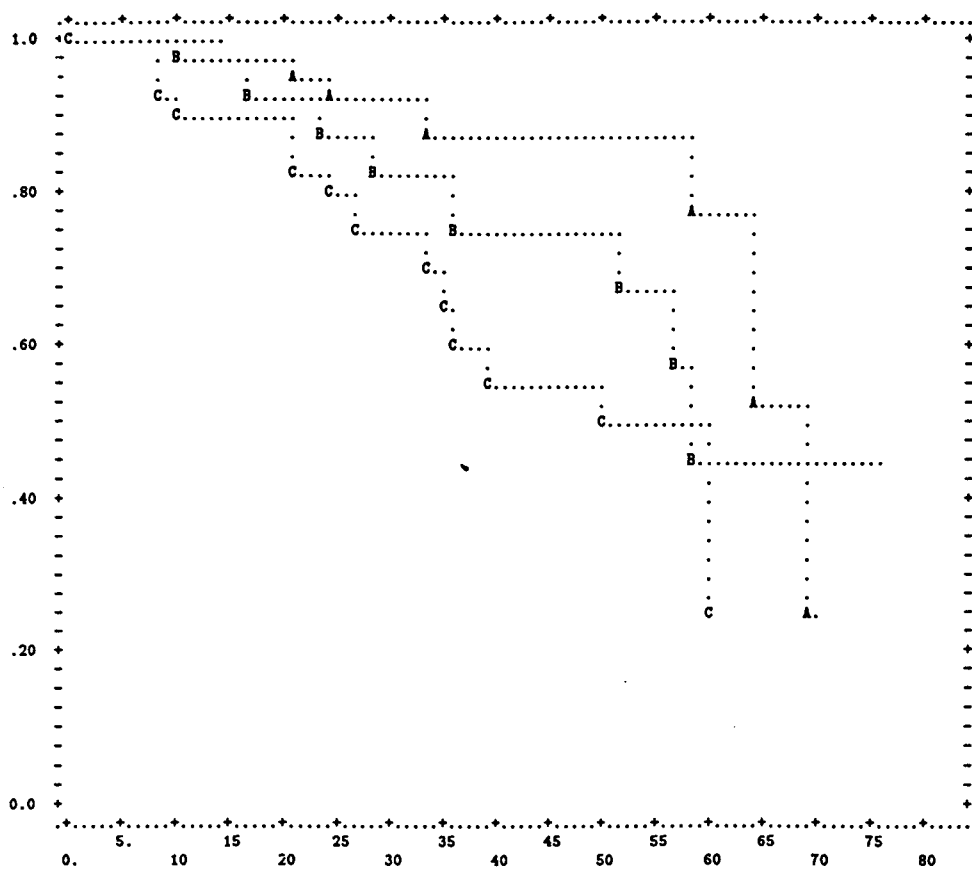


Fig.3. Análisis de supervivencia para gr.histológico en relación con muerte ($p=0.0085$)
 A:grado 1; B:grado 2; C:grado 3.

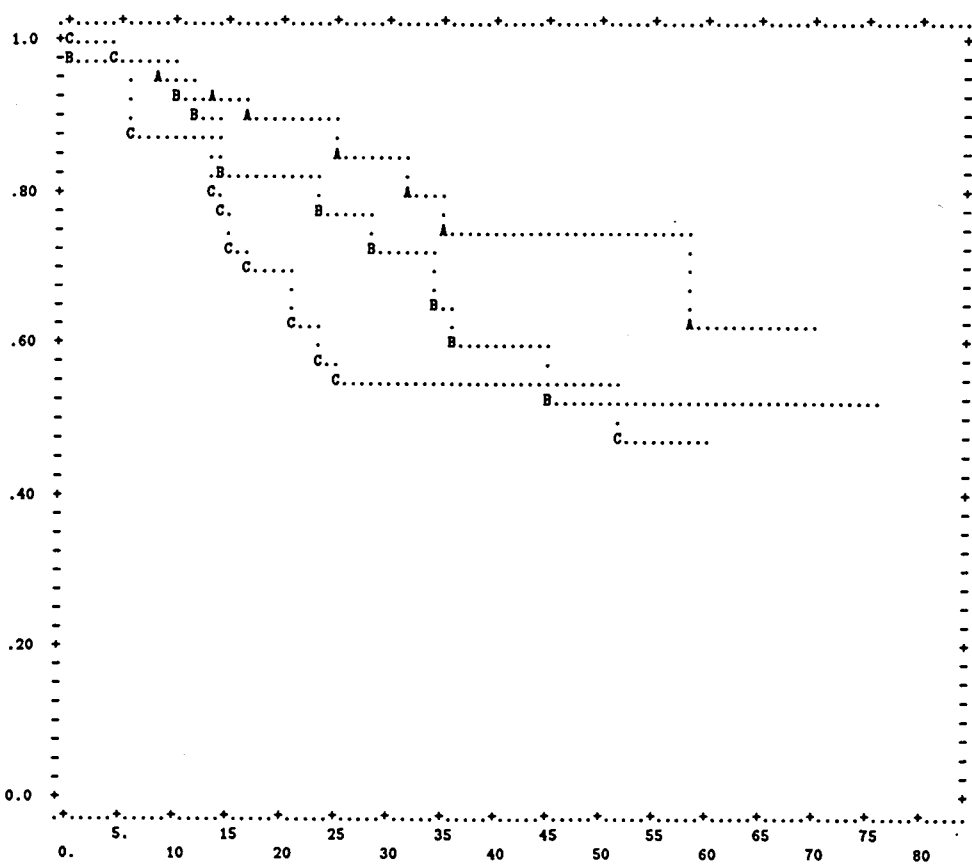


Fig.4. Análisis de supervivencia para gr.histológico en relación con morbilidad ($p=0.0197$)
 A:grado 1; B:grado 2; C:grado 3.

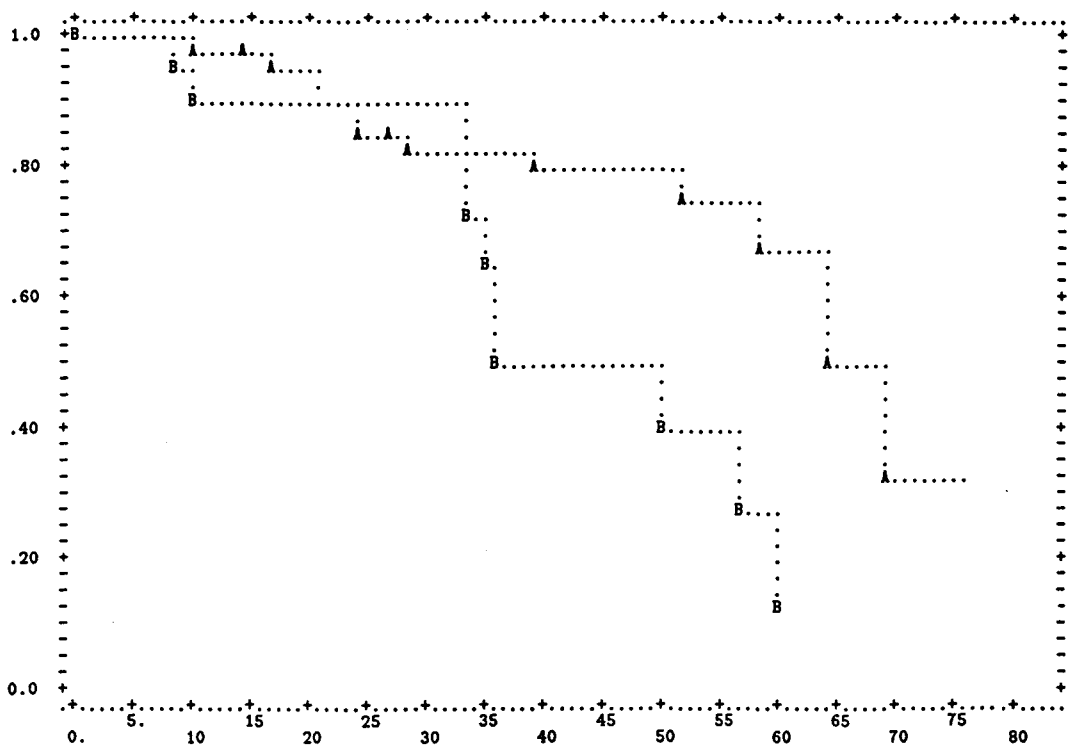


Fig.5. Análisis de supervivencia para Ki67 en relación con muerte ($p=0.0074$)
 A: Ki67 < 700; B: Ki67 > 700

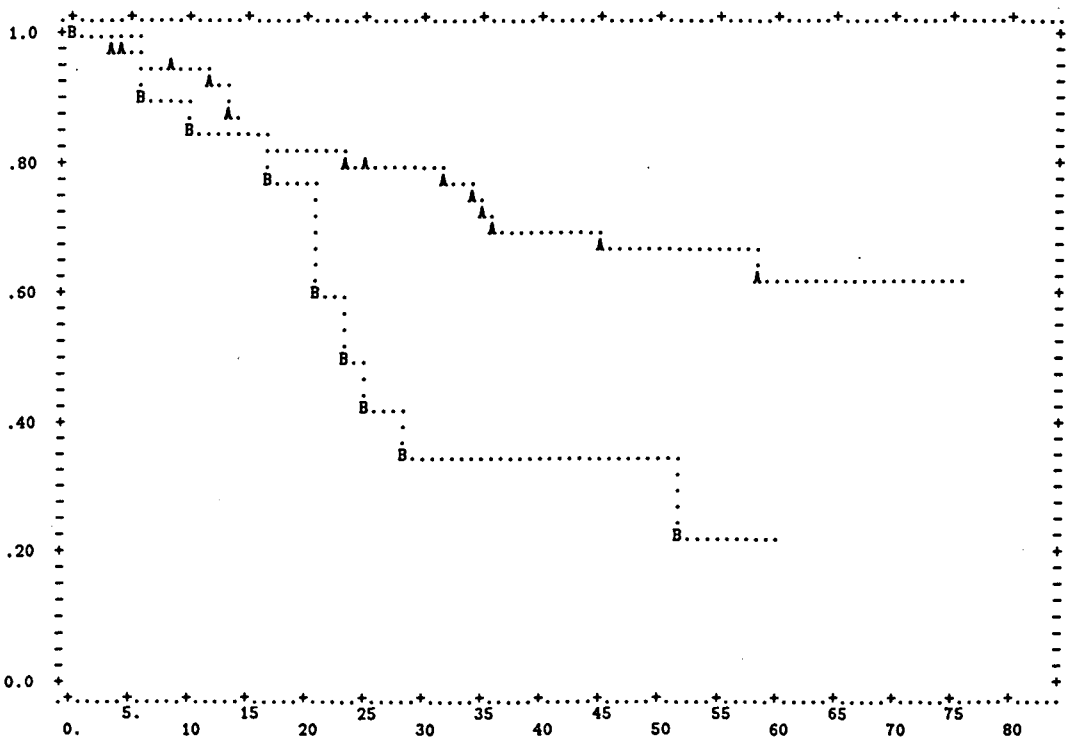


Fig.6. Análisis de supervivencia para Ki67 en relación con morbilidad ($p=0.0199$)
 A: Ki67 < 700; B: Ki67 > 700.

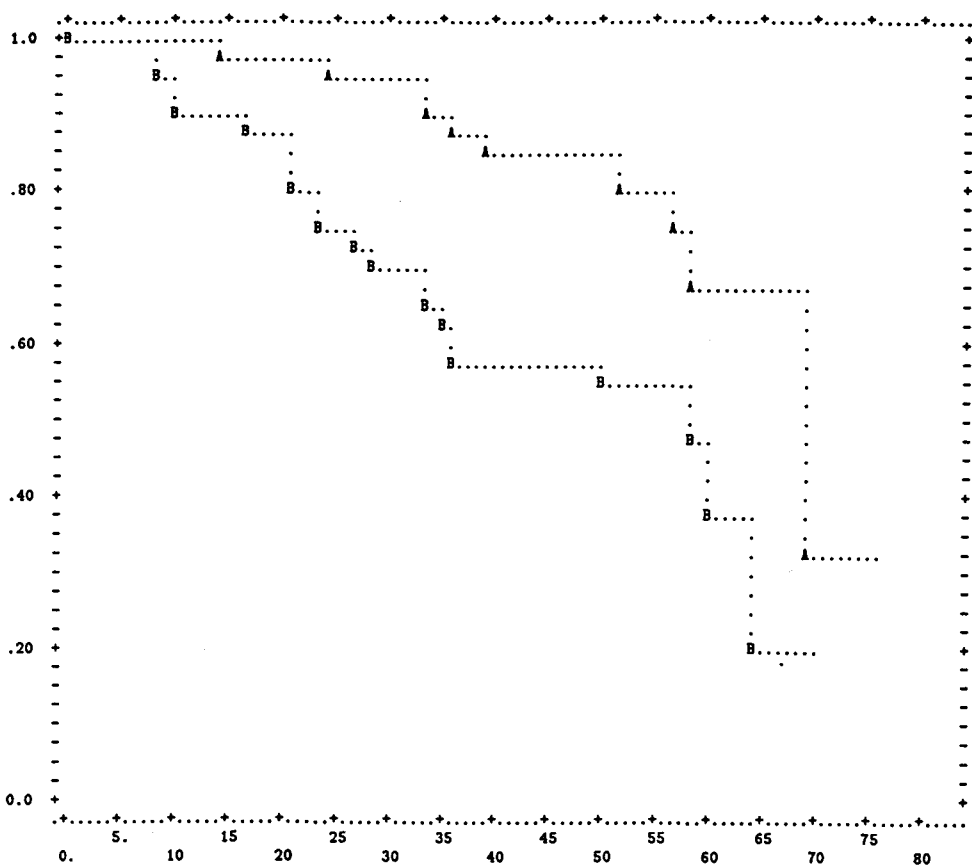


Fig.7. Análisis de supervivencia para metalotioneína en relación con muerte (p=0.0021)
A:negativa; B:positiva.

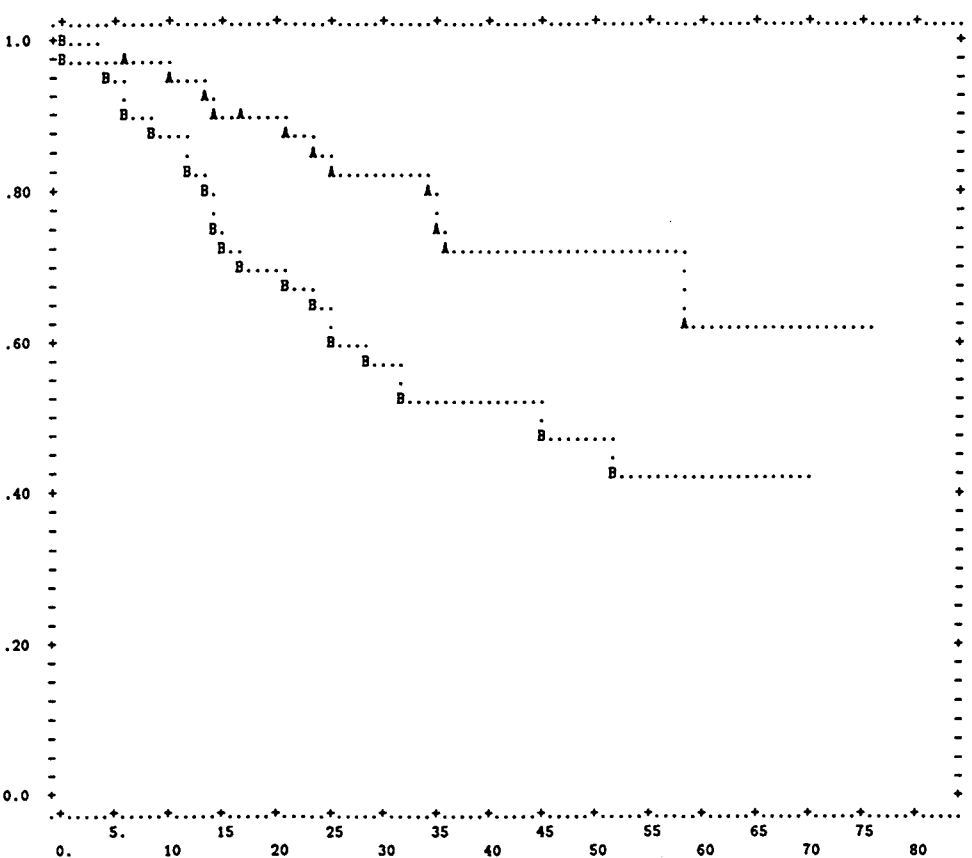


Fig.8. Análisis de supervivencia para metalotioneína en relación con morbilidad (p=0.0081)
A:negativa; B:positiva.

