

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA



**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA
EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN p53 Y OTROS
FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN EL
CÁNCER DE MAMA SIN AFECTACIÓN
GANGLIONAR AXILAR**

TESIS DOCTORAL

presentada por

Miquel Angel Seguí i Palmer

Barcelona, 1999

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA
EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN p53 Y OTROS
FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN EL CÁNCER
DE MAMA SIN AFECTACIÓN GANGLIONAR AXILAR**

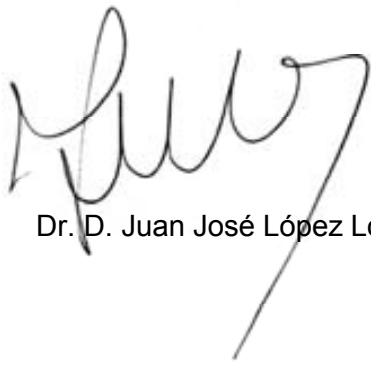
TRABAJO PRESENTADO COMO
TESIS DOCTORAL POR
MIQUEL ANGEL SEGUI i PALMER
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR DE MEDICINA.

Barcelona, Junio de 1999.

El Dr. D. JUAN JOSÉ LÓPEZ LÓPEZ, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, en calidad de Director de Tesis.

Certifica que el trabajo que propone D. MIQUEL ANGEL SEGUÍ i PALMER como Tesis Doctoral titulado “ Estudio del valor pronóstico de la expresión del oncogén p53 y otros factores clinico-patológicos en el cáncer de mama sin afectación ganglionar axilar”, ha sido realizado bajo mi dirección y reúne los méritos suficientes para ser presentada y defendida ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, Junio de 1999.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan José López López', with a long, sweeping underline that extends downwards and to the right.

Dr. D. Juan José López López.

El proyecto en el que se ha basado esta Tesis Doctoral, ha sido subvencionado con una ayuda para la Investigación de Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (F.I.S.S.), número 93/0036, y con una beca para la realización de tesis doctorales de la Fundación Parc Taulí, número 94/182.

A la meva muller, Menchu i a les meves filles Èlia i Aina.

Agradecimientos:

Al Dr. Juan José López López, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y director de la Tesis, por su apoyo e interés mostrado en la realización de este largo trabajo.

A la Dra. M^a Carmen Alonso, fuente de conocimientos en el cáncer de mama e impulsora de este trabajo.

A la Dra. Belén Ojeda y al resto de los médicos del Servicio de Oncología del Hospital de Sant Pau, por la formación recibida.

Al Dr. Eugeni Saigí y al Dr. Miquel Nogué, amigos y compañeros en el trabajo diario, por su apoyo constante.

A la Dra. Gloria Peiró, patóloga, trabajadora incansable y parte fundamental en este estudio.

A todos los médicos, técnicos y administrativos, que de una forma u otra han participado en la elaboración de los datos, por su inestimable ayuda.

A mis padres y hermanos, para compensarles de tantos años de oír hablar de esta Tesis.

Índice

1. - INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. – Epidemiología.....	2
1.2. – Historia natural.....	3
1.3. – Paradigmas del cáncer de mama. Influencia en la evolución de los tratamientos.....	5
1.4. – Definición de factor pronóstico y factor predictivo.....	10
1.5. – Factores pronósticos en cáncer de mama con ganglios negativos.....	14
1.5.1. – Factores pronósticos clínicos.....	16
1.5.1.1. – Edad y estado menopáusico.....	16
1.5.1.2. – Localización tumoral.....	17
1.5.2. – Factores pronósticos histopatológicos.....	17
1.5.2.1 – Tipo histológico.....	17
1.5.2.2. –Tamaño tumoral.....	18
1.5.2.3. – Grado histológico.....	18
1.5.2.4. – Necrosis tumoral.....	19
1.5.2.5. – Invasión vascular y linfática.....	20
1.5.2.6. – Infiltrado linfoplasmocitario.....	21
1.5.2.7. – Componente intraductal asociado.....	22
1.5.3. – Factores pronósticos basados en la cinética celular.....	23
1.5.3.1. – Citometría de flujo. Ploidía y Fase S.....	23
1.5.3.2. – Otros marcadores de proliferación celular.....	27
1.5.4. – Receptores hormonales y factores reguladores de los estrógenos.....	30
1.5.4.1. – Receptores de estrógenos y de progesterona..	30
1.5.4.2. – pS2.....	32

1.5.5. – Proteasas.....	33
1.5.5.1. – Catepsina D.....	33
1.5.5.2. – Activadores e inhibidores del plasminógeno.....	34
1.5.6. – Oncogenes y genes supresores.....	35
1.5.6.1. - HER-2/neu.....	36
1.5.6.2. – Receptor del factor de crecimiento epidérmico..	40
1.5.6.3. – Bcl-2.....	42
1.5.6.4. – p53.....	42
1.5.6.5. – Gen del retinoblastoma.....	52
1.5.6.6. – nm23.....	53
1.5.7. – Angiogenesis Tumoral.....	53
1.6. – Modelos de factores pronósticos.....	54
2. – OBJETIVOS.....	57
3. – PACIENTES Y MÉTODOS.....	59
3.1. – Población sometida a estudio.....	60
3.2. – Datos clínicos y seguimiento.....	61
3.3. – Datos histopatológicos.....	63
3.4. – Receptores hormonales.....	69
3.5. – Análisis de la cinética celular.....	69
3.6. – Sobreexpresión de la proteína p53.....	74
3.7. – Sobreexpresión de la proteína HER-2/neu.....	75

3.8. – Análisis estadístico.....	77
4. – RESULTADOS.....	79
4.1. – Análisis descriptivo y univariado.....	80
4.1. 1. – Evolución de la serie.....	80
4.1. 2. – Cirugía y Radioterapia.....	83
4.1. 3. – Localización tumoral.....	84
4.1. 4. – Edad y menopausia.....	85
4.1. 5. – Tipo histológico.....	89
4.1. 6. – Componente de carcinoma intraductal asociado.....	89
4.1. 7. – Tamaño tumoral patológico.....	90
4.1. 8. – Grado histológico.....	94
4.1. 9. – Infiltrado linfoplasmocitario.....	96
4.1.10. – Desmoplasia.....	96
4.1.11. – Invasión linfática y vascular.....	96
4.1.12. – Necrosis tumoral.....	97
4.1.13. – Receptores hormonales.....	99
4.1.13.1. – Receptores de estrógenos.....	99
4.1.13.2. – Receptores de progesterona.....	101
4.1.13.3. – Valor conjunto de los receptores.....	103
4.1.14. – Citometría de flujo.....	103
4.1.14.1. – ploidía.....	103
4.1.14.2. – Fase S.....	108
4.1.15. – Sobreexpresión de la proteína HER-2/Neu.....	112
4.1.16. – Sobreexpresión de la proteína p53.....	113
4.1.16.1. – Correlación con otras variables.....	114
4.1.16.2. – Valor pronóstico.....	116
4.2. – Análisis multivariado.....	121
4.2.1. – Supervivencia libre de enfermedad.....	121
4.2.2. – Supervivencia libre de recidiva local.....	121

4.2.3. – Supervivencia libre de metástasis.....	123
4.2.4. – Supervivencia específica.....	124
4.3. – Modelos de factores pronósticos.....	125
4.3.1. – Grupos de riesgo para toda la serie.....	125
4.3.2. – Grupos de riesgo para tumores pT1.....	128
4.4. – Análisis descriptivo.....	130
4.5. – Variaciones temporales de los factores pronósticos.....	132
5. – DISCUSIÓN.....	140
5.1. – Consideraciones generales.....	141
5.2. – Evolución de la serie.....	144
5.3. – Factores clínicos.....	145
5.3.1. – Cirugía y Radioterapia.....	145
5.3.2. – Número de ganglios estudiados.....	146
5.3.3. – Localización tumoral.....	146
5.3.4. – Edad y estado menstrual.....	147
5.4. – Factores histopatológicos.....	151
5.4.1. – Tipo histológico.....	151
5.4.2. – Componente intraductal asociado.....	152
5.4.3. – Infiltrado linfoplasmocitario.....	153
5.4.4. – Desmoplasia.....	154
5.4.5. – Invasión linfática y vascular.....	154
5.4.6. – Necrosis tumoral.....	155
5.4.7. – Grado histológico.....	156
5.4.8. – Tamaño tumoral.....	158

5.5. – Receptores hormonales.....	162
5.5.1. – Receptores estrogénicos.....	162
5.5.2. – Receptores de progesterona.....	164
5.6. – Citometría de flujo.....	166
5.6.1. – Ploidía.....	167
5.6.2. – Fase S.....	170
5.7. – Sobreexpresión de HER-2/Neu.....	172
5.8. – Sobreexpresión de p53.....	174
5.8.1. – Metodología de determinación. Tasa de positividad.....	174
5.8.2. – Correlación con otros factores.....	176
5.8.2.1. – Edad.....	176
5.8.2.2. – Factores histopatológicos.....	176
5.8.2.3. – Receptores hormonales.....	176
5.8.2.4. – Citometría de flujo.....	177
5.8.2.5. – HER-2/neu.....	177
5.8.3. – Valor pronóstico.....	177
5.9. – Modelos pronósticos.....	183
5.10. – Variación temporal de los factores pronósticos.....	185
6. – CONCLUSIONES.....	190
7. – BIBLIOGRAFÍA.....	195

1. - Introducción.

1.1. - EPIDEMIOLOGÍA.

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres de casi toda Europa, Norteamérica, la mayoría de Hispanoamérica y Australasia¹. Es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer en los países industrializados, pasando a un segundo plano tras el cáncer de cérvix uterino en los países latinoamericanos y africanos, y tras el cáncer gástrico en los países asiáticos. A nivel mundial se estima un número de casos nuevos de 720.000 cada año, lo que representa el 20% de todos los casos de cáncer. En muchas de estas poblaciones es la causa de muerte más frecuente en las mujeres entre 35 y 55 años y, entre las mujeres menores de 50 años es casi tan común como todos los cánceres juntos en el hombre. En los diversos registros de tumores del mundo, las tasas de incidencia oscilan entre 75-80 nuevos casos por 100.000 mujeres/año (Hawai, Canadá, California) a cifras entre 11 y 13 nuevos casos por 100.000 mujeres/año (Polonia, Japón)^{2,3}. En Norteamérica constituye el 27% de las neoplasias de la mujer y causa el 18% de la mortalidad por cáncer de la mujer³. En España, la incidencia estandarizada por edad para la población mundial varía entre unos 34,7 casos por cada 100.000 mujeres/año en el Registro de Zaragoza al 47,4 y 48,2 de los Registros de Tarragona y Girona^{2,4,5}. La tasa de mortalidad en nuestro medio es relativamente baja, siendo de 16,67 casos por 100.000 mujeres en el Vallés Occidental, de 18,79 en Catalunya y oscilando entre 16 y 20 en diferentes comunidades autónomas, lejos todavía de la tasa cercana a 30 por 100.000 mujeres de Gran Bretaña o Suiza⁶.

Utilizando los datos de Tarragona, Girona y el Vallés, se puede estimar el impacto global del cáncer de mama en nuestro entorno. Según este cálculo, se diagnostican anualmente en Catalunya unos 2.600 casos nuevos de cánceres de mama^{7,8}. De ellos, la mitad morirán a consecuencia de la enfermedad en un intervalo de 7-8 años².

La incidencia del cáncer de mama está creciendo en la mayoría de los países a una tasa de un 2% por año. Los mayores aumentos se están produciendo en áreas donde el riesgo de cáncer de mama era inicialmente bajo², ya que en los países industrializados este aumento en la incidencia refleja probablemente el efecto de las campañas de detección precoz³. En los últimos 20 años, la probabilidad de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida de una mujer del mundo occidental ha pasado de ser un caso entre 20 mujeres a un caso entre 11-12 mujeres², en Catalunya este riesgo es menor, evaluándose en un caso entre 19 mujeres^{7,8}. El riesgo de morir por cáncer de mama también se ha incrementado en la última década, en este caso más modestamente, pasando de un caso entre 30 mujeres a un caso entre 28 mujeres⁹, indicando una tendencia a la estabilización.

1.2. - HISTORIA NATURAL.

El comportamiento clínico del cáncer de mama se caracteriza por una larga historia natural y por una marcada heterogeneidad entre las pacientes. El cáncer de mama está dentro de los tumores de crecimiento más lento, en donde las fases preclínicas de la enfermedad y las fases clínicas tras el tratamiento inicial e incluso tras la aparición de metástasis pueden ser medidas en años. En un extremo del espectro, un subgrupo de pacientes (aproximadamente un 60%) presenta una tasa de mortalidad anual del 2%, mientras que en el extremo contrario hay una población de pacientes con una enfermedad mucho más agresiva, con una tasa de mortalidad anual del 25%¹⁰.

El crecimiento del cáncer primario de mama a través de la mama se produce por infiltración directa hacia el interior del parénquima mamario, a través de los ductos y a través de los vasos linfáticos de drenaje. En un porcentaje muy importante de casos, la neoplasia puede ser multifocal a

pesar de presentarse como un solo tumor primario¹¹. El tamaño clínico del tumor primario se correlaciona de una manera importante con el pronóstico, con una relación directa entre el tamaño tumoral y la probabilidad de metástasis¹²⁻¹⁵.

Los lugares de afectación locorregional más frecuentes son los ganglios linfáticos axilares, supraclaviculares y mamarios internos. La región axilar es la zona de drenaje linfático más importante y aproximadamente la mitad de las enfermas con cáncer de mama evidente clínicamente tienen afectación histológica de los ganglios axilares; este porcentaje va disminuyendo paulatinamente en la última década gracias a los programas de diagnóstico precoz. La probabilidad de afectación está en relación directa con el tamaño tumoral, pero incluso en tumores de tamaño inferior a 5 mm el riesgo de afectación axilar puede llegar al 20%¹⁶. La afectación histológica axilar tiene una gran correlación con el pronóstico en el cáncer de mama; las pacientes sin afectación axilar tienen tasas de supervivencia marcadamente mejores que los pacientes con ganglios axilares afectados; en varias series importantes, la supervivencia a 10 años es del 65-80% para el grupo de ganglios negativos frente al 25-48% para el grupo de ganglios positivos¹⁷⁻¹⁹. En este último grupo, el pronóstico declina progresivamente al aumentar el número de ganglios positivos¹⁴, sin embargo, como una división práctica, se divide a los pacientes en subgrupos: 1 a 3 ganglios positivos, 4 a 9 ganglios positivos y más de 10 ganglios positivos.

Aproximadamente un 20% de las pacientes tienen afectación de los ganglios de la cadena mamaria interna, siendo más frecuente en los casos con afectación axilar²⁰; la afectación supraclavicular se asocia con la afectación axilar importante, conllevando un pronóstico grave, por lo que la última clasificación TNM la categoriza como metástasis a distancia.

La afectación metastásica del cáncer de mama puede afectar a muchos órganos. Estudios realizados en series necrópsicas muestran que

los órganos más frecuentemente afectados son el pulmón (59-69%), hueso (58-65%) y ganglios linfáticos (72-76%); con menor frecuencia se afectan pleura, piel, SNC, riñón, bazo, ovario y pericardio¹⁰.

1.3. - PARADIGMAS DEL CÁNCER DE MAMA. INFLUENCIA EN LA EVOLUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.

Hasta finales de los años 60, el tratamiento del cáncer de mama se basaba en el paradigma de Halsted, según el cual el cáncer de mama se disemina por permeación, es decir, por extensión directa a lo largo de las vías de drenaje linfático, a los órganos distantes, preservando la continuidad con el tumor primario. La vía sanguínea se consideraba de mínima importancia como vía de diseminación, y los ganglios regionales eran de primordial importancia ya que servían de barreras efectivas para impedir el paso de las células tumorales; la afectación axilar es indicadora de la diseminación tumoral y fuente de las metástasis a distancia. Estos conceptos dieron la base para la cirugía “radical” de Halsted, la cirugía “correcta” consistía en la resección del tumor primario, linfáticos regionales y ganglios linfáticos con una disección en bloque. Se pensaba que el cáncer era una enfermedad locorregional y por tanto “curable” si el cirujano era capaz de interpretar que constituía la “región” y usaba una técnica quirúrgica que pudiera resultar en la erradicación de todas las células neoplásicas. Las recidivas locorregionales se consideraban más frecuentemente el resultado de una inadecuada aplicación de la técnica quirúrgica que una manifestación de una enfermedad sistémica. La mastectomía radical evolucionó posteriormente a cirugías radicales extensas y suprarradicales, incluyendo disecciones ganglionares de la cadena mamaria interna y de la región supraclavicular. El paradigma de Halsted también se aplicó a la radioterapia, creyéndose que, dado que las células neoplásicas residuales podían ser destruidas por la radiación, la irradiación locorregional administrada después

de la mastectomía tendría una mayor probabilidad de conseguir la curación que la mastectomía sola¹⁰.

El hecho de que los primeros ensayos randomizados de radioterapia postoperatoria no demostraran mejoría en la supervivencia libre de enfermedad ni en la supervivencia, los hallazgos de laboratorio que mostraban que las células tumorales podían alcanzar órganos distantes vía sanguínea, y la frustración de los médicos por la frecuente aparición de enfermedad diseminada a pesar de aplicar correctamente los postulados del tratamiento locorregional radical, hicieron aparecer paulatinamente en la década de los 70 un nuevo paradigma de la enfermedad, el sistémico, liderado por el Dr. B. Fisher²¹. Para éste, los conceptos biológicos son la base de esta teoría alternativa según la cual el cáncer de mama operable es una enfermedad sistémica en que las metástasis están presentes, pero ocultas, en el momento del diagnóstico en muchas pacientes, por lo que el tratamiento locorregional no puede afectar la supervivencia. En este paradigma la vía sanguínea es de gran importancia para la diseminación de la enfermedad y la positividad de los ganglios axilares es indicador de una compleja inter-relación huésped - tumor que permite el desarrollo de las metástasis.

La aceptación, cuando menos parcial, de este nuevo paradigma llevó al desarrollo de tratamientos locorregionales menos agresivos, corroborados por los resultados del ensayo NSABP B-06^{22,23} que demostró que el uso de la tumorectomía más radioterapia complementaria no suponía un detrimento en la supervivencia, convirtiéndose en tratamiento estándar para gran parte de las pacientes con cáncer de mama estadios I y II.

Evitando los dos extremos surge inevitablemente un paradigma de consenso, llamado "spectrum" por Hellman y Harris^{10,24}, que considera al cáncer de mama una enfermedad sistémica en muchos casos, pero no en todos. Para ello se basan en los resultados de los ensayos randomizados

de diagnóstico precoz; si las metástasis ocurrieran siempre desde el inicio del cáncer de mama, la detección precoz no sería efectiva para disminuir las metástasis y mejorar la supervivencia. A pesar de todos los problemas metodológicos que plantean los estudios de diagnóstico precoz, es innegable que los resultados globales muestran una reducción aproximada del 25% de la mortalidad, sugiriendo que es posible que la diseminación metastásica ocurra durante el curso de la enfermedad y no siempre desde el inicio. Otro argumento de soporte son los resultados de supervivencia a largo tiempo de grupos de enfermas que no recibieron tratamiento sistémico^{25,26} que muestran una proporción no desdeñable de pacientes aparentemente curadas, mayoritariamente en tumores pequeños y sin afectación axilar, pero también en el grupo de tumores con afectación axilar limitada. Para los defensores de este paradigma las variaciones en el tratamiento locorregional no parecen tener una influencia importante en la supervivencia, pero si son significativas en algunas pacientes.

Tanto para el modelo de enfermedad sistémica pura como para el modelo de consenso es evidente que, cuando menos en un gran porcentaje de pacientes, el cáncer de mama es una enfermedad sistémica, no curable solo con tratamientos locorregionales, y que por tanto su historia natural solo puede modificarse con tratamientos también sistémicos.

Así, a inicios de la década de los 70 se iniciaron los primeros ensayos randomizados de quimioterapia complementaria, cuyos resultados mostraron un beneficio claro en las pacientes con ganglios positivos^{27,28}, igualmente los primeros ensayos de tamoxifeno complementario también demostraron resultados beneficiosos. Con estos resultados quedaba abierta la era del tratamiento sistémico complementario.

Los beneficios que se obtienen con el tratamiento adyuvante quedaron plasmados en múltiples trabajos, con una reducción global de la mortalidad de un 20-30% durante los 5 años posteriores al diagnóstico y de un 5-10% al final de los mismos. La realización de un estudio conjunto por

meta-análisis de todos los estudios randomizados y controlados realizados por múltiples equipos investigadores sobre tratamiento sistémico adyuvante^{29,30} evidenció una disminución en el riesgo relativo para la recurrencia con la quimioterapia complementaria de un $26\% \pm 3$ ($p < 0,00001$) y para la muerte de un $11\% \pm 4$ ($p = 0,003$). Para el tratamiento con tamoxifeno complementario, el beneficio fue del $30\% \pm 2$ ($p < 0,00001$) para la recurrencia y del $16\% \pm 3$ ($p < 0,00001$) para la muerte.

A principios de la década de los 80, el tratamiento complementario hormonal y/o citotóxico se convirtió en rutinario para las pacientes con ganglios axilares positivos. Pronto muchos autores empezaron a plantearse la opción del tratamiento sistémico para las pacientes con ganglios negativos, hasta entonces considerados no candidatas dado su “buen” pronóstico global.

Si el desarrollo del tratamiento sistémico había sido una de las consecuencias del paradigma de enfermedad sistémica, otra fue la aparición de múltiples estudios esforzándose en delimitar factores pronósticos. Varios de estos estudios definieron subgrupos de pacientes con ganglios negativos con peor pronóstico que el grupo global. La inmediata sugerencia era la de extender los beneficios del tratamiento complementario a estas pacientes³¹⁻³⁶, por lo que en los primeros años de la década de los 80 se iniciaron varios ensayos randomizados que estudiaban la eficacia del tratamiento complementario en pacientes con ganglios negativos. Antes de la publicación de los primeros resultados, el *National Cancer Institute* norteamericano publicó a mediados de 1988 una Alerta clínica, basándose en los resultados preliminares de tres de estos estudios³⁷ en que recomendaba el tratamiento adyuvante en estas pacientes, levantando una considerable polémica. A principios de 1989 se publicaron los resultados de estos ensayos junto con los resultados de otro estudio³⁸⁻⁴¹. Estos cuatro ensayos venían a demostrar, en su conjunto, que el tamoxifeno podía retrasar la recaída en las pacientes con receptores de estrógenos positivos, y que la quimioterapia podía hacer lo mismo en las pacientes con receptores

positivos y negativos; ningún tratamiento conseguía modificar la supervivencia global, hecho que los autores atribuyeron al corto seguimiento. A pesar de las múltiples opiniones cautelosas o decididamente contrarias^{42,43}, la comunidad científica asumió rápidamente el tratamiento adjunto de las pacientes con ganglios negativos como estándar en al menos el 50% de este grupo de pacientes⁴⁴⁻⁴⁶, hecho que generó una abundante literatura sobre el escaso beneficio absoluto, el cociente riesgo/beneficio y el cociente coste/efectividad del tratamiento^{44,47,48}.

Olvidado ya el paradigma de Halsted, la idea del tratamiento adyuvante en ganglios negativos surgió básicamente del concepto de enfermedad sistémica defendida por Fisher. Sin embargo, la constancia de que un porcentaje amplio de pacientes con ganglios negativos parecía estar curada solo con el tratamiento local^{26,49} y la escasa potencia de los factores pronósticos valorados hasta ese momento, incapaces de delimitar subgrupos de riesgo con relevancia clínica⁵⁰⁻⁵³, contribuyó al auge del modelo de consenso, una de cuyas características más importantes es la búsqueda incesante de factores pronósticos que puedan delimitar las subpoblaciones de pacientes, particularmente las que no tienen afectación axilar, que van a recaer y que por tanto se van a beneficiar del tratamiento complementario. Así, en un editorial aparecido a los pocos meses de la Alerta Clínica del NCI, McGuire clama por la necesidad de establecer grupos pronósticos en las pacientes con ganglios negativos⁵⁴, abriendo de esta manera la carrera en búsqueda de factores pronósticos que está todavía abierta, y cuya filosofía la resume la siguiente frase de Tandom: “La identificación de factores predictores más precisos de la recurrencia y supervivencia en pacientes con cáncer de mama puede mejorar la selección del tratamiento y guiar futuras investigaciones en las cuestiones de biología básica de estos tumores”⁵⁵.

A pesar de que en la actualidad el porcentaje de pacientes con ganglios negativos que reciben tratamiento supera con creces el 50%, el problema de los factores pronósticos dista mucho de estar resuelto, siendo

necesario seguir estudiando el amplio abanico de posibles parámetros pronósticos que nos ayuden a progresar en el conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

1.4. - DEFINICIÓN DE FACTOR PRONÓSTICO Y FACTOR PREDICTIVO.

A menudo se malinterpretan o se confunden los términos pronóstico y predictivo. Un factor pronóstico puede ser definido como cualquier característica que, por si sola o en combinación con otras características, es capaz de dar información sobre la evolución clínica en el momento del diagnóstico o de la cirugía, asociándose con la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global, idealmente en ausencia de tratamiento sistémico adyuvante⁵⁶. Los factores pronósticos potenciales incluyen características demográficas (por ejemplo edad, estado menopáusico, raza), características tumorales histopatológicas (por ejemplo afectación ganglionar axilar, tamaño tumoral, subtipo histológico), marcadores biológicos que miden o se asocian con procesos biológicos supuestamente involucrados en la progresión tumoral (por ejemplo oncogenes alterados, genes tumorales supresores, factores de crecimiento, medidas de proliferación), y otros factores. Los factores pronósticos pueden usarse para predecir la historia natural del tumor.

Un factor predictivo es aquel que es capaz de dar información útil en la selección de los pacientes con capacidad de responder a un determinado tratamiento. El prototipo de factor predictivo es la presencia de receptores hormonales, que median la respuesta al tratamiento hormonal⁵⁷.

Un factor pronóstico ideal debería reunir las siguientes características para tener la máxima utilidad en su aplicación clínica^{58,59}:

- *Deberá ser expresión de un determinado proceso biológico relacionado con la progresión tumoral o con el proceso metastásico*, es decir, debe ser un signo de alarma del potencial agresivo del tumor.
- *Su determinación (clínica, radiológica o en el laboratorio) debe ser estandarizable y reproducible, por un procedimiento fácil y sensible*. Es fundamental que los estudios realizados en distintos centros puedan proporcionar resultados equiparables.
- *Debe poseer un valor predictivo altamente importante e independiente de los factores clinico-patológicos conocidos*. No debemos conformarnos con que los resultados alcancen la significación estadística, se debe alcanzar una diferenciación lo más amplia posible entre los distintos subgrupos pronósticos, identificando un grupo de pacientes con riesgo elevado para la recurrencia o la muerte.
- *Debe ser fácilmente interpretable por el clínico*.
- *Como requisito final, idealmente el análisis del factor no debería consumir tejido tumoral necesario para efectuar otras pruebas*. Dado que existe una tendencia creciente a diagnosticar los tumores en fases más iniciales con tamaños progresivamente menores, será cada vez más difícil disponer de material suficiente para efectuar los distintos estudios necesarios (histológicos, receptores hormonales, inmunohistoquímica, etc.)

Debe imponerse la cautela cuando se interpretan los resultados de los estudios publicados que evalúan potenciales factores pronósticos o predictivos. McGuire⁶⁰ propuso unos requisitos mínimos que debería cumplir un estudio sobre factores pronósticos que incluyen:

- *Los factores estudiados deben tener un significado biológico claro*. A su vez deben definirse claramente las hipótesis en estudio.
-

- *Es necesario precisar si se trata de un estudio piloto, de un estudio definitivo, o de un estudio de confirmación.* Los criterios de evaluación pueden ser diferentes entre los estudios piloto y los otros dos tipos de estudio. Por ejemplo, el número de pacientes en un estudio piloto puede ser menor, o puede que se investigue únicamente un aspecto determinado en un subgrupo concreto de pacientes. Un estudio definitivo debe contener un número suficiente de casos, con diseño apropiado, y es la única base sólida para evaluar un factor pronóstico. Los estudios de confirmación son los que calibran finalmente el valor real de los factores estudiados, al ser aplicados a distintas poblaciones de pacientes.
 - *El tamaño de la muestra es fundamental para poder sacar conclusiones válidas.* El Tamaño mínimo debería ser de 150 casos. Con una cierta información previa es posible calcular ajustadamente el número de casos necesario para evaluar un factor pronóstico dado. Esta información debe incluir una estimación de la magnitud de la contribución de ese factor, y de la correlación de este factor con otros factores pronósticos. También debe incluir información sobre la distribución del factor en la población, sobre la duración del seguimiento, y sobre el número de recaídas y muertes esperado u observado en dicha población.
 - *La población de pacientes a estudiar debe ser apropiada para evaluar la hipótesis, y debe ser cuidadosamente controlada para evitar sesgos intrínsecos.* Una posible causa de sesgo es el estudio de muestras procedentes de “bancos de tumores”, en los que predominan los tumores de tamaño grande, suficiente como para permitir el almacenamiento de muestras congeladas. Otra posible causa de sesgo es el estudio de pacientes incluidas en ensayos clínicos, dado que habitualmente existe una cierta tendencia a incluir en ellos una mayor proporción de pacientes de mal pronóstico. Además, muchos ensayos se limitan a estudiar
-

únicamente pacientes que reúnen unas características determinadas (receptores hormonales, tamaño, edad, etc.).

- *Es preciso hacer una validación de la metodología empleada en el análisis del factor pronóstico.* A menudo las diferencias en los resultados de distintos estudios pueden explicarse por variaciones en la técnica de análisis, o en la sensibilidad de la misma. Es recomendable que los estudios de confirmación se realicen de la misma forma que los estudios precedentes. Al margen de la sensibilidad de la técnica, que define un “positivo” o “negativo” químico, es frecuente usar un nivel de “corte” (cut-off) clínico, que separa los niveles “positivo - negativo”, “alto - bajo”, “expresión normal - sobreexpresión”, etc., que tienen traducción clínica. Estos puntos de corte pueden situarse arbitrariamente en la mediana o en un percentil dado. Este procedimiento tiene la ventaja de que los niveles de corte son reproducibles, pero su inconveniente es que no siempre coinciden con los niveles que tienen mayor repercusión práctica. Es posible efectuar varios cortes y seleccionar el que tiene un mayor poder discriminante, pero en tal caso este nivel de corte no será aplicable a otros grupos de pacientes.
 - *Debe realizarse un análisis multivariado que también incluya factores estándares.* Los valores estadísticos del análisis univariado pueden ser erróneos, ya que dependen del número de pacientes incluidos en el estudio, además muchos factores pronósticos son interdependientes.
 - *Los resultados de un estudio deberían ser fácilmente reproducidos por otros, para que su aplicación a la práctica sea de utilidad.* El diseño de un estudio de confirmación debería ser equivalente al del estudio que se quiere confirmar. De esta forma se podrían sacar más rápidamente y con mayor certeza las conclusiones acerca del valor real del factor o factores estudiados.
-

1.5. - FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA CON GANGLIOS NEGATIVOS.

Los factores pronósticos son usados normalmente para separar las pacientes con cáncer de mama en subgrupos de los que se esperan evoluciones clínicas diferentes. Un ejemplo del uso de factores pronósticos es el tradicional sistema de estadiaje, que incluye como componentes el tamaño del tumor primario, la afectación de los ganglios axilares y la diseminación metastásica del tumor. Sin embargo con el paso del tiempo y con un creciente acumulo de datos, parece evidente que el sistema TNM no es el óptimo para tomar decisiones terapéuticas. Por ejemplo, se considera normalmente que las pacientes con cáncer de mama estadio I tienen un buen pronóstico después de la cirugía; a pesar de ello una proporción no desdeñable de estas pacientes sufrirá una recaída y eventualmente morirá de su enfermedad.

Alguno de los factores tradicionales que se han usado para tomar decisiones terapéuticas incluyen el número de ganglios axilares afectos, el tamaño del tumor, el grado histológico, el estado de los receptores de estrógenos y progesterona y la edad de la paciente. Posteriormente la ploidia del DNA y la fracción en fase S, medidas por citometría de flujo, han sido propuestas como candidatas a unirse a esta lista. Durante los últimos años, las nuevas tecnologías han hecho posible medir un número creciente de potenciales factores pronósticos para las pacientes con cáncer de mama. Incluyen medidas de la diferenciación, proliferación y agresividad tumoral. Marcadores biológicos como los factores de crecimiento, oncogenes y productos de oncogenes son continuamente descubiertos e investigados.

Desde una perspectiva biológica, y en cierta manera histórica, se pueden identificar tres generaciones de factores pronósticos que se describen en la *tabla 1.1*, modificada de Dhingra y Hortobagyi⁶¹, obviando naturalmente la afectación ganglionar axilar.

Factores pronósticos potenciales en cáncer de mama ganglios negativos	
Primera generación	
Edad y menopausia	Localización tumoral
Tamaño tumoral	Subtipo histológico
Segunda generación	
Histopatológicos	
Grado histológico y nuclear	Necrosis tumoral
Permeación linfática y vascular	Desmoplasia
Infiltrado linfocitario	Componente de carcinoma intraductal
Ploidia	
Marcadores de proliferación	
Fracción en fase S	PCNA
Ki-67	³ H labeling index
Predictores de comportamiento biológico/capacidad de respuesta endocrina	
Receptores de estrógenos	Receptores de progesterona
pS2	
Tercera generación	
Oncogenes amplificados/sobreexpresados	
Her-2/Neu	c-myc
int2	EGFR
bcl2	Ciclinas
Genes supresores tumorales mutados	
p53	nm23
Rb	
Proteasas	
Catepsina-D	uPA/PAI-1
Otros	
Receptor IGF1	Angiogenesis

TABLA 1.1: Factores pronósticos potenciales en cáncer de mama ganglios negativos.

Abreviaciones: PCNA, proliferating cell nuclear antigen; IGF-I, insulin-like growth factor; uPA, urokinase-type plasminogen activator; PAI, plasminogen activator inhibitor.

1.5.1. - FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS.

1.5.1.1. - EDAD Y ESTADO MENOPÁUSICO.

La influencia de la edad y del estado menopáusico al diagnóstico en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama es controvertida. Algunos estudios han indicado un peor pronóstico para pacientes jóvenes^{14,62-68}, mientras que otros han mostrado que las pacientes jóvenes tienen mejor pronóstico que las de mayor edad^{69,70}. Varios estudios basados en los registros poblacionales escandinavos han demostrado una relación no lineal con la edad al diagnóstico y la supervivencia de las pacientes, siendo ésta mucho peor en las pacientes más jóvenes (menores de 40 años) y más mayores (mayores de 70 años)^{71,73}. Así mismo, en otros estudios no se ha hallado correlación entre la edad al diagnóstico y el pronóstico, especialmente en el subgrupo de ganglios negativos^{49,52,74,75}. Estos resultados contradictorios se pueden explicar por varias razones: el pequeño número de pacientes en alguno de los estudios, las diferencias en la selección de pacientes o las diferencias en los grupos de edad usados en el análisis.

Probablemente esta falta de unanimidad se debe a que el valor de la edad está más como factor predictivo en cuanto a la respuesta a la hormonoterapia, al tener relación directa con el estado menopáusico. Existe una relación lineal entre la edad y la respuesta al tratamiento con hormonoterapia, las pacientes jóvenes responden con menos frecuencia que las de más edad. Además, a partir de la menopausia se demuestra una correlación entre la edad y la respuesta a la hormonoterapia, lo que traduce una mayor frecuencia de tumores con receptores hormonales positivos conforme se avanza en la edad de diagnóstico de las enfermas⁵⁹.

Numerosos autores han estudiado el pronóstico de un subgrupo muy concreto, el de pacientes muy jóvenes, usualmente menores de 35 años^{62,65,66,67,68,76-81}. En todos los casos este subgrupo se asocia a factores

histopatológicos y moleculares de mal pronóstico, lo que en general conlleva un peor pronóstico global, sin embargo la importancia que se da a la edad como factor pronóstico independiente varía enormemente entre los diferentes grupos de investigadores.

1.5.1.2. - LOCALIZACIÓN TUMORAL.

La relación entre la localización del tumor primario en la mama, normalmente descrita por cuadrantes, y el pronóstico ha sido examinada en una gran serie del American College of Surgeons⁸². En este estudio, con más de 9.000 pacientes, las pacientes con tumores en cuadrantes internos y ganglios negativos tienen un pronóstico ligeramente peor que los tumores de cuadrantes externos; el resultado en pacientes con ganglios positivos no mostró diferencias significativas estadísticamente. Este hallazgo se correlaciona con la afectación preferente de los ganglios de la cadena mamaria interna por los tumores de cuadrantes internos, lo que conlleva un pronóstico similar al de la afectación ganglionar axilar.

1.5.2. - FACTORES PRONÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS.

1.5.2.1. - TIPO HISTOLÓGICO.

Los tipos más comunes de cáncer de mama son los carcinomas ductales infiltrantes y lobulares infiltrantes, tanto en su forma pura o en combinación con otros tipos histológicos tumorales⁵⁶. Cuando hay células de dos o más tipos histológicos, normalmente se clasifica el tumor conforme al elemento más agresivo. Las pacientes con tumores ductales infiltrantes generalmente tienen una mayor incidencia de metástasis en ganglios

axilares y peor evolución clínica que los tipos menos frecuentes de carcinomas infiltrantes^{52,83-86}.

1.5.2.2. - TAMAÑO TUMORAL.

La relación entre el tamaño del tumor primario y la recurrencia y supervivencia de las pacientes con cáncer de mama ha recibido una atención considerable^{12-14,16,17,26,63,75,87,88}. En una de las primeras series con gran número de pacientes, Fisher et al.⁸⁷ halló que el incremento del tamaño tumoral se relacionaba con la probabilidad de recurrencia, particularmente en los tumores con ganglios negativos. Numerosos autores han confirmado este hallazgo^{26,35,51,64,88-91}, con lo que el tamaño tumoral patológico es uno de los más poderosos y consistentes factores pronósticos en ganglios negativos. En las pacientes con ganglios axilares positivos también se observa una tendencia a una mayor recurrencia conforme aumenta el tamaño tumoral, aunque en muchas ocasiones no alcanza una significación estadística, incluso cuando se estratifica por el número de ganglios afectados⁹². A pesar de su indudable valor, muchos autores no le consideran un factor que por si solo sea capaz de discriminar subgrupos de riesgo⁵¹.

1.5.2.3. - GRADO HISTOLÓGICO.

El grado histológico es un componente estándar del informe anatomopatológico. Es una estimación de la diferenciación tumoral y numerosos investigadores lo han propuesto como un potente predictor de la evolución del cáncer de mama, tanto globalmente^{12,75,88,93-98} como en el grupo de pacientes con ganglios negativos^{32,35,52,64,84,89,90,99-102}. De hecho, cuando el grado tumoral se realiza por patólogos entrenados y en una sola institución, la mayoría de los sistemas de gradación se correlacionan bien con la evolución clínica.

El sistema de gradación para el cáncer de mama más generalmente usado es la clasificación de Scarff-Bloom-Richardson, que se compone de tres componentes (grado de diferenciación tubular, pleomorfismo nuclear y el índice mitótico) cada uno valorado en una escala de 1 a 3. El grado de diferenciación tubular se evalúa según la capacidad tumoral de formar estructuras tubulares, glandulares o papilares; el pleomorfismo describe la configuración nuclear; el índice mitótico evalúa el número de mitosis hallado en el espécimen. Las puntuaciones de los tres componentes se suman y se clasifican como grado 1 (bien diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) o 3 (mal diferenciado). Aunque el sistema otorga igual valor a cada componente, varios autores hallan más peso para la diferenciación tubular^{103,104}, el pleomorfismo o grado nuclear^{98,103,105} o el índice mitótico^{106,107}.

La principal crítica al grado tumoral se basa en su teórica escasa reproducibilidad y la falta de acuerdo entre diferentes observadores¹⁰⁸. Sin embargo hay estudios¹⁰⁹ que demuestran una reproducibilidad entre diversos centros no familiarizados con su uso, anteriormente a la realización del estudio, que supera el 80%, mejor porcentaje que el señalado para la determinación del grado en otros tumores como los linfomas no hodgkinianos o los sarcomas.

1.5.2.4. - NECROSIS TUMORAL.

La asociación entre un crecimiento tumoral rápido y la necrosis es reconocida en general, y varios autores han asociado la necrosis extensa con tumores agresivos y de peor pronóstico^{32,107,110-113}, especialmente en pacientes con ganglios negativos. Los tumores malignos se caracterizan por la degeneración y muerte celular, que lleva a la figura histopatológica de la necrosis tumoral; un aporte sanguíneo inadecuado por los vasos imperfectos que se forman en los tejidos neoplásicos puede predisponer a la necrosis por nutrición insuficiente y deficiente eliminación de las células tumorales

muertas. Para Gilchrist¹¹³ la necrosis tumoral representa una forma simplificada del grado histológico.

1.5.2.5. - INVASIÓN VASCULAR Y LINFÁTICA.

La presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos y sanguíneos en el tumor primario puede reflejar un mayor riesgo de metástasis sistémicas ocultas. Sin embargo su significación pronóstica es muy controvertida. Mientras varios estudios han mostrado su valor como factor independiente de otras variables histológicas^{33,75,88,92,114-117}, otros autores no han podido confirmar este hecho^{35,99,118}. Estas observaciones discordantes se deben probablemente al hecho que la identificación histológica de la invasión vascular y linfática es altamente subjetiva; de hecho la frecuencia de la invasión vasculo-linfática por células neoplásicas en el tumor o en su proximidad varía entre el 5 y el 70% en diferentes estudios. Los dos errores posibles más frecuentes son la interpretación errónea de nidos sólidos de carcinoma intraductal como espacios vasculares invadidos, y la confusión con los espacios artefactuados alrededor de los nidos de células tumorales, que se forman como resultado de la pérdida de volumen del tumor durante el proceso de fijado. Para obviar los artefactos se recomienda objetivar la invasión vasculo-linfática en el parénquima mamario adyacente al borde invasivo tumoral; también se han realizado esfuerzos para identificar los vasos intratumorales con diversas técnicas de inmunohistoquímica con solo un éxito limitado (anticuerpos contra grupos sanguíneos o contra factor VIII)^{114,119}. En el subgrupo de ganglios negativos, varios estudios con un importante número de pacientes y seguimiento largo han confirmado el valor pronóstico independiente de la permeación vascular y linfática^{88,114,115,117}.

1.5.2.6. - INFILTRADO LINFOPLASMOCITARIO.

El valor pronóstico del infiltrado linfoplasmocitario en el estroma tumoral no queda claro en la literatura. La infiltración se compone principalmente de linfocitos maduros con una proporción variable de células plasmáticas. Los tumores con gran presencia de infiltrado linfoplasmocitario suelen ser pobremente diferenciados y tener unos límites circunscritos, en lugar de infiltrantes, asociándose con receptores hormonales negativos. Los resultados publicados sobre su valor pronóstico no son concluyentes. Algunos autores describen que la presencia de infiltrado tiene un pronóstico relativamente mejor¹⁰³, frente a otros que no encuentran diferencias significativas o bien, un pronóstico peor^{33,110}.

1.5.2.7. - COMPONENTE INTRADUCTAL ASOCIADO.

Los tumores de mama varían en su composición entre el componente de tumor intraductal y el invasivo, desde tumores con invasión microscópica hasta lesiones compuestas completamente por carcinoma invasivo. Varios autores han observado una tendencia de los tumores con gran componente intraductal a tener una menor presencia de metástasis ganglionares axilares y un mejor pronóstico^{103,120}. Aunque la distribución del componente intraductal dentro y alrededor del tumor primario parece correlacionarse con el riesgo de recurrencia local tras el tratamiento quirúrgico conservador, este hecho no parece relacionarse con un mayor riesgo de recurrencia sistémica¹²¹. En los carcinomas invasivos no se ha demostrado una clara relación entre el patrón estructural del componente intraductal (comedo, cribiforme o papilar) y el pronóstico.

1.5.3. - FACTORES PRONÓSTICOS BASADOS EN LA CINÉTICA CELULAR.

1.5.3.1. - CITOMETRIA DE FLUJO. PLOIDÍA Y FASE S.

El contenido celular de ácido desoxirribonucleico (DNA) ha sido relacionado con el pronóstico del cáncer de mama desde hace más de 2 décadas. Inicialmente se determinaba mediante microespectrofotometría, técnica lenta que requería la selección manual de las células a estudiar. Posteriormente, con la aparición de microespectrofotómetros automatizados este proceso se volvió más cómodo, pero el gran paso adelante se dio al introducirse la citofluorometría de flujo. Esta técnica reúne las ventajas de analizar rápidamente un gran número de células y de permitir el análisis del ciclo celular con mucha mayor rapidez y comodidad. La citometría de flujo de puede aplicar en tejido fresco, muestras congeladas, aspiraciones con aguja tomadas directamente del tumor, y en material parafinado.

El análisis del DNA se realiza tiñendo los núcleos de las células con fluorocromos específicos para los ácidos nucleicos (por ejemplo el yoduro de propidio). Todos ellos se unen estequiométricamente al DNA, por lo que al ser estimulados con láser emiten una señal fluorescente proporcional al contenido del mismo. De esta manera, la intensidad de la fluorescencia es una medida directa de la cantidad de DNA nuclear. Dado que el contenido de DNA de las células varía según la fase del ciclo celular se puede estimar la proporción de células que se hallan en cada fase, analizando simplemente un número suficiente de núcleos. La *figura 1.1* muestra una representación gráfica del ciclo celular.

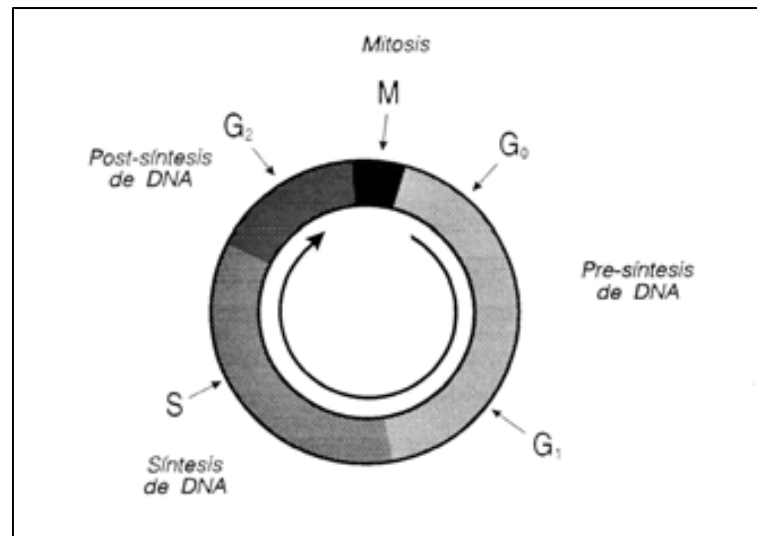


Figura 1.1: Fases del ciclo celular en el cáncer de mama:
S (18 h.), G₂ (4-5 h.), Mitosis (1-2 h.). El ciclo global dura 1-4 días.

El resultado del análisis del DNA celular se expresa gráficamente mediante el llamado histograma de DNA (*figura 1.2*).

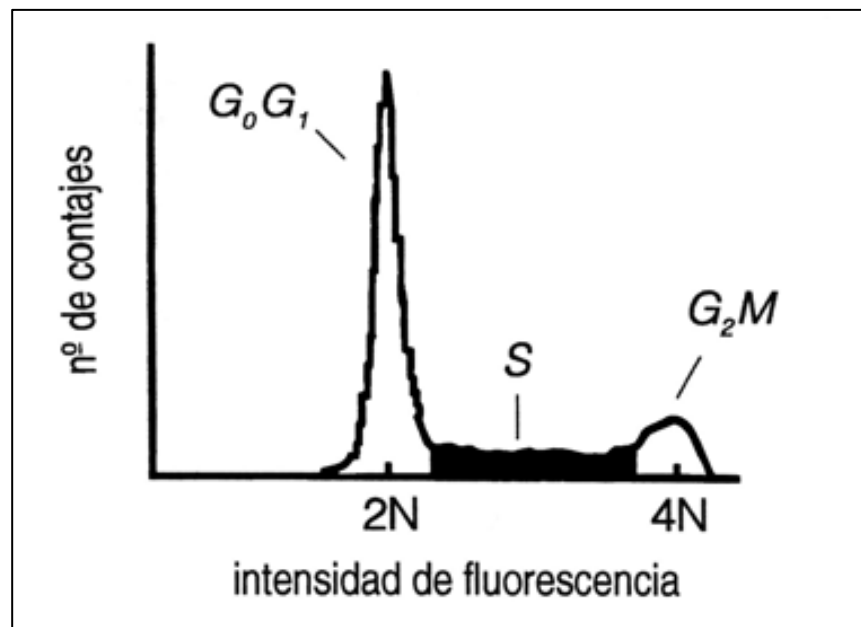


Figura 1.2: Histograma de DNA, en el que se muestran las distintas fases y su relación con el contenido celular de DNA.

El eje de ordenadas del histograma representa el número de elementos contados (células o núcleos), y el eje de abscisas refleja la intensidad de fluorescencia (contenido de DNA). En un histograma normal se observa un gran pico a la izquierda, que corresponde a las células en fase de presíntesis (G_1) y a las células en situación de reposo (G_0), que tienen un contenido de DNA diploide ($2N$). Cuando se inicia la síntesis (fase S) el contenido de DNA aumenta ($2N-4N$), y llega al máximo justo antes de la división o mitosis ($4N$). Por ello las fases G_2 y M aparecen como un pico a la derecha del histograma.

Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular son calculados por ordenador, usando diversos modelos matemáticos. El contenido de DNA o ploidia de una población de células tumorales se expresa por medio del índice de DNA (DI), que es la relación existente entre el contenido modal de DNA (en fase G_0/G_1) de dicha población y el contenido modal de DNA (en fase G_0/G_1) de una población diploide de referencia. Los tumores diploides tendrán un $DI=1$ y los tumores aneuploides un $DI \neq 1$. Las poblaciones aneuploides se dividen en hiperdiploides e hipodiploides, según si el contenido de DNA es respectivamente mayor o menor que el de la fase G_0/G_1 normal. La gran mayoría de los tumores aneuploides son hiperdiploides, mientras que solo un 2% son hipodiploides. También un pequeño porcentaje de histogramas (3%) presenta dos o más poblaciones aneuploides, considerándose multiploides¹²².

Como población diploide de referencia suelen usarse los linfocitos humanos, pero puede usarse cualquier población de células benignas. Incluso las propias células inflamatorias, estromales o endoteliales que están presentes en todo tumor maligno proporcionan un pico diploide. La capacidad de identificar dos poblaciones distintas varía según la técnica de preparación de la muestra y según el aparato empleado, pero en condiciones óptimas es posible separar poblaciones celulares que tengan una diferencia mínima en el contenido de DNA superior al 4%. Como medida de la calidad del histograma se toma el coeficiente de variación (CV), que

está en relación con la anchura de la base del pico de fase G_0/G_1 . Se considera que un CV elevado (un pico ancho) puede enmascarar la presencia de poblaciones tumorales aneuploides muy cercanas a la población diploide, y por lo tanto en todos los estudios de citometría de flujo se establece un CV máximo y se descartan los histogramas que tienen un valor superior.

Así, la citometría de flujo permite obtener una medida del contenido de DNA (ploidía) y también una medida de la actividad proliferativa (fase S), de una manera relativamente sencilla y mecanizada, y se pueden estudiar más de 100.000 células tumorales de una paciente en pocos minutos. Sin embargo, no todos los histogramas son adecuados para la identificación de las poblaciones aneuploides o para la estimación de la fase S, ya que hay casos donde un alto CV o una mala calidad de la muestra (exceso de desechos celulares o baja celularidad) lo impiden. Por otra parte, para calcular correctamente la fase S se necesita que la proporción de células tumorales en el espécimen sea superior al 15% del total de células estudiadas, los porcentajes menores permiten la determinación de la ploidía pero no de la fase S. Estos y otros problemas técnicos llevan a que en muchos estudios no se pueda determinar la ploidía en un 5-10% de los casos y que la fase S no sea valorable hasta en un 40% de los histogramas.

Para clarificar los aspectos clínicos, metodológicos y de control de calidad se celebró en Octubre de 1992 una Conferencia de Consenso que realizó unas recomendaciones para la correcta utilización y evaluación de la citometría de flujo en cáncer de mama^{123,124}.

La ploidía y la fase S se correlacionan generalmente con el grado¹²⁵⁻¹³⁰, receptores hormonales^{122,131-133} y con el tamaño tumoral^{122,127,129,130,132,134} mientras que la correlación con la afectación axilar y la edad es más controvertida^{122,125,127,128,132-134}. La relación entre ploidía y la fase S

es intensa, y en todos los estudios los tumores diploides tienen fases S significativamente más bajas que los tumores aneuploides.

El valor pronóstico de los parámetros determinados por citometría de flujo ha sido analizado en un gran número de estudios, especialmente en pacientes con ganglios axilares negativos. En este subgrupo de pacientes, el valor de la ploidía es independiente para un escaso número de autores^{107,127,132,134}, mientras que el valor de la fase S por sí sola o en combinación con la ploidía es generalmente reconocido^{125,128,130,135-140}, aunque alguna vez se pone en duda su trascendencia clínica por la falta de estandarización de la metodología¹⁴⁰. La fase S es una variable biológica continua más que una variable dicotómica, y cada laboratorio debe validar el valor pronóstico de sus propios valores de fase S, ya que no se ha establecido un punto de corte óptimo que separe homogéneamente los grupos de pacientes con diferente riesgo de recurrencia o muerte.

El contenido de DNA nuclear también se puede estudiar mediante citometría por análisis de imagen, siendo los resultados prácticamente superponibles a la citometría de flujo¹⁴¹, con la ventaja de la selección de células en la citometría por imagen, pero con el inconveniente de la laboriosidad y lentitud de la técnica.

1.5.3.2. - OTROS MARCADORES DE PROLIFERACION CELULAR.

Además de la fase S, la actividad proliferativa tumoral, definida como la proporción de células en ciclo, del total de la población celular, se puede determinar por otros procedimientos, los más importantes son la fijación de timidina tritiada (³H-labelling index), el Ki67 y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por inmunohistoquímica, y, más recientemente, la determinación de la vimentina en las células tumorales, también por técnicas de inmunohistoquímica. Todos ellos se correlacionan bien con el

grado tumoral. El índice mitótico, considerado también un marcador de proliferación, se incluye en la determinación del grado histológico.

El **³H LABELLING INDEX (LI)** o índice de marcaje por timidina tritiada se realiza incubando tejido tumoral fresco y viable con timidina tritiada, un precursor que se incorpora específicamente en el DNA si las células están sintetizándolo. Esto permite la identificación de células en fase S mediante una autoradiografía. El tiempo de exposición es de 1 a 2 semanas y el LI se obtiene contando de 3.000 a 10.000 células de diferentes muestras del mismo tumor. A pesar de su constante valor pronóstico, especialmente en el grupo de ganglios negativos, en prácticamente todos los estudios que utilizan éste método¹⁴²⁻¹⁴⁹, los inconvenientes de la necesidad de tejido fresco, el retraso en obtener los resultados y lo laborioso y especializado del procedimiento han hecho que los investigadores se fueran decantando progresivamente por el uso de la citometría de flujo para determinar la fracción proliferativa, tras la demostración de la correlación de los resultados mediante los dos procedimientos¹⁴⁷.

El **Ki-67** es un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno nuclear, una proteína no-histona, que solo se expresa en células en proliferación (G₁ tardía, S, M y G₂)¹⁵⁰. Este anticuerpo se puede usar en tejido fresco o congelado y ser detectado en él por inmunohistoquímica. Se han desarrollado nuevos anticuerpos, un Ki-67 policlonal¹⁵¹ y el MIB1¹⁵², que interaccionan con péptidos de fragmentos recombinantes del gen de antígeno Ki-67, que son activos en material parafinado.

El Ki-67 se correlaciona directamente con el tamaño tumoral, el grado histológico la invasión vasculo-linfática, el positividad de los ganglios axilares y los receptores hormonales negativos; el Ki-67 se correlaciona bien con el LI pero pobremente con la fase S y el PCNA⁵⁶. Varios estudios han investigado el significado pronóstico del Ki-67, y en muchos se ha hallado una correlación con la evolución clínica en el análisis univariado¹⁵³⁻¹⁶¹.

Muchos de estos estudios tienen relativamente pocos pacientes, están compuestos de grupos heterogéneos de pacientes con ganglios negativos y ganglios positivos y tienen un seguimiento corto. En el subgrupo de pacientes con ganglios negativos^{153-155,157,158}, los estudios sugieren que el Ki-67 es un factor pronóstico para la recurrencia y la supervivencia, pero su valor independiente está todavía por confirmar.

EL ANTIGENO NUCLEAR DE PROLIFERACION CELULAR, PCNA (del inglés: proliferating cell nuclear antigen) es una proteína nuclear asociada con la polimerasa δ del DNA, que está presente en las células proliferantes a lo largo de todo el ciclo celular. El nivel de la proteína se correlaciona con la proliferación celular y, específicamente, con la síntesis de DNA. El anticuerpo monoclonal PC10 reconoce un epítipo de la PCNA humana en tejido mamario fijado. La cantidad medida de PCNA en tumores de mama se correlaciona con la actividad mitótica, el grado y la determinación de la fase S por citometría de flujo. En varios estudios su valor como factor pronóstico ha sido decepcionante, especialmente en pacientes con ganglios negativos^{162,163}.

En los últimos años se ha despertado el interés en la expresión de la **VIMENTINA** como un marcador de la proliferación celular. La vimentina es una proteína de los filamentos intermedios, normalmente asociada a los fibroblastos y otras células de origen mesenquimal, no estando presente en la mayoría de las células epiteliales normales, incluyendo las mamas, que en su lugar contienen queratinas. Se ha demostrado que mientras todos los tumores malignos mamaros continúan expresando queratinas, una fracción sustancial (alrededor del 25%) también expresan vimentina en más del 10% de las células tumorales. La vimentina se expresa preferentemente en tumores con receptores estrogénicos negativos y con una tasa de proliferación alta. Su expresión anómala se ha correlacionado con un mal pronóstico en cáncer de mama en algún estudio piloto¹⁶⁴.

1.5.4. - RECEPTORES HORMONALES Y FACTORES REGULADORES DE LOS ESTROGENOS.

1.5.4.1. - RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA.

El estado de los receptores esteroideos, determinados por métodos de radioinmunoensayo o enzimoimmunoensayo, se ha usado para tomar decisiones terapéuticas en pacientes con cáncer de mama desde hace muchos años, y ya hace 25 años que se publicó el primer artículo sobre el valor pronóstico de los receptores estrogénicos³⁴. Pese a la numerosa literatura sobre esta cuestión, la controversia domina todavía el verdadero papel de los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) como factor pronóstico independiente en el cáncer de mama operable.

Los receptores hormonales se correlacionan invariablemente con la edad y/o la menopausia, siendo positivos más frecuentemente en pacientes mayores¹⁶⁵. Existe una cierta discusión sobre si la mayor proporción de receptores hormonales en las pacientes postmenopáusicas es debida únicamente al estado menstrual o si es un efecto de una mayor edad de las pacientes. Algunos estudios sugieren que la edad no influye cuando se da un estado menstrual determinado, y otros, que la edad se correlaciona de forma más precisa¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. La ausencia de receptores hormonales se relaciona con un mayor grado histológico y una mayor necrosis. Esta relación sugiere que el contenido de RE es un marcador bioquímico del grado de diferenciación tumoral, pero con la ventaja de ser más fácilmente reproducible^{52,145,166,169}. Una buena proporción de estudios corroboran una relación significativa entre la presencia de receptores y una baja proporción de células en proliferación, determinadas por LI, citometría de flujo o marcaje con Ki-67^{122,130,131,133,137,139,148}.

A pesar de los muchos trabajos que hallan un peor pronóstico para las pacientes con RE negativos, de una manera independiente de otros factores pronósticos^{34,36,111,146,148,169,171-173}, este hallazgo no es universal y en muchas ocasiones los resultados son conflictivos^{52,174-178}. La falta de resultados consistentes se atribuye normalmente a una falta de control de calidad en el método de determinación, a la selección de pacientes y al escaso número de casos estudiados. Los estudios en el grupo de ganglios negativos con gran número de pacientes demuestran consistentemente que las pacientes con tumores RE positivos tienen una mayor supervivencia libre de enfermedad. Los datos del grupo de San Antonio y del NSABP¹⁷⁹ indican que esta ganancia es de alrededor del 9% a 5 años. Esta escasa ganancia ha llevado a varios investigadores a concluir que los receptores hormonales *per se* no son un factor suficientemente poderoso para basar en él las decisiones de tratamiento.

El valor adicional de la determinación de los RP, especialmente en el grupo de pacientes con ganglios axilares negativos, no queda claro. Teóricamente la presencia de RP es un indicador de una vía de respuesta a los estrógenos intacta. Sin embargo, en los análisis multivariados de pacientes con ganglios negativos, tanto los RE como los RP, pero rara vez ambos, son factores pronósticos significativos de la evolución clínica^{64,137,145,180,181}. Frecuentemente los RE son mejores predictores de la supervivencia libre de enfermedad, mientras que los RP se asocian mejor con la supervivencia global, probablemente porque es un mejor indicador de la respuesta al tratamiento hormonal que sigue a la recurrencia de la enfermedad.

Algunos estudios con largo seguimiento sugieren que la importancia de los RE como factor pronóstico es mayor en los primeros años, tendiendo a desaparecer con el mayor seguimiento^{169,182,183}, traducándose en una supervivencia a largo plazo similar para las pacientes con RE positivos y RE negativos. Este hecho sugeriría que la ausencia de RE reflejaría mejor la

capacidad de proliferación que el potencial metastásico. Por otra parte, varios estudios^{184,185} han hallado una inesperada relación entre altos niveles de RE y un pronóstico similar al de los RE negativos, especialmente en pacientes postmenopáusicas. Las hipótesis que explicarían esta situación comprenden desde la progresión del tumor con altos niveles de RE a un estado de independencia hormonal hasta la expresión de un producto modificado del gen de los RE. En contraste con esta pobre supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con niveles extremadamente altos de RE, este grupo es el que demuestra mayor beneficio del tratamiento hormonal adyuvante.

Dado el tamaño progresivamente menor de los cánceres de mama diagnosticados en la actualidad, y la incapacidad de los métodos bioquímicos de superar la heterogeneidad intratumoral, se han desarrollado métodos de detección de receptores hormonales por inmunohistoquímica, aunque hay pocos estudios que comparen ambos métodos, los existentes corroboran en general la correlación entre las diferentes metodologías, reflejándose en un semejante valor pronóstico⁵⁶.

En resumen, el grueso del cuerpo científico sugiere que hay diferencias biológicas entre las pacientes con y sin receptores esteroideos, que se manifiestan clínicamente en una historia natural más agresiva en las pacientes con receptores negativos. El valor predictivo de respuesta de los receptores hormonales es indiscutible y ha sido descrito por muchos autores. Aproximadamente dos tercios de las pacientes con cáncer de mama presentan RE y un 50% responderán al tratamiento hormonal.

1.5.4.2. - pS2

El gen pS2 se identificó en una línea celular de cáncer de mama humano en respuesta a la estimulación estrogénica. La proteína pS2 es de

pequeño tamaño (6450 kd) y de función desconocida. Se ha sugerido que la expresión de pS2 podría reflejar el estado funcional de los RE, y que podría ser un factor pronóstico y predictivo en el cáncer de mama⁵⁶.

Algunos estudios han demostrado una intensa asociación entre las concentraciones de pS2 en tumores mamarios humanos y el estado de los RE y RP, sin embargo no se ha hallado relación significativa con la afectación nodal axilar o el tamaño tumoral.

A pesar de unos primeros estudios prometedores^{186,187}, la determinación de la expresión de pS2 por radioinmunoensayo o por inmunohistoquímica no ha demostrado un valor independiente como factor pronóstico¹⁸⁸⁻¹⁹¹. La tendencia a una mejor supervivencia global para los pacientes pS2 positiva podría deberse a la respuesta al tratamiento hormonal tras la recurrencia. La pS2 será probablemente más útil como predictor de la respuesta hormonal, tanto en enfermedad primaria como avanzada, especialmente en combinación con los RE y RP.

1.5.5. - PROTEASAS.

1.5.5.1. - CATEPSINA D.

La catepsina D es una glicoproteína lisosomal inducida por los estrógenos que se procesa de forma anormal en las células tumorales del cáncer de mama. Juega un papel en la invasión tumoral como proteasa, degradando la membrana basal y aumentando la liberación de factores de crecimiento. Por esta función, es una atractiva candidata como marcador pronóstico de la capacidad de invasión y de metastatizar⁵⁶.

La revisión de los primeros estudios^{55,192} que evaluaban su valor pronóstico en el cáncer de mama muestra que, aun considerada un factor positivo por sus autores, en casi todos se alcanza la significación estadística solo en subgrupos específicos de pacientes, tras optimizar el punto de corte para un particular grupo de pacientes. Se han usado diferentes métodos de determinación bioquímicos y inmunohistoquímicos, sin poder validar un punto de corte general. Los estudios que emplean técnicas de inmunohistoquímica^{187,188,193-195} no encuentran relación entre la positividad para la Catepsina D y el pronóstico, aunque se ha preconizado que el marcaje de los elementos estromales, más que el de los elementos tumorales, es el que marca la capacidad de invasión inducida por la Catepsina D^{193,196}. El papel pronóstico de la Catepsina D precisa de nuevos estudios para su definición definitiva.

1.5.5.2. - ACTIVADORES E INHIBIDORES DEL PLASMINÓGENO.

Varios equipos de investigadores han estudiado la vía de activación del plasminógeno en el cáncer de mama y su relación con el proceso de la invasión tumoral. Tanto el *urokinase plasminogen activator* (uPA) como su inhibidor PAI-1 se han evaluado como potenciales factores pronósticos en el cáncer de mama operable. Como con otros nuevos marcadores pronósticos, se han utilizado diferentes metodologías y diferentes anticuerpos monoclonales, con lo que los puntos de corte del uPA y PAI-1 también han sido variados. Varios estudios pilotos¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ han hallado valor pronóstico, especialmente en ganglios negativos, tanto para activadores como para inhibidores. Los resultados son prometedores, pero se deben realizar estudios confirmativos con la misma metodología antes de conocer el valor pronóstico de estos marcadores.

1.5.6. - ONCOGENES Y GENES SUPRESORES.

El ciclo celular es el término utilizado para describir un proceso ordenado que lleva a una duplicación correcta de todos los componentes celulares, y llegar a producir dos células hijas perfectas e idénticas. De una manera simple, se puede decir que hay dos clases de genes, o de productos proteicos dependientes de ellos, que son fundamentales para realizar este proceso de forma correcta: genes cuyos productos son necesarios para que la célula avance en su ciclo de mitosis, y genes cuyas proteínas actúan como vigilantes, monitorizando la eficacia en la realización de este complejo proceso, y que lo paralizan cuando las condiciones no son las correctas. La hipótesis actual de la cancerogénesis reconoce que el cáncer se desarrolla por acumulo sucesivo de mutaciones en estos dos tipos de genes importantes: los protooncogenes y los genes supresores. Mientras una gran variedad de procesos puede dar lugar a mutaciones que contribuyan a la aparición del cáncer, hay tres resultados finales de éstas mutaciones: la sobreexpresión de un gen y su proteína, la alteración del producto del gen, y la inactivación de la proteína codificada.

Los protooncogenes son genes celulares normales que, cuando se inactivan de una manera inapropiada como oncogenes, provocan una disregulación del proceso de crecimiento y diferenciación que aumenta la probabilidad de una transformación neoplásica. En contraste con ellos, los genes supresores son genes normales celulares que al inactivarse alteran el crecimiento y diferenciación celular. El interés inicial se centró en los oncogenes como el c-myc o el Her-2/neu, pero el descubrimiento de los genes supresores como el p53, el gen del retinoblastoma, el gen del tumor de Wilms, el DCC (*deleted in colon carcinoma*), el MCC (*mutated in colon carcinoma*), y el APC (*adenomatous poliposis coli*) ha centrado la investigación en el área de los genes supresores.

1.5.6.1. - HER-2/neu.

La relación entre los protooncogenes y la inducción o mantenimiento de las enfermedades malignas se deriva de estudios realizados en modelos animales, líneas celulares tumorales y en tumores humanos. Los datos elaborados desde la investigación en tumores humanos confirman esta relación desde varias perspectivas: a) hay una elevada expresión de ciertos protooncogenes específicos en algunos tumores malignos humanos, b) la localización de estos protooncogenes está cerca de las translocaciones cromosómicas asociadas a ciertas patologías malignas, y c) se ha detectado la amplificación de protooncogenes en algunas de estas patologías²⁰⁰.

El gen HER-2/neu se localiza en la banda q21 del cromosoma 17, genera un RNA mensajero de 4.8 kb que codifica una glicoproteína de 185 kd, el gen HER-2/neu se relaciona estrechamente con el gen del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Como la proteína del EGF, la proteína que codifica el HER-2/neu tiene un dominio extracelular, otro transmembranoso que incluye dos racimos de repetición ricos en cisteína, y un dominio intracelular, lo que indica que actúa como un receptor celular para un ligando todavía no identificado⁵⁶.

La proteína HER-2/neu se expresa en bajos niveles en las células epiteliales y mioepiteliales del tejido mamario normal, está sobreexpresada también en bajos niveles en el carcinoma in situ papilar y cribiforme y a más altos niveles en el carcinoma in situ ductal tipo comedo (40%) y en el 20-30% de los carcinomas ductales infiltrantes^{201,202}. La sobreexpresión del oncogén HER-2/neu no se limita al cáncer de mama, sino que también se encuentra en otros tumores malignos, como el cáncer colorrectal, tumores vesicales y carcinomas de pulmón no microcíticos pero con un porcentaje de positividad mucho menor. La sobreexpresión se limita generalmente a los adenocarcinomas, cualquiera que sea su localización²⁰³.

En los numerosos estudios en los que se estudia el posible valor pronóstico de la sobreexpresión del HER-2/neu, la comparación con otros factores pronósticos clínicos o histopatológicos es frecuente. La disparidad de resultados puede atribuirse a las distintas técnicas de determinación utilizadas, al número o subgrupos de pacientes estudiados y a la disponibilidad de los distintos factores comparables por parte de los investigadores. En conjunto, hay un cuerpo de evidencia sobre la relación con diferentes factores.

La mayoría de los trabajos describen una correlación positiva de la sobreexpresión con el número de ganglios afectados^{204, 205}. Referente al tipo histológico, el carcinoma lobulillar no expresa la oncoproteína en absoluto, o lo hace en mínima cantidad^{206, 207}. Los carcinomas ductales infiltrantes con extenso componente intraductal o los carcinomas intraductales puros de tipo comedo tienen un porcentaje de positividad superior al de los carcinomas ductales infiltrantes puros^{201,208,209}.

La sobreexpresión se correlaciona generalmente con un grado nuclear o histológico más indiferenciado^{207,209-213}, especialmente con el componente mitótico^{213, 214}. La relación con el tamaño tumoral es fuente de mayores desacuerdos, aunque frecuentemente no se encuentra mayor expresión en los tumores de mayor tamaño^{210, 213,215,216}, varios investigadores si hallan una correlación positiva^{202, 217, 218}.

La relación de la positividad para HER-2/neu y la negatividad para los receptores hormonales, tanto RE como RP, es una de las más confirmadas^{204, 207,209}. En los pocos trabajos en los que esta relación no es significativa^{210,217} se debe, probablemente, a un número insuficiente de pacientes. La expresión de cathepsina D²¹⁹, la aneuploidía y la mayor fase S^{211, 214} se relacionan normalmente con la sobreexpresión del gen, mientras que parece haber poca relación con el EGF y el Ki-67¹⁹⁴. La relación con la expresión del gen p53 parece constante^{214, 220,221}.

Doce años después de los estudios iniciales sobre el valor pronóstico del HER-2/neu en el cáncer de mama²⁰⁰, su papel está todavía por definir.

Ravdin y Chamness²²² han revisado la literatura referente al HER-2/neu, concluyendo que la interpretación de los estudios que analizan el uso de este oncogén y de su proteína como factor pronóstico y predictivo en el cáncer de mama primario es difícil por las diferentes técnicas usadas y por problemas metodológicos en muchos de los estudios. La revisión abarca desde los pequeños estudios piloto con corto seguimiento (útiles para la generación de hipótesis) que muestran un cierto valor, hasta el análisis de las grandes series de pacientes que son necesarias para hallar resultados significativos con suficiente poder estadístico. Estos grandes estudios no dan soporte al uso del HER-2/neu en el estudio de las pacientes con ganglios axilares negativos, el grupo de pacientes en que la refinación en la estimación pronóstica es actualmente más importante. Sin embargo se sugiere que el HER-2/neu puede tener valor para predecir la respuesta a ciertos tratamientos, aunque los estudios sobre esta cuestión son escasos, frecuentemente con pocas pacientes y con resultados conflictivos.

Los primeros estudios que analizaban el posible valor pronóstico del gen HER-2/neu^{200,217,223,224} medían la amplificación del gen, hallando habitualmente que esta amplificación era un factor pronóstico para una baja supervivencia libre de enfermedad y global en pacientes con ganglios axilares positivos, pero no en el subgrupo de ganglios negativos. Los estudios posteriores miden generalmente la expresión de la proteína HER-2/neu más que la amplificación. Esta sobreexpresión proteica se correlaciona bien con la amplificación del gen^{202, 223}, pero se ha hipotetizado que la expresión del gen se relacionaría más directamente con el comportamiento de las células tumorales. La mayoría de los estudios utilizan la inmunohistoquímica para medir los niveles de oncoproteína, ya que esta técnica puede realizarse en material parafinado. Las técnicas de inmunoblotting precisan material fresco o congelado. Los dos métodos de determinación de la oncoproteína se han comparado en series amplias de pacientes, con una concordancia del 95%²²⁵.

El análisis de los estudios realizados con mas de 100 pacientes y un seguimiento mayor de tres años^{200,205,207,210,213,214,217,218,223,226-228} muestra que

varios de ellos encuentran valor pronóstico para la sobreexpresión de la proteína, mientras que otros no hallan utilidad para este factor. Normalmente los análisis univariados conceden un valor pronóstico que disminuye o desaparece en el análisis multivariado, tal vez a causa de la inclusión de otras variables pronósticas poco habituales. La conclusión de autores como Ravdin²²² es que la sobreexpresión del HER-2/neu por inmunohistoquímica añade poco a la capacidad de predecir la supervivencia libre de enfermedad, pero que podría tener cierto valor en la predicción de la supervivencia global.

El examen de los estudios en pacientes con ganglios negativos^{207, 208, 215, 216, 229-231} sugiere una menor utilidad en este subgrupo. Solo un estudio importante da un valor significativo en el análisis multivariado; en el resto, incluso el valor pronóstico en el análisis univariado es débil. Por tanto, no parece que la determinación de la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu tenga valor pronóstico real para las pacientes con ganglios axilares negativos²³².

Un importante problema es la metodología usada, ya que tanto el tipo de anticuerpo usado, como el sistema de definir la positividad del HER-2/neu son muy variables entre los diferentes estudios,

Estudios recientes han barajado la posibilidad de que el oncogén HER-2/neu fuera un factor predictivo frente a la respuesta al tratamiento complementario o que se asociara con la resistencia a ciertos fármacos. Esta podría ser la razón por la que actuara como factor pronóstico más claro en poblaciones con ganglios axilares positivos que reciben tratamiento complementario con quimio u hormonoterapia. También en estos casos los resultados son de difícil interpretación, ya que se ha reportado tanto una mejor supervivencia para las pacientes sin sobreexpresión que reciben tratamiento con CMF^{207, 208}, como una mejor respuesta en pacientes con positividad para el HER-2/neu que reciben tratamiento con CAF adyuvante²³³. No queda claro si estas aparentes discrepancias se deben a las diferencias entre los tipos de quimioterapia, las dosis usadas o a aberraciones estadísticas.