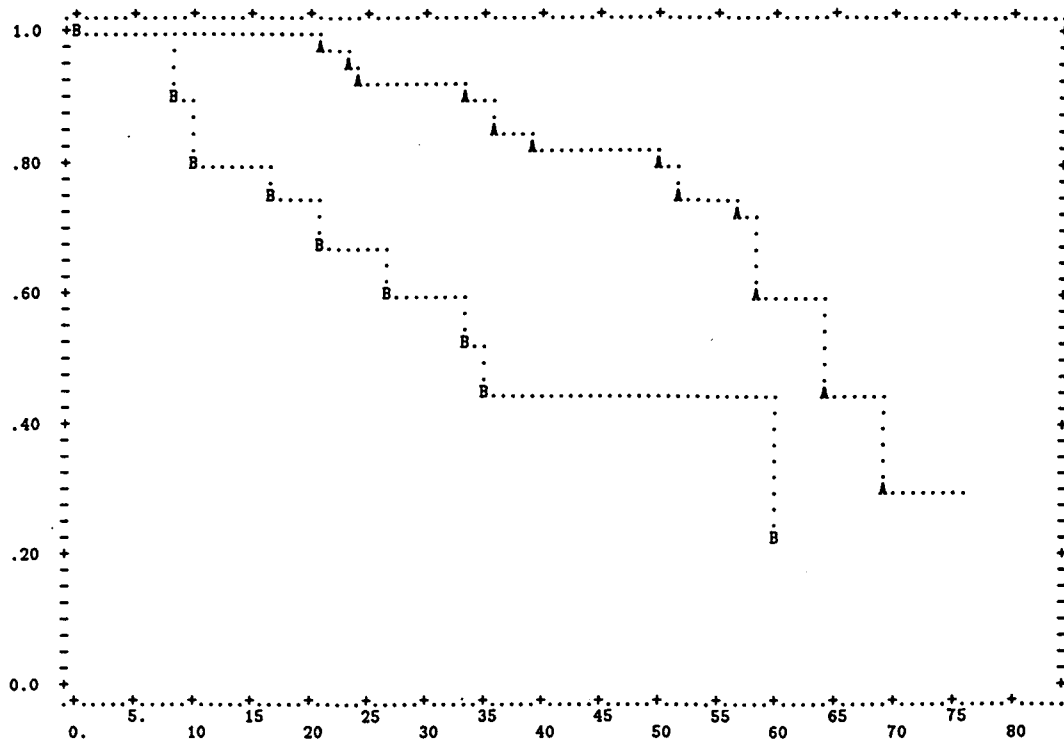


Fig.9. Análisis de supervivencia para met(+)/RE(-) en relación con muerte ($p=0.0003$)
 A: resto grupos; B: met(+)/RE(-).

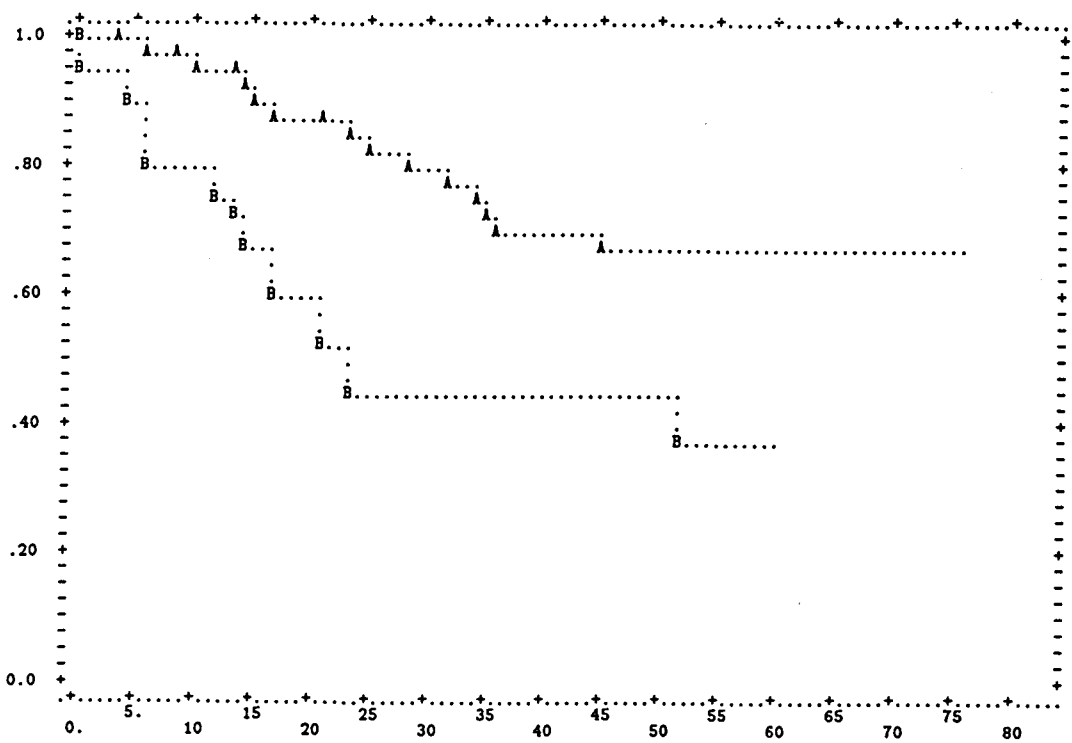


Fig.10. Análisis de supervivencia para met(+)/RE(-) en relación con morbilidad ($p=0.0010$)
 A: resto grupos; B: met(+)/RE(-).

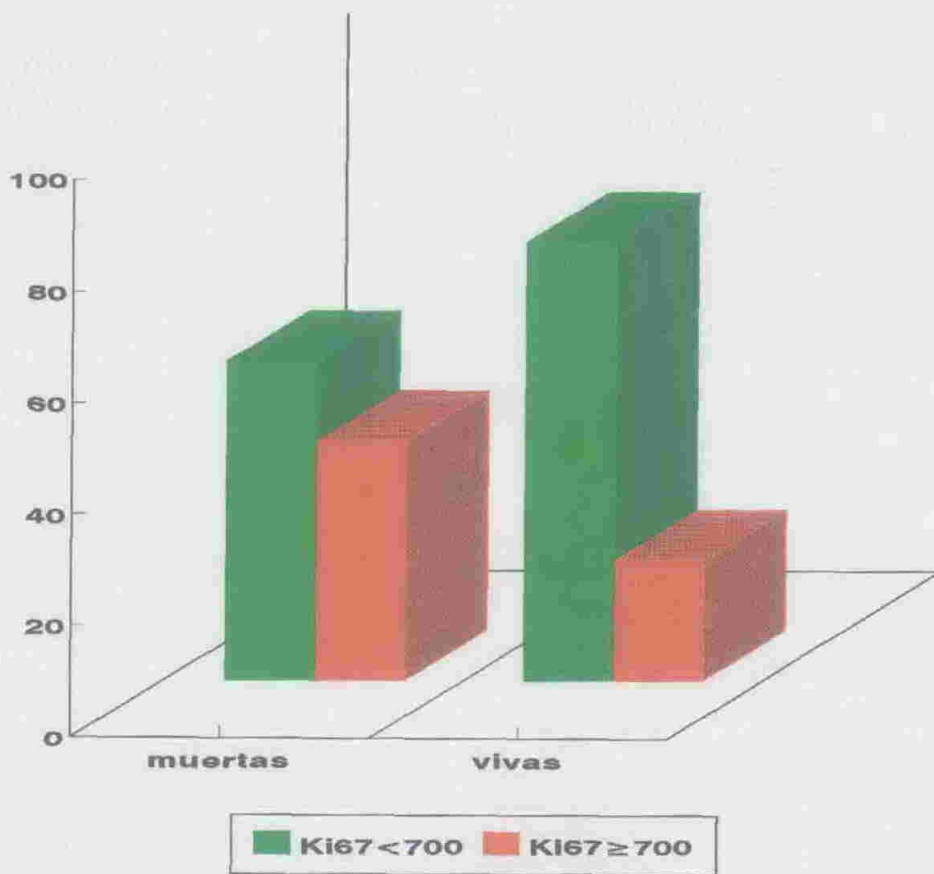


Fig.11. Relación Ki 67 - mortalidad (p=0.0092)

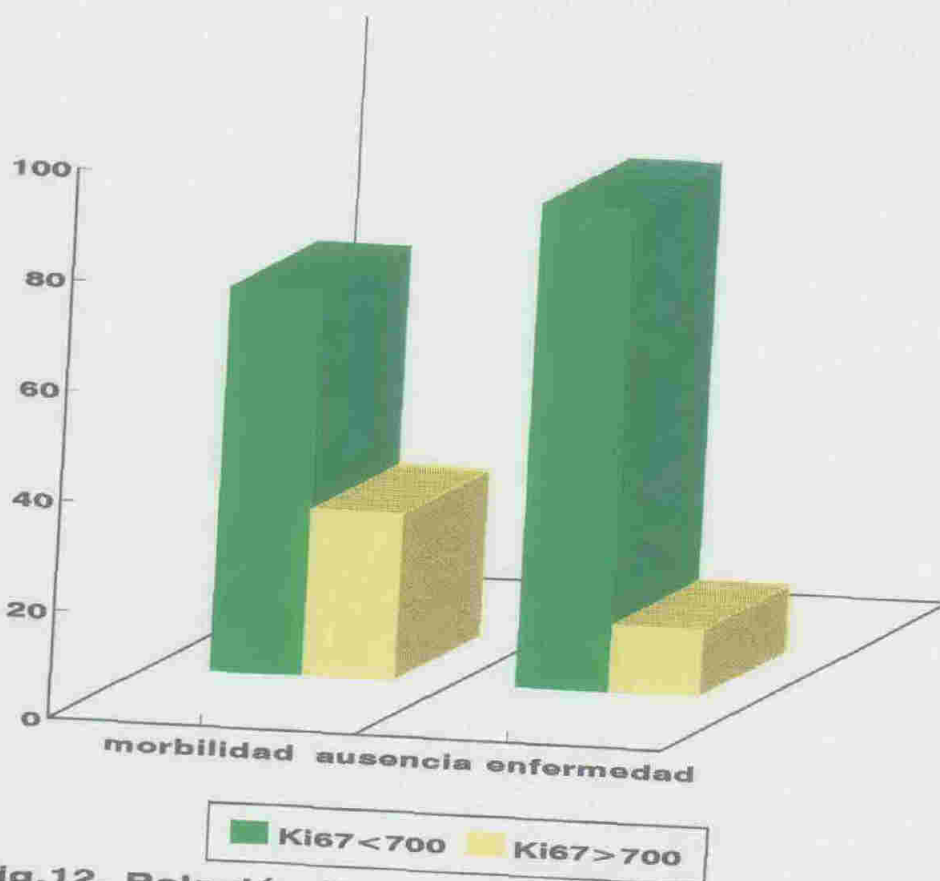


Fig.12. Relación Ki 67 - morbilidad (p=0.0462)

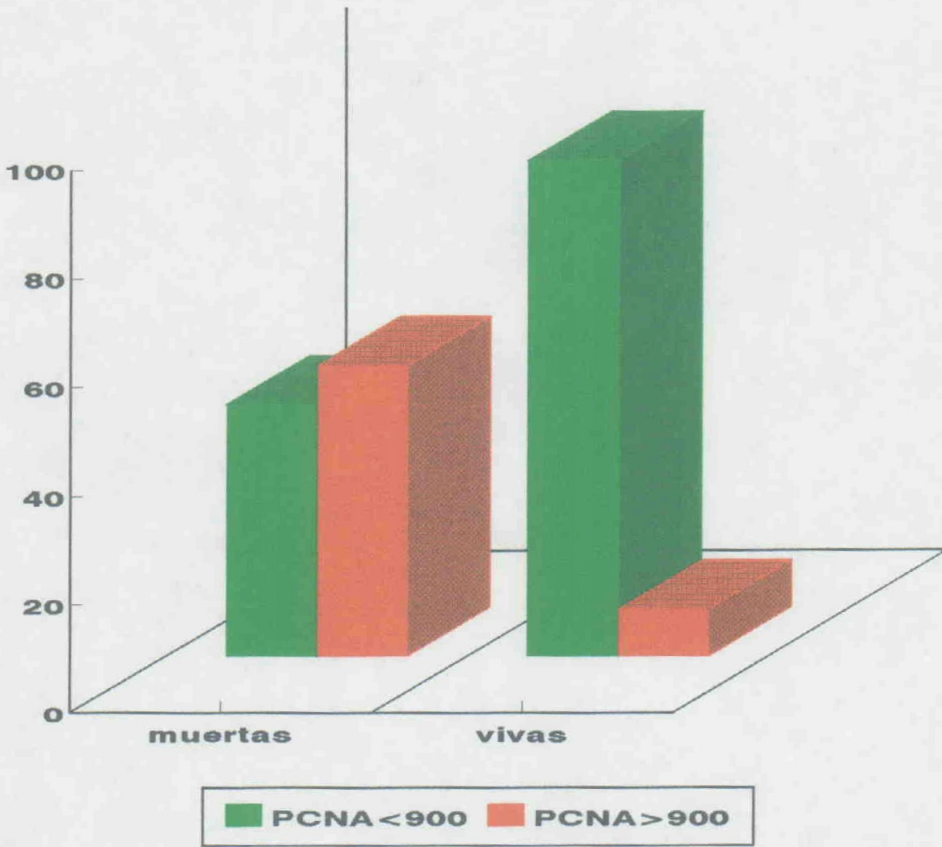


Fig.13. Relación PCNA - mortalidad (p=0.0081)

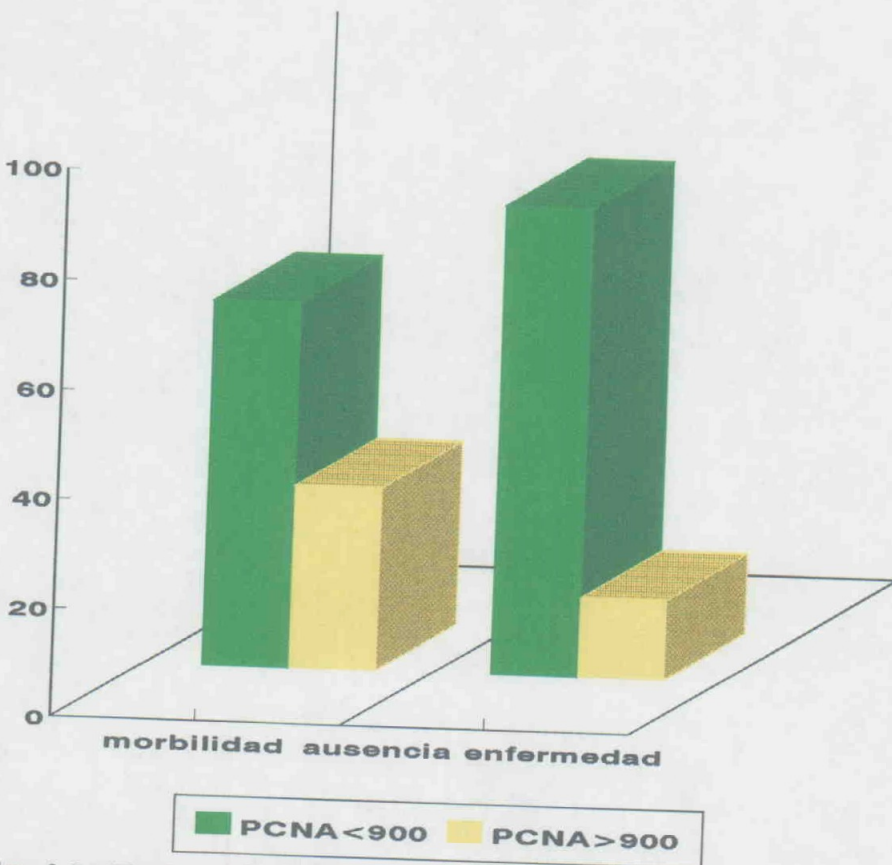


Fig.14. Relación PCNA - morbilidad (p= 0.0461)