Varios estudios sugieren que la presencia de expresión de este gen confiere resistencia al tratamiento con determinados citostáticos o con tamoxifeno²³⁴, así, Climent⁵⁹, en una serie de pacientes con ganglios positivos, halla un peor pronóstico para las pacientes RE positivos que expresan HER-2/neu cuando reciben tratamiento complementario con tamoxifeno, en comparación con el grupo de pacientes RE positivos HER-2/neu negativos con el mismo tratamiento.

Varias líneas de investigación han sugerido que la proteína HER-2/neu, en el fondo un receptor celular, es una diana óptima para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos, entre estos se incluye el anticuerpo monoclonal rhuMAb-HER2, que inhibe el crecimiento de líneas celulares que sobreexpresan HER-2/neu. Un estudio fase II de tratamiento con este anticuerpo en pacientes metastásicas multitratadas ha demostrado una tasa de respuestas objetivas del 11,6%²³⁵. Actualmente están en curso varios ensayos clínicos fase III con quimioterapia convencional ± rhuMAb HER2 en pacientes con cáncer metastásico sin tratamiento previo que sobreexpresen HER-2/neu.

1.5.6.2. - RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una glicoproteína transmembrana de 170 kd, codificada por un gen que se localiza en la banda q21 del cromosoma 7. El EGFR se ha identificado mediante varios métodos, básicamente por inmunohistoquímica y enzimoimmunoanálisis; normalmente está presente con bajos niveles en el epitelio mamario normal, pero está sobreexpresado en el 35-60% de los tumores primarios de mama. Prácticamente todos los estudios han demostrado una relación negativa entre el EGFR y los receptores esteroideos, también son habituales la relación con un grado alto y con índices de proliferación elevados. Solo pocos estudios han hallado

correlación con la edad, el estado menopáusico, el tipo histológico, el tamaño tumoral, o el estado de los ganglios axilares. Varios estudios sugieren una relación con la sobreexpresión del p53 y con los factores de angiogenesis⁵⁶.

El valor pronóstico de EGFR es controvertido; Fox²³⁶ ha revisado los resultados de varios estudios, con más de 3000 pacientes en global, aunque varias publicaciones son meramente actualizaciones de una misma serie^{194, 227}. La mayoría de estos estudios muestran una relación significativa entre el EGFR y la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global en el análisis univariado, sin embargo en los estudios con largo seguimiento, la separación inicial de las curvas tienden a disminuir con el tiempo; en pocos estudios se realiza un análisis multivariado. Otra variable que aumenta la confusión es el tratamiento adyuvante que muchas pacientes han recibido.

En resumen, el EGFR es probablemente un factor pronóstico importante en el cáncer primario de mama, pero la falta de estandarización de la metodología de su determinación, el escaso número de pacientes y el corto seguimiento en muchos de los estudios, y la falta de estudios multivariados hacen imposible establecer conclusiones firmes sobre su valor.

Por otra parte, el papel de EGFR como factor predictivo de respuesta al tratamiento hormonal está mejor definido. Varios grupos han mostrado claramente que los tumores que expresan EGFR son más resistentes al tratamiento hormonal²³⁷. Como en el caso del HER-2/neu, el EGFR está siendo usado como diana terapéutica mediante anticuerpos monoclonales específicos²³⁸.

1.5.6.3. - BCL-2

El protooncogén Bcl-2, descubierto inicialmente en los linfomas no hodgkinianos foliculares, está relacionado con el control de la apoptosis. El producto de este gen se puede detectar por inmunohistoquímica en muchos tipos de tejidos humanos normales, incluyendo el epitelio glandular mamario, así como en muchos tipos de tumores humanos, incluyendo el cáncer de mama²³⁹.

La positividad para Bcl-2 en los carcinomas mamarios se asocia habitualmente con tumores de bajo grado, índice de proliferación bajo, con receptores hormonales positivos y sin sobreexpresión de p53²⁴⁰.

Varios estudios han analizado el valor pronóstico de la baja expresión de la proteína Bcl-2, tanto en ganglios positivos como en ganglios negativos²³⁹⁻²⁴³. Aunque frecuentemente muestra valor en el análisis univariado, este invariablemente desaparece en el análisis multivariado, normalmente desplazado por la expresión de la p53.

1.5.6.4. - p53

El gen p53 abarca de 16 a 20 kb de DNA celular, situado en el brazo corto del cromosoma 17. Este gen codifica una fosfoproteína de 393 aminoácidos implicada en la regulación de la proliferación celular.

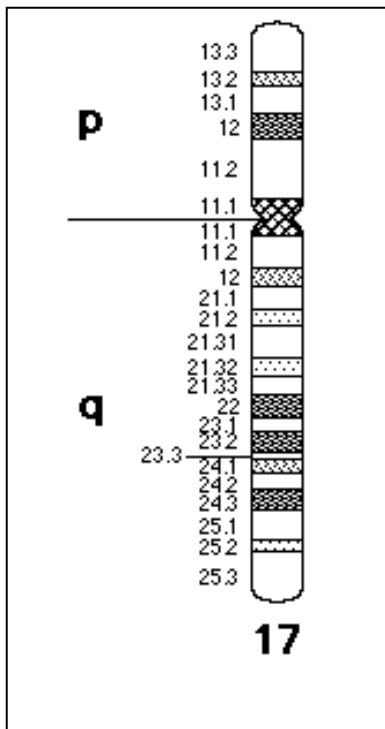
La importante investigación biomédica sobre el gen p53 de los últimos años sugiere que la pérdida de la función normal del p53 se asocia con la transformación celular *in vitro* y con el desarrollo de neoplasias *in vivo*. Las alteraciones del gen p53 o de su proteína son los cambios más frecuentes identificados en los tumores malignos humanos²⁴⁴.

Desde su modesta entrada en el mundo científico en 1979, el p53 ha alcanzado la situación de gen relacionado con el cáncer más importante, y

su estudio se ha convertido en uno de los campos más activos en la investigación del cáncer, consiguiendo, en 1993, el honor de ser nombrada la “molécula del año” por la revista *Science*²⁴⁵.

Además del increíble progreso en la biología molecular del gen p53, los abundantes datos de investigación clínica sugieren que los cambios en el gen o su proteína podrían usarse en la Oncología clínica para el diagnóstico precoz, la evaluación pronóstica, la planificación del tratamiento, y para valorar la respuesta al tratamiento²⁴⁶.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL GEN P53.



El gen p53 abarca de 16 a 20 kb de DNA en el brazo corto del cromosoma 17, en la posición 17p13.1 (figura 1.3). Este gen se compone de 11 exones, el primero de los cuales es no codificante y se localiza a una distancia de 8 a 11 kb de los exones 2 a 11. En la comparación inter-especies, la proteína p53 muestra 5 exones altamente conservados (en más de un 90%), por lo que se considera que estos dominios conservados en la evolución son esenciales en la función del p53²⁴⁶.

Figura 1.3: Cromosoma 17.

El producto del gen p53 es una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos de un peso molecular aproximado de 53 kd (*figura 1.4*).

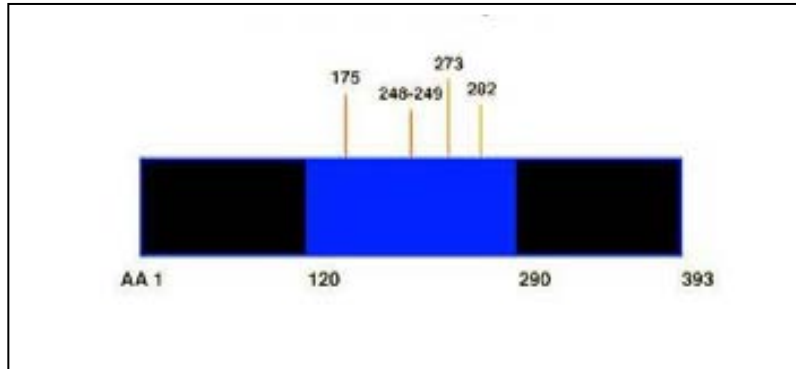


Figura 1.4: Proteína p53

Esta proteína se identificó en 1979²⁴⁷ porque formaba un complejo con el Ag-T del SV40 (antígeno tumoral grande del simio 40). Se determinó que la proteína p53 era de origen celular y que se encontraba en muy baja cantidad en las células normales, pero que se podían detectar cantidades mayores (de 5 a 100 veces) en las células transformadas de cultivo, así como en tumores humanos²⁴⁶. Las primeras investigaciones parecieron confirmar que p53 era un oncogén dominante, como c-myc, y que contribuía a la tumorigénesis cuando se expresaba, al proporcionar un estímulo al crecimiento celular²⁴⁸.

Este paradigma de la función de p53 cambió radicalmente cuando se descubrió que los clones de p53 que se usaron para muchos de los estudios anteriores codificaban versiones mutadas de la proteína p53. De hecho, la proteína p53 salvaje (no mutada) fue capaz de suprimir el fenotipo tumorigénico²⁴⁹. La caracterización genética de tejidos tumorales demostró que la mutación del gen p53 (con la pérdida de heterocigosidad concomitante en el locus 17p13 que codifica el otro alelo de p53) es la alteración genética más frecuente en el cáncer humano^{244,250}. El papel potencialmente importante de la disfunción de p53 en la tumorigénesis

humana fue apoyado también por la demostración de la transmisión de la línea germinal de alelos de p53 mutantes en pacientes con el síndrome de predisposición al cáncer de Li-Fraumeni^{251, 252}. Así, se demostró que, en lugar de ser producto de un oncogén, p53 era miembro de una nueva clase de proteínas, la de los productos de genes supresores de tumores. Las investigaciones se centraron rápidamente en intentar comprender el mecanismo molecular por el que p53 ejercía su efecto supresor de tumores en las células.

Pese a que no están firmemente establecidos, los mecanismos por los que actúa p53 incluyen la regulación de la transición de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular y un papel importante en la determinación de la muerte celular por apoptosis²⁵³⁻²⁵⁵. Estas funciones reguladoras parecen estar mediadas por las interacciones de la proteína p53 con secuencias específicas del DNA, que puede permitir la regulación de otros genes al nivel de transcripción, o tal vez por iniciación de la replicación de DNA²⁵⁶.

En la presencia de daño al DNA, se aumentan los niveles de la proteína p53 y se dispara la cascada genética de los genes WAF1/Cip 1, cuyo producto es una proteína, la p21, que se une a las quinasas ciclin-dependientes e inhibe su actividad. De esta manera el ciclo celular se detiene antes de la síntesis de DNA y se da a la célula la oportunidad de reparar el DNA dañado. Si esta reparación no ocurre con éxito, la presencia de p53 normal puede alternativamente inducir la muerte celular programada (apoptosis)²⁴⁶. Este conjunto de funciones protectoras del daño al DNA es el que ha otorgado al gen p53 el calificativo de “guardián del genoma”²⁵³.

Sin embargo, estos procesos no ocurren en las células tumorales, en que el gen p53 está ausente o está inactivado por mutación o por unión a oncoproteínas virales. Existe una evidencia considerable que implica a la disfunción de p53 en el paso de una función celular normal a la tumorigénesis. La alteración del gen p53 en un porcentaje alto de tumores sugiere la importancia de la incapacitación de las vías dependientes de p53

para conseguir la transformación celular. Los trastornos de la función de p53 pueden contribuir al desarrollo de un fenotipo transformado en dos maneras²⁵⁷: 1) en tipos celulares en que p53 media la detención en G₁ tras el daño al DNA, la pérdida de la función de p53 y la subsiguiente pérdida de la detención en G₁ resultan en la replicación de un patrón de DNA dañado y posiblemente en el desarrollo de cambios genéticos hereditarios en las células hijas. ; y 2) la pérdida de la función de p53 y del desarrollo de las señales que llevan a la apoptosis tras el daño al DNA conduce a la supervivencia de células en situaciones fisiológicamente inapropiadas. Esta última situación puede ser particularmente negativa, ya que la célula sobrevive a pesar del daño en su DNA. Puesto que la célula con p53 mutante tampoco tendría la señal de detención en G₁, está sobreviviendo al daño y está todavía replicando un patrón dañado. Por lo tanto, estos dos mecanismos pueden, de hecho, trabajar en común para contribuir a la inestabilidad genética del tejido humano tras el daño al DNA.

ALTERACIONES DEL GEN p53 EN LAS NEOPLASIAS HUMANAS.

La pérdida de la función normal de p53 se puede alcanzar por varios mecanismos^{244, 258,259}.

- 1) Cambios genéticos en el gen p53, como las mutaciones en la línea germinal, mutaciones somáticas, deleciones y reestructuraciones genómicas. El cambio en el gen p53 más habitual en las neoplasias malignas humanas es la mutación puntual, que da lugar a una proteína alterada. Las mutaciones del gen p53 se encuentran en todos los grupos histogénicos; aproximadamente la mitad de los cánceres de colon, estómago, pulmón, esófago, hígado, mama, sistema reticuloendotelial y tejidos hematopoyéticos contienen mutaciones del gen p53. Más del 90% de las mutaciones presentes en tumores malignos humanos se acumulan entre los exones 5 y 8; en estas regiones, conservadas en la evolución, se han identificado al
-

menos 4 puntos frecuentes de mutación en los aminoácidos 175, 248, 273 y 282. El codón 248 es también un punto habitual de mutación en células germinales²⁶⁰.

- 2) Formación de complejos con oncoproteínas virales²⁶¹, demostrada con el SV40, el virus de la hepatitis B y el Epstein-Barr-Virus entre otros.
- 3) Una tercera vía es la amplificación del gen p53 vía MDM2, con sobreproducción de la proteína, inactivando la función normal de p53²⁶². Esta vía se ha demostrado en los sarcomas humanos²⁶³.
- 4) El cuarto mecanismo es la localización anómala de la proteína p53 en los compartimentos celulares. En algunos cánceres de mama, la proteína es secuestrada en el citoplasma, siendo incapaz de pasar al núcleo donde debe realizar su función reguladora²⁴⁶.

Estos datos confirman la idea de que p53 es una diana celular habitual en la carcinogénesis humana, mediada por factores endógenos y carcinógenos exógenos, así como por varios virus tumorales.

La sensibilidad para detectar las mutaciones de gen p53 varía mucho según sea el método empleado, éstos incluyen la secuenciación del DNA (normalmente por amplificación mediante PCR –*polimerase chain reaction*)²⁶⁴, el análisis del DNA por SSCP (*single-strand conformation polymorphism*)²⁶⁵, y midiendo la acumulación o sobreexpresión de la proteína mutante, estabilizada y no funcional mediante inmunohistoquímica²⁶⁶. Los análisis serológicos para detectar alteraciones de p53 están todavía en su infancia²⁶⁷.

Los métodos de análisis genético (secuenciación y amplificación) permiten la identificación de las mutaciones del gen p53 con una alta sensibilidad (*figura 1.5*). Pero son muy laboriosas y difícilmente aplicables a la rutina diagnóstica²⁴⁶.

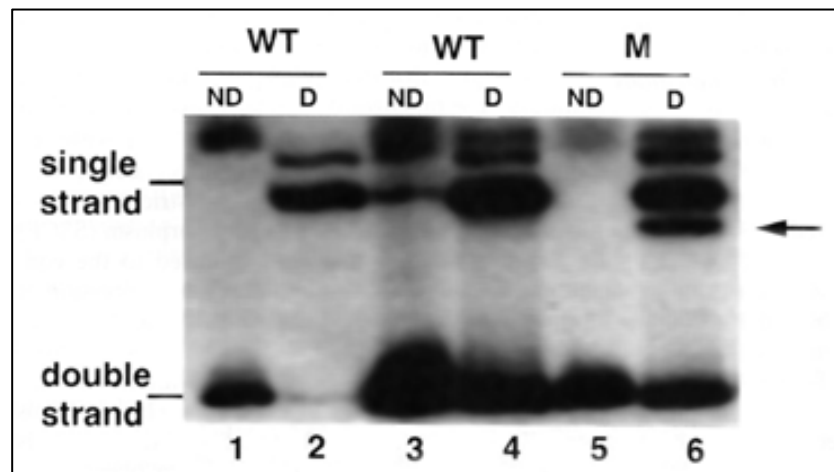


Figura 1.5: Ejemplo de PCR-SSCP de DNA tumoral para los exones 8 y 9 del gen p53 bajo condición desnaturizantes (D) y no desnaturizantes (ND). Las bandas 1 a 4 muestran los patrones migratorios de la proteína salvaje en dos cánceres de mama. Las bandas 5 y 6 son de un cáncer de mama con una mutación en la p53 que se manifiesta como patrón migratorio aberrante (una banda extra) vista en condición desnaturizante (flecha).

Desde el punto de vista clínico, la inmunohistoquímica parece ser el método más útil y práctico para determinar las alteraciones de p53 en las lesiones premalignas y malignas humana. Esta técnica permite localizar e identificar las células que exhiben alteraciones de la proteína p53, sin embargo no puede detectar la pérdida completa del gen p53 o las mutaciones *nonsense* que introducen codones de parada prematuros; de todas maneras, como se ha discutido antes, las mutaciones puntuales no son el único mecanismo por el que la proteína p53 puede estabilizarse. El tratamiento de las células con agentes que dañen el DNA también aumenta la estabilidad y el nivel de la

proteína p53. Por tanto, los resultados positivos en la inmunohistoquímica de la proteína p53 deben interpretarse con cuidado.

p53 EN CÁNCER DE MAMA.

Como en otros muchos tumores humanos, el cáncer de mama presenta una alta tasa de mutaciones en el gen p53. Las regiones mutadas son, en general, las mismas que para el conjunto de neoplasias humanas (*figura 1.6*).

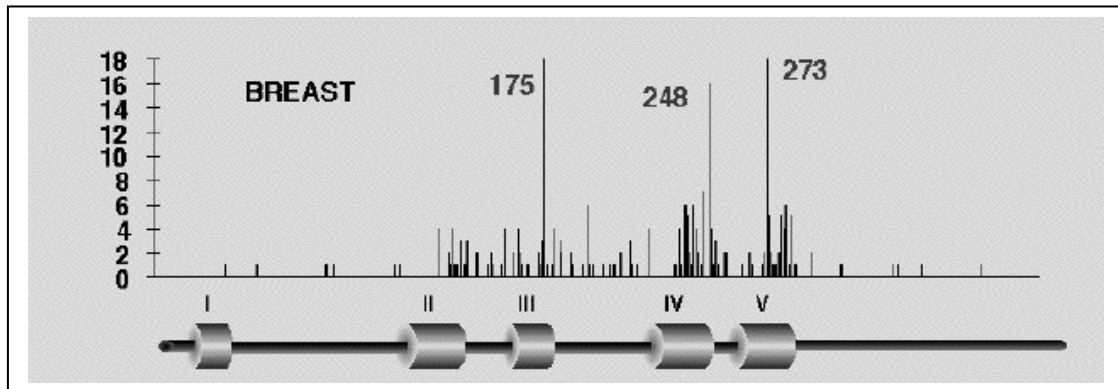


Figura 1.6: Regiones del gen p53 más frecuentemente mutadas en El cáncer de mama.

En una revisión de Allred²⁶⁸, la tasa de mutaciones de p53 en el cáncer de mama primario se cifra en un 34% (14-42%) cuando se determina por SSCP y del 27% (15-50%) cuando la determinación es por inmunohistoquímica en material parafinado. La determinación por inmunohistoquímica en tejido congelado da unas tasas de mutación sensiblemente más altas que en material de archivo, sugiriendo una mayor sensibilidad. En el carcinoma intraductal, las tasas de positividad rondan el 15-20%^{269,270}. Las amplias diferencias observadas entre los múltiples estudios son fácilmente explicables por las importantes diferencias en anticuerpos, métodos de tinción, preparación de las muestras y otros factores técnicos empleados²⁷¹, tanto en un método como en otro, lo que hace necesario una futura

estandarización dado el importante papel que la determinación de las alteraciones de p53 jugará probablemente en la oncología clínica.

Hay una importante controversia en cuanto a la especificidad de la Inmunohistoquímica, nacida de los estudios en que se compara esta técnica con las de análisis genético en las mismas muestras²⁷²⁻²⁷³. Habitualmente la tasa de mutaciones por análisis genético es más baja, hallando un mínimo porcentaje de tumores que son negativos por inmunohistoquímica y positivos por análisis genético, que corresponden probablemente a las deleciones que no se traducen en una proteína anómala²⁷⁴, y un porcentaje más importante de tumores positivos por inmunohistoquímica y negativos por análisis genético. En esta situación es más difícil explicar la discordancia; en la mayoría de los casos la tinción positiva es de menor intensidad y en un porcentaje mucho menor de células que en los casos en que ambas técnicas concuerdan, por lo que se puede suponer que las tinciones débiles corresponden a falsos positivos verdaderos. La confirmación de ésta hipótesis viene dada por el análisis de las características proliferativas y de evolución clínica de estos casos, muy similares a la de los casos negativos por ambos métodos en cuanto a la ploidía y fase S y a la supervivencia libre de enfermedad y global^{275, 276}. Aunque esta hipótesis no es concluyente, parece demostrado que la inmunohistoquímica mide correctamente la acumulación de proteína p53 mutada o no funcionante y estabilizada.

p53 Y PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA

Dado el importante lugar que ocupa el gen p53 en el cáncer de mama, y el momento histórico en que hizo su aparición en la investigación oncológica, pronto aparecieron estudios en que se analizaba su relación con los diferentes factores pronósticos conocidos²⁶⁶, y su propio papel como factor pronóstico en esta neoplasia, especialmente en el grupo de las pacientes con ganglios axilares negativos²⁷⁷.

La sobreexpresión de p53 es relativamente independiente del estado menopáusico^{278, 279}, aunque varios autores han hallado una relación importante con la edad muy joven (menor de 35 años)^{79,275,280}. Pese a que cabría esperar una expresión mayor en tumores más agresivos al diagnóstico, no parece que haya una relación significativa con la afectación de los ganglios axilares²⁸¹⁻²⁸³ y la relación con el tamaño tumoral es débil^{276, 280}. La correlación con el mayor grado histológico^{220,266,276,277,284,285}, la negatividad de los receptores hormonales^{220,266,276,277,280,281,285}, la aneuploidía^{280,286}, la fase S^{275,276,286,287} o ³HLI²⁶⁵ elevados y la positividad para Ki67¹⁶⁰ es importante y constante prácticamente en todos los estudios. En cuanto a la presencia de mutaciones para el HER-2/neu, la mayoría de los autores hallan una relación estadísticamente significativa entre la positividad para ambos genes^{220, 221,276,282}.

Desde 1992 se han publicado múltiples estudios analizando el papel de las alteraciones de p53 como factor pronóstico en el cáncer de mama, muchos de ellos en pacientes con ganglios axilares negativos. La revisión de los que poseen mayor poder estadístico (mayor número de enfermos, mayor seguimiento)^{232,239,243,275-280,282-284,286,288-290} muestra que en la mayoría de ellos se demuestra que la p53 es un factor pronóstico importante e independiente. Incluso al introducir factores pronósticos de proliferación (como la fase S) la p53 mantiene habitualmente su valor independiente en el estudio multivariado^{275, 279}. Estos hallazgos sugieren que, a pesar de la intensa correlación entre la acumulación de p53 mutante y los biomarcadores de proliferación, el gen p53 tiene otras funciones biológicas además de las de regulación del ciclo celular⁵⁶.

Al menos 13 anticuerpos monoclonales distintos, inducidos por la proteína p53, están disponibles para la investigación. El análisis comparativo entre ellos, muestra una tasa de positividad que varía del 18 al 45%, entre los diferentes anticuerpos el Pab1801 y el Pab240 son los que producen una

mayor tasa de positividad y los que mejor se correlacionan con la evolución clínica de las pacientes^{291, 292}.

La asociación entre la determinación de la proteína p53 por inmunohistoquímica y el pronóstico en las enfermas con cáncer de mama es impactante y es tentador añadir la p53 a la lista de biomarcadores que se deben determinar rutinariamente en las pacientes para decidir las opciones terapéuticas. Sin embargo, todavía hay mucho que aprender sobre la función de p53 y de sus interacciones con otros genes y sus productos. Deben desarrollarse métodos estandarizados y de control de calidad antes de introducir la determinación de la p53 en la práctica médica habitual.

1.5.6.5. - GEN DEL RETINOBLASTOMA.

El primer gen supresor que fue clonado es el gen del retinoblastoma (Rb), que codifica una fosfoproteína nuclear de 105 kd. Se sabe que en los pacientes con retinoblastoma familiar un alelo de este gen está mutado en sus células somáticas, en los retinoblastomas de estos pacientes el segundo alelo está también inactivado por delección o mutación. El gen Rb es un prototipo de gen supresor tumoral que controla el ciclo celular en la fase G₁, la proteína Rb es cíclicamente fosforilada y desfosforilada durante el ciclo celular, jugando un papel regulador importante.

Pese a que no hay una mayor incidencia de las neoplasias de mama en las familias con retinoblastoma hereditario, se han hallado cambios estructurales en el gen Rb en un 10-25% de las líneas celulares de cáncer de mama o de tumores primarios de mama²⁹³.

Escasos estudios han investigado la expresión y el hipotético valor pronóstico de la proteína Rb mediante inmunohistoquímica en el cáncer de mama. Los hallazgos muestran que la proteína se expresa en un altísimo

porcentaje de las células neoplásicas. La expresión anormal es la baja expresión, que se asocia con la ploidia, la fase S, el grado y la negatividad de la p53. No parece tener valor pronóstico independiente^{294, 295}.

1.5.6.6. - NM23.

El gen nm23 fue originalmente identificado en librerías de c-DNA de líneas celulares de melanoma con diverso potencial metastásico. Se ha propuesto que el gen nm23 tendría la función de gen supresor para las metástasis. Varios estudios han encontrado una relación significativa entre la expresión del nm23 y una supervivencia libre de enfermedad y global más elevada en pacientes con cáncer de mama primario, sin embargo, ninguno de estos estudios incluían un análisis multivariado^{296, 297}.

1.5.7. – ANGIOGENESIS TUMORAL

Una evidencia experimental importante indica que el crecimiento tumoral depende de la inducción de nuevos vasos sanguíneos o angiogenesis. Después de que un nuevo tumor ha crecido unos milímetros, el posterior crecimiento de la población celular tumoral requiere una neovascularización. Aunque las células endoteliales están activamente proliferando dentro del tumor, la densidad de microvasos intratumoral y la proliferación endotelial son independientes entre sí y también de la proliferación celular tumoral⁵⁶. Varios investigadores han propuesto que contar la formación de microvasos en los tumores podría ofrecer información pronóstica para predecir la recurrencia a distancia. La neovascularización asociada a los tumores se ha determinado por diferentes métodos, incluyendo el marcaje inmunohistoquímico con un anticuerpo policlonal contra antígenos relacionados con el factor VIII o, más específicamente, con un anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula de adhesión CD31. Se

están evaluando actualmente anticuerpos más específicos como el E-9 o el TEC-11²⁹⁸.

Tras el artículo pionero de Weidner²⁹⁹, aparecido en 1991, se han publicado una veintena de estudios retrospectivos correlacionando el conteo de microvasos y el pronóstico en el cáncer de mama primario. La mayoría de los autores confirman una significativa asociación entre la neovascularización y la afectación ganglionar axilar. Gran parte de los estudios hallan que la angiogenesis es un factor pronóstico significativo independiente para la supervivencia libre de enfermedad y para la supervivencia^{288, 300-304}. Sin embargo, parte de los últimos estudios publicados no encuentran esta asociación^{305, 306}, lo que ha llevado a una, probablemente prematura, descalificación por parte de la comunidad de patólogos norteamericanos³⁰⁷.

En resumen, a pesar de que no se ha hallado el método óptimo para determinar la actividad angiogénica en la patología humana, la mayoría de los estudios clínicos han confirmado los hallazgos experimentales, que asocian la elevada neovascularización con la agresividad biológica del tumor. La angiogenesis tumoral es particularmente de interés como posible factor pronóstico dado que parece ser un marcador de la invasión, más que de la diferenciación o de la proliferación, como son la mayoría de los factores pronósticos actualmente disponibles⁵⁶.

1.6. MODELOS DE FACTORES PRONÓSTICOS.

El número y la diversidad de los potenciales factores pronósticos dificultan la labor de sintetizarlos e integrarlos. Los modelos de integración incluyen la escala simple de suma de puntuación para cada factor adverso (como en el caso del grado histológico), las ecuaciones de regresión

múltiple, normalmente derivadas de los modelos de Cox (por ejemplo el índice pronóstico de Nottingham), y los árboles de decisión (como el que da lugar a la clasificación pronóstica de St. Gallen). Por sofisticado que pueda ser el modelo, su validez vendrá dada por la calidad de los datos con que se ha construido y validado⁵⁶.

La mayor parte de la información de la que disponemos se basa en estudios retrospectivos que incluyen relativamente pocos nuevos factores. Algunos de estos estudios cuentan con un gran número de pacientes, pero lo mayor parte tienen pequeño o modesto tamaño de muestra con un seguimiento relativamente corto. Los estudios en cáncer de mama con ganglios negativos, en que aproximadamente un 30% de las pacientes van a recurrir, precisan de un alto número de pacientes y de un seguimiento muy prolongado. Cada estudio tiene sus particulares sesgos y en la mayoría de ellos deben tomarse precauciones en su interpretación. De particular importancia es la falta de estudio multivariado en la evaluación de los potenciales factores pronósticos. Muchos de estos factores están relacionados entre sí, y pueden reflejar diferentes manifestaciones del mismo fenómeno biológico; sin ajustar estadísticamente estas correlaciones los resultados del estudio univariado pueden llevar a conclusiones erróneas. La pregunta debe ser siempre si el nuevo factor pronóstico puede añadir alguna información a lo que se puede obtener de los factores pronósticos clásicos.

Por una parte, la investigación en los nuevos factores pronósticos puede parecer descorazonadora. A pesar de la plétora de potenciales factores pronósticos, la lista de factores establecidos es corta y no ha variado apreciablemente en la última década. Por otra parte, muchos de estos estudios han contribuido a dar luz en el complejo sistema molecular que regula el cáncer de mama humano. En estos momentos empezamos a experimentar en el uso de nuevas terapéuticas que han sido posibles como producto colateral de la investigación en los biomarcadores.

El reto del futuro no es solo determinar que pacientes deben recibir tratamiento complementario, sino, con más importancia, que tratamiento específico es el óptimo para una determinada paciente.

2.- Objetivos.

En un grupo de pacientes con cáncer de mama, sin afectación ganglionar axilar, sin tratamiento sistémico complementario y con seguimiento homogéneo se estudiará:

1. - La ploidía tumoral y la fase S por técnicas de citometría de flujo.
 2. - El porcentaje de tumores que presentan expresión de la proteína producto del oncogén HER-2/neu.
 3. - El porcentaje de tumores que presentan expresión de la proteína producida por el gen p53.
 4. - Las relaciones y asociaciones de la expresión de las proteínas de los genes HER-2/neu y p53 y los factores determinados por citometría de flujo, entre sí y con los factores clinico-patológicos clásicos.
 5. - El valor pronóstico individual de los factores pronósticos más conocidos, clínicos y patológicos.
 6. - El valor pronóstico de la expresión de la proteína HER-2/neu, proteína p53, ploidía y fase S.
 7. - La comparación del valor pronóstico de estos factores con los factores clínicos e histopatológicos clásicos mediante el análisis multivariado.
 8. - Las variaciones temporales de los diferentes factores pronósticos.
-

3.- Pacientes y métodos.

3.1. - POBLACIÓN SOMETIDA A ESTUDIO.

Se consideraron para el estudio todas aquellas pacientes diagnosticadas y tratadas por cáncer infiltrante de mama en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, y con estudio anatomopatológico realizado en el hospital, entre los años 1976 y 1986, ambos incluidos. El estudio incluyó solo a las pacientes en cuya pieza histológica no hubiera afectación ganglionar axilar, con un mínimo de 5 ganglios estudiados, que no hubieran recibido tratamiento sistémico postoperatorio de ningún tipo y que tuvieran un seguimiento clínico superior a 3 años.

De las 280 pacientes que habían cumplido los criterios clínicos de inclusión no fue posible localizar las preparaciones histológicas ni los bloques de parafina en tres casos, por lo que fueron excluidas del estudio; en dos casos el seguimiento clínico, estando vivas y libres de enfermedad, era inferior a 2 años, siendo también excluidas del estudio inicial. Otras cuatro pacientes fueron excluidas posteriormente, al efectuar el estudio histológico, una por carecer de tumor (adenosis esclerosante), dos por ser un carcinoma intraductal, sin evidencia de microinfiltración, y una por presentar invasión tumoral microscópica de un ganglio, descubierta durante la revisión patológica.

Una vez seleccionada la población se pasó al desarrollo de la investigación. La información clínica se obtuvo de revisiones sucesivas de las historias clínicas. La información patológica se obtuvo mediante una revisión exhaustiva de las preparaciones histológicas. Tras seleccionar uno o varios bloques de parafina que fueran representativos de tumor, se realizó la citometría de flujo y la determinación de las proteínas HER-2/neu y p53. Cada una de las líneas de estudio se desarrolló de forma coordinada pero paralela, sin que los diferentes investigadores conocieran los resultados de las otras líneas. A medida que se obtenía la información, esta era codificada

y almacenada en una base de datos informática, no siendo analizada hasta que se efectuó el análisis estadístico final.

3.2. - DATOS CLÍNICOS Y SEGUIMIENTO.

Una vez seleccionados los 271 casos se efectuó una primera revisión de las historias clínicas, recogiendo todas las características en el momento del diagnóstico, así como aquellos sucesos (recaída, muerte) que habían ocurrido hasta aquel momento. Posteriormente se realizaron sucesivas revisiones, en las que se amplió la información de base, actualizando el seguimiento de todas las pacientes. La última revisión se efectuó en Junio de 1998.

En las pacientes cuyos datos clínicos no fueron completos mediante la revisión de las historias clínicas, se intentó conocer su situación clínica mediante llamadas telefónicas directas o consultas con sus respectivos médicos en otros centros hospitalarios. Sólo en aquellos casos en que la información fue fiable se actualizaron los datos.

Las características clínicas de las pacientes registradas fueron:

- **Edad de la paciente** en el momento del diagnóstico.

 - **Estado menstrual**, según la clasificación siguiente¹⁴³:
 - premenopáusica, cuando al diagnóstico estaba menstruando activamente o cuando había pasado menos de 1 año de la menopausia espontánea.
 - premenopáusica, cuando habían pasado de 1 a 5 años desde la menopausia espontánea o de una ooforectomía.
 - postmenopáusica, cuando habían pasado más de 5 años desde la menopausia espontánea o de una ooforectomía.
-

- **Localización del tumor**, entre las siguientes posibilidades:
 - cuadrante supereoexterno
 - cuadrante inferoexterno
 - cuadrante superointerno
 - cuadrante inferointerno
 - unión de cuadrantes externos
 - unión de cuadrantes internos
 - unión de cuadrantes superiores
 - unión de cuadrantes inferiores
 - retroareolar
 - desconocido

- **Tipo de cirugía realizado**, dada la extensión a lo largo del tiempo que incluye el estudio, las posibilidades de tratamiento quirúrgico incluyen las siguientes:
 - mastectomía radical tipo Halsted
 - mastectomía radical modificada
 - mastectomía simple
 - tumorectomía con vaciamiento ganglionar (tratamiento conservador)

- **Tratamiento con radioterapia complementaria**, en los casos en que se realizó y que podía incluir:
 - solo pared torácica
 - pared torácica y áreas ganglionares
 - tratamiento complementario en caso de cirugía conservadora.

Para el seguimiento de las pacientes se utilizó la fecha de cirugía como fecha base a la que referir los intervalos de supervivencia. Se recopilaron los siguientes datos para la creación de intervalos sobre los que realizar el estudio:

- **recurrencia y fecha de recurrencia**, para obtener el intervalo libre de enfermedad
- **estado de último control y fecha del último control**, para obtener la supervivencia global y la específica por cáncer de mama
- **recidiva local**, como primera manifestación de enfermedad recurrente, y **fecha de recidiva local** para el estudio de factores pronósticos en la recidiva local
- **primera metástasis**, sea o no la primera manifestación de enfermedad recurrente, **su localización y fecha de primera metástasis**, para obtener la supervivencia libre de enfermedad a distancia
- **segunda neoplasia y fecha de segunda neoplasia**

3.3. - DATOS HISTOPATOLÓGICOS.

En primer lugar se revisaron los informes anatomopatológicos de las 271 pacientes incluidas, de los que se obtuvo los datos macroscópicos como el tamaño del tumor y el número de ganglios disecados en la pieza quirúrgica.

Se estudiaron de nuevo, por personal cualificado y especialista, las preparaciones histológicas de las pacientes recuperando el material del archivo del Departamento de Anatomía Patológica. En los casos en que las preparaciones presentaban una calidad deficiente, se volvió a obtener cortes de 4-6 micras de los bloques de parafina seleccionados, que se tiñeron con hematoxilina-eosina, sin efectuar otras técnicas. El material utilizado estaba fijado en formol al 10%.

Los parámetros histológicos convencionales, de interés pronóstico, analizados fueron:

- **Tipo histológico**: se aplicaron los criterios expuestos en la Segunda edición de la Clasificación Histológica de los Tumores de Mama, editada por la Organización Mundial de la Salud³⁰⁸.
-

- **Tamaño patológico:** Se recogió el tamaño tumoral patológico (máximo diámetro) en milímetros, y luego se clasificó según la clasificación TNM.

 - **Número de ganglios disecados** en la pieza de vaciamiento ganglionar.

 - **Grado histológico:** Se siguió el método semicuantitativo propuesto por Scarff-Bloom-Richardson y modificado por Elston y Ellis. Para ello se tuvieron en cuenta tres parámetros morfológicos y a cada uno se le asignó una puntuación:
 - *Formación de tubulos:* Se revisaron todas las preparaciones del tumor y se evaluaron las zonas que formaban estructuras glandulares (tubulares o papilares). Debían ser visibles las luces, procurando tener en cuenta los artefactos de fijación. Cuando más del 75% del tumor formaba túbulos se asignó 1 punto, a aquellos entre el 10 y el 75% se les asignó 2 puntos, y a los que tenían menos del 10%, 3 puntos.
 - *Pleomorfismo nuclear:* Cuando el núcleo era pequeño, con poca variabilidad de tamaño y ligeramente superior al de las células epiteliales ductales normales, límites bien definidos y cromatina homogénea, se le asignó 1 punto. Dos puntos cuando su tamaño era mayor que el de las células normales, con núcleo vesicular abierto y moderada variabilidad en cuanto al tamaño y la forma. Si el núcleo era vesicular con el nucleolo prominente, en ocasiones múltiples nucleolos, marcada variabilidad de tamaño y forma especialmente grande y grotesca, se otorgaron 3 puntos.
 - *Índice mitótico:* El índice mitótico se define como el número total de figuras de mitosis en 10 campos de gran aumento en las zonas más celulares. En general, se valoraron en la periferia del tumor, que es la zona más activa de crecimiento. Sólo se consideraron mitosis aquellas que claramente estaban en metafase, anafase o
-

telofase, excluyendo los núcleos hipercromáticos o apoptoicos. La valoración fue hecha con un microscopio Olympus a 400 aumentos. Una o menos mitosis por campo se valoró como 1 punto; de 1 a 2 mitosis por campo, 2 puntos; tres o más mitosis como tres puntos.

El grado global se obtuvo sumando los puntos obtenidos en la valoración de los distintos parámetros referidos de la manera siguiente:

- 3 a 5 puntos: grado 1 o bien diferenciado.
- 6 y 7 puntos: grado 2 o moderadamente diferenciado.
- 8 y 9 puntos: grado 3 o mal diferenciado.

Teniendo en cuenta que este método, al igual que otros utilizados ampliamente en la literatura, tiene un gran componente subjetivo, aproximadamente un 10% de los casos fueron revisados por otro patólogo experto y un 5% vueltos a revisar al azar. En los casos en los que no había acuerdo se realizó una valoración consensuada.

Las *figuras 3.1 y 3.2* muestran ejemplos de tumores con grado 1 y grado 3

– **Invasión vascular venosa:** Se valoró la presencia de invasión vascular en la periferia del tumor y en el estroma circundante. Sólo se consideró como válidos aquellos casos en los que se observaba la presencia de células tumorales en la luz de conductos que poseían también hematíes, coágulos de fibrina, y/o endotelio en su superficie interior, siempre que no hubiera desmoplasia en torno a la supuesta luz vascular, para excluir así los posibles nidos de células tumorales con artefacto de retracción.

– **Invasión vascular linfática:** Investigada también en la periferia del tumor o en el estroma circundante, se interpretó que existía invasión linfática únicamente si se observaban agregados de células tumorales en espacios rodeados por un endotelio claramente identificable, sin

eritrocitos en su interior y sin desmoplasia a su alrededor. Tanto en este caso como en el anterior no se utilizaron técnicas especiales para detectar endotelio.

La *figura 3.3* muestra un ejemplo de invasión linfática.

– **Desmoplasia:** Se consideraron tres categorías teniendo en cuenta si la retracción del estroma circundante al tumor era focal o escasa; moderada con predominio del componente celular tumoral; y marcada o extensa.

– **Componente Inflamatorio:** El componente inflamatorio asociado con linfocitos y células plasmáticas se valoró tanto en el centro como en la periferia del tumor, reseñándose si era nulo, focal o poco marcado o, por el contrario, muy abundante.

– **Necrosis:** No se diferenció entre la necrosis de tipo infarto o de tipo comedo, considerándose solamente la del componente infiltrante. No se tuvo en cuenta la necrosis focal o individual de células, los núcleos con picnosis o las áreas edematosas o mixoides que sugirieran necrosis. Se consideró positiva cuando, al menos, su extensión era mayor del 25% de campos de gran aumento (x400) y en un mínimo de dos campos.

La *figura 3.4* muestra un ejemplo de necrosis tumoral.

– **Componente de carcinoma intraductal asociado:** Se registró este dato según el porcentaje de dicho componente respecto al tumor, de manera que se dividió en dos subgrupos según fuera menor o mayor del 25% del total.

La *figura 3.5* muestra un ejemplo de componente intraductal asociado.

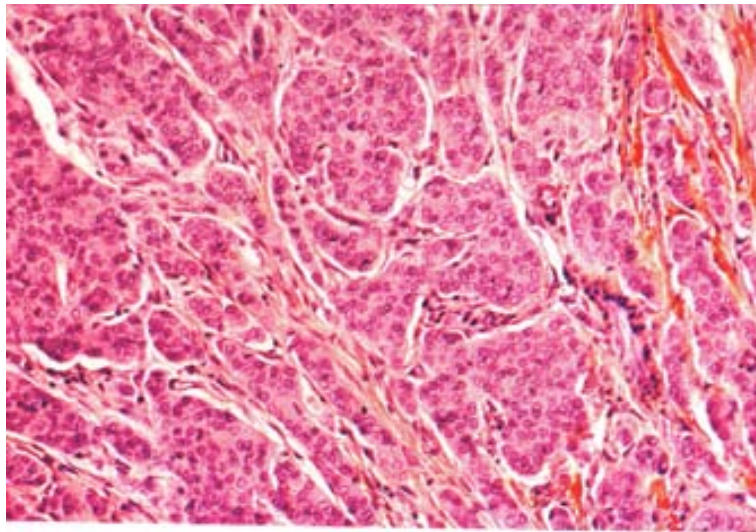


Figura 3.1: Carcinoma ductal infiltrante grado 1 (3+1+1).

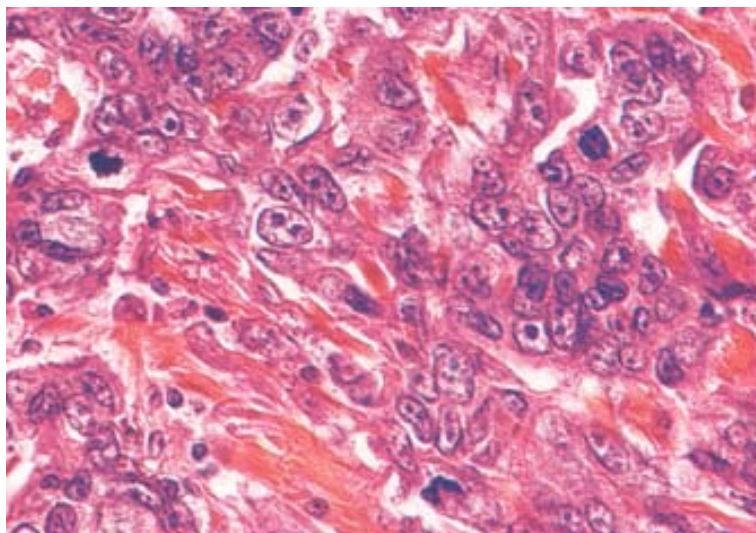


Figura 3.2: Carcinoma ductal infiltrante grado 3 (3+3+3).

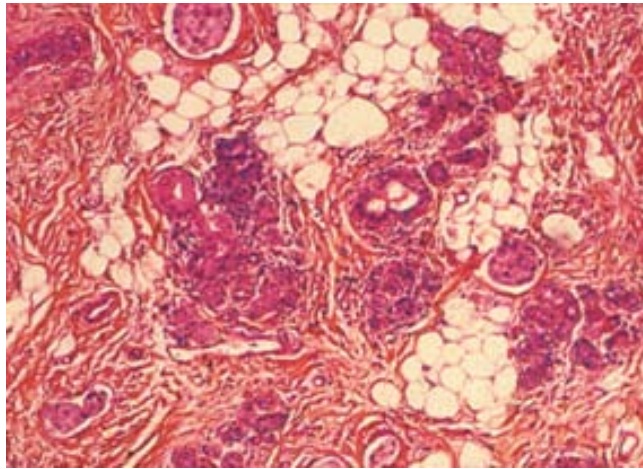


Figura 3.3: Invasión linfática peritumoral.

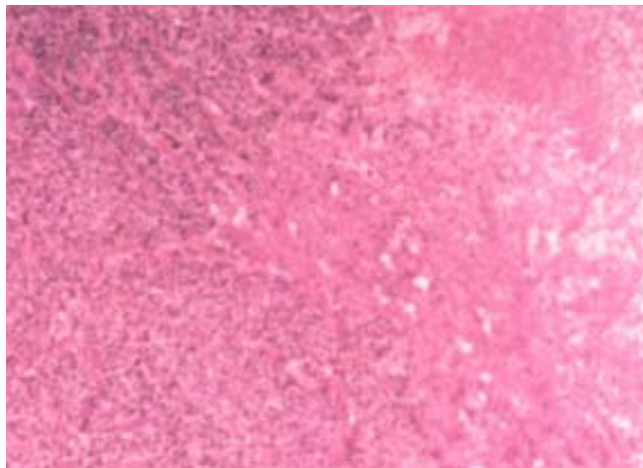


Figura 3.4: Necrosis tipo infarto con hemorragia.

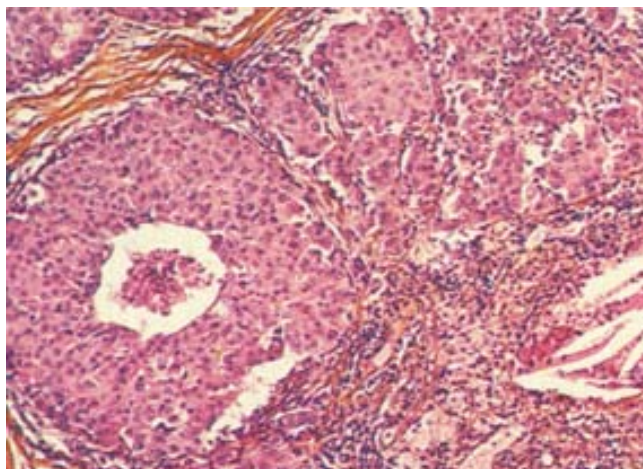


Figura 3.5: Componente intraductal asociado tipo comedo.

3.4. – RECEPTORES HORMONALES.

Se determinaron los valores de los receptores de estrógenos y de progesterona en todos los pacientes. En aquellos casos en los que ya se disponía del valor de los receptores de estrógenos en el momento del diagnóstico, este se determinó por la técnica semicuantitativa. Dado que esta técnica se puso en marcha en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau a partir del año 1980, en un amplio porcentaje de pacientes en que no se disponía de receptores estrogénicos, estos se determinaron por técnicas de inmunohistoquímica. Los receptores de progesterona se determinaron en toda la población estudiada por técnica de inmunohistoquímica sobre cortes preparados desde la pieza parafinada del tumor; se valoró el porcentaje de células marcadas: < 5% (negativos), del 5 al 20%, del 20 al 50% y >50%.

Las *figuras 3.6 y 3.7* muestran ejemplos de tumores RE y RP positivos por inmunohistoquímica.

3.5. – ANALISIS DE LA CINÉTICA CELULAR.

La determinación de la ploidía y de la fase S se realizó por citometría de flujo, mediante un citofluorímetro de flujo EPICS V (Coulter Electronics), equipado con un láser de argón de 5 W y un sistema de adquisición y análisis de datos multiparamétrico MDADS.

Para ello se seleccionaron los bloques de parafina correspondiente a la parte más indiferenciada y más celular del tumor. A continuación se obtuvieron 2 o 3 cortes gruesos de cada bloque seleccionado, por medio de un microtomo ajustado manualmente a unos 40 μm de espesor. Los cortes se desparafinan por inmersión en xileno, con varios lavados por decantación cada 15 minutos, durante dos horas. Posteriormente se elimina el xileno con un mínimo de tres lavados con etanol absoluto.

El segundo paso es la rehidratación del tejido, mediante pases sucesivos en etanol al 100%, 95%, 75%, 70% y 50%, durante 10 minutos en

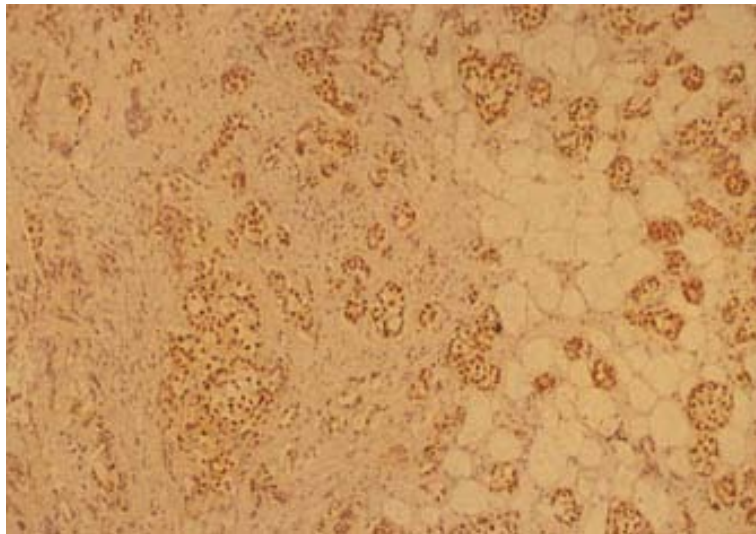


Figura 3.6: Inmunohistoquímica mostrando positividad para los receptores estrogénicos.

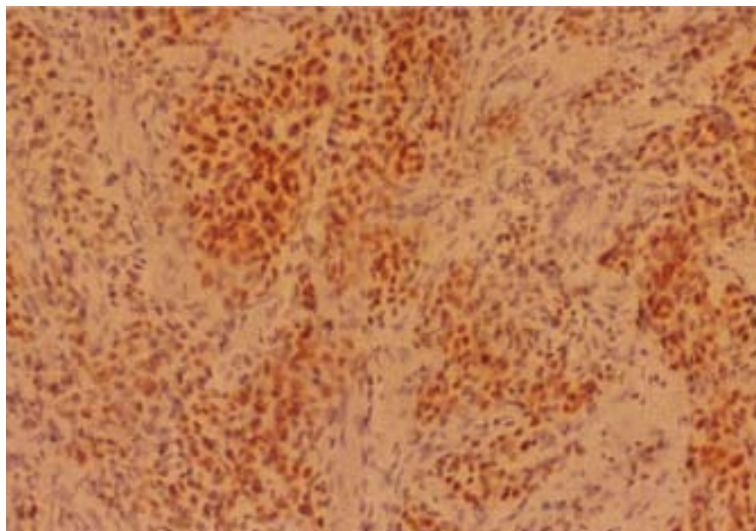


Figura 3.7: Inmunohistoquímica mostrando positividad para los receptores de progesterona.

cada concentración, con lavados por decantación en agua destilada. La hidratación es un factor muy importante para obtener una buena celularidad.

Después de una hidratación óptima, los cortes de tejido parafinado deben presentar un aspecto blando y extendido. La disgregación mecánica se realiza con un bisturí hasta obtener una pasta homogénea. El tejido así dispersado se sumerge en una solución de pepsina al 0,5% disuelta en CINA al 0,9% a pH 1,5, y se incuba a 37°C durante 60-100 minutos con agitación suave y constante. De esta manera se obtiene una suspensión de núcleos, libres de estructuras celulares. Se separa el sobrenadante mediante pipeta, desechando el sedimento, y se filtra la solución con una malla de nylon de 50 μm de diámetro a fin de eliminar los restos de estroma tisular que no hayan sido digeridos.

Se centrifuga durante 2 minutos a 2.050 r.p.m. y se comprueba la riqueza de núcleos de la dispersión obtenida mediante microscopía óptica, se vuelve a centrifugar durante 2 minutos a 2.050 r.p.m. y se ajusta la concentración de núcleos a unos $1-3 \times 10^6/\text{ml}$, que es la necesaria para lograr una tinción óptima.

Se resuspende el sedimento en una solución de ribonucleasa al 0,5% en PBS, dejándola incubar durante 30 minutos a 37°C, para eliminar el RNA libre. Se añade yoduro de propidio a la solución anterior, ajustándolo a una concentración de 20 $\mu\text{m}/\text{ml}$, y se deja actuar durante 20 horas a 4°C. Al día siguiente se dispone ya de los núcleos teñidos con el fluorocromo, aptos para ser analizados. Finalmente se filtra con una malla de nylon de 50 μm .

Tras completar estos pasos se procede al análisis en el citómetro de flujo. Se irradian los núcleos con el láser sincronizado a una longitud de onda de 488, con una potencia de 100 mW. Se selecciona la fluorescencia roja del yoduro de propidio, con un filtro de absorción de 610 nm, eliminándose la luz del láser con un filtro de interferencia de 515 nm. Se mide la fluorescencia en escala lineal, en un mínimo de 20.000 núcleos para cada caso estudiado.

Se estudia la distribución de frecuencias de las intensidades de fluorescencia de los núcleos, que representan el contenido de DNA de los

núcleos en las distintas fases del ciclo celular. Para ello se usó el programa PARA1 (Coulter Electronics), incorporado al sistema MDADS. Se identificaron los picos correspondientes a las fases G_0/G_1 y G_2/M de cada población celular hallada, y se calcularon la distribución del ciclo celular y el índice de DNA (DI). El coeficiente de variación fue calculado en la base del pico de fase G_0/G_1 de la población diploide.

Como población celular de control para el cálculo de la ploidía se utilizaron las células inflamatorias y del estroma peritumoral que se hallaban presentes en el propio espécimen conservado en parafina, y que habían sido procesadas junto con las células tumorales.

Cuando existe un único pico de fase G_0/G_1 , el contenido de DNA de las células tumorales equivale al de las células benignas acompañantes, y por tanto el tumor es diploide, con un $DI=1$. Cuando hay más de un pico de fase G_0/G_1 se considera que uno corresponde a las células normales y el otro (o los otros), a las células tumorales, y que por tanto el tumor es aneuploide. En tal caso se obtiene el DI calculando la relación entre ambos picos (normalmente el primero corresponde a la población diploide). Para que un pico aneuploide fuese tenido en cuenta debía contener al menos un 10% de los núcleos.

Como parámetros de posible valor pronóstico se evaluaron el índice de DNA y la fracción celular en fase S. Como medida de calidad de los histogramas se registró el coeficiente de variación.

La *figura 3.8* muestra varios ejemplos de los diferentes histogramas obtenibles.

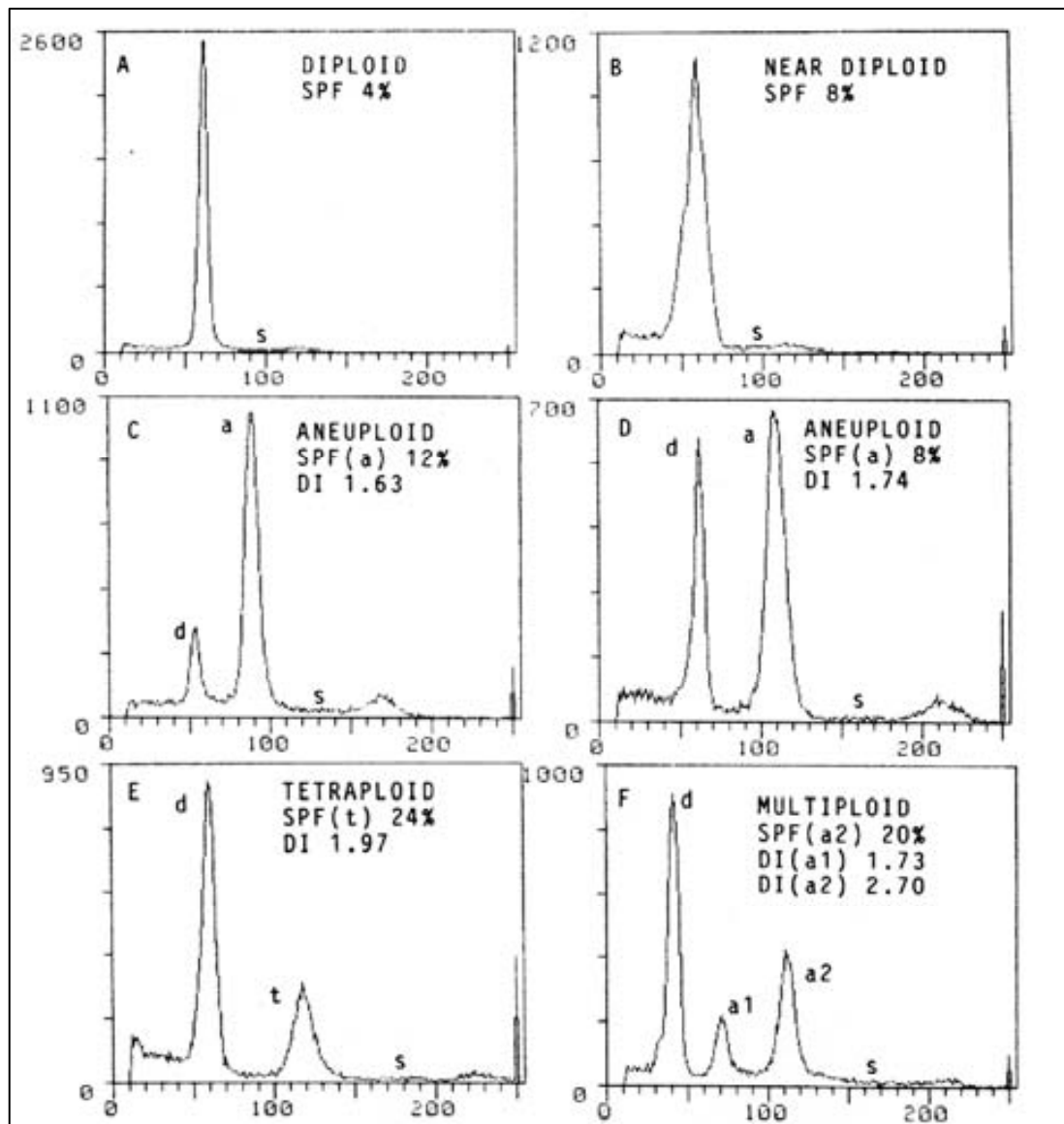


Figura 3.8: Ejemplos de histogramas obtenibles por citometría de flujo.

3.6. – SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53.

La determinación de la sobreexpresión de la proteína producto del gen mutado p53 se realizó mediante técnica de inmunohistoquímica usando el método de la avidina-biotina peroxidasa en material parafinado. La técnica consiste en adherir cortes de 5 micras de espesor del material parafinado en un portaobjetos, con un tratamiento previo con poli-L-lisina para incrementar la adhesividad. Las muestras fueron desparafinadas mediante sucesivos pases en xileno, alcohol absoluto y alcohol de 95°.

Posteriormente los portaobjetos se incubaron en buffer tris durante 5 minutos y se trataron con microondas en una solución de citrato durante 10 minutos, para incrementar la penetración de los distintos reactivos. Una vez finalizado este proceso se incubaron secuencialmente en buffer tris durante 5 minutos, y por último se incubó con peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la actividad peroxidasa endógena.

Posteriormente se incubaron las muestras en cámara oscura con una solución de ovoalbúmina al 10% y suero anticabra al 10%, para bloquear la unión inespecífica con proteínas tisulares, y después con el anticuerpo monoclonal anti-p53 Pab 1801 (Biogenex, California) a dilución 1/40 en buffer PBS y suero de cabra al 10% durante 2,5 horas.

Una vez finalizada la incubación y eliminado el exceso de anticuerpo específico, se procedía a incubar las muestras con un segundo anticuerpo antiproteínas de ratón a la dilución de 1/20 durante treinta minutos y después con la solución del complejo avidina-biotina durante otros treinta minutos. Finalizada la incubación y eliminado el exceso de complejo avidina-biotina, se incubaban las muestras con tetróxido de osmio al 0,1% durante 30 segundos, para incrementar la señal obtenida. Posteriormente se realizaba la contratinción con verde metilo durante dos minutos, se eliminaba el exceso de colorante con agua desionizada, se deshidrataba con alcoholes de distinta graduación, se limpiaba con xileno y se cubría con un cubreobjetos.

Para la valoración de los resultados, las muestras fueron observadas independientemente por dos observadores, y los casos con discrepancias se

revisaban. Se consideró positiva toda tinción nuclear en más del 5% de las células malignas. Las muestras positivas fueron clasificadas en cuatro grupos según el porcentaje de células positivas: del 5 al 20%, del 20 al 40%, del 40 al 60% y más del 60%, y en tres grupos según la intensidad de la tinción nuclear: débil, moderada e intensa.

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica se incluyó cada vez que se realizó dos controles positivos, uno positivo débil y otro positivo intenso, y un control negativo. En el caso de diferencias en los resultados de los controles se repitió el procesamiento de las muestras.

La *figura 3.9* muestra un ejemplo de positividad para p53.

3.7. –SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER-2/neu.

La determinación de la oncoproteína HER-2/neu se determinó también mediante inmunohistoquímica, empleando un método similar al descrito con la p53. Las diferencias fundamentales radican en la ausencia de tratamiento con microondas, el anticuerpo específico utilizado, que fue un anticuerpo policlonal (dilución 1/20) obtenido en conejos (LanderDiagnóstica) y el segundo anticuerpo específico antiproteínas de conejo.

Al igual que se realizó con la p53, se empleó como control de calidad de la técnica un control positivo y otro negativo. Se consideró como positivas las muestras con tinción específica a nivel de la membrana citoplasmática en al menos un 5% de las células malignas.

La *figura 3.10* muestra un ejemplo de la positividad para HER-2/neu.

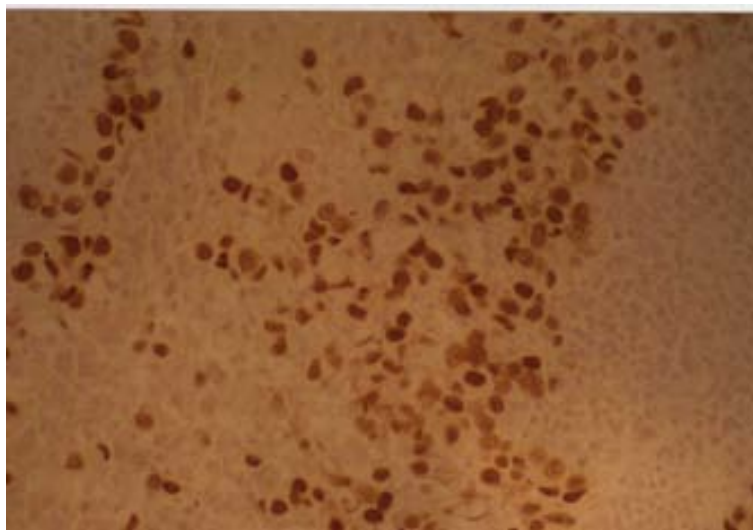


Figura 3.9: Inmunohistoquímica mostrando positividad para la proteína p53.

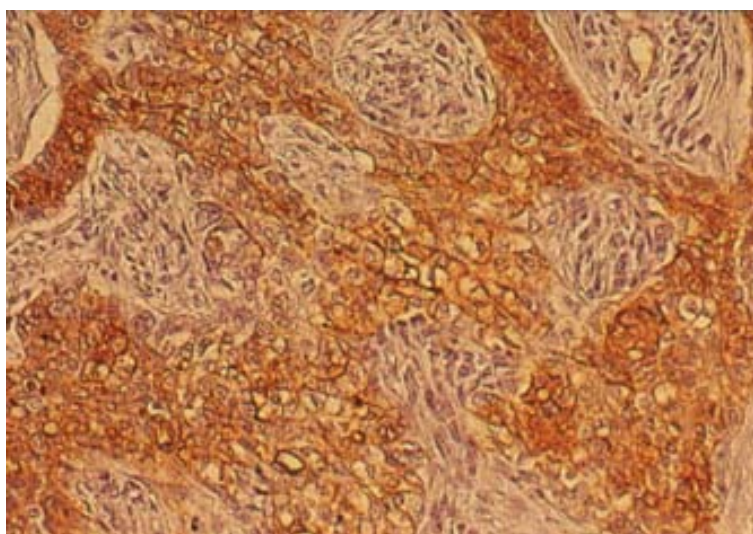


Figura 3.10: Inmunohistoquímica mostrando positividad para la proteína HER-2/neu.

3.8. – ANALISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos en el estudio fueron introducidos y almacenados en una base de datos informática. El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS-PC para Windows.

Para los análisis de supervivencia las variables categóricas, como el grado histológico o la sobreexpresión de los oncogenes, se convirtieron en dicotómicas tras encontrar el punto de corte óptimo. Determinadas variables como la edad, el índice de DNA y la fase S se analizaron como variables dicotómicas, si se hallaba un punto de corte óptimo, y como variables continuas, aplicando, si era necesario, distintas transformaciones, básicamente logarítmicas y *cubic spline*.

La comparación entre variables categóricas se hizo mediante el test del χ^2 , y entre variables continuas mediante el test de Spearman.

Las curvas de supervivencia se realizaron según el método actuarial de Kaplan-Meier. La comparación entre dos o más curvas de supervivencia se realizó mediante el test de Log-rank de Mantel-Cox, confirmado mediante el test de Breslow para datos censurados. El riesgo relativo (RR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%) fue estimado usando el modelo de Cox con una sola variable. El riesgo relativo se define como la probabilidad de no recurrir o no morir con relación a la probabilidad de recurrir o de morir.

La fecha que se utilizó como base para la obtención de intervalos de supervivencia fue la fecha de cirugía. Para la obtención del intervalo de supervivencia libre de enfermedad se consideró la fecha en que ocurrió la primera recurrencia, fuera esta local o metastásica; para la supervivencia libre de metástasis, la fecha en que ocurrió la primera manifestación metastásica, independientemente que hubiera una recidiva local previa. En el estudio de la recidiva local solo se consideraron las recidivas locales aisladas y como primera manifestación de enfermedad recurrente.

La supervivencia global se obtuvo con la fecha de muerte por cualquier causa; en la supervivencia específica por cáncer de mama, las muertes por otra causa se consideraron sucesos truncados en el momento de ocurrir.

El análisis multivariado se realizó mediante el método de regresión múltiple de Cox. Se buscó el modelo que mayor verosimilitud obtuviera, intentando a su vez utilizar las variables más objetivas y menos difíciles de obtener en la práctica diaria. En el análisis multivariado se introdujeron las variables con un riesgo relativo en el estudio univariado significativamente diferente de 1. Empezando con un modelo inicial que incluyera todas las variables significativas en el análisis univariado se obtuvo un modelo final mediante un proceso de selección *backward LR*.

Dado que las variables no son independientes, el resultado de los análisis univariado y multivariado pueden ser diferentes. Por esta razón, todas las variables que no fueron significativas en el análisis univariado fueron añadidas individualmente en el modelo final de regresión para evitar prescindir de algún factor pronóstico importante.

Tanto en el análisis univariado como en el multivariado se considera la categoría de referencia la de mejor pronóstico putativo.

4.- Resultados.

4.1. – ANALISIS DESCRIPTIVO Y UNIVARIADO.

4.1.1. – EVOLUCIÓN DE LA SERIE.

Un total de 271 pacientes cumplieron los criterios de inclusión en el estudio. Fueron intervenidas con cirugía radical del 1 de enero de 1976 al 31 de diciembre de 1986.

En el momento de cerrar el estudio, el seguimiento medio de las pacientes vivas en el último control es de 12,2 años (rango 4,5 – 20,8 años). El 75% de las pacientes vivas en el último control tiene un seguimiento superior a los 10 años.

De las 271 pacientes habían recaído 95 pacientes (35,1%); la primera manifestación de enfermedad fue la recidiva local en 27 pacientes (28,4%), metástasis a distancia en 63 (66,3%) y ambas simultáneamente en 5 casos (5,3%).

Nueve pacientes con recidiva local aislada presentaron posteriormente enfermedad diseminada, con lo que el número de pacientes que han presentado metástasis durante el seguimiento es de 77 (28,4% de todas las pacientes). La localización de la primera metástasis se describe en la *tabla 4.1*.

Localización	Número	%
Partes blandas	19	24,7
Hueso	14	18,3
Pleuropulmonar	29	37,6
Hígado	4	5,2
S.N.C.	1	1,2
Múltiple	10	13

Tabla 4.1: Localización de la primera metástasis

En el momento del último control clínico, 155 pacientes estaban vivas sin evidencia de enfermedad (57,2% del total de pacientes), de ellas 14 tras haber sufrido una recidiva local y 2 tras enfermedad a distancia (fosa supraclavicular homolateral); 7 pacientes (2,6%) estaban vivas y con enfermedad metastásica activa. Un total de 68 enfermas (25,1%) habían muerto a consecuencia de su enfermedad, y 22 (8,2%) habían fallecido por otras causas. 19 pacientes habían sido perdidas de control sin evidencia de enfermedad, con un seguimiento medio de 6 años (rango 4,5 – 13 años). Solo el 3% de las recurrencias y el 6% de las muertes ocurren después del duodécimo año.

La supervivencia específica por cáncer de mama es del 69,3% a los 15 años. La supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia libre de metástasis a los 15 años es respectivamente del 62,71% y 65,97% (*tabla 4.2, figuras 4.1 y 4.2*).

Suceso	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	75,43%	67,00%	62,71%
Supervivencia libre de metástasis	80,27%	72,26%	65,97%
Supervivencia específica	89,75%	76,65%	69,30%

Tabla 4.2: Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años.

Tras cualquier recurrencia, la supervivencia media es de 2,77 años, con un 23% de pacientes vivas a los 5 años; tras la aparición de metástasis estas cifras bajan a 2,1 años de supervivencia media y un 14% de supervivientes a los 5 años.

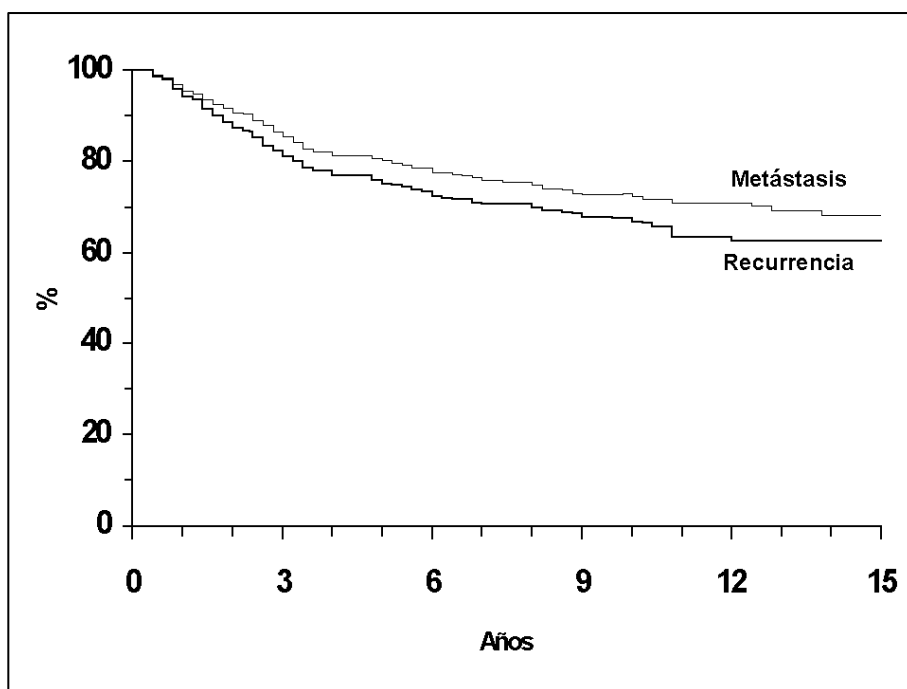


Figura 4.1: Supervivencia libre de metástasis y libre de recurrencia.

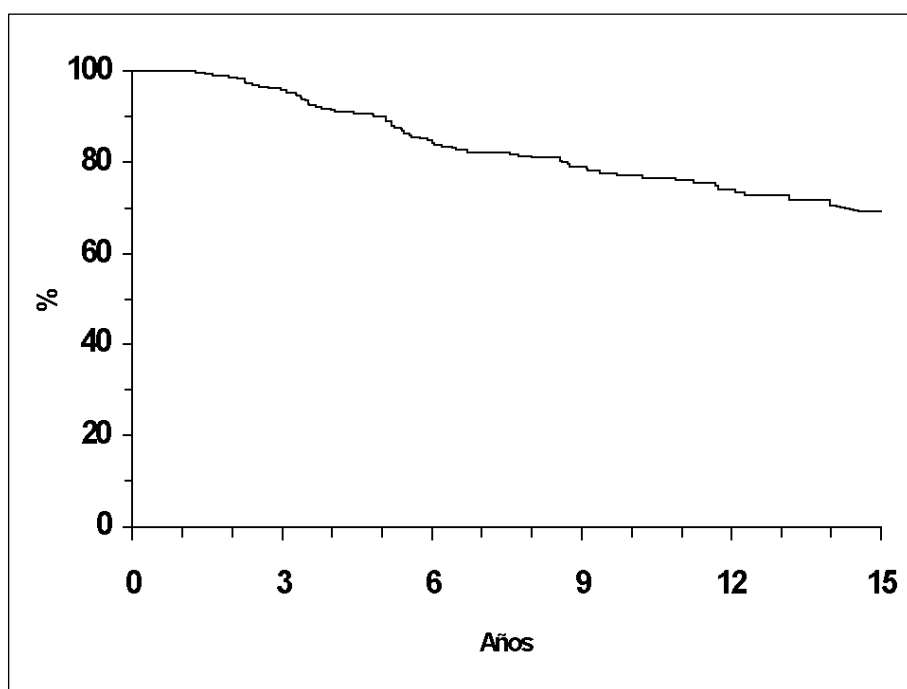


Figura 4.2 Supervivencia específica de toda la serie.

Un total de 26 pacientes han presentado una segunda neoplasia (*tabla 4.3*). 13 de ellas una segunda neoplasia mamaria en la mama contralateral, con una media de tiempo de aparición de 61 meses (rango 7 – 129 meses). Entre las segundas neoplasias hay que destacar un sarcoma de pared torácica, probablemente radioinducido.

Localización	Número
Mama contralateral	13
Colon	4
Sarcoma	3
Ovario	2
Endometrio	1
Laringe	1
Melanoma coroides	1
Piel	1

Tabla 4.3: Localización de las segundas neoplasias

4.1.2. – CIRUGÍA Y RADIOTERAPIA.

El tipo de cirugía que se realizó en las 271 pacientes se detalla en la *tabla 4.4*. Se administró radioterapia en pared y/o áreas en 21 pacientes sometidas a mastectomía, y radioterapia complementaria en todos los casos de cirugía conservadora. La mediana de ganglios axilares que se disecaron fue de 12 (rango 5 – 32), solo en 25 pacientes el número de ganglios fue de 5 o 6. Ni el tipo de cirugía, ni la administración de radioterapia, ni el número de ganglios estudiados tienen valor pronóstico.