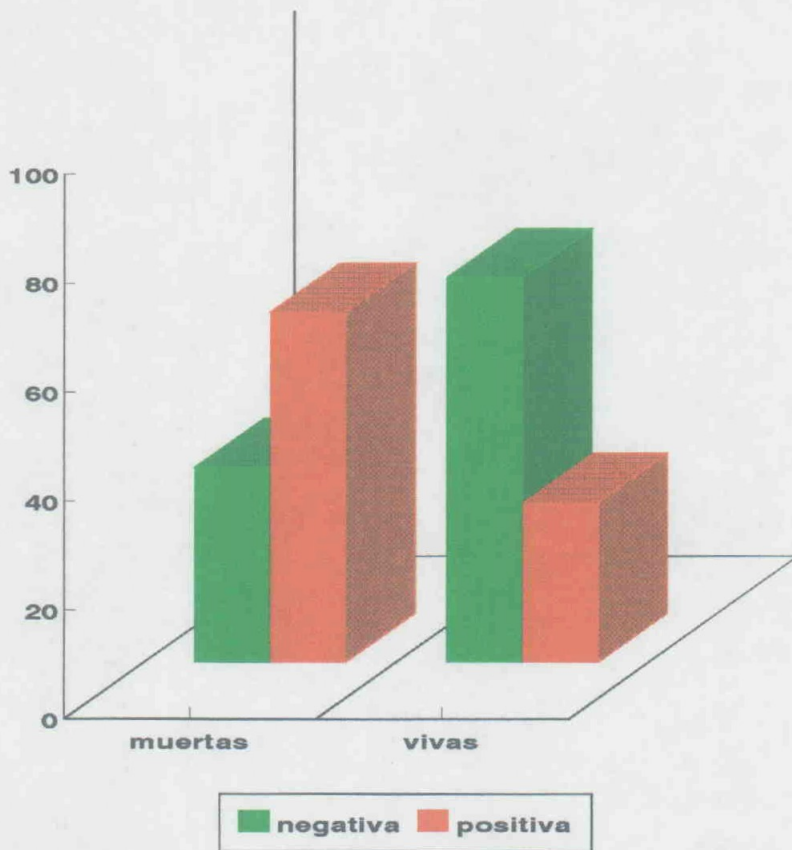


Fig.15. Relación metalotioneína-mortalidad ($p=0.0022$)

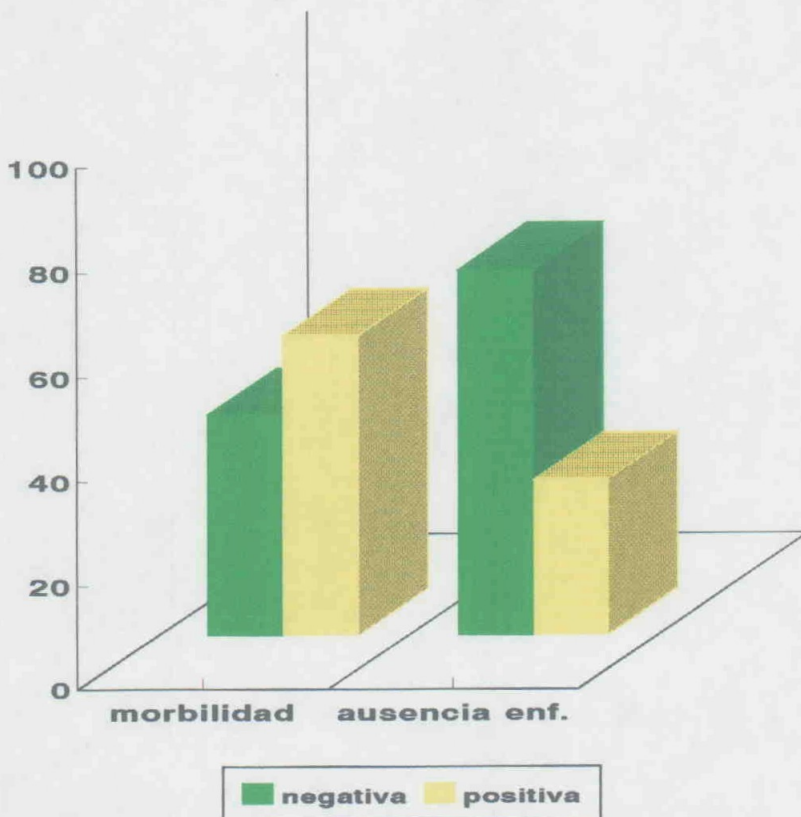


Fig.16. Relación metalotioneína-morbilidad ($p=0.0115$)

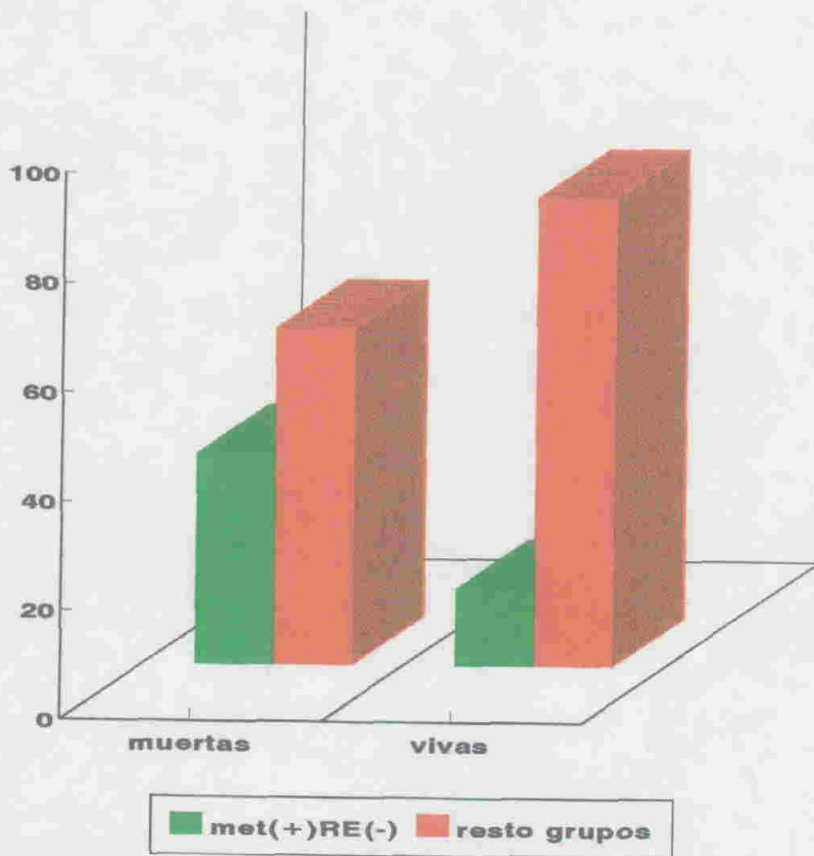


Fig.17. Relación met(+)
RE(-) - mortalidad (p=0.0165)

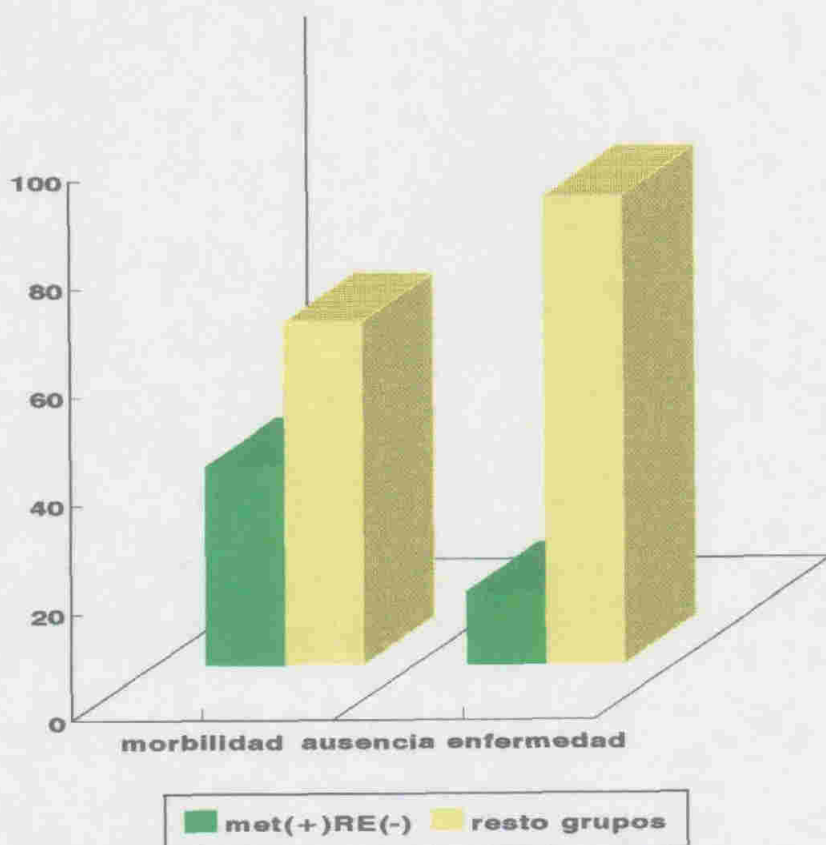


Fig.18. Relación met(+)
RE(-) - morbilidad (p=0.0166)

Foto A. **Receptores de estrógenos**. Células tumorales negativas. Tinción positiva en los núcleos del epitelio ductal no tumoral. (25X).

Foto B. **Receptores de estrógenos**. Inmunotinción específica en las células tumorales con extensión >75% e intensidad fuerte. (25X).

Foto C. **Catepsina D**. Células tumorales negativas. Tinción de las células del estroma. (200X).

Foto D. **Catepsina D**. Inmunotinción positiva en la mayoría (>75%) de las células tumorales. (25X).

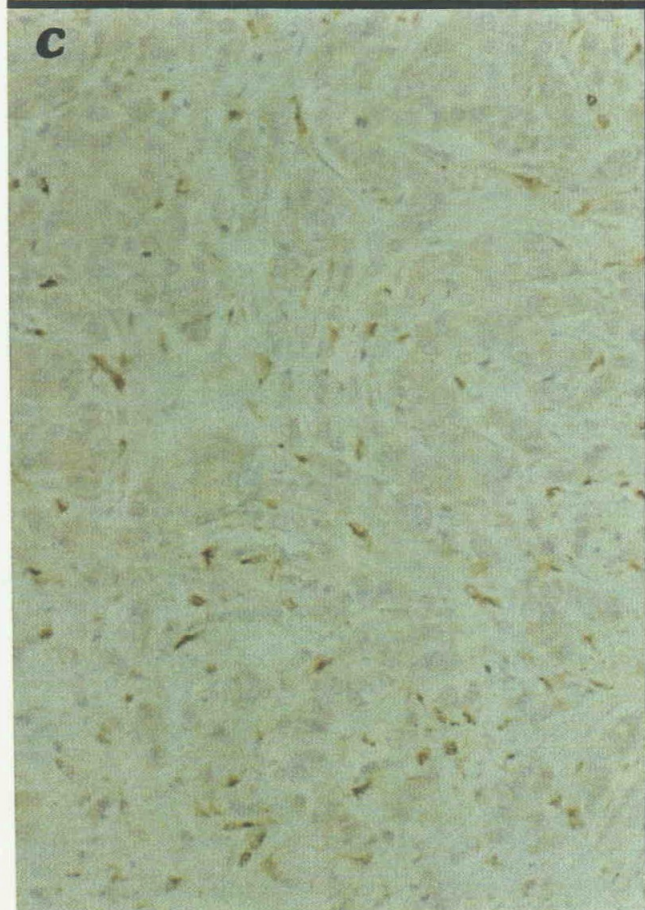
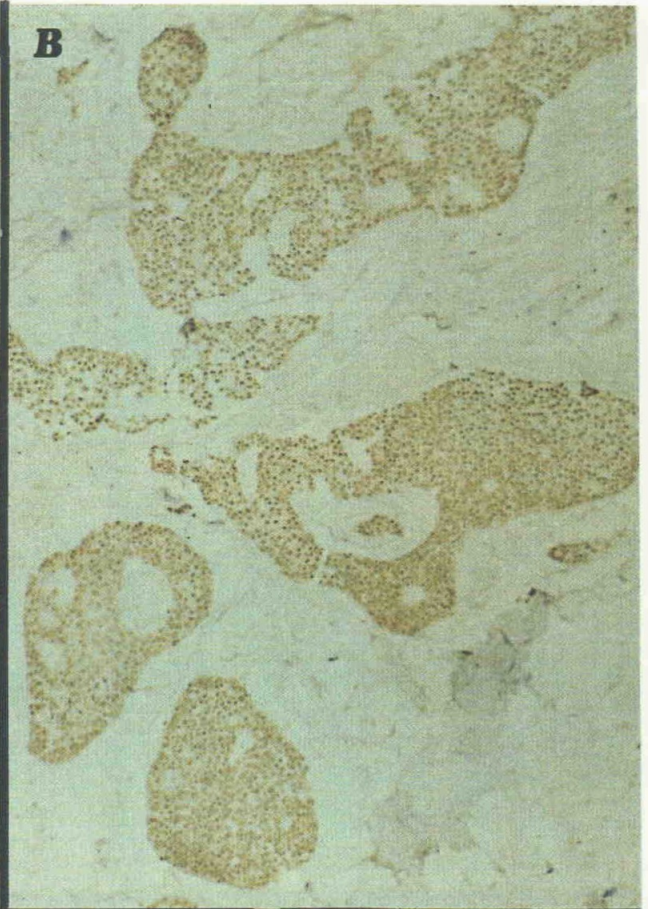


Foto E. **Metalotioneína**. Tinción negativa de las células tumorales. Células mioepiteliales positivas. (25X).

Foto F. **Metalotioneína**. Inmunotinción positiva en >75% de las células tumorales. (200X).

Foto G. **Vimentina**. Tinción negativa de las células tumorales. (100X).

Foto H. **Vimentina**. Inmunotinción positiva en las células tumorales (>10% células positivas). (400X).