Procedimiento	Numero	%
Mastectomía radical	17	6.3
Mastectomía radical modificada	229	84.5
Mastectomía simple	5	1.8
Cirugía conservadora	20	7.4

Tabla 4.4: Procedimientos quirúrgicos realizados.

4.1.3. – LOCALIZACIÓN TUMORAL.

En 267 casos se pudo conocer la localización de la lesión primaria en la mama, se describe en la *tabla 4.5*.

Localización	Número	%
Cuadrante superoexterno	108	39.9
Cuadrante inferoexterno	29	10.7
Unión de cuadrantes externos	14	5.2
Línea media	56	20.5
Cuadrante supero interno	37	13.7
Cuadrante inferointerno	16	5.9
Unión de cuadrantes internos	7	2.6
Desconocido	4	1.5

Tabla 4.5: Localización del tumor primario.

Agrupándolos, de los 267 casos en que era conocida la localización tumoral, 207 pacientes (77,5%) tenían tumores en cuadrantes externos o línea media, y 60 pacientes (22,5%) en cuadrantes internos. Este factor no se correlaciona con ningún otro del estudio.

En el estudio de su valor pronóstico, no es factor significativo para la supervivencia específica ni para la supervivencia libre de metástasis,

quedando en el límite de la significación en la supervivencia libre de enfermedad (log-rank, $p=0,0703$; Breslow, $p=0,0492$). Este valor pronóstico se debe enteramente a su influencia en la recidiva local (*figura 4.3*), donde si es un factor pronóstico significativo: log-rank, $p=0,025$; RR 2,294 (IC 95%, 1,082 – 4,86) para cuadrantes internos vs. Cuadrantes externos y línea media.

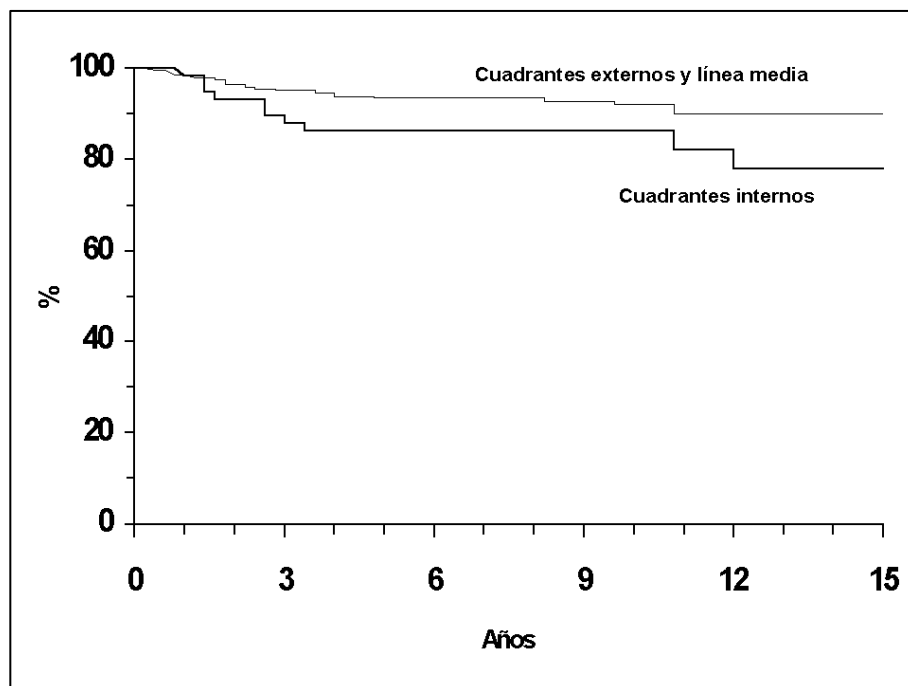


Figura 4.3: Supervivencia libre de recidiva local, según la localización Del tumor primario ($p=0.025$).

4.1.4. – EDAD Y MENOPAUSIA.

La edad media de la población estudiada era de 56 años (rango 27 – 81 años). La distribución por grupos de edades se describe en la *figura 4.4*.

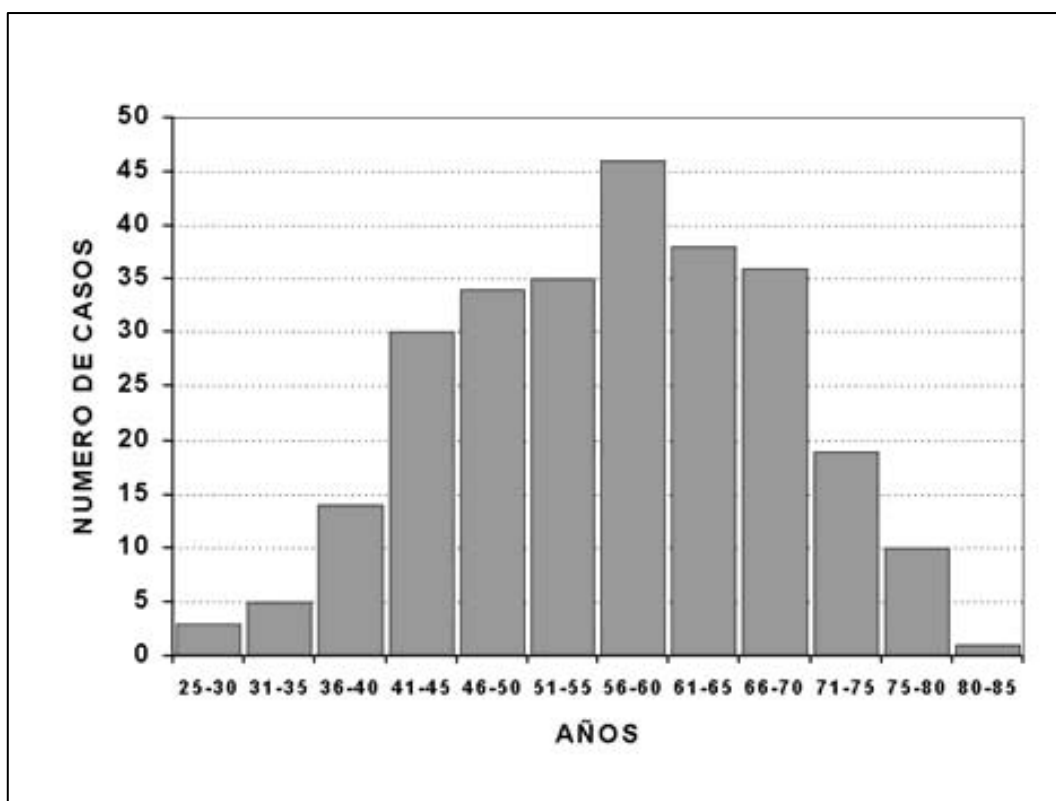


Figura 4.4: Distribución del número de casos por grupos de edades.

El 30,6% de las pacientes era premenopáusica al diagnóstico; el 12,5% era perimenopáusica y el 56,9% postmenopáusica. La edad media de las pacientes pre y perimenopáusicas es de 47 años, y de 63,5 años en postmenopáusicas.

El estado menstrual se correlaciona con el componente intraductal asociado (mayor presencia en pacientes pre y perimenopáusicas, $p=0,00017$), los receptores de estrógenos y de progesterona (mayor tasa de negatividad en pacientes pre y perimenopáusicas, $p=0,017$ y $p=0,007$ respectivamente) y hay una tendencia a que las pre y perimenopáusicas se correlacionen con la positividad para HER-2/neu ($p=0,07$). Esta variable no es factor pronóstico para ningún suceso.

La edad al diagnóstico es una variable continua, al buscar un punto de corte ideal, este no se encontró para la supervivencia libre de enfermedad (ya sea para cualquier tipo de recaída o para metástasis), ni para la supervivencia específica, aunque en este caso se acercó a la significación al separar los grupos en la edad de 65 años. Por tanto se optó por introducirla en el estudio como una variable continua. Del estudio de las tasas de recurrencias para los diferentes grupos de edad, se concluyó que la transformación que mejor predecía el comportamiento pronóstico era el *cubic spline*

Introducida en el análisis con la transformación *cubic spline*, la edad al diagnóstico es un factor pronóstico significativo para la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,0013$), la supervivencia libre de metástasis ($0,0196$), y la supervivencia específica por cáncer de mama ($0,013$). La representación gráfica del riesgo relativo según la edad se puede observar en la *figura 4.5*.

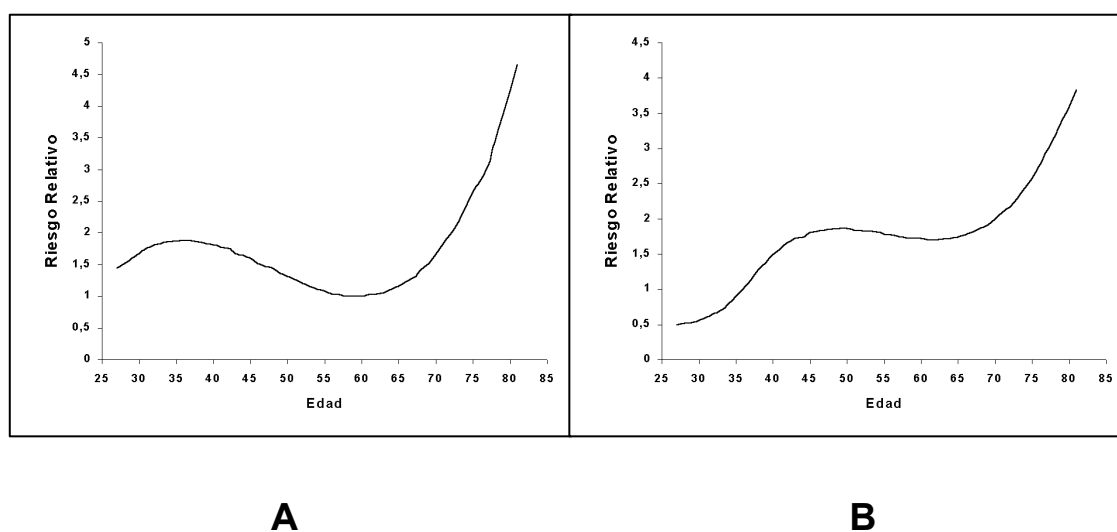


Figura 4.5: Representación de la transformación *cubic spline* con relación a la edad y el riesgo relativo de recurrencia (A) y de mortalidad (B). La transformación para el riesgo relativo de metástasis es superponible a la de mortalidad.

Como se puede observar, el riesgo relativo de padecer una recurrencia de la enfermedad es mínimo alrededor de los 60 años, elevándose al nivel de 1,5 – 2 para el grupo de edad más joven, y hasta 4

para las edades mayores. Para la supervivencia libre de metástasis y para la supervivencia global, el riesgo relativo es bajo para las edades jóvenes, discretamente más alto en el grupo de edad media, y se eleva francamente a partir de los 70 años.

Como en el caso de la localización tumoral, las diferencias entre recurrencia y mortalidad se deben a la influencia de la recidiva local (*Figura 4.6*). Esta es significativamente más frecuente en las pacientes menores de 45 años que en las mayores ($p=0,02$); cuando se elimina este factor, analizando solo las metástasis, la curva de riesgo relativo se iguala a la de la mortalidad.

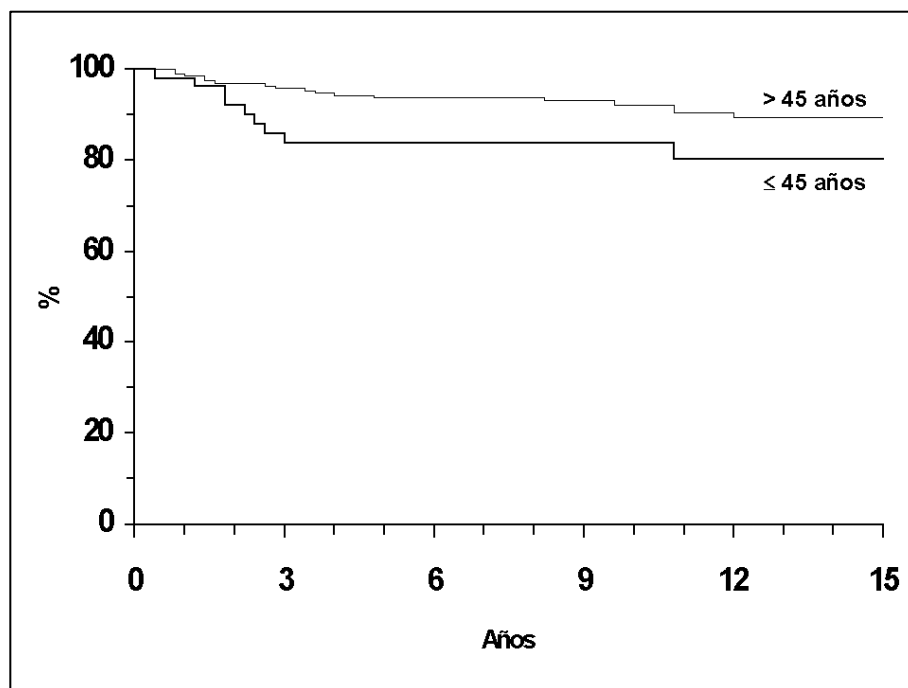


Figura 4.6: Supervivencia libre de recidiva local según la edad ($p=0,02$).

Dada su intensa relación con el estado menstrual, los factores con los que se correlaciona la edad son los mismos, con mayor significación estadística: componente intraductal ($p=0,001$), negatividad de RE ($p=0,002$),

negatividad de RP ($p=0,005$), y positividad para la oncoproteína HER-2/neu ($p=0,031$).

4.1.5. – TIPO HISTOLÓGICO.

La gran mayoría de las pacientes tenían un carcinoma ductal infiltrante, 256 casos (94,4%), solo 14 pacientes (5,2%) fueron diagnosticadas de un carcinoma lobulillar infiltrante y una paciente (0,4%) de un carcinoma papilar. No fue factor pronóstico para ningún suceso.

4.1.6. – COMPONENTE DE CARCINOMA INTRADUCTAL ASOCIADO.

En 111 pacientes (41%) se objetivo un componente intraductal mayor del 25% del tumor. Como ya se ha descrito, esta presencia se correlaciona con la edad y la menopausia. Es destacable su relación con la expresión de las oncoproteínas: el 25,5% de los tumores con componente intraductal asociado muestran sobreexpresión de la HER-2/neu, frente al 14,1% de los que no tienen componente intraductal ($p=0,024$); no hay correlación con la sobreexpresión de la proteína p53. El componente intraductal asociado no tiene valor pronóstico para ningún suceso.

4.1.7. – TAMAÑO TUMORAL PATOLÓGICO.

La media del tamaño tumoral patológico fue de 30 milímetros, con un rango de 5 a 80 mm. La distribución según categorías de la clasificación TNM se observa en la *tabla 4.6*.

pT	Número	%
pT1a-b	21	7,7
pT1c	81	29,9
pT2	149	55
pT3	29	7,4

Tabla 4.6: Distribución del tamaño tumoral según categorías pT.

El tamaño tumoral se correlaciona significativamente con los teóricos factores de proliferación y desdiferenciación. A medida que aumenta el diámetro tumoral hay mayor proporción de grados II y III ($p=0,002$), mayor presencia de necrosis ($p=0,011$), más tumores con RE negativos ($p=0,0001$) y RP negativos ($p=0,0001$), mayor proporción de aneuploidía ($p=0,04$), mayor fase S ($p=0,0001$) y mayor positividad para la proteína p53 ($p=0,004$).

Para dicotomizar la variable se ha hecho un estudio de la significación (*figura 4.7*), hallando que el punto de corte que resulta en un mayor valor pronóstico es el de 2 centímetros.

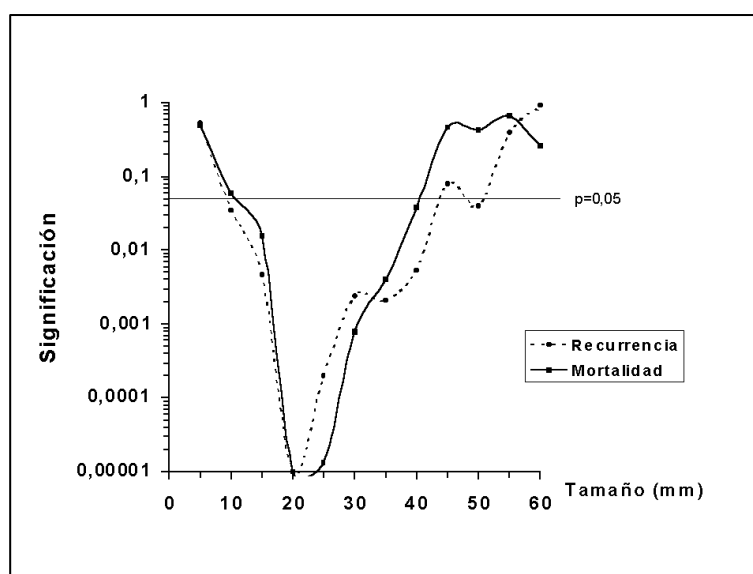


Figura 4.7: Grado de significación para los diferentes tamaños tumorales. Haciendo cortes cada 5 mm, cualquier tamaño entre los 10 y los 40 mm muestra valor significativo, sin embargo, tanto para la supervivencia libre de enfermedad como para la supervivencia específica, la máxima significación se halla en los 2 cm.

Empleando este punto de corte (pT1 vs pT2-3), el tamaño tumoral es un factor pronóstico significativo para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de metástasis y supervivencia específica (*tabla 4.7*). En las *figuras 4.8* y *4.9* se representan la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia específica.

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	p
Supervivencia libre de enfermedad	pT1	1		<0,0001
	pT2-3	2,971	(1,811 - 4,872)	
Supervivencia libre de metástasis	pT1	1		<0,0001
	pT2-3	4,202	(2,267 - 7,788)	
Supervivencia específica	pT1	1		<0,0001
	pT2-3	5,162	(2,553 - 10,436)	

Tabla 4.7: Riesgo relativo (RR) y significación para el tamaño tumoral (pT1 vs pT2).

Las tasas de supervivencia a los 5, 10 y 15 años se reflejan en la *tabla 4.8*.

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	pT1	88,21%	82,78%	81,24%
	pT2-3	67,18%	56,78%	50,95%
Supervivencia libre de metástasis	pT1	94,10%	88,64%	88,64%
	pT2-3	71,44%	61,86%	53,33%
Supervivencia específica	pT1	98,01%	93,54%	88,64%
	pT2-3	82,20%	66,81%	57,33%

Tabla 4.8: Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años para el tamaño tumoral.

Al analizar el subgrupo de los tumores pT1, las diferencias entre los pT1a-b y pT1c también son importantes (*tabla 4.9*), pero dado el escaso número de eventos en el grupo de pT1a-b, las diferencias no alcanzan la significación.

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	pT1a-b	90,48%	90,48%	90,48%
	pT1c	87,61%	80,67%	78,80%
Supervivencia libre de metástasis	pT1a-b	95,24%	95,24%	95,24%
	pT1c	93,80%	86,81%	86,81%
Supervivencia específica	pT1a-b	100%	94,74%	95,24%
	pT1c	97,49%	93,13%	86,81%

Tabla 4.9: Tasa de supervivencia a 5, 10 y 15 años para los tumores pT1.

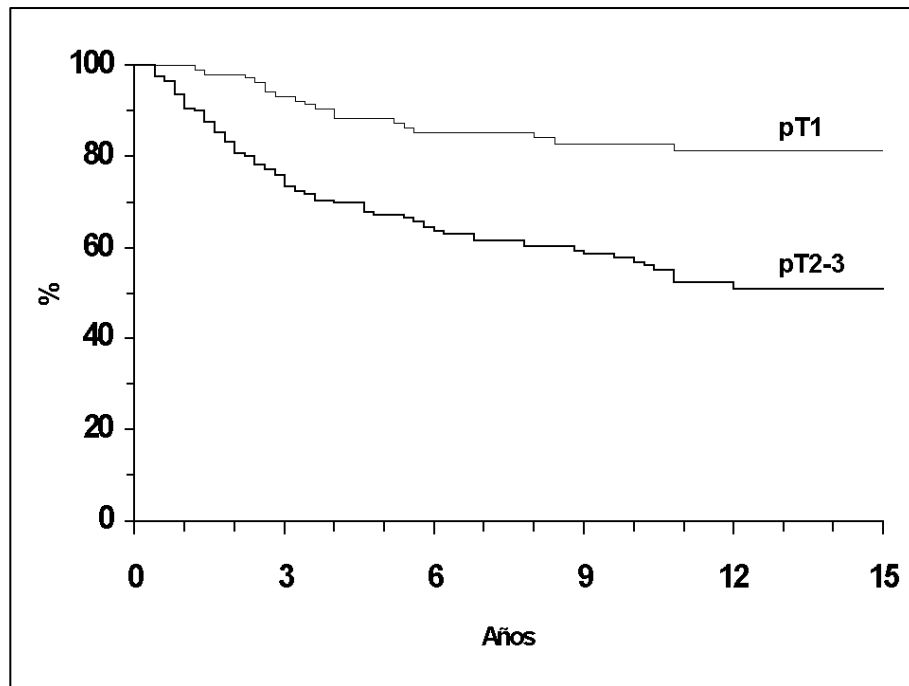


Figura 4.8: Supervivencia libre de enfermedad según el tamaño tumoral ($p < 0,0001$)

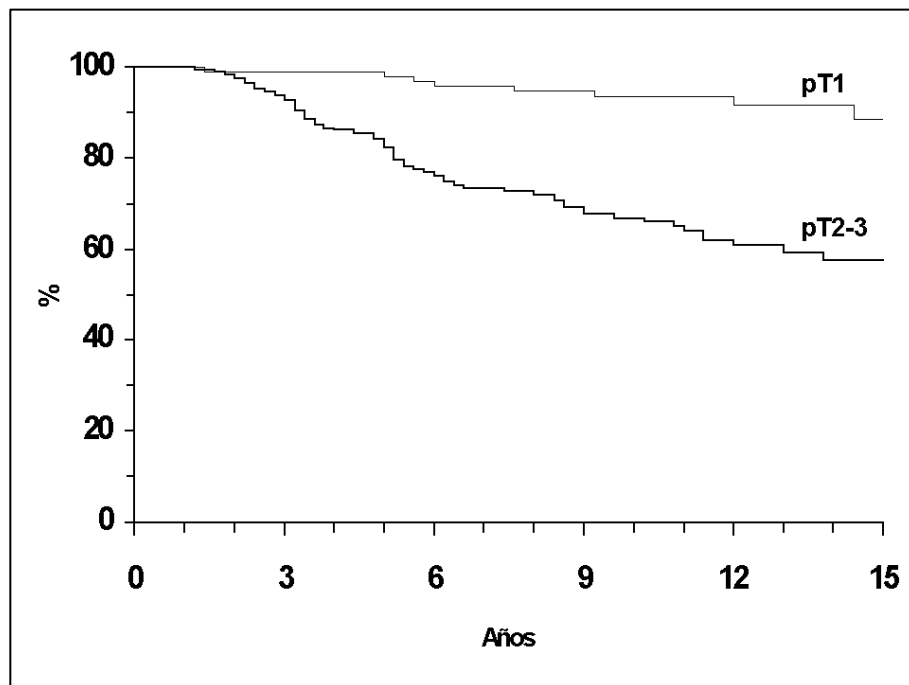


Figura 4.9: Supervivencia específica según el tamaño tumoral ($p < 0,0001$)

4.1.8. – GRADO HISTOLÓGICO.

De las 271 pacientes, 67 (24,7%) se evaluaron como grado 1; como grado 2, 133 (49,1%); y como grado 3, 71 pacientes (26,2%). Para dicotomizar la variable se agruparon los casos con grado 2 y grado 3, dado que su evolución clínica es muy similar en esta serie.

El mayor grado histológico se correlaciona con la presencia de necrosis tumoral ($p=0,0001$), con la presencia de invasión linfática y vascular ($p=0,036$), con la negatividad para los RE ($p=0,015$) y para los RP ($p=0,027$). El 42% de los tumores grado 2 y 3 son aneuploides, mientras que solo lo son el 24,6% de los tumores grado 1 ($p=0,012$); los grados altos, también presentan una fase S media más elevada; en cuanto a la positividad para la p53, el 37,2% de los grados altos presentan positividad, frente al 11,9% de los grados 1 ($p=0,0001$).

El grado histológico es un factor pronóstico significativo para la supervivencia libre de metástasis y específica, no alcanza la significación para la supervivencia libre de enfermedad (*Tablas 4.10 y 4.11, Figura 4.10*).

El análisis de los distintos componentes que forman el grado histológico (diferenciación tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico), muestra que todos ellos tienen una significación nula o marginal en los diferentes sucesos. En ningún caso, su valor pronóstico supera el del grado histológico global.

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	p
Supervivencia libre de enfermedad	Grado 1	1		0,156
	Grado 2 y 3	1,426	(0,870 - 2,335)	
Supervivencia libre de metástasis	Grado 1	1		0,020
	Grado 2 y 3	2,045	(1,104 - 3,786)	
Supervivencia específica	Grado 1	1		0,017
	Grado 2 y 3	2,206	(1,127 - 4,319)	

Tabla 4.10: RR y significación para el grado histológico (grado 1 vs. grado 2 y 3).

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	Grado 1	86,54%	75,41%	67,48%
	Grado 2 y 3	71,47%	64,01%	61,03%
Supervivencia libre de metástasis	Grado 1	92,54%	83,46%	77,55%
	Grado 2 y 3	75,96%	68,42%	65,22%
Supervivencia específica	Grado 1	98,51%	89,96%	80,14%
	Grado 2 y 3	84,84%	72,87%	65,73%

Tabla 4.11: Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años para el grado histológico.

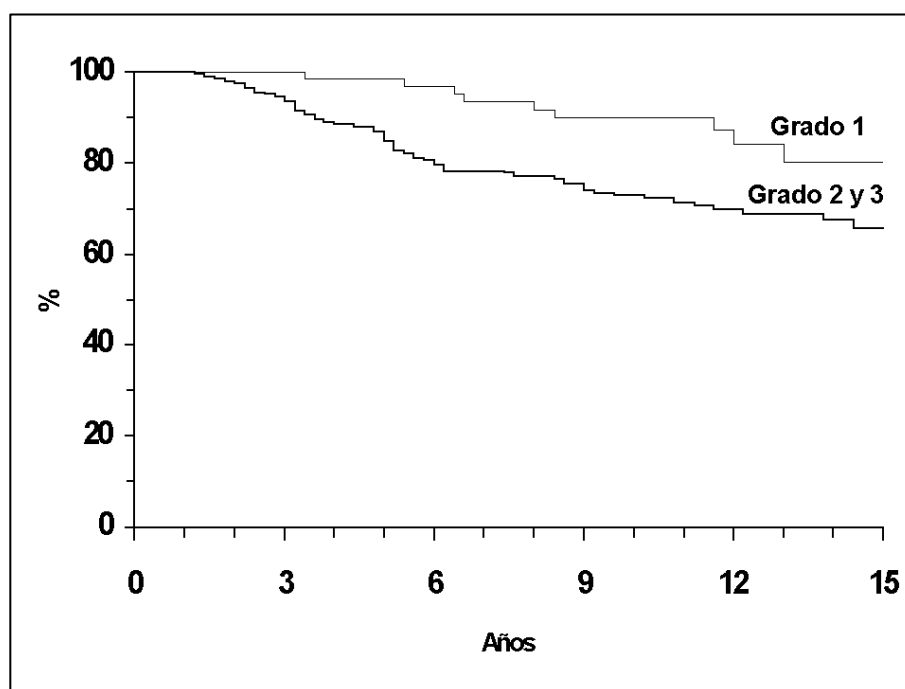


Figura 4.10: Supervivencia específica según el grado histológico (p=0,017).

4.1.9. – INFILTRADO LINFOPLASMOCITARIO.

El 54,2% de las pacientes no presentaban un infiltrado linfoplasmocitario, el 47.8%, un infiltrado moderado o importante. Su presencia se correlaciona con el grado ($p < 0,00001$), necrosis ($p < 0,00001$), negatividad de RE ($p = 0,0008$) y RP ($p = 0,041$), y con positividad para HER-2/neu ($p = 0,043$) y p53 ($p = 0,004$). No es factor pronóstico para ningún suceso.

4.1.10. – DESMOPLASIA.

La revisión histológica mostró que 9 pacientes (3,3%) no presentaban desmoplasia apreciable, 125 (46,1%) una desmoplasia moderada, y 137 (50,6%) una desmoplasia importante. Dado el escaso número de casos sin desmoplasia, se agruparon con el grupo que presentaba desmoplasia moderada.

No se correlaciona significativamente con ningún otro factor asociado, solo hay una tendencia a correlacionarse con la ausencia de componente intraductal. La presencia de desmoplasia importante tampoco es un factor pronóstico significativo para ningún suceso estudiado.

4.1.11. – INVASIÓN LINFÁTICA Y VASCULAR.

En esta serie, 47 pacientes (17,3%) presentaban invasión linfático-vascular, mientras 224 (82,7%) no la presentaban. Este factor solo se correlaciona con el grado histológico. Pese a que hay una tendencia para que los tumores con invasión linfático-vascular tengan peor evolución clínica, estas diferencias no alcanzan la significación estadística.

4.1.12. – NECROSIS TUMORAL.

La presencia de necrosis tumoral se distribuyó de la siguiente manera: 170 casos (62,7%) no presentaron necrosis, 58 (21,4%) presentaron necrosis moderada y 43 pacientes (15,9%) necrosis tumoral importante. Para dicotomizar la variable se agruparon la presencia vs. la no presencia de necrosis. La presencia de necrosis se correlaciona con el mayor tamaño tumoral ($p=0,0002$), el grado mayor ($p=0,00001$), la presencia de infiltrado linfoplasmocitario ($p<0,00001$), la negatividad de RE ($p=0,001$) y RP ($p=0,02$). El 42,9% de los tumores con necrosis presentaban sobreexpresión de la proteína p53, mientras que solo la presentaban el 23,6% de los tumores sin necrosis ($p=0,004$).

Pese a las diferencias, siempre a favor de la ausencia de necrosis, solo para la supervivencia específica alcanzó significación estadística (*tablas 4.12 - 4.13, y figura 4.11*).

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	P
Supervivencia libre de enfermedad	No	1		0,127
	Sí	1,374	(0,911 - 2,073)	
Supervivencia libre de metástasis	No	1		0,103
	Sí	1,455	(0,924 - 2,291)	
Supervivencia específica	No	1		0,033
	Sí	1,675	(1,037 - 2,706)	

Tabla 4.12: RR y significación para la necrosis tumoral (no vs sí).

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	No	81,49%	69,70%	62,49%
	Sí	64,95%	62,47%	58,38%
Supervivencia libre de metástasis	No	82,67%	75,96%	68,78%
	Sí	69,79%	65,98%	65,98%
Supervivencia específica	No	93,47%	82,21%	71,31%
	Sí	77,96%	68,07%	65,84%

Tabla 4.13: Tasa de supervivencia a 5, 10 y 15 años para la necrosis tumoral.

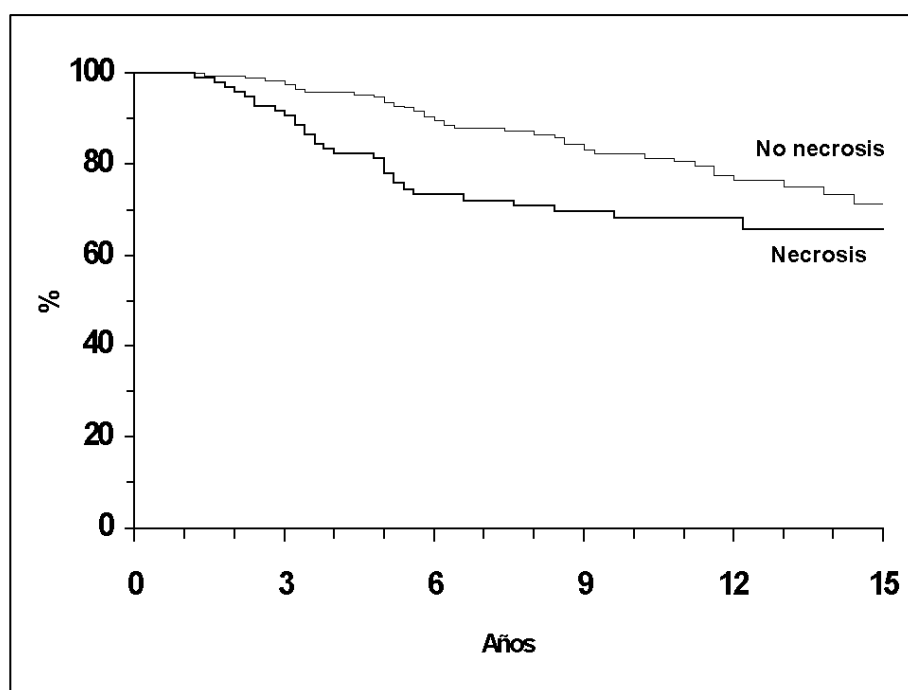


Figura 4.11: Supervivencia específica según la necrosis tumoral (p=0,033).

4.1.13. – RECEPTORES HORMONALES.

La determinación por métodos bioquímicos de los receptores de estrógenos se conocía en 208 casos; en los casos restantes y los receptores de progesterona para todas las pacientes, se determinaron por inmunohistoquímica, no siendo posible obtener un resultado válido en 10 casos, por tanto, los RE y RP son conocidos en 263 casos

4.1.13.1. – Receptores de estrógenos.

En los casos determinados por método bioquímico se definieron como positivos los valores ≥ 10 fmol/mg, con este corte fueron negativos 98 casos y positivos 110 casos, el valor medio fue de 41, 8 fmol/mg (rango 3 – 508); para la inmunohistoquímica, los negativos (menos del 5% de las células marcadas) fueron 25, y los positivos 28. La variable es desconocida en 10 casos. En resumen, 123 (47,1%) pacientes tenían RE negativos y 138 (52,9%) RE positivos. Dentro del grupo de RE positivos, 42 pacientes (16,1% del total) tenían valores altos de RE (>100 fmol/mg o $>50\%$ células positivas).

La positividad de los RE se correlaciona significativamente con la edad mayor ($p=0,004$) y el estado postmenopáusico ($p=0,01$), con el menor tamaño tumoral ($p<0,0001$), el grado menor ($p=0,004$), la menor infiltración linfoplasmocitaria ($p=0,002$), y la ausencia de necrosis ($p=0,005$). El 28,5% de los tumores RE positivos son aneuploides, mientras que en los tumores RE negativos la tasa de aneuploidía es del 47,5% ($p=0,001$), también se correlaciona con la fase S, siendo esta menor en los tumores RE positivos ($p<0,0001$). Hay también una correlación entre la positividad de los RE y la negatividad para p53 ($p=0,0004$). La relación con los receptores de progesterona es directa e intensa ($p<0,0001$).

Hay una clara tendencia a que los RE negativos tengan peor evolución clínica que los RE positivos; esta tendencia es válida para todos los sucesos analizados, pero en ninguno de ellos alcanza la significación estadística. Las tasas de supervivencia se describen en la *tabla 4.14*, y en la *figura 4.12* se puede observar como la diferencia inicial entre las curvas desaparece conforme aumenta el seguimiento.

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	Positivos	78,84%	69,82%	61,18%
	Negativos	71,9%	63,27%	60,03%
Supervivencia libre de metástasis	Positivos	82,77%	74,06%	71,04%
	Negativos	77,69%	70,06%	63,62%
Supervivencia específica	Positivos	91,01%	78,99%	71,74%
	Negativos	88,43%	74,39%	66,48%

Tabla 4.14: Tasa de supervivencia a 5, 10 y 15 años para los receptores de estrógenos.

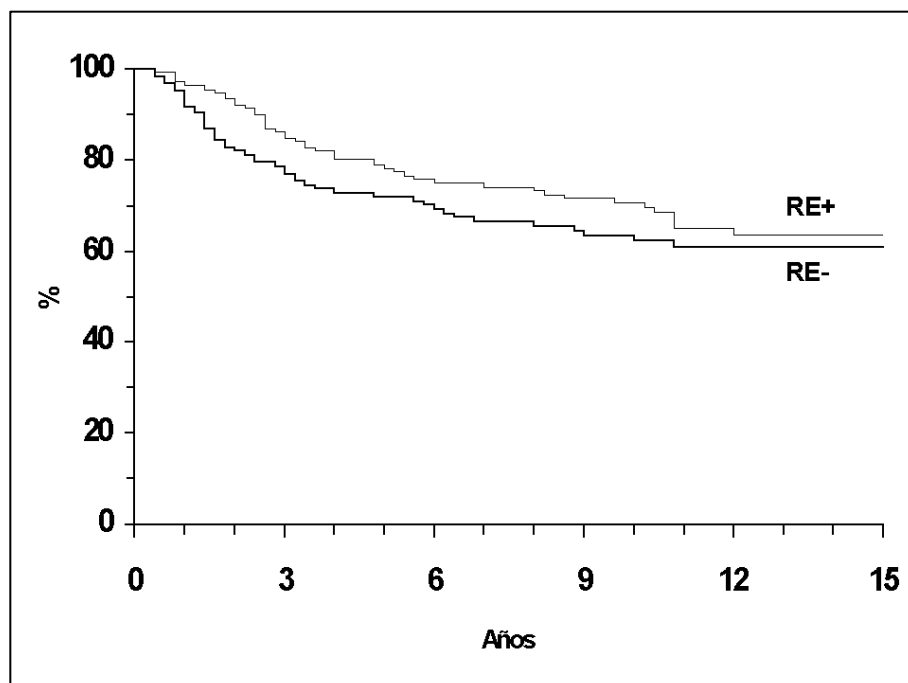


Figura 4.12: Supervivencia libre de enfermedad según los receptores estrogénicos ($p=N.S.$)

Llama la atención el comportamiento de los tumores con valores más altos de RE. Estas 42 pacientes, de las cuales el 83% son postmenopáusicas, el 66% con un tamaño mayor de 2 cm y el 45% aneuploides, tienen un comportamiento clínico similar a las de los receptores negativos, con un pronóstico mucho peor que el de las pacientes con valores positivos más bajos (*figura 4.13*), tanto para la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,010$) o de metástasis ($p=0,015$), como para la supervivencia específica ($p=0,016$).

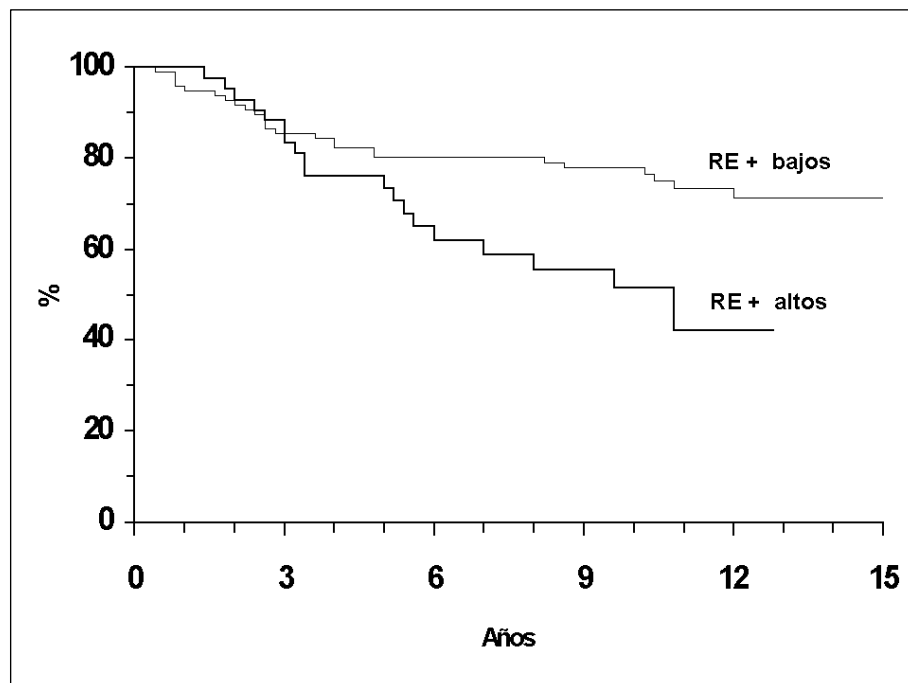


Figura 4.13: Supervivencia libre de enfermedad según el nivel de positividad de los RE ($p=0,010$).

4.1.13.1. – Receptores de progesterona.

Todos las determinaciones de RP se realizaron por técnica de inmunohistoquímica, siendo desconocido el valor de 10 casos. En 167 pacientes (64%) los RP fueron negativos, y en 94 (36%) positivos.

Como en el caso de los RE, la positividad de los RP se correlaciona con la edad mayor ($p=0,006$) y la post-menopausia ($p=0,007$), menor tamaño tumoral ($p<0,0001$), grado menor ($p=0,02$), menor infiltrado linfoplasmocitario ($p=0,04$), ausencia de necrosis ($p=0,02$), menor porcentaje de aneuploidía ($p=0,002$) y menor fase S ($p<0,0001$). Los receptores de progesterona se correlacionan con la positividad para la proteína p53, el 26,7% de los tumores RP positivos son positivos para la p53, frente al 47,3% de los tumores RP negativos ($p=0,02$).

Como en el caso de los RE, la tendencia es que los RP positivos tengan mejor pronóstico que los RP negativos (*figura 4.14*), pero tampoco alcanza la significación estadística en ningún suceso, aunque se acerca ella para la supervivencia libre de metástasis ($p=0,07$) y la supervivencia específica ($p=0,07$). El efecto de los altos niveles de positividad no aparece en los receptores de progesterona.

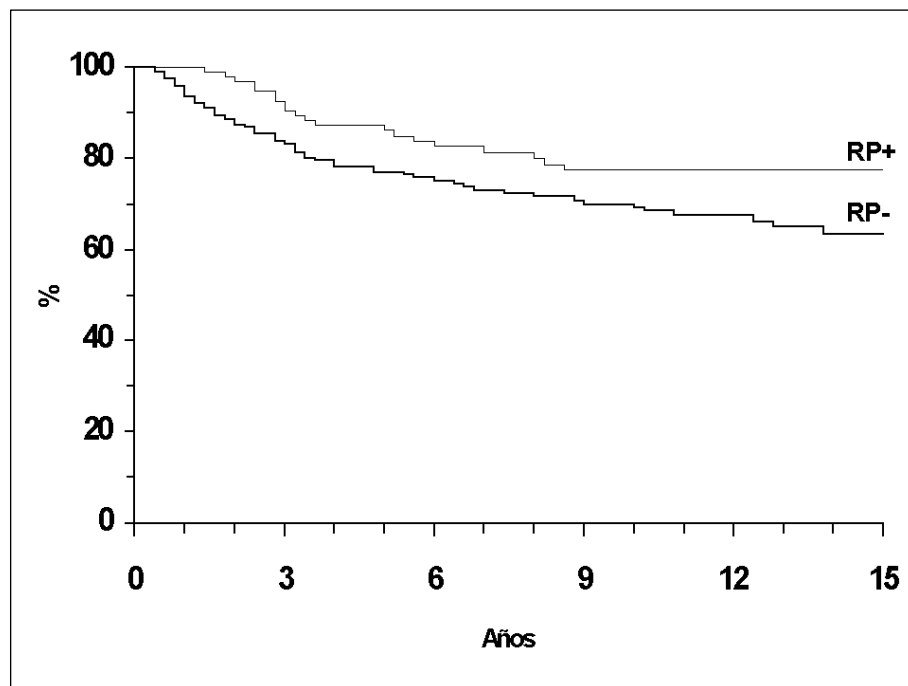


Figura 4.14: Supervivencia libre de metástasis según los receptores de progesterona ($p=0,07$).

4.1.13.3. – Valor conjunto de los receptores.

La *tabla 4.15* muestra la determinación conjunta de los receptores de estrógenos y de progesterona.

		RP	
		Positivos	Negativos
RE	Positivos	92	46
	Negativos	2	121

Tabla 4.15: Determinación conjunta de RE y RP.

El grupo de RE positivos y RP negativos tiene un comportamiento pronóstico igual al del grupo RP negativos, por lo que la valoración conjunta de ambos receptores no parece añadir valor a la determinación aislada de los receptores de progesterona.

4.1.14. – CITOMETRÍA DE FLUJO.

4.1.14.1. – Ploidía.

La determinación de la ploidía no se pudo realizar por problemas técnicos en 13 casos; el histograma de la distribución del índice de DNA (DI) se puede ver en la *figura 4.15*.

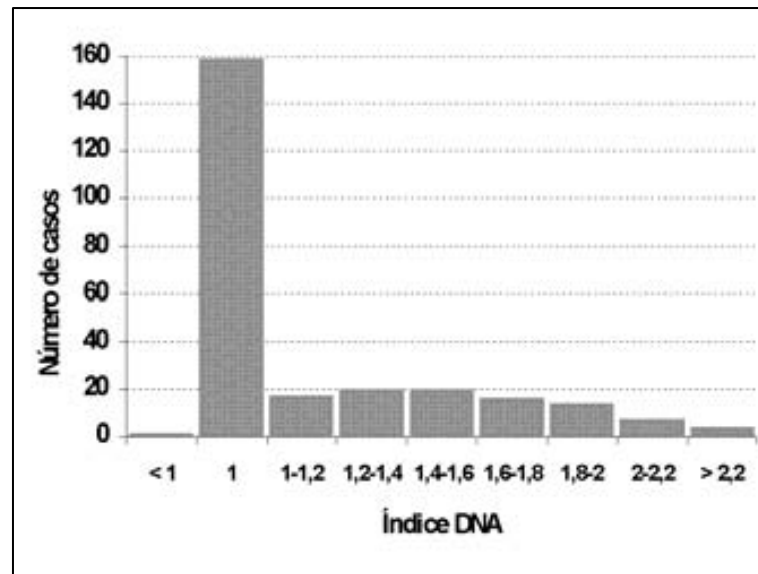


Figura 4.15: Distribución de número de casos según el índice de DNA.

La media de índice de DNA para la población aneuploide fue de 1,52 (rango 1,08 – 3,28)

La distribución por categorías se hizo siguiendo las recomendaciones de Wenger¹²², y se describe en la *tabla 4.16*.

Categoría	DI	Número	%
Hipodiploide	< 1	1	0,4
Diploide	1	149	57,8
Near-diploide	1,01-1,2	12	4,7
Hiperdiploide	1,21-1,85	64	24,8
Tetraploide	1,86-2,05	13	5
Hipertetraploide	> 2,05	9	3,5
Multiploide	*	10	3,9

(* más de una población celular)

Tabla 4.16: Distribución de la ploidía.

Para dicotomizar la variable se agruparon los diploides y near-diploides, dado su idéntico comportamiento clínico, vs. el resto de aneuploides, quedando por tanto 151 casos euploides (62,5%) y 107 aneuploides (37,5%).

Como ya se ha descrito anteriormente, la euploidía se correlaciona con el menor grado histológico y con la positividad de los RE y RP. No se correlaciona con la expresión de la proteína HER-2/neu o de la proteína p53.

Con la dicotomización en euploides y aneuploides, la ploidía es un potente factor pronóstico para todos los sucesos (*tablas 4.17 y 4.18, figuras 4.16 y 4.17*).

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	P
Supervivencia libre de enfermedad	Euploide	1		0,008
	Aneuploide	1,716	(1,145-2,572)	
Supervivencia libre de metástasis	Euploide	1		0,0002
	Aneuploide	2,268	(1,449 - 3,550)	
Supervivencia específica	Euploide	1		<0,0001
	Aneuploide	2,634	(1,630 - 4,256)	

Tabla 4.17: RR y significación para la ploidía (euploide vs aneuploide).

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	Euploide	81,20%	72,42%	65,48%
	Aneuploide	62,46%	53,83%	53,83%
Supervivencia libre de metástasis	Euploide	87,38%	79,40%	73,20%
	Aneuploide	65,96%	57,08%	54,88%
Supervivencia específica	Euploide	93,70%	84,49%	76,57%
	Aneuploide	77,82%	62,04%	54,22%

Tabla 4.18: Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años para la ploidía.

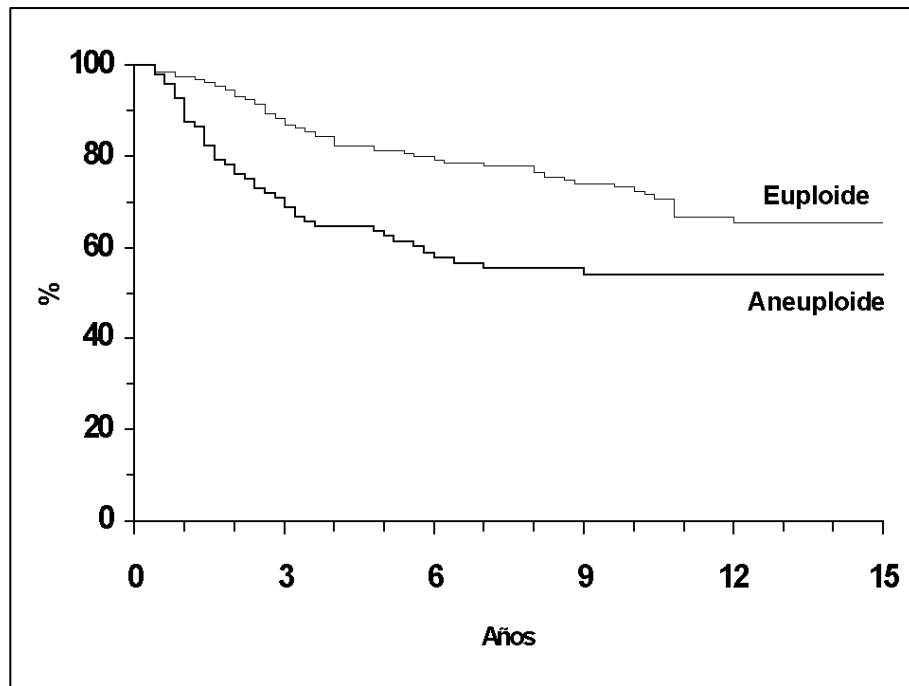


Figura 4.16: Supervivencia libre de enfermedad según ploidía ($p=0,008$).

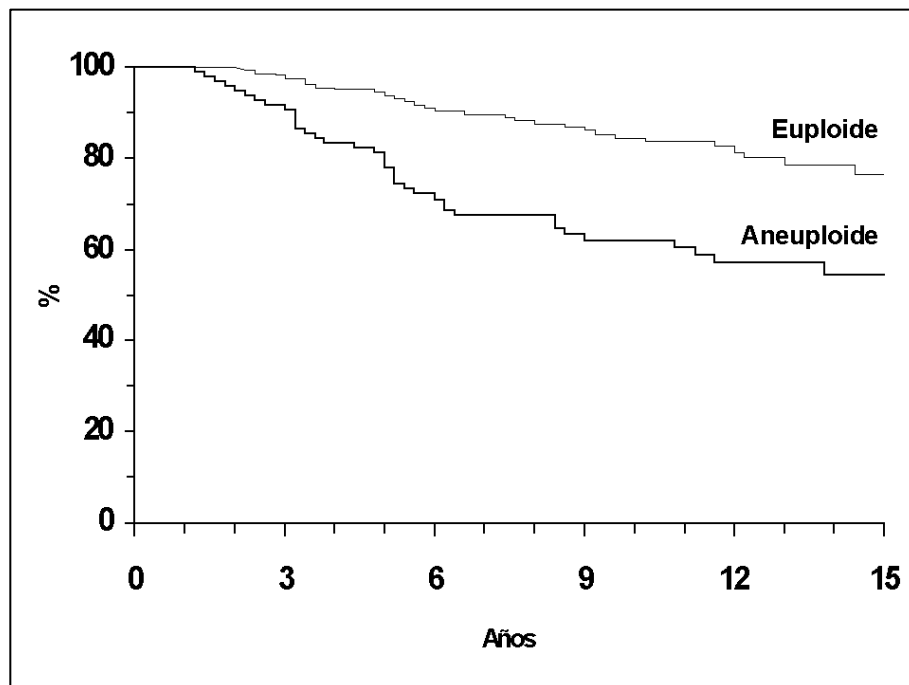


Figura 4.17: Supervivencia específica según ploidía ($p<0,0001$).

Al igual que con la variable edad, el índice de DNA es una variable continua, por lo que se ha testado su valor pronóstico como tal. Entre las transformaciones probadas, también el *cubic spline* es la que mejor se adecua al valor pronóstico, para la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,0005$), la supervivencia libre de metástasis ($p=0,0002$) y supervivencia específica ($0,0001$). Sin embargo, en esta variable la introducción en el análisis del valor continuo con la transformación *cubic spline*, no añade un valor pronóstico importante al de la dicotomización.

La *figura 4.18* muestra la relación del índice de DNA con transformación *cubic spline* con el riesgo relativo de recurrencia y de mortalidad. El riesgo relativo de la zona near-diploide es similar al de los tumores diploides, aumenta hacia un pico máximo alrededor del DI 1,4-1,6, disminuye ligeramente en la zona tetradiploide, para aumentar luego de manera importante. La observación de ésta curva apoya la dicotomización realizada en el análisis previo.

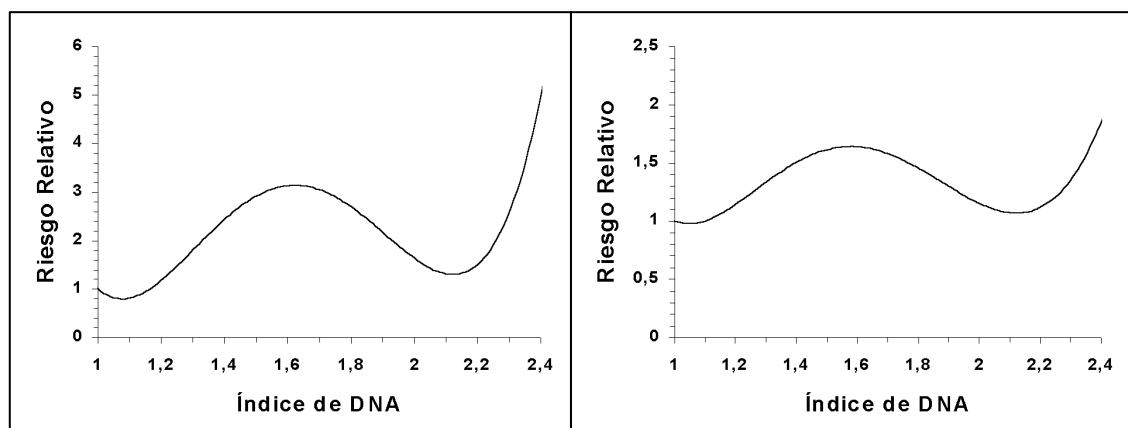
**A****B**

Figura 4.18: Representación de la transformación *cubic spline* con relación al índice de DNA y el riesgo relativo de recurrencia (A) y de mortalidad (B). La transformación para el riesgo relativo de metástasis es superponible a la de mortalidad.

4.1.14.2. – Fase S.

La determinación de la cinética celular solo se pudo realizar en 162 casos (59,8%). En el resto de los casos, el exceso de desechos celulares o la falta de muestra representativa de tumor hizo que el resultado de la cinética celular no fuera válido.

La población seleccionada por el hecho de disponer de Fase S no muestra diferencias significativas en ninguna de las características clínicas patológicas o de expresión de oncogenes, respecto a toda la población estudiada. La única característica con mínimas diferencias es la tasa de tumores euploides, que es del 57,8% para toda la serie frente al 63% de la población con fase S válida, resultado por otra parte lógico ya que es habitual que sea en los tumores aneuploides donde se concentren al máximo las dificultades técnicas para poder realizar la fase S.

La mediana del coeficiente de variación en los 162 casos fue de 7,8% (rango 4 – 9,9%). La fase S media de todos los casos válidos fue de 13,84% (rango 3,12 – 29,5%). Para la población euploide la media fue de 10,4% (rango 3,12 – 28,6%), y para la población aneuploide de 16,9% (4,26 – 29,5%).

Las fases S altas se correlacionan con el mayor tamaño tumoral ($p=0,0001$), mayor grado histológico ($p=0,001$), mayor necrosis ($p<0,0001$), negatividad de RE ($p<0,0001$) y RP ($p<0,0001$), índice de DNA más alto ($p<0,0001$), y positividad de p53 ($p=0,003$).

La búsqueda del punto de mejor corte para toda la población con fase S conocida (*figura 4.19*) concluyo en con el valor del 14% como mejor discriminador pronóstico.

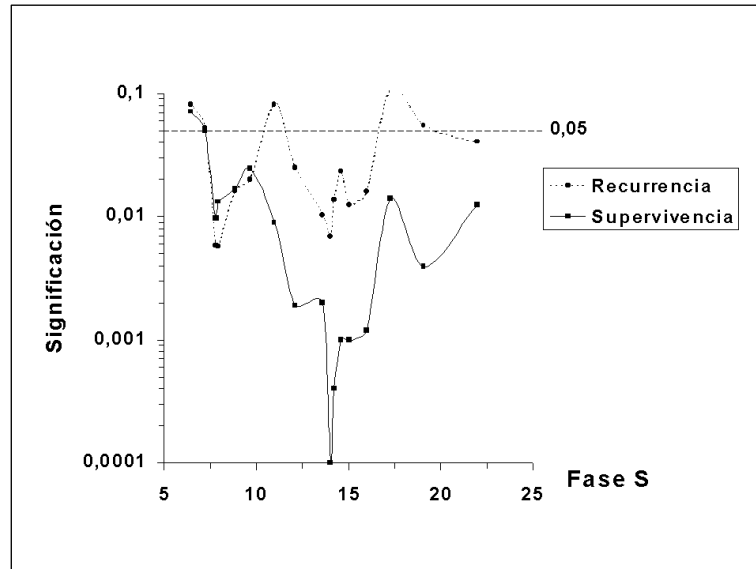


Figura 4.19: Grado de significación para diferentes puntos de corte de la fase S.

Con esta dicotomización, la fase S es factor pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de metástasis y supervivencia específica (*tablas 4.19 y 4.20, figuras 4.20 y 4.21*).

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	P
Supervivencia libre de enfermedad	Baja	1		0,0069
	Alta	2,011	(1,199 - 3,372)	
Supervivencia libre de metástasis	Baja	1		0,0004
	Alta	2,790	(1,536 - 5,067)	
Supervivencia específica	Baja	1		0,0001
	Alta	3,271	(1,717 - 6,230)	

Tabla 4.19: RR y significación para la fase S (baja vs alta).

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	Baja	83,29%	70,91%	69,04%
	Alta	63,29%	53,95%	51,88%
Supervivencia libre de metástasis	Baja	90,91%	84,51%	76,82%
	Alta	65,71%	57,18%	54,09%
Supervivencia específica	Baja	96,66%	89,07%	79,11%
	Alta	74,5%	59,88%	57,71%

Tabla 4.20: Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años para la fase S.

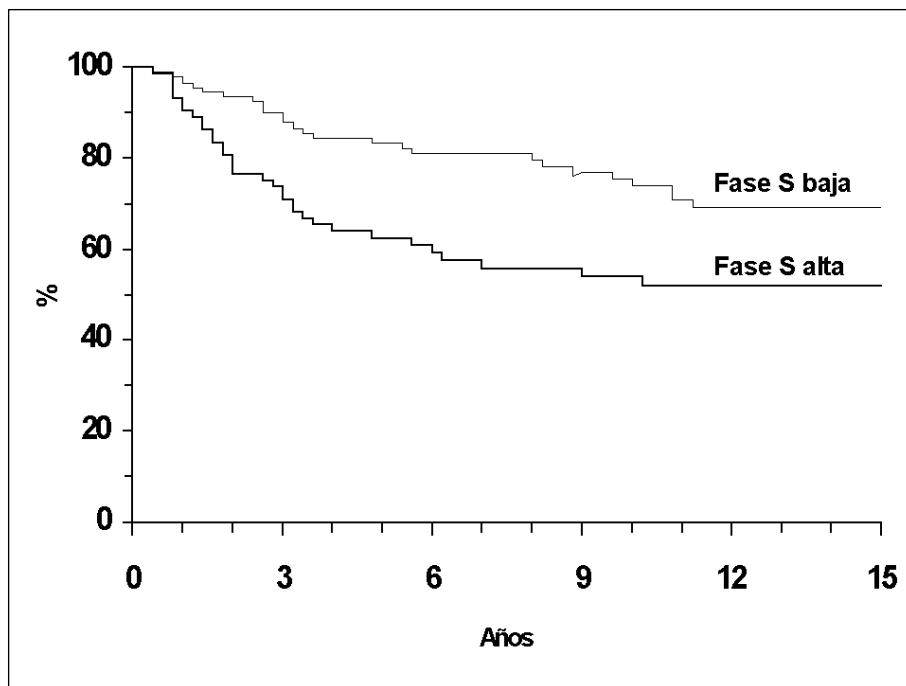


Figura 4.20: Supervivencia libre de enfermedad según la fase S ($p=0,0069$).

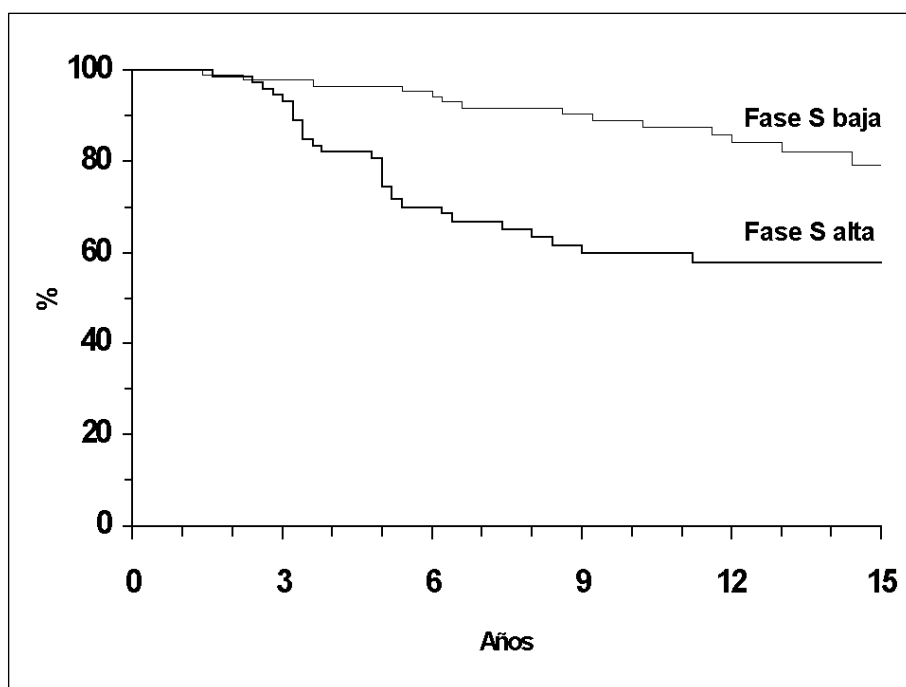


Figura 4.21: Supervivencia específica según la Fase S ($p=0,0001$).

Al ser la fase S una variable continua, también se ha analizado como tal, introduciéndola de forma lineal. De esta manera, la fase S es también un factor pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,0058$), la supervivencia libre de metástasis ($p=0,0008$), y la supervivencia específica ($p=0,0003$). Comparando estos valores con los de la *tabla 4.19*, no hay una mejoría notable en su valor pronóstico respecto a la variable dicotomizada.

Siguiendo las recomendaciones del Consenso del uso de la Citometría en cáncer de mama¹²³, se buscó el punto de corte de máxima significación pronóstica por separado en los tumores euploides y en los tumores aneuploides. El mejor punto de corte fue 7,8% en los euploides, con una significación de $p=0,016$ para la supervivencia libre de enfermedad y $p=0,036$ para la supervivencia global. En los tumores aneuploides no se encontró un punto de corte con valor pronóstico, probablemente debido al bajo número de casos (54 pacientes); con el valor del 14%, solo el 28,7% de los tumores euploides tenían una fase S baja.

4.1.15. – SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER-2/NEU.

La sobreexpresión de la proteína Her-2/neu se pudo determinar en 247 pacientes (90,1%) del total. El porcentaje de células teñidas se refleja en la *tabla 4.21*.

% Tinción	Nº de pacientes	%
NEGATIVO (< 5%)	201	81,4
5-20%	3	1,2
20-50%	15	6,1
> 50%	28	11,3

Tabla 4.21: Porcentaje de tinción celular por Her-2/neu.

Al considerar positiva toda tinción superior al 5%, son negativos para Her-2/neu 201 pacientes (81,4%), y positivos 36 pacientes (19,6%).

La positividad para HER-2/neu solo se correlaciona con la presencia de componente intraductal asociado ($p=0,024$) y el infiltrado linfoplasmocitario ($p=0,04$), con una tendencia a que las pacientes pre y perimenopáusicas tengan más tumores positivos ($p=0,07$).

La presencia de positividad para la proteína HER-2/neu no es un factor pronóstico significativo en ninguno de los sucesos analizados, sin presentar tan solo una tendencia estadística a ello. La búsqueda de un mejor punto de corte que el del 5% de células teñidas tampoco ofreció resultados positivos.

4.1.16. – SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53.

La sobreexpresión de la proteína p53 se pudo determinar en 263 casos. La distribución por intensidad de tinción y porcentaje de células con tinción nuclear se describen en las *tablas 4.22 y 4.23*.

Intensidad tinción	Número	%
Negativa	158	60,1
Débil	38	14,4
Moderada	52	19,8
Intensa	15	5,7

Tabla 4.22: Intensidad de tinción por p53.

% tinción	Número	%
NEGATIVA (< 5%)	158	60,1
5-20%	24	9,1
20-40%	41	15,6
40-60%	32	12,2
> 60%	8	3

Tabla 4.23: Porcentaje de tinción por p53.

La valoración de la expresión de la proteína p53 se realizó mediante un histocore de intensidad + porcentaje, los resultados de esta valoración de reflejan en la *tabla 4.24*.

Histocore p53	Número	%
0	158	60,1
2	18	6,8
3	19	7,2
4	31	11,8
5	21	8
6	13	4,9
7	3	1,1

Tabla 4.24: Distribución del Histocore de la p53.

14.1.16.1. – Correlación con otras variables.

– Edad y menopausia.

La positividad para p53 no se correlaciona con la edad ni con el estado menopáusico, el 40,9% de las pre y perimenopáusicas son p53 positivas frente al 39,2% de las postmenopáusicas.

– Receptores hormonales.

El 29,5% de las pacientes RE positivos frente al 51,2% de los RE negativos, son p53 positivas ($p=0,0004$); igualmente, el 26,7% de los tumores RP positivos frente al 47,3% de los RP negativos, son p53 positivos ($p=0,0013$).

– Ploidía y fase S.

Hay una tendencia a las diferencias significativas ($p= 0,13$) en la positividad para la p53 entre los tumores euploides (36,6%) y los aneuploides (46,2%). Hay una clara diferencia respecto a la fase S, el 25,8% de los tumores con fase S baja frente al 55,1 de los tumores con fase S alta, son positivos para la p53 ($p=0,0001$). La media de la fase S para los tumores

p53 negativos es de 10,3% (rango 3,12 – 28,6%), y para los tumores p53 positivos de 15,7 (rango 3,9 – 29,5%).

– Características histopatológicas.

La *tabla 4.25* resume las correlaciones de la p53 con las características histopatológicas.

Característica	Categoría	Casos con p53 positiva	P
Tipo histológico	Ductal	33,6%	0,04
	Lobulillar	7,1%	
Tamaño	< 1 cm.	19%	0,004
	1,1-2 cm.	30%	
	> 2 cm.	47,5%	
Grado histológico	1	20,9%	0,0004
	2	4,3%	
	3	52,9%	
Permeación vascular	No	39,9%	0,99
	Sí	40%	
Permeación linfática	No	39,3%	0,62
	Sí	43,2%	
Desmoplasia	No	37,1%	0,35
	Sí	42,7%	
Inf. Linfoplasmocitaria	No	32,4%	0,004
	Sí	48,8%	
Necrosis	No	33,3%	0,004
	Si	51%	
Componente intraductal	No	42,2	0,36
	Si	36,7	

Tabla 4.25: Correlaciones de la p53 con las características histopatológicas.

Entre los componentes del grado, el que mejor se correlaciona con la p53 es el índice mitótico ($p=0,0016$).

– Sobreexpresión de la proteína Her-2/neu.

No hay relación entre la expresión de los dos oncogenes, el 30,5% de los tumores HER-2/neu negativos y el 37,8% de los tumores Her-2/neu positivos, expresan positividad para la p53 ($p=0,93$). Solo en 17 casos de los 240 en que se conocen ambos factores, los tumores son positivos para las dos proteínas.

14.1.16.2. – Valor pronóstico.

El punto de corte para definir la positividad de la sobreexpresión de p53 se estableció en el valor >2 del histocore de la p53. En este valor se alcanzaba la máxima significación pronóstica. De hecho, la población con un porcentaje de células marcadas del 5 al 20% e intensidad de tinción leve (histocore 2), presentan tasas de recurrencia y supervivencia igual a la población con histocore 0.

Usando este punto de corte, la tasa de positividad para la p53 es del 33,1% (87 pacientes de 263 en que se conoce la variable). La positividad de la proteína p53 es un importante factor pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de metástasis y supervivencia específica. (tablas 4.26 y 4.27, figuras 4.22, 4.23 y 4.24).

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	P
Supervivencia libre de enfermedad	Negativo	1		0,0001
	Positivo	2,225	(1,473 - 3,359)	
Supervivencia libre de metástasis	Negativo	1		0,0001
	Positivo	2,447	(1,545 - 3,874)	
Supervivencia específica	Negativo	1		0,0001
	Positivo	2,606	(1,594 - 4,260)	

Tabla 4.26: RR y significación para la p53 (negativo vs positivo).

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	Negativo	82,74%	74,41%	71,45%
	Positivo	62,81%	53,97%	47,06%
Supervivencia libre de metástasis	Negativo	87,90%	80,36%	76,98%
	Positivo	67,45%	58,47%	53,51%
Supervivencia específica	Negativo	93,04%	84,87%	77,30%
	Positivo	80,15%	65,30%	55,69%

Tabla 4.27: Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años para la p53.

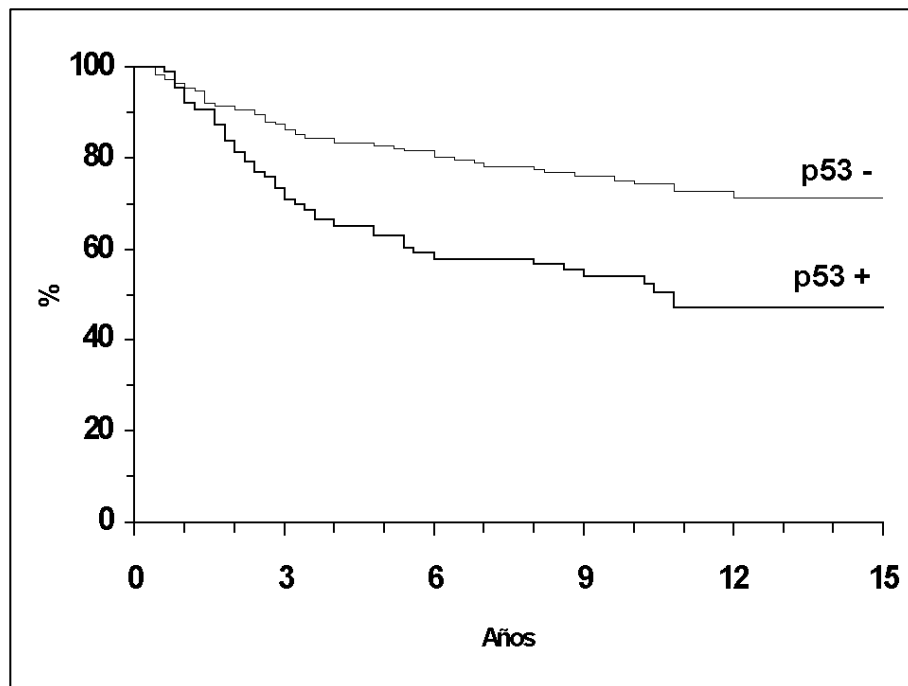


Figura 4.22: Supervivencia libre de enfermedad según la p53 (p=0,0001).

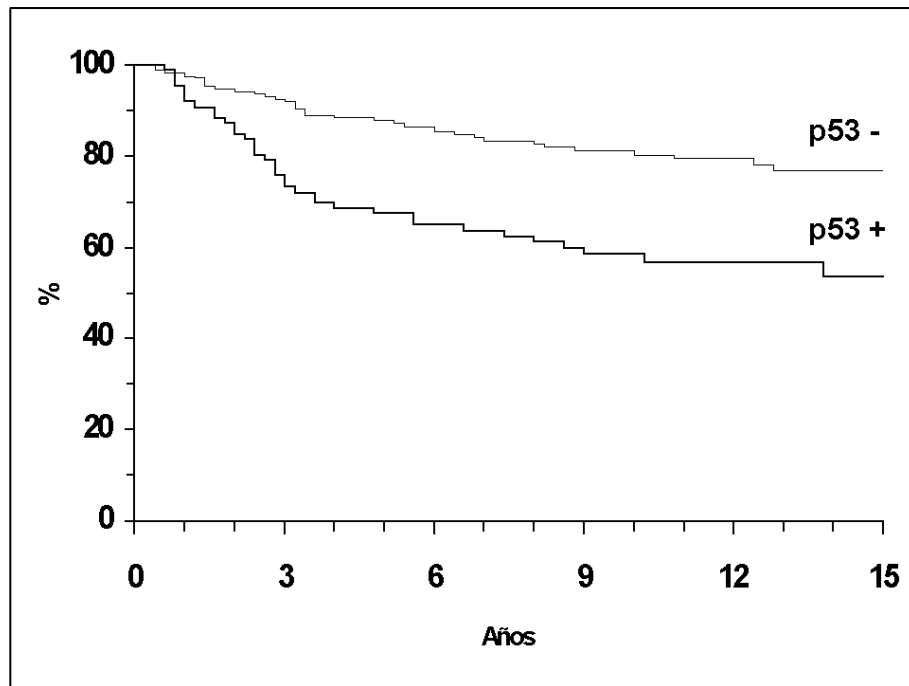


Figura 4.23: Supervivencia libre de metástasis según la p53 (p=0,0001).

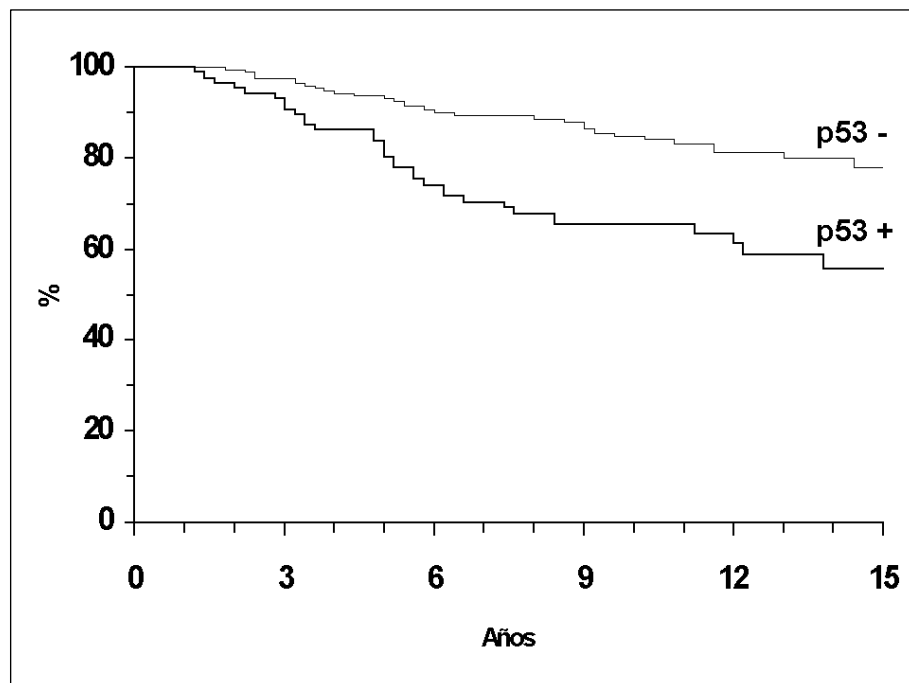


Figura 4.24: Supervivencia específica según la p53 (p=0,0001).