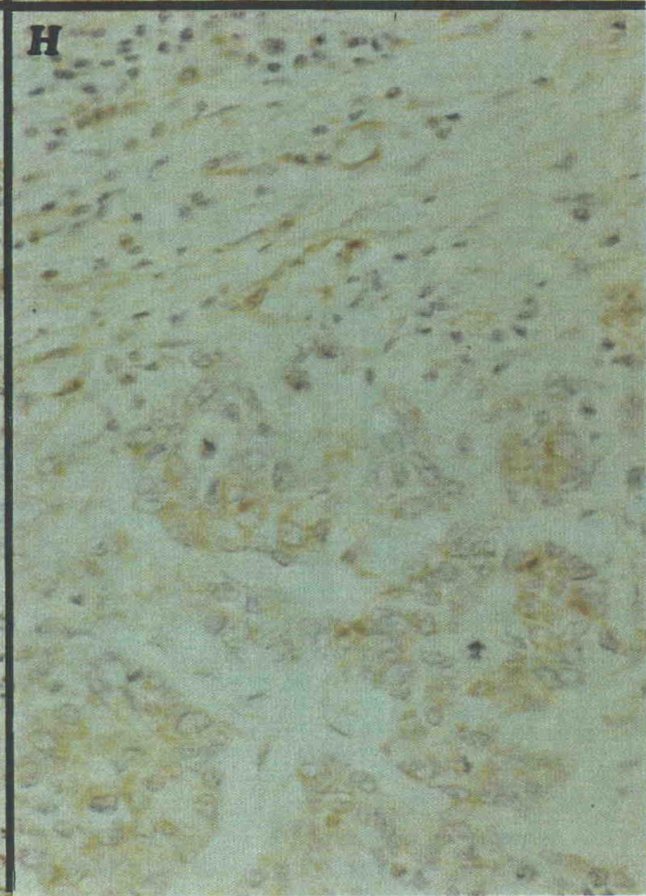
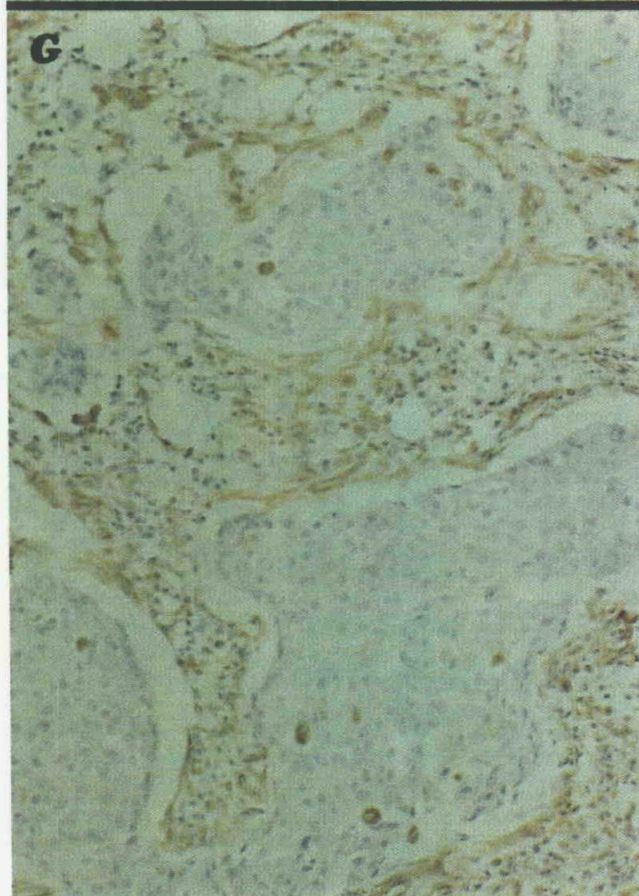
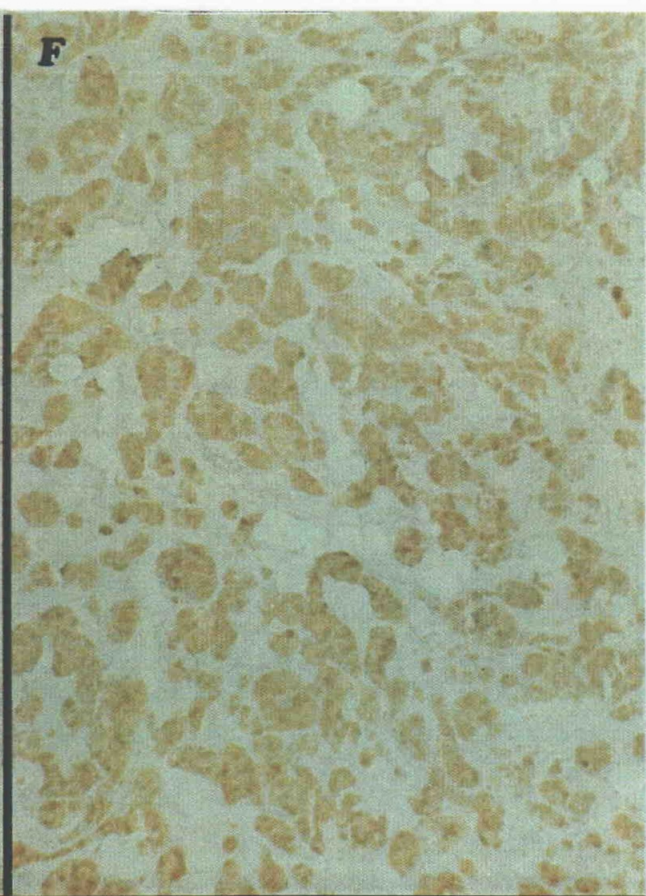
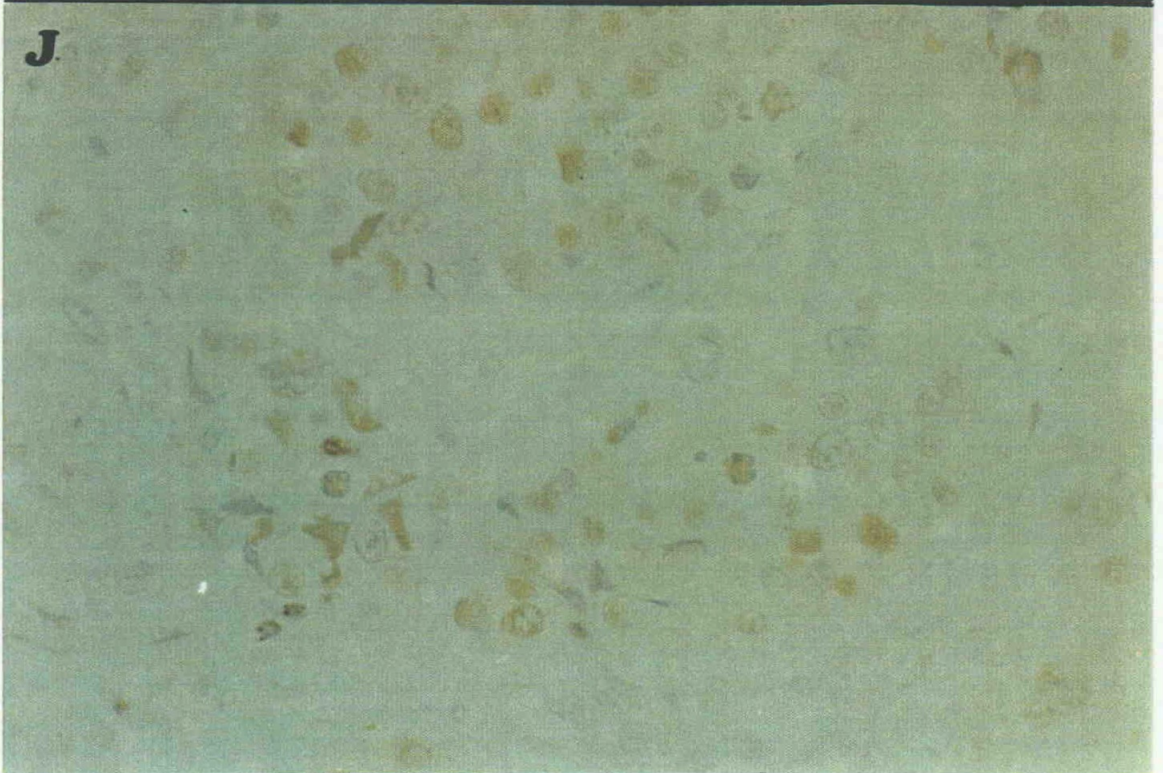
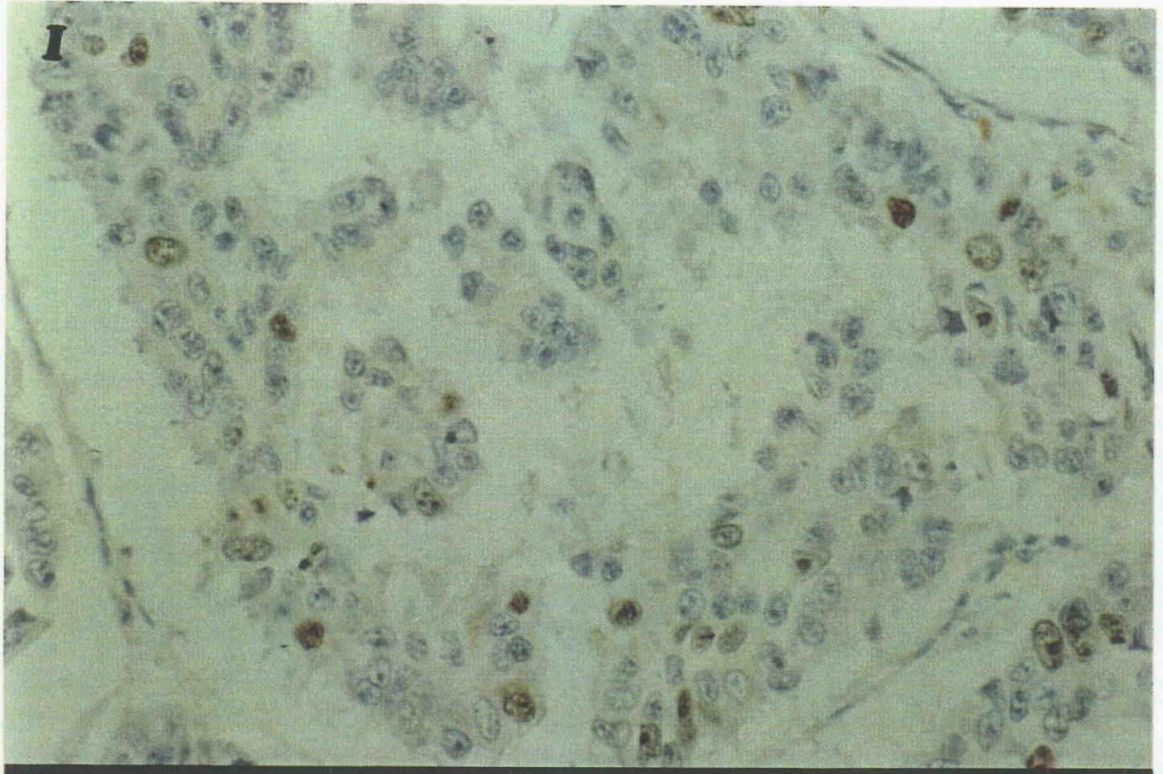


Foto I. **Ki 67**. Inmunotinción positiva en algunos núcleos de células tumorales. (400X).

Foto J. **PCNA**. Inmunotinción positiva en algunos núcleos de células tumorales. (400X).



7. CONCLUSIONES

1.- El estadio ganglionar se confirma como el factor pronóstico de mayor relevancia en los carcinomas de mama.

2.- El número de mitosis y el grado histológico se relacionan de manera significativa con la ocurrencia de muerte, metástasis y recidiva, así como con la supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad.

3.- El índice de Ki 67 ha mostrado significación estadística en la predicción de muerte y desarrollo de metástasis, así como en la supervivencia global y en el intervalo libre de enfermedad.

4.- El índice de PCNA se asocia significativamente a la ocurrencia de muerte y morbilidad y a la predicción del intervalo libre de metástasis, pero no de la supervivencia global.

5.- La presencia de receptores de estrógeno es un factor de buen pronóstico, relacionándose de manera significativa con un incremento de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad.

6.- La catepsina D carece de valor como factor pronóstico independiente.

7.- La tinción para metalotioneína ha mostrado valor pronóstico independiente en la predicción de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad, así como en la ocurrencia de muerte y desarrollo de metástasis.

8.- La asociación de metalotioneína (+) y RE (-) identifica un subgrupo de pacientes de peor pronóstico con un acortamiento significativo de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad.

9.- La vimentina no tiene valor pronóstico para predecir la evolución clínica de las pacientes.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Haagensen CD. Disease of the breast (2^a ed.) Filadelfia: Saunders, 1971.
2. McDivitt RW et al. Tumors of the breast. En: Atlas of Tumor Pathology, section 2. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1968.
3. Rosen PP et al. Noninvasive breast carcinoma: frequency of unsuspected invasion and implication for treatment. *Ann Surg* 1979; 189:377.
4. Schnitt SJ et al. Current concept: ductal carcinoma in situ (intraductal carcinoma of the breast). *N Engl J Med* 1988; 898.
5. Rosner D et al. Noninvasive breast carcinoma: result of a national survey by the American College of Surgeon. *Ann Surg* 1980; 192:139.
6. Smart CR et al. Implications from SEER data on breast management. *Cancer* 1978; 41:787.
7. Harris JR, Holland R, Kinne D. Ductal carcinoma in situ (DCIS). The new dilemma. Houston: Educational symposia, 1991; 23.
8. Baker LH. Breast Cancer Detection Demonstration Project: five year summary report. *CA* 1982; 32:194.
9. Azzopardi JG. Problems in breast pathology. En: Bennington JL, editor. Major Problems in Pathology. Londres: Saunders, 1979; 193.
10. Barners R, Masood S. Potential value of hormone receptor assay in carcinoma in situ of breast. *Am J Clin Pathol* 1990; 94:533.
11. Bartkova J et al. Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 protein in mammary ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol* 1990; 21:1164.
12. Locker AP al. Flow cytometric and histological analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Surg* 1990; 77:564.
13. Meyer JS. Cell kinetics of histologic variants of in situ breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 7:171.
14. Lagios MD. Duct carcinoma in situ. Pathology and treatment. *Surg Clin North Am* 1990; 70:853.
15. Lagios MD et al. Mammographically detected duct carcinoma in situ. kFrequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. *Cancer* 1989; 63:618.
16. Andersen JA, Nielsen M, Blichert-Toft M. The growth pattern of in situ carcinoma in the female breast. *Acta Oncol* 1988; 27:739.
17. Andersen J, Blichert-Toft M, Dyreborg U. In situ carcinoma of the breast. Types, growth pattern, diagnosis and treatment. *Eur J Surg Oncol* 1987; 13:105.
18. Schwartz GF et al. Staging and treatment of clinically occult breast cancer. *Cancer* 1984; 53:1379.
19. Holland R et al. Extent, distribution, and mammographic/histological correlations of breast ductal carcinoma in situ. *Lancet* 1990; 335:519.

20. Farrow JH. Current concepts in the detection and treatment of the early breast cancer. *Cancer* 1970; 25:458.
21. Silverstein MJ et al. Intraductal carcinoma of the breast (208 cases). Clinical factors influencing treatment choice. *Cancer* 1990; 66:102.
22. Ashikari R, Huvos AG, Snyder RE. Prospective study of noninfiltrating carcinoma of the breast. *Cancer* 1977; 39:435.
23. Sunshine JA et al. Breast carcinoma in situ: a retrospective review of 112 cases with a minimum 10 year follow-up. *Am J Surg* 1985; 150:44.
24. Kinne DW et al. Breast carcinoma in situ. *Arch Surg* 1989; 124:33.
25. Westbrook KC, Gallager HS. Intraductal carcinoma of the breast: a comparative study. *Am J Surg* 1985; 130:667.
26. Fisher ER et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol 6). Intraductal carcinoma (DCIS). *Cancer* 1986; 57:197.
27. Recht A et al. Conservative surgery and radiotherapy for ductal carcinoma in situ (DCIS). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1991; 10:47.
28. Solin LJ et al. Definitive irradiation for intraductal carcinoma of the breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19:843.
29. Stotter AT et al. The role of limited surgery with irradiation in primary treatment of ductal in situ breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18:283.
30. Bornstein BA et al. Results of treating ductal carcinoma in situ with conservative surgery and radiation therapy. *Cancer* 1991; 67:7.
31. World Health Organization . Histological typing of breast tumours. 2nd ed. International Histological Classification of Tumours No.2. Geneva: World Health Organization 1981; 19.
32. Adair F et al. Long-term follow-up of breast cancer patients: the 30-year report. *Cancer* 1974; 33:1145.
33. Breslow A, Brancaccio ME. Intracellular mucin production by lobular carcinoma of the breast. *Cancer* 1973; 31:110.
34. Carter D et al. Relationship of necrosis and tumor border to lymph node metastases and 10-year survival in carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 1978; 2:39.
35. Lane N et al. Clinico pathologic analysis of the surgical curability of breast cancers. A minimum ten-year study of a personal series. *Ann Surg* 1961; 153:483.
36. Foote FW Jr, Stewart FW. Lobular carcinoma in situ: a rare form of mammary cancer. *Am J Pathol* 1941; 17:491.
37. Henson D, Tarone R. A study of lobular carcinoma of the breast based on the Third National Cancer Survey in the United States of America. *Tumori* 1979; 65:133.
38. Newman W. Lobular carcinoma of the female breast. Report of 73 cases. *Ann Surg* 1966; 164:305-314.

39. Richter GO, Dockerty MB, Clagett OT. Diffuse infiltrating scirrhous carcinoma of the breast. Special consideration of the single-filing phenomenon. *Cancer* 1967; 20:363.
40. Dixon JM et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 1982; 6:149.
41. Martinez V, Azzopardi JG. Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. *Histopathology* 1979; 3:448.
42. Ashikari R et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Cancer* 1973; 31:110.
43. DiConstanzo D et al. Prognosis in infiltrating lobular carcinoma. An analysis of "classical" and variant tumors. *Am J Surg Pathol* 1990; 14:12.
44. Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW. Breast carcinoma at the extremes of age: a comparison of patients younger than 35 years and older than 75 years. *J Surg Oncol* 1985; 28:90.
45. Nesland JM, Holm R, Johannessen JV. Ultrastructural and immunohistochemical features of lobular carcinoma of the breast. *J Pathol* 1985; 145:39.
46. Dwarakanath S et al. S-100 protein sensitivity in breast carcinomas: a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Hum Pathol* 1987; 18:1144.
47. Grudzinskas JG et al. Circulating levels of pregnancy specific beta 1 glycoprotein in patients with testicular, bronchogenic and breast carcinomas. *Cancer* 1980; 45:102.
48. Du Toit RS et al. Invasive lobular carcinomas of the breast: the prognosis of histopathological subtypes. *Br J Cancer* 1989; 60:605.
49. Shousha S et al. Alveolar variant of invasive lobular carcinoma of the breast. A tumor rich in estrogen receptors. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:1.
50. Harris M et al. A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1984; 50:23.
51. Egger H, Dressler W. A contribution to the natural history of breast cancer. Duct obliteration with periductal elastosis in the centre of breast cancers. *Arch Gynecol* 1982; 231:191.
52. Tremblay G. Elastosis in tubular carcinoma of the breast. *Arch Pathol* 1974; 98:302.
53. Masood S, Barwick KW. Estrogen receptor expression of the less common breast carcinomas (Abstract). *Am J Clin Pathol* 1990; 93:437.
54. Carstens PH et al. Tubular carcinoma of the breast. A long term follow-up. *Histopathology* 1985; 9:271.
55. Cooper HS, Patchefsky AS, Krall RA. Tubular carcinoma of the breast. *Cancer* 1978; 42:2334.
56. Ekblom P et al. Basement membrane and apocrine epithelial antigens in differential diagnosis between tubular carcinoma and sclerosing adenosis of the breast. *J Clin Pathol* 1984; 37:357.
57. McDivitt RW, Boyce W, Gersell D. Tubular carcinoma of the breast. Clinical and pathological observations concerning 135 cases. *Am J Surg Pathol* 1982; 6:401.