Dentro del grupo de tumores p53 positivos, también hay diferencias pronósticas según la menor o mayor sobreexpresión de p53, dividiéndola en histocore 3-5 (+) e histocore 6-7 (++). Con esta división, de los 87 pacientes p53 positivos, 71 pacientes son p53 + y 16 p53 ++. Las diferencias son significativas en la supervivencia libre de enfermedad, quedando en la marginalidad para la supervivencia libre de metástasis y la supervivencia específica, probablemente por el escaso número de casos (*tablas 4.28 y 4.29, figura 4.25*).

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	P
Supervivencia libre de enfermedad	+	1		0,015
	++	2,300	(1,151 - 4,595)	
Supervivencia libre de metástasis	+	1		0,11
	++	1,813	(0,854 - 3,850)	
Supervivencia específica	+	1		0,12
	++	1,820	(0,845 - 3,918)	

Tabla 4.28: RR y significación para la p53, según la menor o mayor expresión (+ vs ++).

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	+	69,01%	59,93%	51,42%
	++	33,48%	25,11%	25,11%
Supervivencia libre de metástasis	+	70,21%	61,95%	56,05%
	++	54,84%	40,22%	40,22%
Supervivencia específica	+	82,98%	66,87%	61,18%
	++	87,10%	69,70%	33,26%

Tabla 4.29: Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años para la p53, según la menor o mayor expresión.

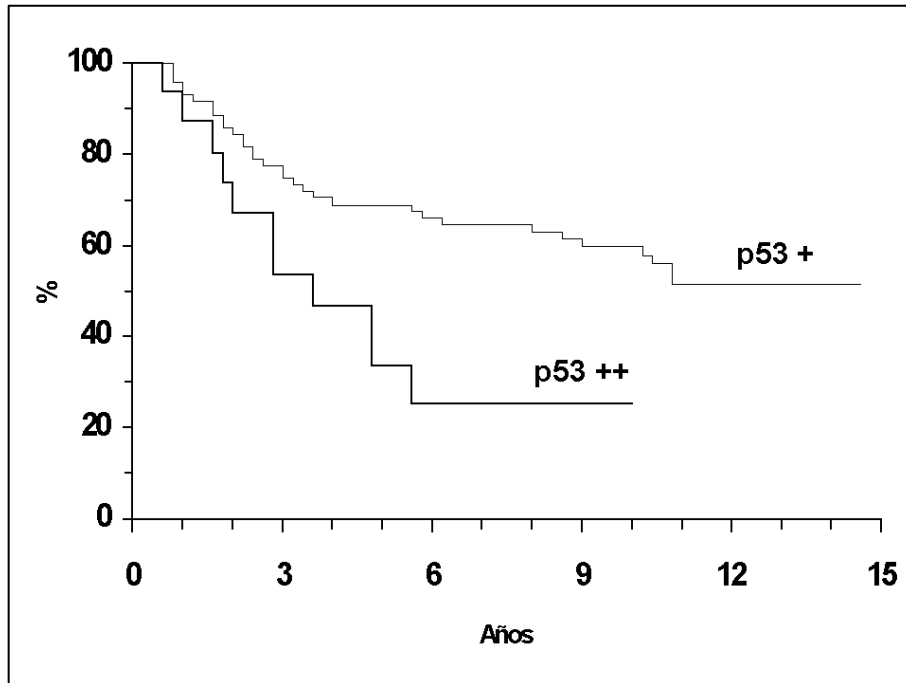


Figura 4.25: Supervivencia libre de enfermedad según la menor o mayor expresión de p53 ($p=0,015$).

La expresión de la p53 es el único factor pronóstico en el subgrupo de pacientes con tumores pT1 en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,04$), supervivencia libre de metástasis ($p=0,0013$), y supervivencia específica ($p < 0,0001$).

4.2. – ANALISIS MULTIVARIADO.

En el análisis multivariado, realizado según el método de Cox, se realizaron múltiples modelos hasta hallar el de mayor ajuste. Inicialmente se introdujo entre las variables la Fase S como variable dicotómica, pero dado que no resultaba factor pronóstico para ningún suceso, no variaba los resultados finales, y disminuía el número de casos de una manera notable, los modelos finales se realizaron sin introducir esta variable para mejorar la significación estadística. Para cada suceso se presenta un modelo final realizado con las variables dicotómicas con valor significativo en el análisis univariado, e introduciendo la edad como variable continua con transformación *cubic spline*. Los análisis se realizaron sobre un total de 252 pacientes de los que se disponían de todos los datos.

4.2.1. – SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD.

La *tabla 4.30* resume las variables con valor significativo en el estudio univariado.

Variable	Categoría	p
Edad	*	0,0013
Tamaño tumoral	pT1 vs. pT2-3	< 0,0001
Ploidía	Euploide vs. aneuploide	0,008
p53	Negativo vs. positivo	0,0001
Fase S	Baja vs. alta	0,0069

* Introducida como *cubic spline*.

Tabla 4.30: Variables significativas en el estudio univariado para la supervivencia libre de enfermedad.

El modelo final de la regresión de Cox (sin incluir la fase S) se refleja en la *tabla 4.31*.

Variable	Categoría	RR	IC 95%	P
Tamaño	pT1	1		0,0002
	pT2-3	2,595	(1,564 - 4,301)	
Edad	<i>Cubic spline</i>	1,475	(1,156 - 1,883)	0,0018
p53	Negativo	1		0,0082
	Positivo	1,767	(1,158 - 2,696)	
Ploidia	Euploide	1		0,036
	Aneuploide	1,566	(1,028 - 2,385)	

Tabla 4.31: Factores significativos en el análisis multivariado para la supervivencia libre de enfermedad.

4.2.2. – SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL.

Los dos únicos factores que tienen valor pronóstico significativo en la aparición de una recidiva local como primera manifestación de enfermedad recurrente son la localización de tumor en cuadrantes internos ($p=0,025$) y la edad menor de 45 años ($p=0,02$). En el análisis multivariado, ambas mantienen su valor pronóstico (*tabla 4.32*).

Variable	Categoría	RR	IC 95%	p
Localización	Externos/línea media	1		0,0086
	Internos	2,838	(1,302 - 6,184)	
Edad	< 45 años	1		0,0076
	≥ 45 años	2,961	(1,334 - 6,572)	

Tabla 4.32: Factores significativos en el análisis multivariado para la supervivencia libre de recidiva local, como primera manifestación de enfermedad recurrente.

4.2.3. – SUPERVIVENCIA LIBRE DE METÁSTASIS.

La *tabla 4.33* resume las variables con valor significativo en el estudio univariado.

Variable	Categoría	p
Edad	*	0,019
Tamaño tumoral	pT1 vs. pT2-3	< 0,0001
Grado histológico	1 vs. 2-3	0,02
Ploidía	Euploide vs. aneuploide	0,0002
p53	Negativo vs. positivo	0,0001
Fase S	Baja vs. alta	0,0004

* Introducida como *cubic spline*.

Tabla 4.33: Variables significativas en el estudio univariado para la supervivencia libre de metástasis.

El modelo final de la regresión de Cox (sin incluir la fase S) se refleja en la *tabla 4.34*.

Variable	Categoría	RR	IC 95%	p
Tamaño	pT1	1		0,0001
	pT2-3	3,584	(1,915 - 6,705)	
Ploidia	Euploide	1		0,0067
	Aneuploide	1,895	(1,194 - 3,007)	
p53	Negativo	1		0,0070
	Positivo	1,901	(1,192 - 3,032)	
Edad	<i>Cubic spline</i>	1,3617	(0,999 - 1,854)	0,0502

Tabla 4.34: Factores significativos en el análisis multivariado para la supervivencia libre de metástasis.

4.2.4. – SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA.

La *tabla 4.35* resume las variables con valor significativo en el estudio univariado.

Variable	Categoría	P
Edad	*	0,013
Tamaño tumoral	pT1 vs. pT2-3	< 0,0001
Grado histológico	1 vs. 2-3	0,017
Ploidía	Euploide vs. aneuploide	< 0,0001
p53	Negativo vs. positivo	0,0001
Fase S	Baja vs. alta	0,0001

* Introducida como *cubic spline*.

Tabla 4.35: Variables significativas en el estudio univariado para la supervivencia específica.

El modelo final de la regresión de Cox (sin incluir la fase S) se refleja en la *tabla 4.36*.

Variable	Categoría	RR	IC 95%	p
Tamaño	pT1	1		0,0001
	pT2-3	4,209	(2,056 - 8,618)	
Ploidia	Euploide	1		0,0045
	Aneuploide	2,051	(1,249 - 3,367)	
p53	Negativo	1		0,0139
	Positivo	1,880	(1,136 - 3,112)	
Edad	<i>Cubic spline</i>	1,458	(1,032 - 2,060)	0,0321

Tabla 4.36: Factores significativos en el análisis multivariado para la supervivencia específica.

En resumen, el principal factor pronóstico para todos los sucesos es el tamaño tumoral patológico, seguido por la sobreexpresión de la p53 y la ploidía, con una tendencia a empeorar el pronóstico por la edad; en la supervivencia libre de enfermedad, el grupo de edad de menores de 40 años y mayores de 65-70 años; en la supervivencia libre de metástasis y la supervivencia específica, el grupo de mayores de 65-70 años.

4.3. – MODELOS DE FACTORES PRONÓSTICOS.

Dado que las tres principales variables pronóstica categorizables son el tamaño tumoral, la sobreexpresión de la p53 y la ploidía, se ha realizado un modelo con estos factores pronósticos para establecer grupos de riesgo.

4.3.1. – GRUPOS DE RIESGO PARA TODA LA SERIE.

Se han clasificado las pacientes en cuatro grupos de riesgo, según tengan ninguno, uno, dos o tres factores de riesgo; los factores de riesgo derivados del análisis multivariado son: tamaño tumoral > 2cm, presencia de sobreexpresión de la p53, y aneuploidía (*tabla 4.37*).

Grupo de riesgo	Número de factores adversos
Mínimo	0
Bajo	1
Medio	2
Alto	3

Tabla 4.37: Clasificación en grupos de riesgo.

Esta clasificación delimita perfectamente cuatro grupos de riesgo con altas diferencias estadísticas para la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia libre de metástasis y la supervivencia específica (*tablas 4.38 y 4.39, figuras 4.26, 4.27 y 4.28*).

Suceso	Categoría	RR	IC 95%	P
Supervivencia libre de enfermedad	Mínimo	1		< 0,0001
	Bajo	2,184	(1,039 - 4,631)	
	Medio	3,935	(1,887 - 8,163)	
	Alto	7,444	(3,335 - 16,618)	
Supervivencia libre de metástasis	Mínimo	1		< 0,0001
	Bajo	3,750	(1,291-10,890)	
	Medio	6,951	(2,440-19,800)	
	Alto	16,736	(5,650-49,578)	
Supervivencia específica	Mínimo	1		< 0,0001
	Bajo	6,159	(1,428-26,558)	
	Medio	13,511	(3,206-56,929)	
	Alto	27,905	(6,435-121,000)	

Tabla 4.38: RR y significación para los diferentes grupos de riesgo.

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	Mínimo	92,66%	88,67%	88,67%
	Bajo	81,49%	69,39%	65,49%
	Medio	66,32%	58,89%	50,74%
	Alto	42,31%	29,62%	29,62%
Supervivencia libre de metástasis	Mínimo	98,15%	94,19%	94,19%
	Bajo	88,00%	77,35%	70,71%
	Medio	71,54%	60,54%	60,54%
	Alto	42,31%	33,85%	29,62%
Supervivencia específica	Mínimo	100%	97,87%	97,87%
	Bajo	96,73%	83,98%	75,92%
	Medio	77,64%	67,33%	59,87%
	Alto	69,23%	41,03%	30,77%

Tabla 4.39. Tasas de supervivencia a los 5, 10 y 15 años, según los grupos de riesgo.

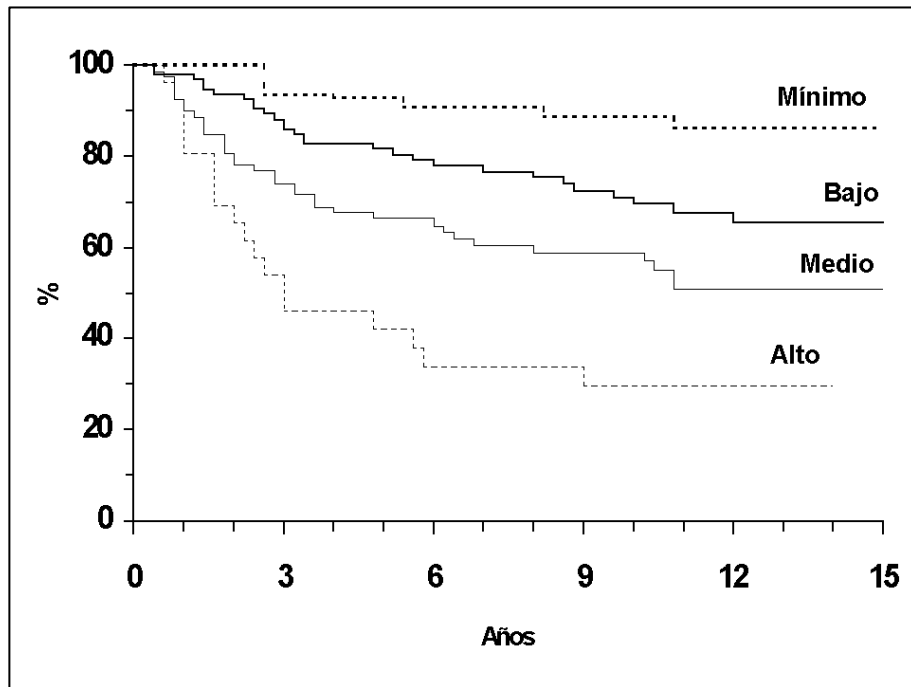


Figura 4.26: Supervivencia libre de enfermedad según la clasificación pronóstica ($p < 0,0001$).

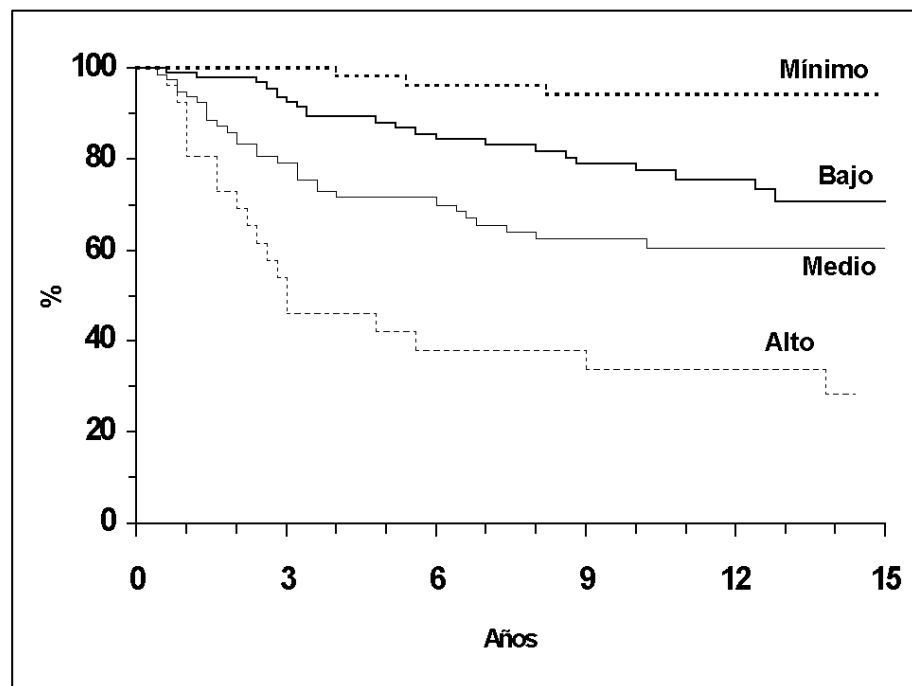


Figura 4.27: Supervivencia libre de metástasis según la clasificación pronóstica ($p < 0,0001$).

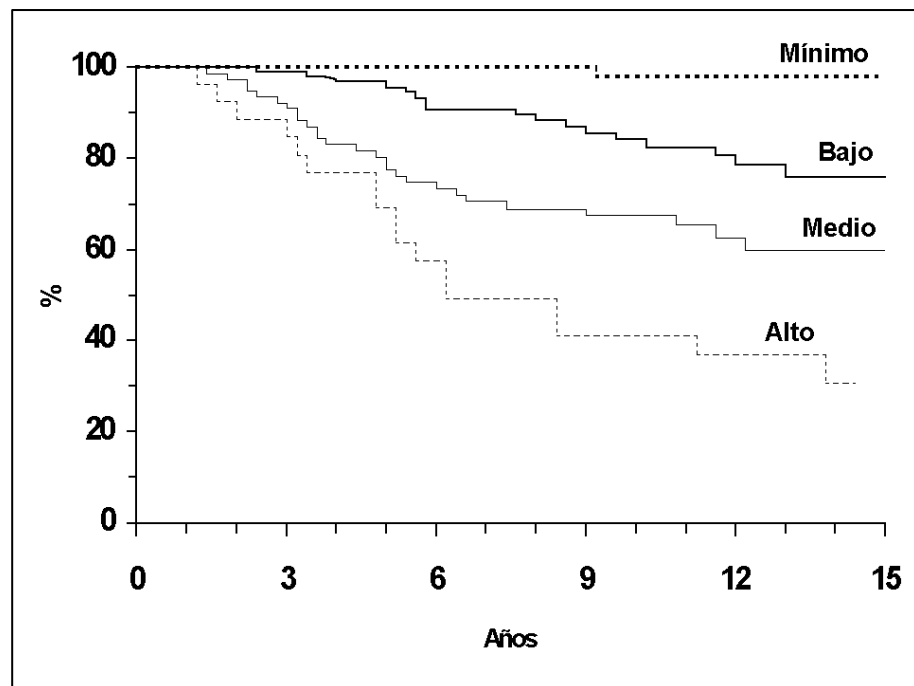


Figura 4.28: Supervivencia específica según la clasificación pronóstica ($p < 0,0001$).

4.3.2. – GRUPOS DE RIESGO PARA TUMORES pT1.

El principal factor pronóstico, y de hecho, el que se utiliza en la práctica clínica como primer discriminador a la hora de decidir el tratamiento, es el tamaño tumoral. Por eso se ha realizado un modelo pronóstico diferenciado para los tumores de tamaño ≤ 2 cm.

En el grupo de los tumores pT1 la ploidía carece de valor pronóstico. ($p=0,77$), por lo que el análisis se centra en el tamaño (pT1a-b vs. pT1c), y la sobreexpresión de la p53. Al igual que en el modelo previo, se ha realizado una clasificación en riesgo bajo, medio y alto, según tuvieran ninguno, uno o dos factores adversos.

Nuevamente hay una diferenciación clara entre los tres grupos de riesgo, lo que se refleja en la *tabla 4.40* y las *figuras 4.29* y *4.30*. No se

puede calcular el riesgo relativo, ya que en el primer grupo no hay eventos (supervivencia libre de metástasis y supervivencia específica).

Suceso	Categoría	5 años	10 años	15 años
Supervivencia libre de enfermedad	Bajo	94,12%	94,12%	94,12%
	Medio	90,42%	85,22%	82,92%
	Alto	76,19%	65,19%	65,19%
Supervivencia libre de metástasis	Bajo	100%	100%	100%
	Medio	96,80%	91,42%	91,42%
	Alto	80,49%	68,56%	68,56%
Supervivencia específica	Bajo	100%	100%	100%
	Medio	100%	96,38%	91,79%
	Alto	90,23%	79,26%	69,35%

Tabla 4.40 Tasas de supervivencia a 5, 10 y 15 años para los diferentes grupos de riesgo, en pT1.

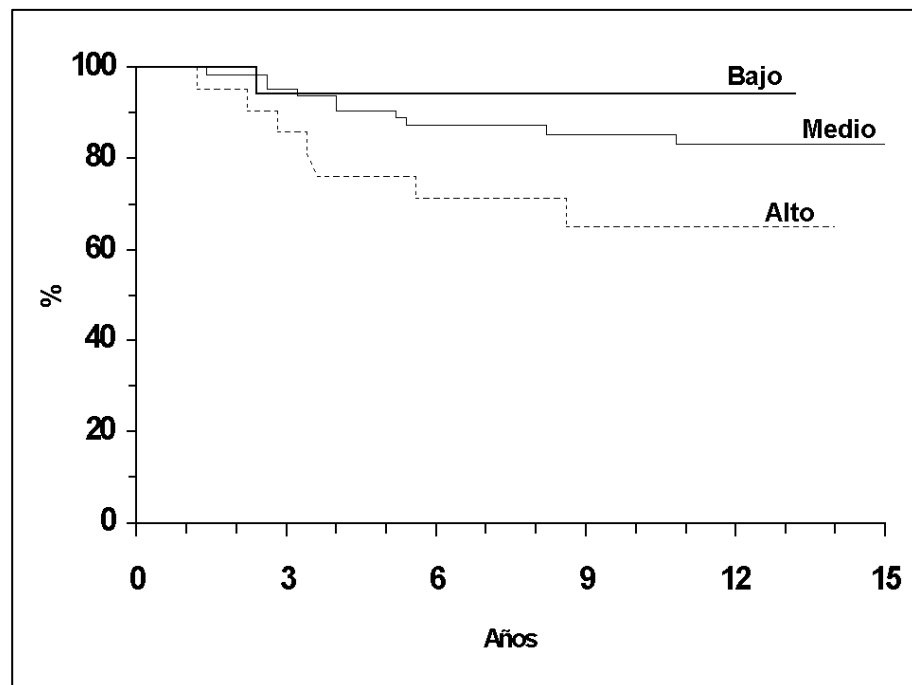


Figura 4.29: Supervivencia libre de enfermedad según grupos de riesgo en pT1 ($p=0,025$).

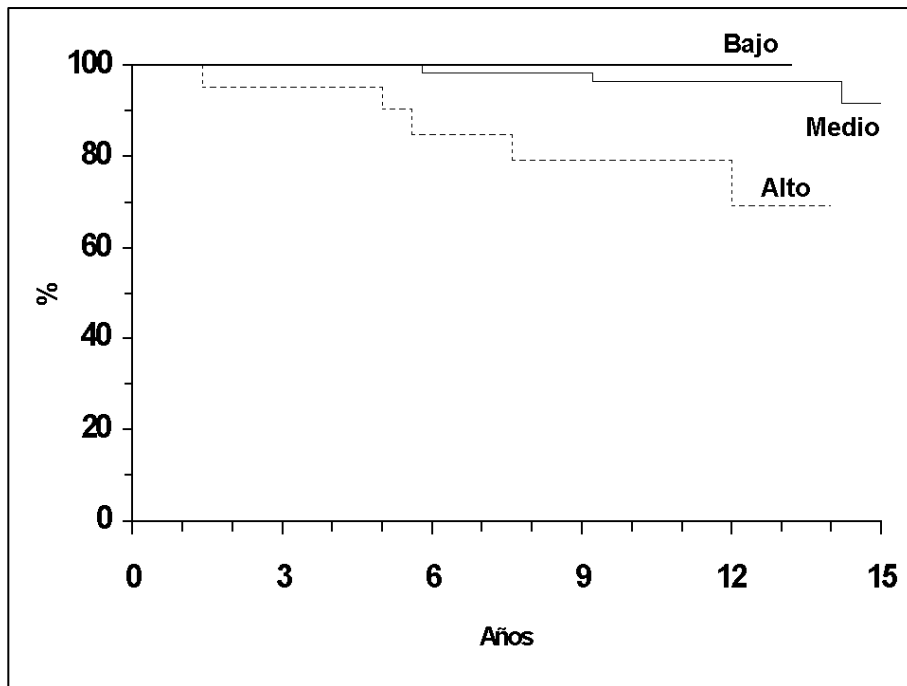


Figura 4.30: Supervivencia específica según grupos de riesgo en pT1 ($p=0,0009$).

4.4. – ANALISIS DESCRIPTIVO.

De la misma manera que Silvestrini²⁴³, se ha realizado un modelo de análisis descriptivo (*figura 4.31*) para investigar de que manera el uso simultáneo de varios factores puede mejorar el valor predictivo de los diferentes factores en solitario.

Para ello se seleccionan grupos con un mínimo de 15 pacientes con uno o más factores pronósticos determinados que definen tasas de recurrencia, y eliminando los que no añaden información pronóstica, adoptando como orden de preeminencia de factores en primer lugar el tamaño tumoral, en segundo la p53, tercero la ploidía, e incorporando en cuarto lugar la fase S, dado su importante poder en el estudio univariado.

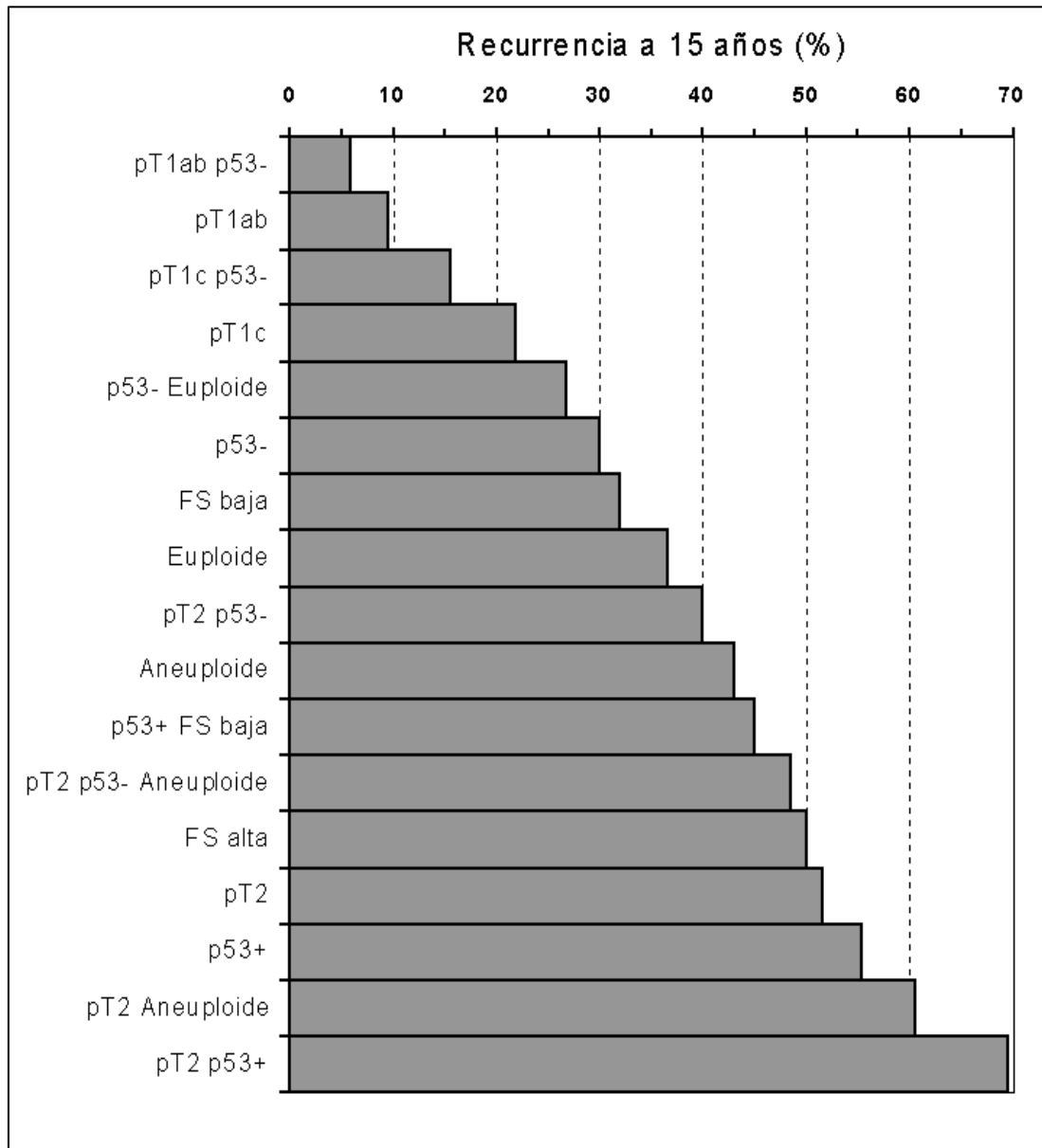


Figura 4.31: Probabilidad de recurrencia a 15 años según las diferentes variables, solas o en combinación.

4.5. – VARIACIONES TEMPORALES DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS.

La observación de las curvas de supervivencia sugiere que hay factores pronósticos cuyo valor varía a lo largo del tiempo. Varios autores opinan que el estudio de las variaciones temporales puede informar sobre los factores que influyen en las recurrencias tempranas y tardías, y por tanto sobre la agresividad biológica y la capacidad de metastatizar de los diferentes tumores, según sus características biológicas.

Para estudiar este problema se han utilizado simultáneamente tres métodos, primero el estudio de los factores que influyen en la recurrencia haciendo cortes temporales con seguimiento máximo de 3, 5 y 10 años; para ello, los pacientes que no han recurrido se consideran eventos censurados a final del periodo de estudio; segundo, dividiendo el seguimiento en dos periodos independientes, el primero que cubre los 5 primeros años del seguimiento, en el que aparecen 64 recurrencias del total (67%), y un segundo que cubre los años posteriores, en que ocurren 18 recurrencias (33%), y en el que las pacientes que han recurrido en el primer periodo se excluyen del análisis; y tercero, comparando las tasas de recurrencia anuales según los diferentes factores (representando gráficamente la tendencia, para evitar picos aislados).

El estudio de la tasa anual de recurrencia (*figura 4.32*) para toda la serie muestra un primer pico de recurrencias en los 2 – 3 primeros años, con un segundo pico menor en los años 10 – 11. La tasa anual media de recurrencia en los 5 primeros años es del 5,6%, mientras que el periodo 5 – 15 años es del 1,9%.

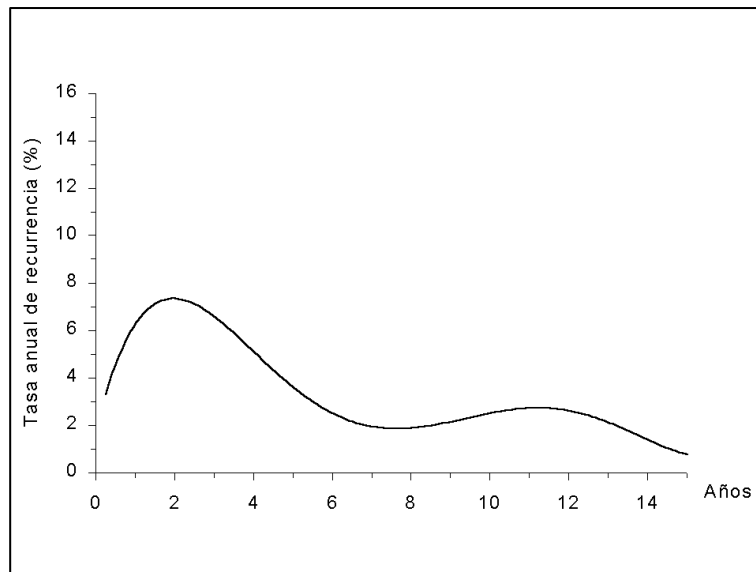


Figura 4.32: Representación de la tasa anual de recurrencia para todas las pacientes.

La edad al diagnóstico es un factor que mantiene su valor pronóstico, tanto al cortar el seguimiento a 5 ($p=0,03$) y 10 años ($p=0,02$), como con el seguimiento completo ($p=0,001$). Sin embargo no influye en las recurrencias ocurridas únicamente en el segundo periodo, ya que las tasas de recurrencia de los dos grupos (definidos por la transformación cubic spline) se superponen a partir del sexto año (*figura 4.33*).

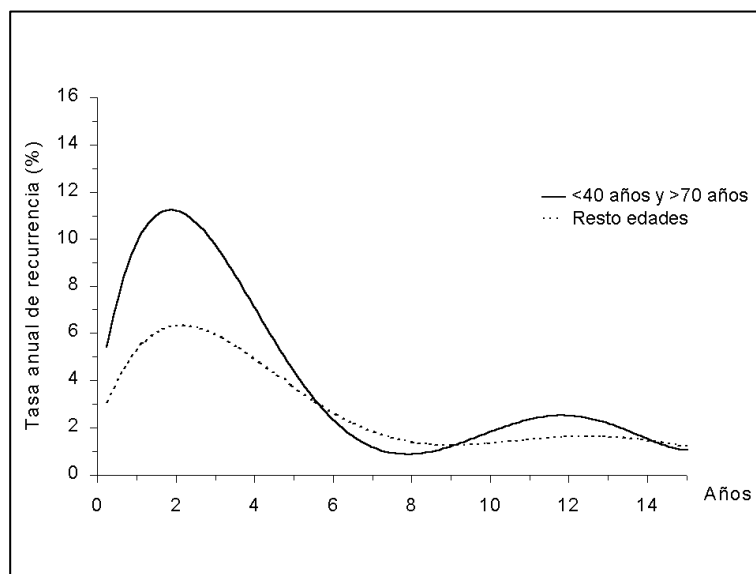


Figura 4.33: Representación de la tasa anual de recurrencia según la edad.

En el caso de los receptores, los RE no tienen valor pronóstico en ningún corte, mientras que los RP tienen valor a los 3 años ($p=0,0069$), que van perdiendo progresivamente a los 5 ($p=0,01$) y 10 años ($p=0,07$), desapareciendo al computar todo el seguimiento ($p=0,12$). En la *figura 4.34* se puede observar como las tasas de recurrencia son similares a partir del tercer año de seguimiento.

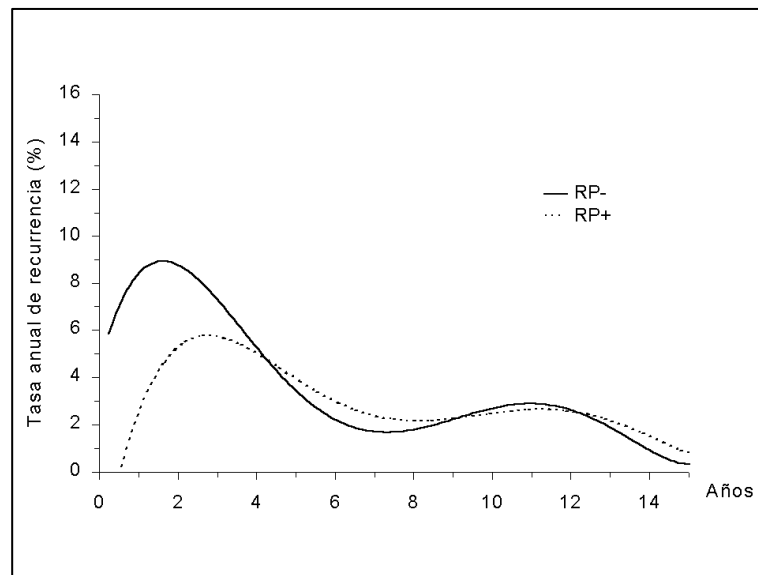


Figura 4.34: Representación de la tasa anual de recurrencia según los RP.

El grado histológico y la necrosis tienen un comportamiento similar al de los receptores, su inicial valor pronóstico disminuye conforme pasan los años, desapareciendo al computar todo el seguimiento. En la *figura 4.35* se puede observar como a partir del sexto año, la tasa de recurrencia de los tumores con grado 1 supera a la de los grados 2 y 3, sugiriendo que con más seguimiento, las tasas de recurrencia globales tiendan a igualarse.

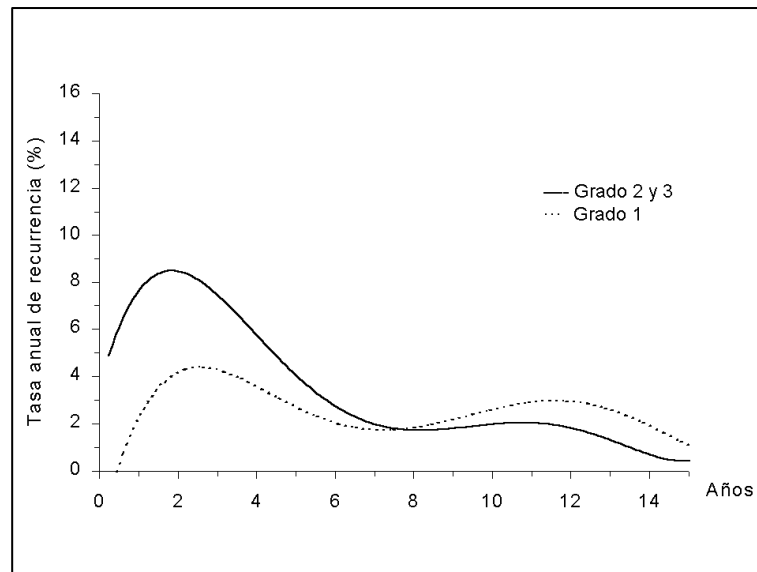


Figura 4.35: Representación de la tasa anual de recurrencia según el grado histológico.

La ploidía es un factor pronóstico con valor en todos los momentos del seguimiento, sin embargo existe una tendencia a disminuir su potencia a lo largo del tiempo ($p=0,0004$ a los 5 años y $p=0,008$ al completar el seguimiento). De hecho no es un factor que influya en las recurrencias posteriores al quinto año.

La *figura 4.36* muestra que en los primeros 5 años hay una gran diferencia entre las tasas de recurrencia de tumores euploides y aneuploides, pero que a partir de entonces tienden a igualarse, e incluso a partir del octavo año de seguimiento, la tasa de recurrencia de los tumores euploides se mantiene de forma continua alrededor del 2 - 3% anual, mientras que es prácticamente nula para los tumores aneuploides.