58. Oberman HA, Fidler WJ Jr. Tubular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 1979; 3:387.
59. World Health Organization. Histological typing of breast tumors. *Tumori* 1972; 68:181.
60. Ridolfi RL et al. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer* 1977; 40:1365.
61. Richardson WW. Medullary carcinoma of the breast. A distinctive tumor type with a relative good prognosis following radical mastectomy. *Br J Cancer* 1956;10:415.
62. Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci* 1979; 9:144.
63. Lesser ML, Rosen PP, Kinne DW. Multicentricity and bilaterality in invasive breast carcinoma. *Surgery* 1982; 91:234.
64. Rapin V et al. Medullary breast carcinoma. A reevaluation of 95 cases of breast cancer with inflammatory stroma. *Cancer* 1988; 61:2503.
65. Beahrs OH et al. Report of the working group to review the National Cancer Institute-American Cancer Society Breast Cancer Detection Demonstration Projects. *JNCI* 1979; 62:640.
66. Rasmussen BB, Rose C, Christensen IB. Prognostic factors in primary mucinous breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:155.
67. Snyder M, Tobon H. Primary mucinous carcinoma of the breast. *Breast* 1977; 3:17.
68. Lesser ML et al. Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: correlations with epidemiology and pathology. *Cancer* 1981; 48:229.
69. Sousha S et al. Oestrogen receptors in mucinous carcinoma of the breast: an immunohistochemical study using paraffin wax sections. *J Clin Pathol* 1989; 42:902.
70. Hull MT, Warfel KA. Mucinous breast carcinomas with abundant intracytoplasmic mucin and neuroendocrine features: light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11:29.
71. Rasmussen BB et al. Argrophilic cells in 202 human mucinous breast carcinomas. Relation to histopathologic and clinical features. *Am J Clin Pathol* 1985; 84:737.
72. Rosen PP. Mucocele-like tumors of the breast. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:464.
73. Fisher ER et al. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol n° 4). *Cancer* 1975; 36:1.
74. Page DL et al. Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology* 1983; 7:525.
75. Venable JG, Schwartz AM, Silverberg SG. Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity. *Hum Pathol* 1990; 21:333.
76. Carter D, Orr SL, Merino MJ. Intracystic papillary carcinoma of the breast after mastectomy, radiotherapy or excisional biopsy alone. *Cancer* 1983; 52:14.

- 77.** Czernobilsky B. Intracystic carcinoma of the female breast. *Surg Gynecol Obstet* 1967; 124:93.
- 78.** Devitt JE, Barr JR. The clinical recognition of cystic carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1984; 159:130.
- 79.** Meyer JS, Bauer WC, Rao BR. Subpopulations of breast carcinoma defined by S-phase fraction, morphology and estrogen receptor content. *Lab Invest* 1978; 39:225.
- 80.** Tiltman AJ. DNA ploidy in papillary tumours of the breast. *S Afr Med J* 1989; 75:379.
- 81.** Rosen PP. Arthur Purdy Stout and papilloma of the breast. Comments on the occasion of his 100th birthday. *Am J Surg Pathol* 1986; 10(Suppl 1):100.
- 82.** Kraus FT, Neubecker RD. The differential diagnosis of papillary tumors of the breast. *Cancer* 1962; 15:444.
- 83.** Rosen PP, Oberman HA. Tumors of the mammary gland. Atlas of tumor pathology. Third series, fasc 7. Ed by Rosai J, Sobin LH. Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC; 1993.
- 84.** Fisher ER et al. Mucoepidermoid and squamous cell carcinomas of breast with reference to squamous metaplasia and giant cell tumors. *Am J Surg Pathol* 1981; 7:15.
- 85.** Kaufman MW et al. Carcinoma of the breast with pseudosarcomatous metaplasia. *Cancer* 1984; 53:1908.
- 86.** Huvos AG, Lucas JC Jr, Foote FW Jr. Metaplastic breast carcinoma. *NY State J Med* 1973; 73:1078.
- 87.** Ellis IO et al. Immunocytochemical investigation of intermediate filament proteins and epithelial membrane antigen in spindle cell tumors of the breast. *J Pathol* 1988; 154:157.
- 88.** Wargotz ES, Deos PH, Norris HJ. Metaplastic carcinoma of the breast. II: Spindle cell carcinoma. *Hum Pathol* 1989; 20: 732.
- 89.** Rostock RA, Bauer TW, Eggleston JC. Primary squamous carcinoma of the breast: a review. *Breast* 1984; 108:893.
- 90.** Farrand R et al. Epidermoid carcinoma of the breast. *J Surg Oncol* 1979; 12:207.
- 91.** Chen TK. Fine needle aspiration cytology of squamous cell carcinoma of the breast. *Acta Cytol* 199; 34:664.
- 92.** Sousha S et al. Squamous cell carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108:893.
- 93.** Hjorth S, Magnusson PH, Blomquiste PJ. Adenoid cystic carcinoma of the breast. Report of a case in a male and review of the literature. *Acta Chir Scand* 1977; 143:155.
- 94.** Qizilbash AH, Patterson MC, Oliveira KF. Adenoid cystic carcinoma of the breast. Light and electron microscopy and a brief review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 1977; 101:302.
- 95.** Friedman BA, Oberman HA. Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol* 1970; 54:1.

- 96.** Koss LG, Brannan CD, Ashikari R. Histologic and ultrastructural features of adenoid cystic carcinoma of the breast. *Cancer* 1970; 26:1271.
- 97.** Rosen PP. Adenoid cystic carcinoma of the breast. A morphologically heterogeneous neoplasm. *Pathol Annu* 1989; 24(2):237.
- 98.** Peters GN, Wolff M. Adenoid cystic carcinoma of the breast. Report of 11 new cases: review of the literature and discussion of biological behavior. *Cancer* 1982; 52:680.
- 99.** Anthony PP, James PD. Adenoid cystic carcinoma of the breast: prevalence, diagnostic criteria and histogenesis. *J Clin Pathol* 1975; 28:647.
- 100.** Tavassoli FA, Norris HJ. Mammary adenoid cystic carcinoma with sebaceous differentiation. A morphologic study of the cell types. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110:1045.
- 101.** Dūe W et al. Characterization of adenoid cystic carcinoma of the breast by immunohistology. *J Clin Pathol* 1989; 42:470.
- 102.** Holland R, Van Haelst UJ. Mammary carcinoma with osteoclast-like giant cells. Additional observations on six cases. *Cancer* 1984; 53:1963.
- 103.** Ichijima K et al. Breast cancer with reactive multinucleated giant cells: report of three cases. *Acta Pathol Jpn* 1986; 36:449.
- 104.** Agnantis NT, Rosen PP. Mammary carcinoma with osteoclast-like giant cells. A study of eight cases with follow-up data. *Am J Clin Pathol* 1979; 72:383.
- 105.** Nielsen BB, Kiaer HW. Carcinoma of the with stromal multinucleated giant cells. *Histopathology* 1985; 9:183.
- 106.** Ferguson TB Jr, McCarty KS Jr, Filston HC. Juvenile secretory carcinoma and juvenile papillomatosis: diagnosis and treatment. *J Pediatr Surg* 1987; 22:637.
- 107.** Oberman HA et al. Juvenile papillomatosis and breast carcinoma. *Cancer* 1985; 55:1345.
- 108.** Guerry P, Erlandson RA, Rosen PP. Cystic hypersecretory hyperplasia and cystic hypersecretory duct carcinoma of the breast. Pathology, therapy and follow-up of 39 patients. *Cancer* 1988; 61:1611.
- 109.** Rosen PP, Scott M. Cystic hypersecretory duct carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 1984; 8:31.
- 110.** d'Amore ES et al. Invasive apocrine carcinoma of the breast: a long term follow-up study of 34 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1988; 12:37.
- 111.** Robbins GF et al. Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Clin North Am* 1974; 54:801.
- 112.** Mazoujian G et al. Expression of GCDFP-15 in breast carcinomas. Relationship to pathologic and clinical factors. *Cancer* 1989; 63:2156.
- 113.** Abati AD, Kimmel M, Rosen PP. Apocrine mammary carcinoma. A clinicopathologic study of 72 cases. *Am J Clin Pathol* 1990; 94:371.

- 114.** Eusebi V et al. Apocrine differentiation in lobular carcinoma of the breast: a morphologic, immunologic and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1984; 15:134.
- 115.** Saigo PE, Rosen PP. Mammary carcinoma with "choriocarcinomatous" features. *Am J Surg Pathol* 1981; 5:773.
- 116.** Cohle SD et al. ACTH-secreting carcinoma of the breast. *Cancer* 1979; 43:2370.
- 117.** Hillyard CJ et al. Calcitonin in breast and lung cancer. *Clin Endocrinol* 1976; 5:1.
- 118.** Mavligit GM, Cohen JL, Sherwood LM. Ectopic production of parathyroid hormone by carcinoma of the breast. *N Engl J Med* 1971; 285:154.
- 119.** Lee AK et al. Tumor marker expression in breast carcinomas and relationship to prognosis. An immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1985; 84:687.
- 120.** Kaneko H et al. Norepinephrine-producing tumors of bilateral breasts: a case report. *Cancer* 1978; 41:2002.
- 121.** Cubilla AL, Woodruff JM. Primary carcinoid tumor of the breast. A report of eight patients. *Am J Surg Pathol* 1977; 1:283.
- 122.** Clayton F et al. Argyrophilic breast carcinomas: evidence of lactational differentiation. *Am J Surg Pathol* 1982; 6:323.
- 123.** Pagani A et al. Chromogranin A and B gene expression in carcinomas of the breast. Correlation of immunocytochemical, immunoblot and hybridization analysis. *Am J Pathol* 1990; 136:319.
- 124.** Benisch B et al. Solid glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast (a light and ultrastructural study). *Am J Clin Pathol* 1983; 79:243.
- 125.** Fisher ER et al. Glycogen-rich, clear cell breast cancer: with comments concerning other clear cell variants. *Hum Pathol* 1985; 16:1085.
- 126.** Hull MT et al. Glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast: a light and electron microscopy study. *Cancer* 1981; 48:2003.
- 127.** Hull MT, Warfel KA. Glycogen-rich clear cell carcinomas of the breast. A clinicopathologic and ultrastructural study. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:553.
- 128.** Sørensen FB, Paulsen SM. Glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast: a solid variant with mucus. A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study of a case. *Histopathology* 1987; 11:857.
- 129.** Toikkanen S, Joensuu H. Glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast: a clinicopathologic and flow cytometric study. *Hum Pathol* 1991; 22:81.
- 130.** Aboumrad MH, Horn RC Jr, Fine G. Lipid-secreting mammary carcinoma: report of a case associated with Paget's disease of the nipple. *Cancer* 1963; 16:521.
- 131.** Ramos CV, Taylor HB. Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathologic analysis of 13 examples. *Cancer* 1974; 33:812.

- 132.** Van Bogaert LJ, Maldague P. Histologic variants of lipid-secreting carcinoma of the breast. *Virchows Arch (A)* 1977; 375:345.
- 133.** Thorner PS et al. Malignant myoepithelioma of the breast. An immunohistochemical study by light and electron microscopy. *Cancer* 1986; 57:745.
- 134.** Bigotti G, DiGiorgio CG. Myoepithelioma of the breast: histologic, immunologic and electronmicroscopic appearance. *J Surg Oncol* 1986; 2:58.
- 135.** Toth J. Benign human mammary myoepithelioma. *Virchows Arch (A)* 1977; 374:263.
- 136.** Squires JE, Betsill WL Jr. Intracystic carcinoma of the breast. A correlation of cytomorphology, gross pathology, microscopic pathology and clinical data. *Acta Cytol* 1981; 25:267.
- 137.** Hull MT et al. Signet-ring cell carcinoma of the breast: a clinicopathologic study of 24 cases. *Am J Clin Pathol* 1980; 73:31.
- 138.** Merino MJ, LiVolsi VA. Signet-ring carcinoma of the female breast: a clinicopathologic analysis of 24 cases. *Cancer* 1981; 48:1830.
- 139.** Gallenber MM, Loprinzi CL. Breast cancer and pregnancy. *Semin Oncol* 1989; 16:369.
- 140.** Potter JF, Schoeneman M. Metastases of maternal cancer to the placenta and fetus. *Cancer* 1970; 25:380.
- 141.** Droulias CA et al. Inflammatory carcinoma of the breast. A correlation of clinical, radiologic and pathologic findings. *Ann Surg* 1976; 184:217.
- 142.** Shukla HS et al. The significance of mammary skin edema in noninflammatory breast cancer. *Ann Surg* 1979; 189:53.
- 143.** Lee BJ, Tannenbaum NE. Inflammatory carcinoma of the breast: a report of twenty-eight cases from the breast clinic of Memorial Hospital. *Surg Gynecol Obstet* 1924; 39:580.
- 144.** Noguchi S et al. Management of inflammatory carcinoma of the breast with combined modality therapy including intraarterial infusion chemotherapy as an induction therapy. Long-term follow-up results of 28 patients. *Cancer* 1988; 61:1483.
- 145.** Paradiso A et al. Cell kinetics and hormonal receptor status in inflammatory breast carcinoma. Comparison with locally advanced disease. *Cancer* 1989; 64:1922.
- 146.** Lucas FV, Pérez-Mesa C. Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 1978; 41:1595.
- 147.** Saltzstein SL. Clinically occult inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 1974; 34:382.
- 148.** Donegan WL, Pac'rta B. Combined therapy for inflammatory breast cancer. *Arch Surg* 1990; 125:578.
- 149.** Fastenberg NA et al. Management of inflammatory carcinoma of the breast. A combined modality approach. *Am J Clin Oncol* 1985; 8:134.
- 150.** Baron PL et al. Occult breast cancer presenting with axillary metastases: update management. *Arch Surg* 1990; 125:210.

- 151.** Ashikari R et al. Breast cancer presenting as an axillary mass. *Ann Surg* 1976; 183:415.
- 152.** Rosen PP, Kimmel M. Occult breast carcinoma presenting with axillary lymph node metastases: a follow-up study of 48 patients. *Hum Pathol* 1990; 21:518.
- 153.** Westbrook KC, Gallager H. Breast carcinoma presenting as an axillary mass. *Am J Surg* 1971; 122:607.
- 154.** Haupt HM, Rosen PP, Kinne DW. Breast carcinoma presenting with axillary lymph node metastases. An analysis of specific histopathologic features. *Am J Surg Pathol* 1985; 9:165.
- 155.** Halsted WS. The results of radical operation for the cure of carcinoma of the breast. *Ann Surg* 1907; 46:1.
- 156.** Breslow A. Occult carcinoma of second breast following mastectomy. *JAMA* 1973; 226:1000.
- 157.** Inglehart JD et al. An ultrastructural analysis of breast carcinoma presenting as isolated axillary adenopathy. *Ann Surg* 1982; 196:8.
- 158.** Cho D et al. Primary breast cancer of the vulva. *Obstet Gynecol* 1985; 66:798.
- 159.** Cogswell HD, Czerny EW. Carcinoma of aberrant breast of axilla. *Am Surg* 1961; 27:388.
- 160.** Kariniemi AL et al. Expression of differentiation antigens in mammary and extramammary Paget's disease. *Br J Dermatol* 1984; 110:203.
- 161.** Bussolati G, Pich A, Alfani V. Immunofluorescence detection of casein in human mammary dysplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch (A)* 1975; 365:15.
- 162.** Imam A, Yoshida SO, Taylor CR. Distinguishing tumour cells of mammary from extramammary Paget's disease using antibodies to two different glycoproteins from human milk-fat-globule membrane. *Br J Cancer* 1988; 58:373.
- 163.** Chaudary MA et al. Paget's disease of the breast. *Cancer* 1970; 26:680.
- 164.** Hyun KH et al. Histochemical studies of lectin binding patterns in keratinized lesions, including malignancy. *Virchows Arch (A)* 1984; 402:337.
- 165.** Ashikari R et al. Paget's disease of the breast. *Cancer* 1970; 26:680.
- 166.** Kister SJ, Haagensen CD. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 119:606.
- 167.** Salvadori B, Fariselli G, Saccozzi R. Analysis of 1000 cases of Paget's disease of the breast. *Tumori* 1976; 62:529.
- 168.** Comisión de las sociedades oncológicas para la planificación oncológica en España. Aproximación a la epidemiología del cáncer en España. En: Libro blanco de la oncología en España. Barcelona: Jims, 1988; 19.
- 169.** Baak JPA et al. Prognostic indicators in breast cancer - morphometric methods. *Histopathology* 1982; 6:327.

- 170.** Alexieva-Figush J et al. The prognostic value and relationship of patient characteristics, estrogen and progesterin receptors, and site of relapse in primary breast cancer. *Cancer* 1988; 61:758.
- 171.** Chevallier B et al. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in operable breast cancer: results of uni- and multifactorial analysis (meeting abstract). *Cancer* 1988; 62:2517.
- 172.** Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. Correlations with concordant and discordant estrogen and progesterone receptors. *Cancer* 1987; 59:1554.
- 173.** Meyer JS, Province M. Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: prognostic power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res Treat* 1988; 12:191.
- 174.** Harris JR et al. Cancer of the breast. En DeVita VT, Hellman S, Rosenberg (eds.). *Cancer: Principles and practice of oncology*. 2nd ed. Philadelphia, J.B. Lippincott 1985; 119.
- 175.** Consensus Conference. Adjuvant chemotherapy for breast cancer. *JAMA* 1985; 254:3461.
- 176.** National Cancer Institute. Clinical Alert . Bethesda, Mayo 1988.
- 177.** McGuire W. Adjuvant therapy of node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1989; 320:525.
- 178.** Glick J. Meeting highlights: adjuvant therapy for breast cancer. *JNCI* 1988; 80:471.
- 179.** Fisher B, Redmon C, Wickerham. Systemic therapy in patients with node-negative breast cancer: a commentary based on two National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) clinical trials. *An Intern Med* 1989; 111:703.
- 180.** DeVita VT. Breast cancer therapy. Exercising all our options. *N Engl J Med* 1989; 320:527.
- 181.** Glick JH. Adjuvant therapy for node-negative breast cancer: a proactive view. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, ed. *Important Advances in Oncology* 1990. Philadelphia: Lippincott, 1990; 183.
- 182.** Henderson IH. Adjuvant therapy for node-negative breast cancer: a cautious interpretation. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, ed. *Important Advances in Oncology* 1990. Philadelphia: Lippincott, 1990; 199.
- 183.** Ingle JN. Prognostic factors in women with node-negative breast cancer. En: *Educational Book (ASCO, Educational Symposia, Houston, Texas, mayo 1991)*, 1991; 17.
- 184.** NIH Consensus Conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991; 265:391.
- 185.** Levine MN et al. When is a prognostic factor useful?: a guide for the perplexed. *J Clin Oncol* 1991; 9:348.
- 186.** Staging for carcinoma of the breast. In: Beahrs O, Henson D, Hutter R, Myers M, eds. *Manual for staging of cancer*. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott 1988; 145.

- 187.** American Joint Committee for Cancer Staging and End-Results Reporting. Staging of cancer of the breast: manual for staging of cancer. Chicago. Whiting Press 1978; 101.
- 188.** Fisher B et al. Ten-year followup results of patients with carcinoma of the breast in a cooperative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 140:528.
- 189.** Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi V. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. *Cancer* 1978; 41:1170.
- 190.** Haagensen CD. Treatment of curable carcinoma of the breast. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1977; 2:975.
- 191.** Schottenfeld D et al. Ten year results of the treatment of primary operable breast carcinoma. *Cancer* 1975; 38:1001.
- 192.** Spratt JS, Donegan WL. Carcinoma of the breast, pg 136. Philadelphia, WB Saunders, 1967.
- 193.** Payne WS et al. Surgical treatment of breast cancer. Trends and factors affecting survival. *Arch Surg* 1970; 101:105.
- 194.** Pickrin JW. Lymph node metastasis in carcinoma of the female mammary gland. *Bull Roswell Park Mem Inst* 1956; 1:79.
- 195.** Pickren JW. Significance of occult metastases. *Cancer* 1961; 14:1266.
- 196.** Saphir O, Amromin GD. Obscure axillary lymph-node metastasis in carcinoma of the breast. *Cancer* 1948; 1:238.
- 197.** Huvos AG, Hutter RVP, Berg JW. Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. *Ann Surg* 1971; 173:44.
- 198.** Fisher ER et al. Detection and significance of occult axillary node metastases in patients with invasive breast cancer. *Cancer* 1978; 45:2025.
- 199.** Apostolikas N, Petraki C, Agnantis NJ. The reliability of histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer. *Path Res Pract* 1989; 184:35.
- 200.** Friedman S et al. Importance of tumor cells in axillary node sinus margins ("clandestine" metastases) discovered by serial sectioning in operable breast carcinoma. *Acta Oncol* 1988; 27:483.
- 201.** Wilkinson EJ et al. Occult axillary lymph node metastases in invasive breast carcinoma: characteristics of the primary tumor and significance of the metastases. *Pathol Ann* 1982; 17:67.
- 202.** Trojani M et al. Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of the breast: Detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer* 1987; 55:303.
- 203.** Trojani M et al. Micrometastases to axillary lymph nodes from invasive lobular carcinoma of breast: Detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer* 1987; 56:838.

- 204.** Rosen PP, Saigo PE, Braun DW. Axillary micro and macrometastases in breast cancer. *Ann Surg* 1981; 194:585.
- 205.** Nasser IA et al. Occult axillary lymph node metastases in "node-negative" breast carcinoma. *Hum Pathol* 1993; 24:950.
- 206.** Mansi JL, Berger T. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7:445.
- 207.** Mansi JL et al. Bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer: An early predictor of bone metastases. *Br Med J* 1987; 295:1093.
- 208.** Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP. Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer. *J R Soc Med* 1983; 76:359.
- 209.** Redding WH et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983; 2:1221.
- 210.** Fisher B et al. Cancer and the breast: Size of neoplasm and prognosis. *Cancer* 1969; 24:1071.
- 211.** Nemoto T et al. Management and survival of female breast cancer: Results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer* 1969; 45:2917.
- 212.** Urban JA. Bilaterality of cancer of the breast. Biopsy of the opposite breast. *Cancer* 1967; 20:1867.
- 213.** Urban JA. Biopsy of the "normal" breast in treating breast cancer. *Surg Clin North Am* 1969; 49:291.
- 214.** Slack NH et al. Experience with bilateral primary carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 136:433.
- 215.** Hansemann D von. Ueber assymetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch Pathol Anat* 1890; 119:299.
- 216.** Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the lip. *JAMA* 1920; 74:656.
- 217.** Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the skin. *Ann Surg* 1921; 73:141.
- 218.** Greenough RB. Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J Cancer Res* 1925; 9:453.
- 219.** Bloom HJG. Prognosis in carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1950; 4:259.
- 220.** Bloom HJG. Further studies on prognosis of breast carcinoma. *Br J Cancer* 1950; 4:347.
- 221.** Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11:359.
- 222.** Black MM, Opler SR, Speer FD. Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surg Gynecol Obstet* 1955; 100:488.
- 223.** Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Histological grading of breast cancer. *Pathol Annu* 1980; 15:239.

- 224.** Scarff RW, Torloni H. Histological typing of breast tumours (international histological classification of tumours no. 2). Geneva: World Health Organization. 1968.
- 225.** Elston CW, Ellis IO. 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* 1991; 19:403.
- 226.** Ellis IO et al. The relationship of histological type to survival and oestrogen receptor status in primary operable breast carcinoma. *J Pathol* 1987; 157:219A.
- 227.** Todd JH et al. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 56:489.
- 228.** Auer G et al. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. *Cancer Res* 1984; 44:394.
- 229.** Olszewski W et al. Flow cytometry of breast carcinoma. 1: Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer* 1981; 48:980.
- 230.** Tavares AS. Ploidy and histological types of mammary carcinoma. *Eur J Cancer* 1967-68; 3:449.
- 231.** Dowle CS, Owainati A, Robins A. The prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br J Surg* 1987; 74:133.
- 232.** Barnard NJ et al. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 1987; 152:287.
- 233.** Bouzubar N et al. Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer* 1989; 59:943.
- 234.** Walker RA, Camplejohn RS. Comparison of monoclonal antibody Ki67 reactivity with grade and DNA flow cytometry of breast carcinomas. *Br J Cancer* 1988; 57:281.
- 235.** Lovekin C et al. C-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63:439.
- 236.** Andersen JA et al. Selection of high risk groups among prognostically favorable patients with breast cancer. An analysis of the value of prospective grading of tumor anaplasia in 1048 patients. *Ann Surg* 1981; 194:1.
- 237.** Black MM, Barclay TH, Hankey BF. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer* 1975; 36:2048.
- 238.** Black MM, Speer FD. Nuclear structure in cancer tissues. *Surg Gynecol Obstet* 1957; 105:97.
- 239.** Hopton DS et al. Histological grading of breast cancer: significance of grade on recurrence and mortality. *Eur J Surg Oncol* 1989; 15:25.
- 240.** Rosen PP et al. Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann Surg* 1981; 193:15.
- 241.** Thorensen S. Histological grading and clinical stage at presentation in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1982; 46:457.

- 242.** Kusama S et al. The gross rates of growth of human mammary carcinoma. *Cancer* 1972; 30:594.
- 243.** Heuser L, Spratt JS, Polk HC Jr. Growth rates of primary breast cancers. *Cancer* 1979; 43:1888.
- 244.** Gershon-Cohen J, Berger SM, Klickstein HS. Roentgenography of breast cancer moderating concept of "biologic predeterminism". *Cancer* 1963; 16:961.
- 245.** Pearlman AW. Breast cancer: influence of growth rate on prognosis and treatment evaluation : a study based on mastectomy scar recurrences. *Cancer* 1976; 38:1826.
- 246.** Spratt JS Jr. Personal communication , 1978.
- 247.** Fournier DV, Weber E, Hoeffken W et al. Growth rate of 147 mammary carcinomas. *Cancer* 1980; 45:2198.
- 248.** Meyer JS, Bauer WC. Tritiated thymidine labeling index of benign and malignant human breast epithelium. *J Surg Oncol* 1976; 8:165.
- 249.** Johnson HA, Bond VP. A method of labelling tissues with tritiated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cellular proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the human breast. *Cancer* 1961; 14:639.
- 250.** Meyer JS, Hixon B. Advanced stage and early relapse of breast carcinomas associated with high thymidine labelling indices. *Cancer Res* 1979; 39:4042.
- 251.** Gentili C, Sanfilippo O, Silvestrini R. Cell proliferation and its relationship to clinical features and relapse in breast cancers. *Cancer* 1981; 48:974.
- 252.** Meyer JS et al. Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labelling. *Cancer* 1983; 51:1879.
- 253.** Tubiana M, Pejovic MH, Chavaudra N. The long term prognostic significance o the thymidine labelling index in breast cancer. *Int J Cancer* 1984; 33:441.
- 254.** Silvestrini R et al. Tumor cell kinetics and clinical outcome in resectable breast cancer (Abstract). European Study Group for Cell Proliferation. Milan, 1989.
- 255.** Hery M et al. The DNA labelling index: a prognostic factor in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1987; 9:207.
- 256.** Meyer JS et al. Breast carcinoma cell kinetics, morphology, stage and host characteristics. A thymidine labelling study. *Lab Invest* 1986; 54:41.
- 257.** Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218:474.
- 258.** Morstyn G et al. Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1983; 72:1844.
- 259.** Roberts CG, de Fazio A, Tattersall MH. A simple and rapid method for the identification of cycling cells in freshly excised tumours. *Cytobios* 1985; 43:313.

- 260.** Kikuyama S et al. Cell kinetic study of human carcinomas using bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet* 1988; 20:1.
- 261.** Quim CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990; 160:93.
- 262.** Williams MA et al. Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 1982; 137:341.
- 263.** Buys CHCM, Osinga J. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. *Chromosoma* 1984; 89:387.
- 264.** Goodpasture C, Bloom SE. Visualisation of nucleolar organiser regions in mammalian chromosome using silver staining. *Chromosoma* 1975; 53:37.
- 265.** Ploton D et al. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18:5.
- 266.** Crocker J, Mc Cartney JC, Smith PJ. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organiser region data in non Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1988; 154:151.
- 267.** Smith R, Crocker J. Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. *Histopathol* 1988; 12:113.
- 268.** Raymond WA, Leong AS-Y. Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. *Hum Pathol* 1989; 20:741.
- 269.** Dervan PA et al. Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:401.
- 270.** Sivridis E, Sims B. Nucleolar organiser regions: new prognostic variable in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1990; 43:390.
- 271.** Taylor IW et al. The influence of age on the DNA ploidy levels of breast tumors. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19:623.
- 272.** Moran R, Black M, Alpert L. Correlation of cell cycle kinetics, hormone receptors, histopathology and nodal status in human breast cancer. *Cancer* 1984; 54:1586.
- 273.** Remvikos Y, Magdelenat H, Zajdela A. DNA flow cytometry applied to fine needle sampling of human breast cancer. *Cancer* 1988; 61:1629.
- 274.** Hedley DW, Rugg CA, Taylor IW. Influence of cellular DNA content on disease free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res* 1984; 44:5395.
- 275.** Mc Guire WL et al. Impact of flow cytometry on predicting recurrence and survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1985; 5:117.
- 276.** Thorud E, Fossa SD, Vaage S. Primary breast cancer. Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathological characteristics. *Cancer* 1986; 57:808.
- 277.** Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* 1980; 2:161.

- 296.** Sasaki K et al. Relationship between labelling indices of Ki67 and BrdUrd in human malignant tumors. *Cancer* 1988; 62:989.
- 297.** Silvestrini R et al. Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell Tissue Kinet* 1988; 21:123.
- 298.** Veneroni S et al. Comparative analysis of (H3)-thymidine labelling index and monoclonal antibody Ki67 in non-Hodgkins lymphoma. *Hematol Oncol* 1988; 6:21.
- 299.** Kamel OW, Franklin WA, Ringus JC. Thymidine labelling index and Ki67 growth fraction in lesions of the breast. *Am J Pathol* 1989; 134:107.
- 300.** Barnard NJ et al. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 1987; 152:287.
- 301.** Mc Gurrin JF et al. Assessment of tumor cell kinetics by immunohistochemistry in carcinoma of the breast. *Cancer* 1987; 59:1744.
- 302.** Wrba F, Reiner A, Markis-Ritzinger E et al. Prognostic significance of immunohistochemical parameters in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1988; 183:277.
- 303.** Gerdes J et al. Growth fraction in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki67. *J Clin Pathol* 1986; 39:977.
- 304.** Lellé RJ et al. The correlation of growth fraction with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer* 1987; 59:83.
- 305.** Raymond WA, Leong AS-Y. The relationship between growth fractions and estrogen receptors in human breast carcinoma, as determined by immunohistochemical staining. *J Pathol* 1989; 158:203.
- 306.** Charpin C et al. Multiparametric evaluation (SAMBA) of growth fraction (monoclonal Ki67) in breast carcinoma tissue sections. *Cancer Res* 1988; 48:4368.
- 307.** Cattoretti G et al. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41:178.
- 308.** Gerdes J et al. Growth fractions and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1987; 129:486.
- 309.** Lellé RJ et al. Beziehung zwischen Wachstumsfraktion, Menopausenstatus und Hormonrezeptorgehalt bei benignen und malignen Veränderungen der Mamma. *Tumor Diagn Ther* 1987; 8:75.
- 310.** Colley M, Kommos F, Bibbo M. Assessment of hormone receptors in breast carcinoma by immunohistochemistry and image analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1989; 11:307.
- 311.** Horny HP, Horst HA. Proliferation of invasive breast carcinomas and colorectal adenocarcinomas: an immunohistochemical in situ investigation with the monoclonal antibody Ki67. *Zentralbl Allg Pathol Anat* 1988; 134:547.
- 312.** Leonardi E et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992; 45:416.

- 313.** Walker RA, Wilkinson N. p21 RAS protein expression in benign and malignant human breast. *J Pathol* 1988; 156:261.
- 314.** Lellé RJ et al. Bestimmung der Wachstumsfraktion bei Mammakarzinomen mit Hilfe des monoklonales Antikörpers Ki67. *Tumor Diagn Ther* 1986; 7:181.
- 315.** Lellé RJ et al. Determination of growth fraction in benign breast disease (BBD) with monoclonal antibody Ki67. *J Cancer Res Oncol* 1987; 113:73.
- 316.** Wrba F et al. Ki67 immunoreactivity in breast carcinomas in relation to transferrin receptor expression, estrogen receptor status and morphological criteria. *Oncology* 1989; 46:255.
- 317.** Wintzer HO et al. Ki67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991; 67:421.
- 318.** Bravo R et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 1987; 326:515.
- 319.** Takasaki T, Deng J, Tan E. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformatio: Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 1981; 154:1899.
- 320.** Kurki P et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin) in activated human T lymphocytes. *J Immunoi* 1987; 138:4114.
- 321.** Kurki P et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin) during the cell cycle. *Exp Cell Res* 1986; 166:209.
- 322.** Miyachi K, Fritzler M, Tan E. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferative cells. *J Immunol* 1978; 121:2228.
- 323.** Celis J, Bravo R. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84:795.
- 324.** Haneda H et al. The relationship of the proliferating cell nuclear antigen protein to cis-diammine-dichloroplatinum (II) resistance of a murine leukemia cell line P388/CDDP. *Oncology* 1991; 48:234.
- 325.** Hall PA et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell prliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162:285.
- 326.** Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96:121.
- 327.** Battersby S, Anderson TJ. Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/Cyclin. *Human Pathol* 1990; 21:781.
- 328.** Aaltoma S, Lipponen P, Syrjänen K. Prognostic value of cell proliferation in breast cancer as determined by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining. *Anticancer Res* 1992; 12:1281.

- 329.** Aaltoma S et al. Proliferating cell nuclear antigen (PC-10) immunolabelling and other proliferation indices as prognostic factors in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119:288.
- 330.** Magno WB et al. Correlation of proliferative index (PCNA reactivity and Ki67 reactivity) in primary breast carcinoma with hormone status, lymph node status, and disease free survival. *Connect Med* 1992; 56:667.
- 331.** Frierson HF. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas: comparison with clinical and pathological variables. *Modern Pathol* 1993; 6:290.
- 332.** Aaltoma S et al. Hormone receptors as prognostic factors in female breast cancer. *Ann Med* 1991; 23:643.
- 333.** Lipponen P et al. Sex steroid receptors, S-phase fraction and DNA ploidy as determinants of the risk of relapse and death of female breast cancer. *Anticancer Res* 1992; 12:677.
- 334.** Kamel OW et al. Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin- fixed, paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2. *Am J Pathol* 1991; 138:1471.
- 335.** Woods AL et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathol* 1991; 19:21.
- 336.** Bravo R, Mc Donald Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. Association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987; 105:1549.
- 337.** Scott RJ, et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991; 165:173.
- 338.** Kreipe H et al. A new proliferation associated nuclear antigen detectable in paraffin embedded tissues by the monoclonal antibody KiS1. *Am J Pathol* 1993; 142:3.
- 339.** Campeljohrn RS, Brock A, Barnes DM. KiS1 a novel proliferative marker: flow cytometric assessment of staining in human breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 1993; 67:657.
- 340.** Mc Cormick D et al. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantitation of cell proliferation associated antigen. *Histopathology* 1993; 22:543.
- 341.** Sampson SA et al. KiS1 a novel monoclonal antibody wich recognises proliferating cells: evaluation of its relationship to prognosis in mammary carcinomas. *J Pathol* 1992; 168:161.
- 342.** Dossett JA. Summing-up (biology). In: Forrest APM, Kunkler PB, eds. *Prognostic factors in breast cancer*. Edinburg: ES Livingstone, 1967; 455.
- 343.** Page DL, Anderson TJ. *Diagnostic Histopathology of the Breast*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987.
- 344.** Alderson MR, Hamlin I, Staunton MD. The relative significance of prognostic factors in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1971; 25:646.

- 345.** Bilik R et al. Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1989; 28:13.
- 346.** Horny HP, Horst HA. Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunohistological study. *Virchows Arch (A)* 1986; 409:275.
- 347.** Whiteside TL et al. Clonal analysis and in situ characterization of lymphocytes infiltrating human breast carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 1986; 23:169.
- 348.** Bettelheim R et al. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *Br J Cancer* 1984; 50:771.
- 349.** Nime FA et al. Prognostic significance of tumor emboli in intramammary lymphatics in patients with mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1977; 1:25.
- 350.** Rosen PP. Tumor emboli in intramammary lymphatics in breast carcinoma: pathologic criteria for diagnosis and clinical significance. *Pathol Annu* 1983; 18:215.
- 351.** Roses DF, Bell DA, Flotte TJ. Pathologic predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1982; 78:817.
- 352.** Bell JR, Friedell GH, Goldenberg IS. Prognostic significance of pathologic findings in human breast carcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 1969; 129:258.
- 353.** Friedell GH, Betts A, Sommers SC. The prognostic value of blood vessel invasion and lymphocytic infiltrates in breast carcinoma. *Cancer* 1965; 18:164.
- 354.** Rosen PP et al. Prognosis in stage (T1N1M0) breast cancer. *Ann Surg* 1981; 194:576.
- 355.** Weigand RA et al. Blood vessel invasion and axillary lymph node involvement as prognostic indicators for human breast cancer. *Cancer* 1982; 50:962.
- 356.** Rasmussen BB et al. Elastosis in relation to prognosis in primary breast carcinoma. *Cancer Res* 1985; 45:1428.
- 357.** Shivas AA, Douglas JG. The prognostic significance of elastosis in breast carcinoma. *J R Coll Surg Edinb* 1972; 17:315.
- 358.** Tamura S, Enjoji M. Elastosis in neoplastic and non-neoplastic tissues from patients with mammary carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 1988; 38:1537.
- 359.** Robertson AJ et al. Prognostic value of measurement of elastosis in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1981; 34:738.
- 360.** Glaubitz LC et al. Elastosis in human breast cancer. Correlation with sex steroid receptors and comparison with clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108:27.
- 361.** Silverberg SG, Chitale AR. Assessment of significance of proportions of intraductal and infiltrating tumor growth in ductal carcinoma of the breast. *Cancer* 1973; 32:830.
- 362.** Saigo PE, Rosen PP. The application of immunohistochemical stains to identify endothelial-lined channels in mammary carcinoma. *Cancer* 1987; 59:51.
- 363.** Rosen PP et al. Are prognostic factors for local control of breast cancer treated by primary radiotherapy significant for patients treated by mastectomy? *Cancer* 1986; 57:1415.

- 364.** Ellis IO et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. II: Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992; 20:479.
- 365.** Schnitt SJ, Connolly JL, Recht A. Influence of infiltrating lobular histology on local tumor control in breast cancer patients treated with conservative surgery and radiotherapy. *Cancer* 1989; 64:448.
- 366.** Parl FF, Richardson LD. The histologic and biologic spectrum of tubular carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 1983; 14:694.
- 367.** Peters GN, Wolff M, Haagensen CD. Tubular carcinoma of the breast. Clinical pathologic correlations based on 100 cases. *Ann Surg* 1981; 193:138.
- 368.** Anderson TJ et al. Comparative pathology of breast cancer in a randomised trial of screening. *Br J Cancer* 1991; 64:108.
- 369.** Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991; 15:334.
- 370.** Baker RR. Unusual lesions and their management. *Surg Clin N A* 1990; 70:963.
- 371.** Bloom HJ, Richardson WW, Fields JR. Host resistance and survival in carcinoma of the breast: a study of 104 cases of medullary carcinoma in a series of 1411 cases of breast cancer followed for 20 years. *Br Med J* 1970; 3:181.
- 372.** Moore OS, Foote FW Jr. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 1949; 2:635.
- 373.** Cutler SJ et al. Prognostic factors in cancer of the female breast. *Cancer* 1966; 19:75.
- 374.** Pedersen L, Holdk S, Schindt T. Medullary carcinoma of the breast. *Cancer Treat Rev* 1988; 15:53.
- 375.** Rosen PP et al. A long-term follow up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7:355.
- 376.** Clayton F. Pure mucinous carcinomas of the breast: morphologic features and prognostic correlates. *Hum Pathol* 1986; 17:34.
- 377.** Komaki K et al. Mucinous carcinoma of the breast in Japan. A prognostic analysis based on morphologic features. *Cancer* 1988; 61:989.
- 378.** Melamed MR, Robbins GF, Foote FW Jr. Prognostic significance of gelatinous mammary carcinoma. *Cancer* 1961; 14:699.
- 379.** Toikkanen S, Kujari H. Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long-term follow up. *Hum Pathol* 1989; 20:758.
- 380.** Rasmussen BB. Human mucinous carcinomas and their lymph node metastases. A histological review of 247 cases. *Pathol Res Pract* 1985; 180:377.
- 381.** Rosen PP, Wang T. Colloid carcinoma of the breast. Analysis of 64 patients with long-term follow up. (Abstract) *Am J Clin Pathol* 1980; 73:304.

- 382.** Scharnhorst D, Huntrakoon M. Mucinous carcinoma of the breast: recurrence 30 years after mastectomy. *South Med J* 1988; 81:656.
- 383.** Lee M, Terry R. Surgical treatment of carcinomas of the breast. Pathological finding and pattern of relapse. *J Surg Oncol* 1983; 23:11.
- 384.** Fisher ER et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No 4) Invasive papillary cancer. *Am J Clin Pathol* 1980; 73:313.
- 385.** Lim SK, Kovi J, Warner OG. Adenoid cystic carcinoma of breast with metastasis: a case report and review of the literature. *J Nat Med Assoc* 1979; 71:329.
- 386.** Nayer HR. Cylindroma of the breast with pulmonary metastases. *Dis Chest* 1957; 31:324.
- 387.** Verani RR, Van der Bel-Kahn J. Mammary adenoid cystic carcinoma with unusual features. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:653.
- 388.** Elsner B. Adenoid cystic carcinoma of the breast. Review of the literature. *Pathol Eur* 1970; 54:1.
- 389.** Ro JY, Silva EG, Gallager HS. Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 1987; 18:1276.
- 390.** Lusted D. Structural and growth patterns of adenoid cystic carcinoma of breast. *Am J Clin Pathol* 1970; 54:419.
- 391.** McDivitt RW, Stewart FW. Breast carcinoma in children. *JAMA* 1966; 195:388.
- 392.** Karl SR, Ballantine TV, Zaino R. Juvenile secretory carcinoma of the breast. *J Pediatr Surg* 1985; 20:368.
- 393.** Azzopardi JG et al. Carcinoid tumors of the breast: the morphological spectrum of argyrophil carcinomas. *Histopathology* 1982; 6:549.
- 394.** Bussolati G et al. Endocrine markers in argyrophilic carcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 1987; 11:248.
- 395.** Jensen EV, Jacobson IH. Basic guides to the mechanisms of estrogen action. *Rec Prog Hormone Res* 1962; 18:387.
- 396.** Deshpande N, Jensen EV. Accumulation of tritiated estradiol by human breast tissue. *Steroids* 1976; 10:219.
- 397.** Folca PJ, Glascock RF, Irvine WT. Studies with tritium labelled hexoestrol in advanced breast cancer. *Lancet* 1961; 2:796.
- 398.** Wira CB, Rochefort H, Bauleieu E. Evaluation of tissue steroid binding in vitro. In vitro methods in reproductive cell biology. *Acta Endocrinol* 1971 (supl.153); 67:223.
- 399.** Chamness GC, Mercer WD, Mc Guire WL. Are histochemical methods for estrogen receptor valid?. *J Histochem Cytochem* 1980; 28:792.
- 400.** Markaverich BMS, Clark JH. Tumor binding sites for estradiol in rat uterine nuclei: relationship to uterotrophic response. *Endocrinology* 1979; 105:1458.

- 401.** Clark JH et al. Heterogeneity of estrogen binding sites in cytosol of rat uterus. *J Biol Chem* 1978; 253:7630.
- 402.** Braunsberg H, Hammond KD. Practical and theoretical aspects in the analysis of steroids receptors. *J Steroid Biochem* 1980; 13:1133.
- 403.** Nenci I et al. Bases et applications de la cytochimie des recepteurs stéroïdiens. *Int J Breast Mammary Pathol Senologia* 1982; 1:15.
- 404.** Wagner RK. Extracellular and intracellular steroid binding proteins. Properties discrimination assay and clinical applications. *Acta Endocrino (supl.88)* 1978; 218:1.
- 405.** Wrange O. Isoelectric focusing of steroid hormone receptors in slabs of polyacrylamide gel. *Breast Cancer Res Treat* 1983; 3:97.
- 406.** Clark JH et al. Estrogen and progesterone receptors: Methods for characterization, quantification and purification. *Methods Cancer Res* 1976; 12:367.
- 407.** Wittliff JL. Steroid binding proteins in normal and neoplastic mammary cells. *Methods Cancer Res* 1975; 11:233.
- 408.** Wittliff JL. Biochemical basis for the selection of hormonal treatment in the patient with breast cancer. Presentation at the Southeastern Cancer Study Group, Atlanta, GA, October 1977.
- 409.** Raam SR et al. Estrogen receptor assay: Interlaboratory and intralaboratory variations in the measurement of receptors using dextran-coated charcoal technique. *Eur J Cancer* 1981; 17:643.
- 410.** Oxley DK et al. Precision in estrogen and progesterone receptor assays. Results of the first CAP survey. *Am J Clin Pathol* 1982; 78:587.
- 411.** Greene GL, Jensen EV. Monoclonal antibodies as probes for estrogen receptor detection and characterization. *J Steroid Biochem* 1982; 16:353.
- 412.** Mc Celland RA, Berger U, Miller LS. Immunocytochemical assay for estrogen receptor in patients with breast cancer: Relationship to biochemical assay and to outcome of therapy. *J Clin Oncol* 1986; 4:1171.
- 413.** Straus MJ et al. Estrogen receptor heterogeneity and the relationship between estrogen receptor and tritiated thymidine labeling index in human breast cancer. *Oncology* 1982; 39:197.
- 414.** Giri DD et al. Immunohistology of oestrogen receptor and D5 antigen in breast cancer. Correlation with oestrogen receptor content of adjacent cryostat sections assay by radioligand binding and enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1987; 40:734.
- 415.** King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984; 307:745.
- 416.** Kurzon RM, Sternberger LA. Estrogen receptor immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1978; 26:803.
- 417.** Lee SH. Cytochemical study of estrogen receptor in human mammary cancer. *Am J Clin Pathol* 1978; 70:197.

- 418.** Lee SH. Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1980; 73:323.
- 419.** Mc Carty KS Jr et al. Comparison of biochemical and histochemical techniques for estrogen receptor analyses in mammary carcinoma. *Cancer* 1980; 46:2842.
- 420.** Pascal RR et al. Immunohistologic detection of estrogen receptors in paraffin-embedded breast cancers: Correlation with cytosol measurements. *Hum Pathol* 1986; 17:370.
- 421.** Pertschuk LP et al. Histochemical analyses of steroid hormone receptors in breast and prostatic carcinoma. *J Histochem Cytochem* 1980; 28:799.
- 422.** Bergqvist A, Carlström K, Ljungberg O. Histochemical localization of estrogen and progesterone receptors: Evaluation of a method. *J Histochem Cytochem* 1984; 32:493.
- 423.** Goeij TFP de, Bosman FT. Determination of steroid hormone dependency of tumors utilizing tissue sections. Survey of histochemical techniques and their application in surgical pathology. *J Pathol* 1986; 149:163.
- 424.** Nenci I. Estrogen receptor cytochemistry in human breast cancer: Status and prospects. *Cancer* 1981; 48:2674.
- 425.** Greene GL, Fitch FW, Jensen EV. Monoclonal antibodies to estrophilin: Probes for the study of estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:157.
- 426.** Greene GL et al. Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:5115.
- 427.** Jonat W, Maass H, Stegner HE. Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res* 1986; 46(Supl):4296.
- 428.** King WJ et al. Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors. *Cancer Res* 1985; 45:293.
- 429.** Mc Carty KS Jr et al. Estrogen receptor analysis: correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109:716.
- 430.** Pertschuk LP, Eisenberg KB, Carter AC. Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies: correlation with biochemistry and clinical endocrine response. *Cancer* 1985; 55:1513.
- 431.** Shintaku IP, Said JW. Detection of estrogen receptor with monoclonal antibodies in routinely processed, formalin-fixed paraffin sections of breast carcinoma: use of DNase pretreatment to enhance sensitivity. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:161.
- 432.** Andersen J, Poulsen S. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors (ER) using formalin-fixed paraffin-embedded human breast cancer tissue : correlation with clinical endocrine response. *J Steroid Biochem* 1988; 30:337.
- 433.** Andersen J, Orntoft TF, Poulsen HS. Immunohistochemical demonstration of estrogen receptors (ER) in formalin-fixed, paraffin-embedded human breast cancer tissue by use a monoclonal antibody to ER. *J Histochem Cytochem* 1988; 36:1553.

- 434.** Cheng L et al. Demonstration of estrogen receptors by monoclonal antibody in formalin-fixed breast tumors. *Lab Invest* 1988; 58:346.
- 435.** Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mama. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1896; 2:104.
- 436.** Huggins C, Bergenstal DM. Inhibition of human mammary and prostatic cancers by adrenalectomy. *Cancer Res* 1952; 12:134.
- 437.** Luft R et al. Hypophysectomy in management of metastatic carcinoma of breast. In: Currie A, ed. *Endocrine aspects of breast cancer; proceeding of conference held at University of Glasgow*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1958; pp:27.
- 438.** Jensen EV. Pattern of hormone receptor interactions. In: Griffiths K, Pier-Repont EG eds. *Some aspects of etiology and biochemistry of prostatic cancer*. Cardiff: Alpha Omega Alpha, 1970; pp:151.
- 439.** Mass H et al. Estrogen receptors in human breast cancer tissue. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 113:337.
- 440.** Engelsman E et al. Oestrogen receptors in human breast cancer tissue and response to endocrine therapy. *Br Med J* 1973; 2:750.
- 441.** Leung BS et al. Predictability of response to endocrine ablation in advanced breast carcinoma. *Arch Surg* 1973; 106:515.
- 442.** Savlov ED et al. Correlation between certain biochemical properties of breast cancer and response to therapy. Preliminary report. *Cancer* 1974; 33:303.
- 443.** Mc Guire WL. Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 1978; 38:4289.
- 444.** Clark GM, Mc Guire WL. Progesterone receptors and human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1983; 3:157.
- 445.** Thorpe SM et al. Estrogen and progesterone receptor profile patterns in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1983; 3:103.
- 446.** Mc Guire WL et al. Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast. *Am J Physiol* 1982; 243:99.
- 447.** Jenson EV, De Sombre ER, Jungblut PW. *Estrogen receptors in hormone responsive tissues and tumors*. Chicago: University of Chicago Press, 1967; pp:15.
- 448.** Hill SM et al. Estrogen receptor expression in human breast cancer associated with an estrogen receptor gene restriction fragment length polymorphism. *Cancer Res* 1989; 49:145.
- 449.** Raam S et al. Defective estrogen receptors in human mammary cancers: Their significance in defining hormone dependence. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80:756.
- 450.** Kasid A, Lippman ME. Estrogen and oncogene mediated growth regulation of human breast cancer cells. *J Steroid Biochem* 1987; 27:465.
- 451.** Clark GM et al. Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1983; 309:1343.

- 452.** Fisher ER et al. Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. *Cancer* 1980; 45:349.
- 453.** Chua DYF et al. Correlation of steroid receptors with histologic differentiation in mammary carcinoma: a Singapore experience. *Cancer* 1985; 56:2228.
- 454.** Barbi GP et al. Correlation between steroid hormone receptors and prognostic factors in human breast cancer. *Oncology* 1987; 44:265.
- 455.** Dressler LG et al. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988; 61:420.
- 456.** Sigurdsson H et al. Indicators of prognosis in node negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322:1045.
- 457.** Sirvent JJ et al. Hormonal receptors, cell proliferation fraction (Ki67) and c-erbB-2 amplification in breast cancer. Relationship between differentiation degree and axillary lymph node metastases. *Histol Histopath* 1994; 9:563.
- 458.** Hanna W, et al. The correlation of Ki67 growth factor and ERICA in breast cancer. *Mod Pathol* 1992; 5:220.
- 459.** Pegoraro RJ et al. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer among women of different racial groups. *Cancer Res* 1986; 46:2117.
- 460.** Mc Guire WL et al. Estrogen receptors in human breast cancer: an overview. In: Mc Guire WL, Carbone PP, Vollmer EP, editors. *Estrogen receptors in human breast cancer*. New York: Raven, 1975; pp:1.
- 461.** Kern WH. Morphologic and clinical aspects of estrogen receptors in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1979; 148:240.
- 462.** Kohail HM et al. A multifactorial analysis of steroid hormone receptors in stages I and II breast cancer. *Ann Surg* 1985; 201:611.
- 463.** Knight WA et al. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977; 37:4669.
- 464.** Sismondi P et al. Prognostic value of estrogen receptor determined by radiochemical vs. histochemical methods in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1985; 6:67.
- 465.** Fisher B et al. Breast cancer estrogen and progesterone receptor values: their distribution, degree of concordance, and relation to number of positive axillary nodes. *J Clin Oncol* 1983;1:349.
- 466.** Shek LLM, Godolphin W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. *Cancer Res* 1988; 48:5565.
- 467.** Bozzetti C et al. Determination of estrogen receptors in human breast cancer: comparison between enzyme immunoassay and dextran-coated charcoal method. *Tumori* 1986; 72:511.
- 468.** Valagussa P et al. Prognostic importance of estrogen receptors to select node negative patients for adjuvant chemotherapy. In: Salmon e, Jones SE, eds. *Adjuvant therapy of cancer III*. Nueva York, Grune and Stratton, 1981; pp:329.

- 469.** Pichon MF et al. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res* 1980; 40:3357.
- 470.** Pouillart P et al. Cancers mammaires métastases: comparaison de la signification pronostique et de la sensibilité à la chimiothérapie selon la présence de récepteurs d'oestradiol et de progesterone. *Bull Cancer* 1982; 461.
- 471.** Hawkins A et al. Prognostic significance of oestrogen and progesterone receptor activities in breast cancer. *Br J Surg* 1987; 74:1009.
- 472.** Fisher B et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6:1076.
- 473.** Moot SK, Peters GN, Cheek JH. Tumor hormone receptor status and recurrence in premenopausal node negative breast carcinoma. *Cancer* 1987; 60:382.
- 474.** Ruder AM et al. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Cancer* 1989; 64:196.
- 475.** Capony F et al. Increased secretion, altered processing and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* 1989; 49:3904.
- 476.** Rochefort H et al. Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 1989; 34:177.
- 477.** Touitou I et al. Differential regulation of cathepsin D by sex steroids in mammary cancer and uterine cells. *Mol Cell Endocrinol* 1989;66:231.
- 478.** Cavailles V et al. Estrogens and growth factors induce mRNA of the pro-cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Nucl Acid Res* 1988; 16:1903.
- 479.** Thorpe SM et al. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49:6008.
- 480.** Spyrtatos F et al. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989; ii:1115.
- 481.** Pujol P et al. A prospective study on the prognostic values of cathepsin D levels in breast cancer. *Cancer* 1993; 71:2006.
- 482.** Duffy MJ et al. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with biochemical, histological and clinical findings. *Clin Chem* 1991; 37:101.
- 483.** Namer M et al. Prognostic value of total cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 19:85.
- 484.** Granata G et al. Prognostic relevance of cathepsin D versus oestrogen receptors in node negative breast cancers. *Eur J Cancer* 1991; 27:970.
- 485.** Tandon AK et al. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322:297.

- 486.** Kute TE et al. Cathepsin D as a prognostic indicator for node negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assays. *Cancer Res* 1992; 52:1.
- 487.** Henry JA et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer. A immunohistochemical study. *Cancer* 1990; 65:265.
- 488.** Domagala W et al. Cathepsin D in invasive ductal NOS breast carcinoma as defined by immunohistochemistry: no correlation with survival at 5 years. *Am J Pathol* 1992; 141:1003.
- 489.** Cherian MG, Goyer RA. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci* 1978; 23:1.
- 490.** Kagi JRR, Nordberg M. Metallothionein. Birkhauser, Basel 1979; pp:48.
- 491.** Kagi JHR et al. Equine hepatic and renal metallothioneins: purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content. *Biol Chem* 1974; 249:3537.
- 492.** Kagi JHR, Vallee BL. *J Biol Chem* 1960; 235:3460
- 493.** Kagi JHR, Vallee BL. *J Biol Chem* 1961; 236:2435.
- 494.** Panemangalore M et al. Changes in intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. *Dev Biol* 1983; 97:95.
- 495.** Webb M, Cain K. Functions of metallothionein. *Biochem Pharmacol* 1982; 31:137.
- 496.** Banerjee D, Onasaka S, Cherian MG. Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm on rat liver and kidney. *Toxicology* 1982; 24:95.
- 497.** Bremner I, Williams RB, Young BW. Distribution of copper and zinc in the liver of the developing fetus. *Br J Nutr* 1977; 38:87.
- 498.** Ryden L, Deustsh HF. Preparation and properties of the major copper-binding component in human fetal liver. *J Biol Chem* 1978; 253:519.
- 499.** Eastman A, Richon VM. Biochemical mechanisms of platinum antitumor drugs. Mc Brien DC, Slater TF (eds). Oxford IRL Press 1985; pp:91.
- 500.** Kontozoglou TE, Banerjee D, Cherian G. Immunohistochemical localization of metallothionein in human testicular embryonal carcinoma cells. *Virchows Arch (A)* 1987; 415:545.
- 501.** Nartey N, Cherian MJ, Banerjee D. Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *Am J Pathol* 1987; 129:177.
- 502.** Schmid KW et al. Presence and possible significance of immunohistochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast. *Virchows Arch (A)* 1993; 422:153.
- 503.** Fresno M et al. Localization of metallothionein in breast carcinomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch (A)* 1993; 423:215.
- 504.** Bier, B et al. Immunohistochemical demonstration of metallothionein in normal human breast tissue and benign and malignant breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 30:213.

- 505.** Haerles T et al. Gabbiani G et al. Immunohistochemical detection of metallothionein in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases. *Path Res Pract* 1994; 190:675.
- 506.** Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. III: Analysis of tumors. *Am J Clin Pathol* 1985; 84:413.
- 507.** Leader M et al. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. *Histopathology* 1987; 11:63.
- 508.** Azumi N, Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1987; 88:286.
- 509.** Gould VE. Histogenesis and differentiation: a reevaluation of these concepts as criteria for the classification of tumors. *Hum Pathol* 1986; 17:212.
- 510.** Raymond WA, Leong ASY. Vimentin: a new prognostic parameter in breast carcinoma? *J Pathol* 1989; 158:107.
- 511.** Domagala W et al. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki67 growth fraction. *Am J Pathol* 1990; 136:219.
- 512.** Catoretti G et al. Vimentin and p53 expression on epidermal growth factor receptor positive, oestrogen receptor negative breast carcinomas. *Br J Cancer* 1988; 57:353.
- 513.** Raymond WA, Leong ASY. Coexpression of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in benign and neoplastic breast epithelium. *J Pathol* 1989; 157:299.
- 514.** Thompson EW et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1992; 150:534.
- 515.** Sommers CL et al. Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1989; 49:4258.
- 516.** Meyer JS, Lee JY. Relationships of S-phase fraction of breast carcinoma in relapse to duration of remission, estrogen receptor content, therapeutic responsiveness and duration of survival. *Cancer* 1987; 59:1744.
- 517.** Lellé RJ et al. Growth fraction as determined in cytologic specimens of breast carcinomas: a study with the monoclonal antibody Ki67. *New Frontiers in Cytology: Modern Aspects of Research and Practice*. Edited by K Goertler, GE Feihter, S Witte. Berlin, Springer-Verlag, 1988; pp:212.
- 518.** Sainsbury JR et al. Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence on and death from breast cancer. *Lancet* 1987; i:1398.
- 519.** Silvestrini R, Diadone MG, Casparini G. Cell kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Cancer* 1985; 1982.
- 520.** Thorpe SM et al. Prognostic value of steroid hormone receptors: Multivariate analysis of sistematically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47:6126.

- 521.** Scheuter AL et al. The neu gene: an erbB homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGFR. *Science* 1985; 229:976.
- 522.** Slamon DJ et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177.
- 523.** Tandon AK et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7:1120.
- 524.** Walker RA, Gullick WJ, Garley JM. An evaluation of immune reactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1989; 60:426.
- 525.** Varley JM et al. Alterations to either c-erbB-2 (neu) or c-myc proto oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short term prognosis. *Oncogene* 1987; 1:423.
- 526.** Van de Vijver MJ et al. Neu protein overexpression in breast cancer. *N Engl J Med* 1988; 319:1239.
- 527.** Borg A et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50:4332.
- 528.** Slamon DJ et al. Studies of the HER-2/neu proto oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707.
- 529.** De Potter CR. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator?. *Hum Pathol* 1994; 25:1264.
- 530.** Allred DC et al. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1991; 23:974.
- 531.** De Potter CR et al. The p185^{erbB2} protein is localized on cell organelles involved in cell motility. *Clin Exp Metast* 1993; 11:462.
- 532.** De Potter CR et al. Keratinocyte induced chemotaxis in the pathogenesis of Paget's disease. *Am J Clin Pathol* 1994; 24:349.
- 533.** Querzoli P et al. Expression of p21 ras gene products in breast cancer relates to histological types and to receptor and nodal status. *Breast Cancer Res Treat* 1988; 12:23.
- 534.** Clair T, Miller WR, Cho-Chung YS. Prognostic significance of the expression of a ras protein with a molecular weight of 21.000 by human breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47:5290.
- 535.** Watson DMA, Elton RA, Jack WJL. The H-ras oncogene product p21 and prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 17:161.
- 536.** Escot C et al. Genetic alteration of the c-myc proto oncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4834.
- 537.** Bonilla M et al. In vivo amplification and rearrangement of c-myc oncogene in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80:665.
- 538.** Cline M, Battifora H, Yokota J. Proto oncogene abnormalities in human breast cancer. Correlation with anatomic features and clinical course or diagnosis. *J Clin Oncol* 1987; 5:999.

- 539.** Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453.
- 540.** Kern SE et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991; 252:1708.
- 541.** Mercer WE et al. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down regulation of proliferating cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1958.
- 542.** Kern SE et al. Oncogenic forms of p53 inhibit p53 regulated gene expression. *Science* 1992; 256:827.
- 543.** Bartek J et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6:1699.
- 544.** Porter PL et al. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J Pathol* 1992; 140:145.
- 545.** Nigro JM et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342:705.
- 546.** Catoretti G et al. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41:178.
- 547.** Rodrigues NR et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:7555.
- 548.** Iggo R, Gatter K, Bartek J. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335:675.
- 549.** Barbareschi M et al. Tumor suppressor gene products, proliferation and differentiation markers expression in lung neuroendocrine neoplasms. *J Pathol* 1992; 166:343.
- 550.** Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982; 30:403.
- 551.** Davidoff AM et al. Relationship between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 1991; 110:259.
- 552.** Ostrowsky JL et al. p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991; 164:75.
- 553.** Walker RA et al. Expression of p53 protein in infiltrating and in situ breast carcinomas. *J Pathol* 1991; 165:203.
- 554.** Isola J et al. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1109.
- 555.** Silvestrini R et al. Cell kinetics of 9200 human breast cancers: consistency of basic and clinical results. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1992; 33:238 (A1427).
- 556.** Thor AD et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:845.

- 557.** Allred DC, Clark GM, Elledge R et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:200.
- 558.** Barnes DM et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993; 24:469.
- 559.** Steeg PS et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *JNCI* 1988; 80:200.
- 560.** Hennessy C et al. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: and association with good prognosis. *JNCI* 1991; 83:281.
- 561.** Bevilacqua G et al. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989; 49:5185.
- 562.** Cohen S et al. A native 170,000 dalton epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1982; 257:1523.
- 563.** Hunter T, Cooper JA. Protein tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem* 1985; 54:897.
- 564.** Downward J et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and c-erbB oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307:521.
- 565.** Sainsbury JRC et al. Epidermal growth factor receptor status as a predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987; 1:1398.
- 566.** Toi M, et al. Immunocytochemical and biochemical analysis of epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer tissue: relationship to estrogen receptor and lymphatic invasion. *Int J Cancer* 1989; 43:220.
- 567.** Grimaux M et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in node positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1989; 14:77.
- 568.** Battaglia F et al. Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid receptors and axillary node involvement. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24:1685.
- 569.** Koenders PG, Beex LVAM, Geurts-Moespot A et al. Epidermal growth factor receptor negative tumors are predominantly confined to the subgroup of estradiol receptor positive human primary breast cancers. *Cancer Res* 1991; 51:4544.
- 570.** Spyrtatos F et al. Epidermal growth factor receptors and prognosis in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 17:83.
- 571.** Nicholson S et al. Expression of epidermal growth factor receptors associated with lack of response to endocrine therapy in recurrent breast cancer. *Lancet* 1989; 1:182.
- 572.** Chamness GC et al. Estrogen inducible heat shock protein hsp27 predicts recurrence in node negative breast cancer. *Proc AACR* 1989; 30:252 (abst).
- 573.** Tandon AK et al. Clinical significance of heat-shock/stress response proteins in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16:146 (abst).

- 574.** Thor A, Benz C, Moore D. Stress response protein (SRP27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histologic and prognostic correlations. *JNCI* 1991; 83:170.
- 575.** Jakowlev SB et al. Sequence of pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1984; 12:2861.
- 576.** Foekens JA et al. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 1990; 50:3832.
- 577.** Schwartz LH et al. pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51:624.
- 578.** Marques LA et al. Independent prognostic value of laminin receptor expression in breast cancer survival. *Cancer Res* 1990; 50:1479.
- 579.** Kuhajda FP et al. Haptoglobin related protein (Hpr) epitopes in breast cancer as predictor of recurrence of the disease. *N Engl J Med* 1989; 321:636.
- 580.** Foekens JA et al. Prognostic value of receptors for insuline-like growth factor I, somatostatin and epidermal growth factor in human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49:7002.
- 581.** Hsu SM, Raine L, FaugerH. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981; 75:816.
- 582.** Sirvent JJ, Salvadó MT. Receptores de estrógenos en cáncer de mama. Estudio inmunohistoquímico en material congelado e incluido en parafina. *Clin Invest Gin Obs* 1990; 17:180.
- 583.** Parl FF, et al. Prognostic significance of estrogen status receptor in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastases and histopathologic grading. *Cancer* 1984; 54:2237.
- 584.** Hanna W et al. The predictive value of ERICA in breast cancer recurrence. A univariate and multivariate analysis. *Modern Pathol* 1993; 6:748.
- 585.** Domagala W et al. Immunohistochemical profile of invasive lobular carcinoma of the breast: predominantly vimentin and p53 protein negative, cathepsin D and estrogen receptor positive. *Virchows Arch A* 1993; 423:497.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

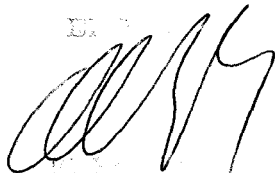
Excmo. Sr. Rector de la Universidad Nacional Autónoma de México
en el C. de la Facultad de Medicina, Hospital General de México D.F.
D.E. MARIA DEL MAR RAMOS MARTOS

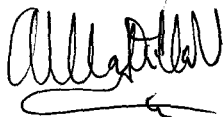
TRABAJO DE GRADUACIÓN: RELACION ENTRE FRACCION DE
PROLIFERACION Y MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS (RECEP-
TORES DE ESTROGENO, CATERSINA D Y METALOTIONEINA)


ACREDITADO EN EL TÍTULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA

APTO CUM LAUDE

20 OCTUBRE










?



En el Doctorado,