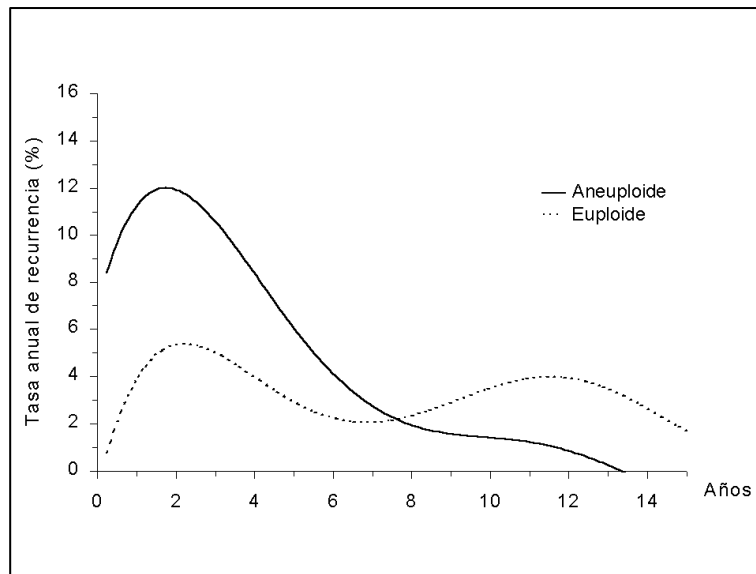


Figura 4.36: Representación de la tasa anual de recurrencia según la ploidía.

La fase S sigue el mismo comportamiento que la ploidía, mantiene su poder pronóstico al fin del seguimiento, pero su máximo valor se encuentra en los 5 primeros años, en este caso las tasas de recurrencia tienden a igualarse a partir del séptimo año (figura 4.37).

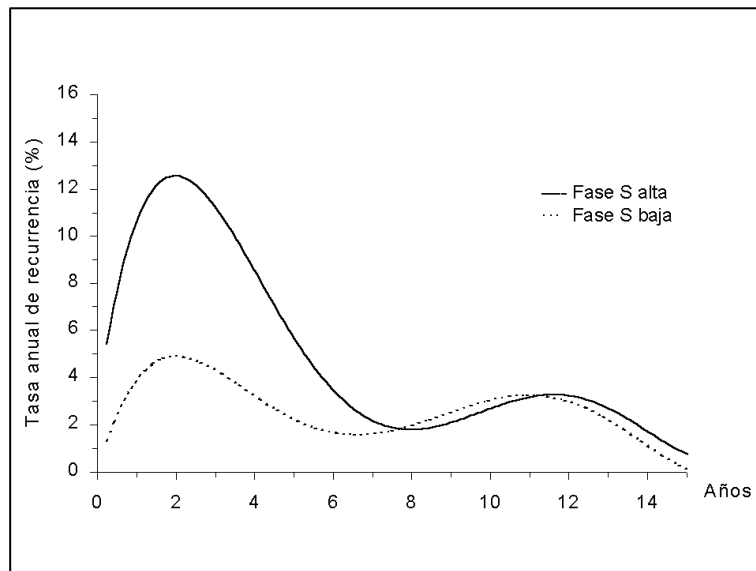


Figura 4.37: Representación de la tasa anual de recurrencia según la fase S.

La sobreexpresión de la proteína p53 tiene valor pronóstico en todos los momentos del seguimiento, tendiendo a aumentarlo conforme pasa el tiempo ($p=0,0008$ a los 5 años y $p=0,0001$ al final del seguimiento). Es un potente factor para predecir el comportamiento tumoral en los 5 primeros años, y en el segundo periodo de seguimiento se acerca a la significación estadística ($p=0,07$), sugiriendo que su valor pronóstico se extiende a todo el intervalo del seguimiento (*figura 4.38*).

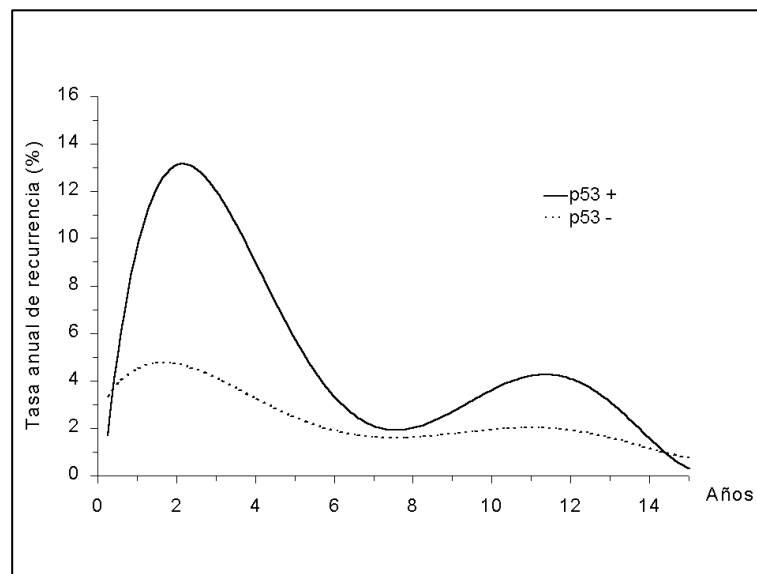


Figura 4.38: Representación de la tasa anual de recurrencia según la p53.

El tamaño tumoral es el factor que presenta un máximo valor como factor pronóstico a lo largo de todo el seguimiento, manteniéndolo a lo largo del tiempo y siendo el único factor que tiene significación estadística para predecir las recurrencias tardías ($p=0,015$). En la *figura 4.39* se ve que la tasa de recurrencia de los tumores mayores de 2 cm es siempre superior a la de los tumores más pequeños; en los 5 primeros años, la tasa media de recurrencia de los tumores pT2-3 es 7,75% mientras que es 2,5% para los tumores pT1, en el periodo posterior a los 5 años, es 3,5% para los pT2-3 y 0,8% para los pT1.

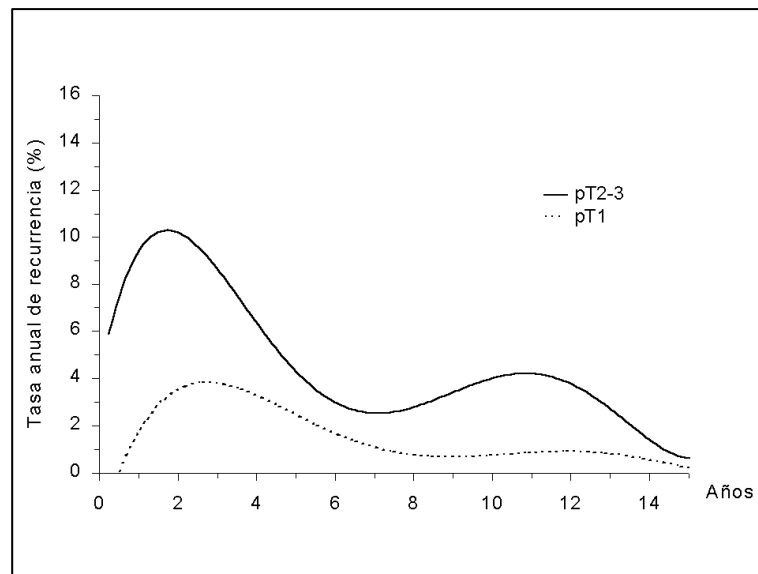


Figura 4.39: Representación de la tasa anual de recurrencia según el tamaño tumoral.

En resumen, la mayoría de los factores pronósticos solo son capaces de predecir las recurrencias precoces. Los que tienen más poder pronóstico inicial lo mantienen al final del seguimiento, a pesar que en la mayoría de ellos las tasas de recurrencia de los diferentes grupos a partir del quinto o sexto año se igualan. Solo el tamaño tumoral y, con menor poder estadístico, la sobreexpresión de la p53 mantienen su valor pronóstico a lo largo del tiempo, y son además capaces de predecir que pacientes recurrirán a partir del quinto año. La tasa de recurrencia del factor adverso (pT2-3 o p53 +) siempre es superior al del factor de bajo riesgo (*figura 4.40*).

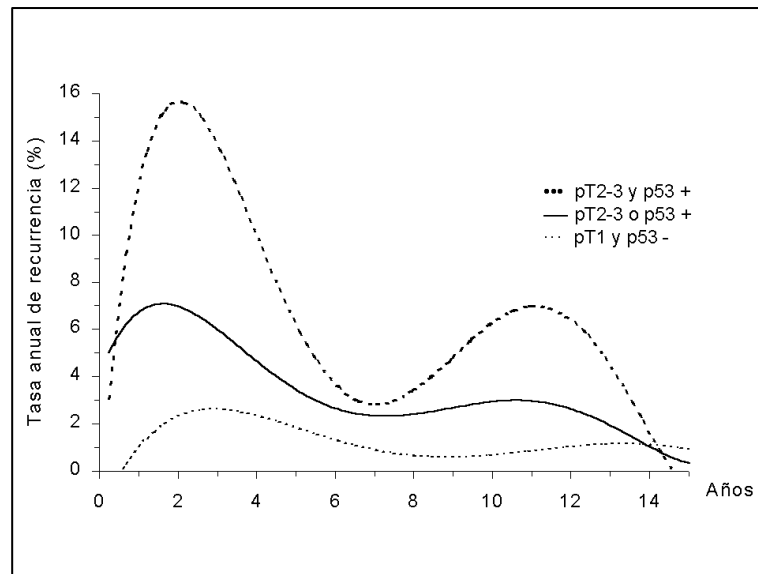


Figura 4.40: Representación de la tasa anual de recurrencia según el tamaño tumoral y la expresión de la p53.

5.- Discusión.

5.1.- CONSIDERACIONES GENERALES.

En el momento actual, cuando una gran parte de las pacientes con cáncer de mama con ganglios axilares negativos reciben tratamiento complementario, debemos recordar la pregunta que se hacía hace varios años uno de los principales investigadores en este tema: ¿realmente necesitamos factores pronósticos para el cáncer de mama? ³⁰⁹.

Tras la Alerta clínica del NCI³⁷, y la publicación de los resultados preliminares de los ensayos que demostraban un beneficio del tratamiento complementario en este grupo de pacientes³⁸⁻⁴¹, gran parte de la comunidad oncológica empezó a tratar sistemáticamente a muchas pacientes con ganglios negativos³¹⁰. El metaanálisis del Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group³¹¹ concluyó que la quimioterapia complementaria puede prolongar significativamente la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, reduciendo la tasa anual de mortalidad en un 16%, y que el Tamoxifeno la reducía en un 17%; estos resultados, independientes del estado de los ganglios axilares, acabaron con las reticencias que se pudieran tener con el tratamiento adyuvante en el cáncer de mama ganglios negativos, muchas veces independientemente de los factores pronósticos³¹².

Esta posición se refuerza con los ensayos clínicos de prevención de cáncer de mama en grupos de riesgo, en que se randomiza entre tamoxifeno y placebo. Sin embargo, la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama entre estas mujeres de alto riesgo es menor que la que tiene una paciente con cáncer de mama tratado de tener una recurrencia de su enfermedad; si es ético administrar tamoxifeno a una mujer para intentar prevenir el cáncer de mama, no menos ético será prescribir tamoxifeno adyuvante a una mujer con cáncer de mama para prevenir una recurrencia de su enfermedad.

La situación actual cambia el enfoque del tema de los factores pronósticos en el cáncer de mama ganglios negativos. A principios de la década de los 80 se pensaba que el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama ganglios negativos era tan bueno que no se justificaba la necesidad del tratamiento complementario, dada su toxicidad³¹³. La

apreciación posterior de que las tasas de supervivencia no eran tan aceptables, y la demostración de la efectividad del tratamiento complementario, llevó a una frenética búsqueda de factores que nos dijeran que pacientes debían ser tratadas^{44,314}. En la actualidad, cuando no es infrecuente el tratamiento con quimioterapia en tumores menores de 1 centímetro con ganglios negativos, la respuesta a la pregunta que encabezaba este capítulo ya no es tan sencilla.

Probablemente la respuesta sea que sigue siendo necesario conocer los factores pronósticos, pero no para saber a que pacientes tratar, sino para saber, por una parte, a quien no debemos tratar, ya que su pronóstico es excelente, y por otra parte, con que intensidad debemos tratar a las otras pacientes, dada la variación en la evolución clínica de los diferentes subgrupos de pacientes con ganglios axilares negativos.

Aunque determinados parámetros como el tamaño, el status ganglionar, el grado y los receptores hormonales parecen bastar para tomar decisiones terapéuticas, varios factores convierten la situación en más compleja:

1.- La baja capacidad de discriminación de subgrupos pronósticos en las pacientes con ganglios negativos que se consigue con los factores clásicos.

2.- El uso de la quimioterapia primaria puede alterar el tamaño tumoral y la positividad de los ganglios axilares, dejándonos así huérfanos de los principales factores pronósticos actuales, y por tanto sin criterios para posteriores tratamientos complementarios.

3.- El frecuente diagnóstico de la enfermedad en programas de diagnóstico precoz, con menor tamaño y menor afectación axilar que cuando el diagnóstico es clínico. Hakama et al.³¹⁵ estudian las diferencias entre los tumores diagnosticados mediante programas de diagnóstico precoz y los diagnosticados clínicamente; tanto los casos diagnosticados en la primera ronda de mamografías como en las sucesivas son de tamaño menor y con menor afectación ganglionar que los diagnosticados mediante palpación, sin

embargo, cuando se estudian variables biológicas como la ploidía y la tasa de proliferación mediante la fase S, los tumores diagnosticados en las rondas sucesivas y los diagnosticados clínicamente se asemejan entre sí, diferenciándose de los de primera ronda. Estos resultados hacen pensar que, una vez descartados los tumores con baja tasa de proliferación que se diagnostican al iniciar el programa de diagnóstico precoz, los diagnósticos posteriores son de tumores con un mejor pronóstico teórico por tamaño y estado de los ganglios axilares, pero con unas características biológicas de agresividad mayor, y que podemos no valorar correctamente.

El estudio de los factores pronósticos moleculares puede ayudarnos a solucionar estos problemas, añadiendo información a la que suministran los factores clásicos, cuando estos son insuficientes.

La realización de estudios sobre factores pronósticos está sometida al riesgo de realizar sesgos por diferentes motivos, dificultando su interpretación. McGuire⁶⁰ ha sugerido la manera de evitarlos, cumpliendo unos requisitos mínimos que se describen en la introducción. Creo que el presente estudio los cumple: el estudio del valor de la sobreexpresión de la oncoproteína p53, se basa en la demostrada importancia de la función de este gen en las neoplasias en general y en el cáncer de mama en particular; es un estudio confirmativo con un tamaño de muestra sobradamente superior al de los 150 casos recomendados, con una población con mínimos sesgos, ya que recoge prácticamente todos los casos diagnosticados consecutivamente en un periodo de 11 años, sin tratamiento complementario sistémico. El estudio estadístico abarca el análisis univariado y multivariado, estudiando las variables en forma categórica, pero también en forma continua cuando el comportamiento del factor así lo sugería; asimismo se introduce el análisis temporal de los factores pronósticos que probablemente ayude a comprender mejor su comportamiento. La determinación de todos los factores pronósticos evaluados se ha efectuado siguiendo métodos y criterios ya descritos y comprobados en otros estudios.

Una cuestión importante es el tiempo de seguimiento. En el cáncer de mama, especialmente en el subgrupo de ganglios negativos, es necesarios un mínimo de 10 años para hablar de resultados concluyentes³¹⁶. Los efectos observados en las porciones iniciales de las curvas de supervivencia no son solo prematuros, sino que incluso pueden ser erróneos. El seguimiento medio de esta serie de pacientes supera los 12 años, lo que permite que sean pocas las recurrencias por observar, aumentando de esta manera el valor clínico de las significaciones estadísticas.

5.2. – EVOLUCIÓN DE LA SERIE.

La tasa de supervivencia específica por cáncer de mama es del 69,3% a los 15 años. Hay publicadas pocas series que engloben todo el grupo de pacientes con ganglios negativos y que reporten supervivencias con este seguimiento; Ciatto et al.³¹⁷ en una serie de 5.623 pacientes cifra en el 72% la tasa de supervivencia para el grupo de ganglios negativos; en la serie de Joensuu et al.³¹⁸, con solo 186 pacientes con ganglios negativos demostrados patológicamente, pero con un seguimiento de 27 años, la tasa de supervivencia a 15 años es del 68%; finalmente, en un estudio epidemiológico de Gamel et al.³¹⁹, con más de 150.000 pacientes de la base de datos de la SEER reporta una tasa de “curación” de las pacientes con ganglios negativos del 66% a 20 años. La tasa de supervivencia de nuestra serie es comparable a estos resultados, lo que refuerza la idea de la ausencia de sesgo por selección. La comparación con otras series con menor seguimiento^{17,19,89} muestra tasas similares, tanto de supervivencia como de recurrencia, a diferentes intervalos temporales. Otras series importantes describen tasas mayores, como la del Fox Chase Cancer Center⁹¹, con una supervivencia libre de enfermedad del 81% a 10 años, sin embargo, la alta tasa de tumores pequeños en esta serie (un 60% de pT1) desvirtúa estas cifras.

Prolongando la curva teórica de supervivencia hasta los 20 años, la supervivencia con este seguimiento sería del 65%; dada la baja tasa de mortalidad que tiene el cáncer de mama después de los 20 años (menor del 1%), podemos suponer que un 60-62% de las pacientes seguirán vivas tras unos 25 años de seguimiento, representando la fracción de pacientes curadas, tasa similar a la descrita en los estudios citados anteriormente.

Tras los 12 primeros años, tanto la tasa de recurrencia como de mortalidad es muy baja, pero no inexistente. De hecho, en la presente serie, la última recurrencia aparece a los 16 años de seguimiento. Para la mortalidad el seguimiento todavía debe ser mayor, ya que se ha descrito que el 25% de la mortalidad se produce en la segunda década de seguimiento²⁶, describiéndose mortalidad por cáncer de mama hasta los 27-30 años de seguimiento³¹⁸.

La curva de supervivencia se retrasa unos dos años y medio respecto a la de recurrencia durante gran parte del periodo de seguimiento del estudio. Esta situación es consistente con las estadísticas publicadas de la expectativa de vida tras la recaída en ganglios negativos, con una supervivencia media tras la recurrencia de 30 meses^{89,320}.

5.3. – FACTORES CLÍNICOS.

5.3.1. – CIRUGÍA Y RADIOTERAPIA.

El predominio de la mastectomía radical en nuestra serie se corresponde con los usos habituales en el periodo del estudio. En esos años no estaba claro el papel de la radioterapia complementaria en este grupo de pacientes, por lo que su utilización es irregular y escasa, tendiendo a

disminuir con el paso de los años. Es ya un axioma de la Oncología que el tipo de cirugía en cáncer de mama no influye en la aparición de metástasis ni en la supervivencia²¹, y así pasa en esta serie. La administración de radioterapia tras la mastectomía es menor del 10% en el presente estudio, y tampoco influye en ningún suceso, incluyendo la aparición de una recidiva local.

5.3.2. – NUMERO DE GANGLIOS ESTUDIADOS.

Analizando los casos de nuestra serie, en la que más del 90% de pacientes tiene más de 6 ganglios axilares estudiados con una mediana de 12, no hemos hallado ninguna relación entre este parámetro y el pronóstico de las pacientes. Para pocos autores el número de ganglios disecados es un factor importante, Arriagada et al.¹⁸¹, estudiando más de 3.000 pacientes con ganglios negativos, hallan que cuando el número de ganglios estudiados es inferior a 5 aumentan significativamente las recaídas, indicando probablemente una insuficiencia del vaciamiento axilar o de la técnica histopatológica.

5.3.3. – LOCALIZACIÓN TUMORAL.

La localización de los tumores en los cuadrantes de la mama es la habitual en la literatura, con un predominio de los cuadrantes externos sobre los internos y la línea media^{17,33,110}. Como es también habitual, la localización inicial del tumor no se ha asociado a ninguna otra característica clínica o patológica.

Según nuestros resultados, la localización del tumor no tiene relación con la mortalidad, aunque existe una relación, marginalmente significativa, entre la localización en cuadrantes internos y la recurrencia, que se debe

enteramente a su influencia en la aparición de una recidiva locorregional. En este caso si que se alcanza la significación estadística ($p=0,025$). Los datos de la larga serie del American College of Surgeons^{14,82} sugieren un pronóstico ligeramente peor para los tumores de cuadrantes internos. Sin embargo otros autores no confirman estos resultados^{17,33,51}, y para Fisher³²¹, la falta de valor pronóstico de la localización en cuadrantes internos y la nula influencia de la radioterapia en prevenir la aparición de metástasis en estos tumores es uno de los principales argumentos para atacar la teoría de Halsted. En todo caso, la mayor tasa de recidivas locorregionales en los tumores internos que aparece en nuestra serie, y que se mantiene al ajustarla por la edad, se debe probablemente a una mayor proporción de afectación de la cadena mamaria interna.

5.3.4. – EDAD Y ESTADO MENSTRUAL.

La edad media de las pacientes de esta serie (56 años) se sitúa dentro de los valores habitualmente referidos en otros trabajos que analizan pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos. Los valores extremos de edad media descritos en dichos trabajos son de 54 años para el mínimo¹¹⁰ y 62 años el máximo¹³⁷. En nuestra serie el 20% de las pacientes tiene una edad igual o menor de 45 años (solo un 3% tiene 35 años o menos), y, al no ser una serie seleccionada por criterios de ensayo clínico, el 15% son mayores de 70 años.

El 43% es pre o perimenopáusica. La edad y el estado menstrual se correlacionan intensamente, con los 55 años como punto divisorio, por debajo de él, el 90% de las pacientes son pre o perimenopáusicas, por encima de él, el mismo porcentaje son postmenopáusicas. Esta relación hace que los factores con que se asocia el estado menstrual sean los mismos que para la edad. El estado menstrual, como para la mayoría de los

autores, no es un factor pronóstico por si solo, reflejando groseramente el valor de la edad.

En nuestra serie la edad joven solo se correlaciona significativamente con el componente intraductal extenso y la negatividad de los receptores estrogénicos. No hemos encontrado referencias en la literatura sobre el componente intraductal, mientras que la correlación de la edad y los receptores es un hallazgo prácticamente universal para todos los autores que la han analizado^{65,68,77,79,81,137,166,168}. A diferencia de otros autores, no hemos encontrado una asociación entre la edad joven y el grado^{65,67,79,81,90}, el tamaño tumoral^{68,79,81}, la invasión linfático-vascular⁶⁷, la necrosis⁶⁷, la aneuploidía^{132,137}, la fase S alta^{133,137}, ni la sobreexpresión de la p53^{68,79,280}. Probablemente se deba a que la mayoría de los autores que analizan este tema fijan el límite de edad joven en los 35 años, dado el bajo porcentaje de casos en nuestra serie con esta edad, no podemos confirmar estos hallazgos. En nuestra serie hay una tendencia a que la edad joven se asocie a la expresión de la proteína del gen HER-2/neu, Tandom et al.²⁰⁴, en una amplia serie, hallan una relación significativa entre la edad joven y la expresión de HER-2/neu, no así otros autores^{202,212}.

No hemos hallado un punto de corte que divida a las pacientes en dos grupos con pronósticos claramente diferenciados. Sin embargo, el estudio de este factor como una variable continua nos muestra una interesante variación del nivel de riesgo. Las pacientes jóvenes (aproximadamente menores de 40 años) doblan el riesgo relativo de tener una recaída de su enfermedad respecto de las edades medias. Para las pacientes mayores de 70 años este riesgo se eleva rápidamente de una forma lineal. Cuando analizamos la supervivencia libre de enfermedad a distancia y la supervivencia específica por cáncer de mama, el mayor riesgo de las mujeres jóvenes prácticamente desaparece, persistiendo el mayor riesgo para las pacientes con edades mayores de 65 – 70 años. La explicación la hallamos en las recaídas locorregionales, mucho más frecuentes en las pacientes menores de 45 años. La ausencia de un

aumento del riesgo de metástasis o muerte en estas pacientes sugiere una escasa importancia de la recidiva locorregional pura en el pronóstico de las enfermas con ganglios axilares negativos. Dado que las pacientes de edad avanzada no parecen tener tumores más agresivos, el importante incremento en la mortalidad por cáncer hace pensar que quizás estos casos sean tratados de forma más conservadora, o que tengan una mayor mortalidad cuando aparezcan complicaciones derivadas de la enfermedad o del tratamiento.

En la literatura médica, el valor pronóstico de la edad en el cáncer de mama es fuente de una notable controversia, apareciendo frecuentemente resultados contradictorios. Esta situación se puede explicar en buena parte por problemas metodológicos⁷¹. En muchos estudios el número de casos es pequeño; en otros la población está seleccionada por el hecho de participar en un ensayo clínico o de pertenecer a un centro de referencia, lo que normalmente excluye a las pacientes de edad avanzada; y otras veces los estudios se basan en registros poblacionales, con la consiguiente inexactitud en la definición exacta de la causa de muerte. Por otra parte, en muchos estudios los grupos de edad se forman de una forma arbitraria, basándose en la edad de 50 años o en la edad media. Otro factor de confusión es el estudio de la mortalidad por todas las causas que se hace en unos estudios, o de la mortalidad específica por cáncer de mama que se hace en otros.

En general, se atribuye a la edad joven un mal pronóstico^{14,62-68}, pero también hay estudios que no hallan ningún valor pronóstico a la edad^{49,52,74,75,77}, o que adjudican el mal pronóstico a las pacientes de edad avanzada^{69,70}. Varios estudios basados en los registros poblacionales escandinavos han demostrado una relación no lineal entre la edad al diagnóstico y la supervivencia de las pacientes, siendo ésta mucho peor en las pacientes más jóvenes (menores de 40 años) y de edad más avanzada (mayores de 70 años)⁷¹⁻⁷³. Varios trabajos analizan concretamente el valor pronóstico de la edad en pacientes con ganglios negativos, ya sea como

factor principal a estudio, o como un factor más en los estudios multivariados en referencia a otros factores^{51,52,66,67,91,125,127,133,137,175,280}. La mayoría de ellos no hallan una relación entre la recurrencia o la mortalidad y la edad; en el estudio de Sigurdsson et al.¹³⁷ aparece una relación entre la edad mayor de 75 años y una mayor tasa de mortalidad, pero al haber analizado la supervivencia global, los autores no la atribuyen a una mayor mortalidad por cáncer. En dos estudios, que incluyen análisis multivariado, la edad joven es un factor de mal pronóstico, pero en ambos casos se trata de series seleccionadas, la de Rosner et al.⁹¹ tiene una proporción muy alta de tumores pequeños y corto seguimiento; en el caso de Elledge et al.²⁸⁰, solo se incluían enfermas con tumores entre 1 y 3 centímetros, pertenecientes a un banco de tumores y también con un seguimiento corto. Por tanto, la opinión generalizada parece ser que la edad no influye en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos. Sin embargo, los estudios basados en registros poblacionales del norte de Europa sustentan los hallazgos de nuestra serie, ya que invariablemente describen un pronóstico notablemente peor para las enfermas de edades avanzadas. Como en muchas otras ocasiones, los pacientes de mayor edad son un grupo poco estudiado en la Oncología y frecuentemente olvidado en los análisis estadísticos. La aplicación de transformaciones cuadráticas³²² o cúbicas³²³ a la edad resaltan los diferentes niveles de riesgo, ayudando a entender mejor la influencia de la edad en el pronóstico del cáncer de mama.

Parece haber acuerdo en la mayor tasa de recidivas locorregionales en las pacientes jóvenes, especialmente en el tratamiento conservador⁶⁷. En los últimos años se ha estudiado intensamente un subgrupo de pacientes muy concreto, el de las menores de 35 años, atribuyéndole un particular mal pronóstico. La discusión se centra en si este mal pronóstico se debe a la más frecuente presencia en estas pacientes de factores patológicos adversos^{68,76,81}, o si el pronóstico es independiente de esta asociación⁶⁵⁻⁶⁷, implicando una mayor inestabilidad genética en las pacientes con cáncer de mama y edad temprana⁷⁹.

5.4. – FACTORES HISTOPATOLÓGICOS.

5.4.1. – TIPO HISTOLÓGICO.

En nuestra serie la incidencia del tipo histológico “ductal” sin más especificación es del 94%, mayor que en otras, en las que oscila entre el 65% y el 80%. La proporción de carcinomas lobulillares es la habitual (alrededor del 5-10%); y por el contrario la incidencia de los otros tipos (tubular, medular, papilar, ...) es mínima en comparación al 5-10% normalmente reportado³²⁴. Las variaciones apreciadas pueden ser debidas a la variabilidad entre series, pero también a diferencias en la aplicación de los criterios que definen cada tipo histológico. En nuestro caso se consideró, con rigor, que para clasificar un tumor dentro de uno de los tipos especiales el patrón histológico debía aparecer en el 100% de la extensión del tumor. De no ser así, el tumor era clasificado como simplemente ductal NOS.

A causa de la escasez de tipos histológicos distintos al ductal NOS, en este estudio no hemos podido detectar ninguna relación entre el tipo histológico y otras características. En la literatura hay pocos datos respecto a estas asociaciones, siendo la más destacable la relación entre el tipo ductal y la presencia de invasión vasculo-linfática¹¹⁶.

El reducido número de tumores de tipo histológico diferente al ductal NOS ha impedido la evaluación de su valor pronóstico. Algunos trabajos han descrito que la existencia de un carcinoma tubular, mucinoso, papilar o medular se asocia a una evolución más favorable que cuando el tipo es ductal^{52,83-86,325} especialmente cuando su tamaño es inferior a dos centímetros³³, manteniendo su valor en el análisis multivariado. Así pues, parece que la determinación del tipo histológico puede ser útil de cara a evaluar el pronóstico de un tumor, puesto que existen algunos tipos que

tienen una evolución especialmente favorable. Ahora bien, el hecho de que estos tipos histológicos sean infrecuentes limita la utilidad de este factor a unos pocos casos.

5.4.2. – COMPONENTE INTRADUCTAL ASOCIADO.

En un 41% de las pacientes, el componente intraductal asociado era extenso (más del 25% de la neoplasia). Como ya se ha descrito, esta presencia se correlaciona con la edad y la menopausia, apareciendo más frecuentemente en pacientes jóvenes. El 25,5% de los tumores con componente intraductal asociado expresan sobreexpresión de HER-2/neu, frente al 14,1% de los que no tienen componente intraductal, siendo esta asociación significativa. Este hallazgo es compatible con lo descrito por otros autores^{205,214}. Allred²⁰⁹ describe que esta asociación se limita al carcinoma intraductal tipo comedocarcinoma, y disminuye conforme lo hace la proporción de CDIS en la lesión, desde el 56% en CDIS puro, al 22% en carcinomas ductales infiltrantes con componente intraductal asociado, hasta llegar al 11% del carcinoma ductal infiltrante sin componente intraductal asociado. Nuestros porcentajes son superponibles a los de este autor.

En nuestra serie, el componente intraductal asociado no tiene valor pronóstico para ningún suceso. Varios autores han observado una tendencia de los tumores con componente intraductal extenso ha tener un mejor pronóstico^{103,120}, aunque frecuentemente su valor desaparece en el estudio multivariado⁵². Aunque la distribución del componente intraductal dentro y alrededor del tumor primario parece correlacionarse con el riesgo de recurrencia local tras el tratamiento quirúrgico conservador, este hecho no parece relacionarse con un mayor riesgo de recurrencia sistémica¹²¹. El escaso número de cirugías conservadoras en nuestras pacientes, no permite sacar conclusiones sobre este aspecto.

5.4.3. – INFILTRADO LINFOPLOSMOCITARIO.

Aproximadamente un 48% de las pacientes presentaban un infiltrado linfoplasmocitario moderado o importante. La frecuencia con que se describe en la literatura es variable, oscilando entre un 47% y un 80%¹⁰⁷, indicando probablemente una disparidad en los criterios empleados.

Su presencia se correlaciona significativamente con una serie de características histopatológicas indicadoras de agresividad neoplásica, como son el grado, la necrosis, y la negatividad de receptores estrogénicos y de progesterona. Estas asociaciones han sido descritas directa o indirectamente en la literatura^{103,324,326}. También hemos hallado una relación directa entre la presencia de infiltrado linfoplasmocitario y la positividad para las proteínas HER-2/neu y p53, hecho también descrito en varios estudios^{214,278}.

En nuestra serie la infiltración linfoplasmocitaria no es factor pronóstico significativo para ningún suceso. El valor pronóstico del infiltrado linfoplasmocitario en el estroma tumoral no queda claro en la literatura. Los resultados publicados sobre su valor pronóstico no son concluyentes. Algunos autores han asociado el infiltrado linfocitario a una evolución más favorable en los carcinomas de mama medulares³²⁴; menos claro es que la misma asociación se pueda atribuir al infiltrado linfoplasmocitario en los carcinomas ductales infiltrantes no medulares. Varios investigadores han descrito un relativo mejor pronóstico por su presencia^{214,326}, mientras que otros no encuentran diferencias significativas, o bien, un pronóstico peor^{33,75,110}.

5.4.4. – DESMOPLASIA.

La desmoplasia se consideró inicialmente como una reacción de defensa del huésped frente al tumor, aunque posteriormente este significado se ha puesto en duda³². Es un hallazgo habitual en los tumores infiltrantes de mama³², pero los tumores varían considerablemente en la cantidad y las características cualitativas de su estroma. Los extremos están representados por el carcinoma medular y las variantes celulares de los carcinomas ductales, que prácticamente no tienen desmoplasia, y los carcinomas escirros, caracterizados por una importante colagenización. En nuestra serie, la desmoplasia moderada o importante aparecía en casi todos los casos. Su mayor presencia no se correlacionaba significativamente con ningún otro factor, ni tiene valor pronóstico alguno. Estos resultados concuerdan con los de la literatura^{52,324}.

5.4.5. – INVASIÓN LINFÁTICA Y VASCULAR.

En esta serie, un 17% de las pacientes presentaban invasión linfática y/o vascular; básicamente a costa de la invasión linfática, ya que solo 5 pacientes de la serie presentaban invasión vascular clara. Esta incidencia se encuentra dentro de los reportados normalmente en la literatura, que van del 7 al 30% en las pacientes con ganglios negativos^{31,88,106,117,130,288,327}. Estas variaciones en su frecuencia se deben probablemente al hecho que la identificación histológica de la invasión vascular y linfática es altamente subjetiva. La frecuencia con que se halla aumenta notablemente cuando se usan tinciones especiales para la elastina o métodos inmunohistoquímicos¹¹⁵.

Varios estudios han hallado una correlación entre la invasión vascular y linfática y el grado histológico alto^{114,116} que también hallamos en nuestra

serie. Bosari et al.¹³⁰ halla una correlación con la presencia de una fase S alta que nosotros no hemos podido confirmar.

La significación pronóstica de este factor es controvertida en las pacientes con ganglios negativos. Varios estudios han mostrado su valor como factor independiente de otras variables histológicas^{114,117,130,288,327}. Rosen limita este valor para las pacientes con T1N0^{33,88}. Otros autores no han podido confirmar este hecho^{35,99,118}, y en algún caso¹¹⁵, una cuidadosa revisión histológica disminuye considerablemente el valor demostrado inicialmente. Nuestros resultados muestran una tendencia a que los tumores con invasión linfático-vascular tengan peor evolución clínica, cifrando la diferencia en la tasa de recurrencia en un 8% a los 15 años de seguimiento y en la tasa de mortalidad en un 7%, sin embargo estas diferencias no alcanzan la significación estadística.

5.4.6. – NECROSIS TUMORAL

El 47% de nuestras pacientes presentaban en el estudio histológico una necrosis moderada o importante, no se hizo ningún intento en diferenciar la necrosis tipo “comedo” de la del tipo “*infart-like*”. Esta frecuencia es similar a la de otras series^{52,85,110,111,112,169,326}.

Al igual que en las series de Fisher et al.^{32,52,85,99} y Carlomagno et al.²³⁶ en nuestras pacientes la presencia de necrosis se asocia significativamente con el mayor tamaño tumoral, los grados histológicos altos y la negatividad de los receptores hormonales, lo que sugiere que se trata de un indicador de proliferación tumoral, indicando algún autor que la necrosis tumoral representa una forma simplificada del grado histológico¹¹³. No hemos podido hallar la relación con la aneuploidía y la fase S que encuentran Joensuu et al.¹²⁸. En nuestra serie, los tumores con necrosis muestran una positividad para la p53 que dobla la de los tumores sin ella. Esta asociación solo está descrita en un reciente artículo de Fresno et al.³²⁸.

Al igual que en la invasión linfático-vascular, hay una diferencia entre el pronóstico para los tumores según la necrosis, siempre a favor de la ausencia de necrosis. En este caso las diferencias entre las tasas de recurrencia y mortalidad al final del seguimiento se cifran en el 5% - 6%, pero el mayor número de casos con presencia de necrosis permite alcanzar la significación estadística para la supervivencia específica ($p=0,03$). Cuando estudiamos su valor pronóstico con menor seguimiento, la significación es mayor. La observación de las curvas de supervivencia nos muestra que hay una divergencia inicial que empieza a igualarse a partir del quinto año, para finalizar con esta mínima diferencia. Este patrón de comportamiento, similar al de otros factores, y que se discutirá más adelante, nos sugiere que su valor se limita a los primeros años del seguimiento. Una situación similar ya ha sido descrita por Gilchist¹¹³ en un grupo de pacientes con ganglios positivos; dada la evolución clínica más rápida en este grupo de pacientes, el cambio en la tendencia ocurría en el tercer año. Este factor temporal puede explicar la significación independiente hallada por varios autores^{110-112,324}, ya que en estas series el seguimiento no supera los 6 años. En la serie de Fisher et al. de 581 pacientes del ensayo NSABP B-04, el valor hallado a los 5 años de seguimiento, desaparecía al actualizar la serie con 5 años más de seguimiento^{32,99}.

5.4.7. – GRADO HISTOLÓGICO.

De las 271 pacientes el 24,7% tenían un grado 1, el 49,1% un grado 2, y el 26,2% un grado 3. Estos porcentajes son similares a los que describen varios autores, siempre empleando el mismo esquema de gradación^{95,100,145,136}. Rosen et al.⁸⁸ solo hallan un 10% de tumores grado 1, pero es una serie en la que solo se analizan tumores pequeños. Para poder analizar este factor se han agrupado los casos con grado 2 y grado 3. Este dicotomización, ya realizada por otros autores^{100,145} se basa en que la evolución clínica de ambos grupos es muy similar en esta serie. Para evitar

sesgos, todos los análisis estadísticos realizados se repitieron con la variable categorizada en sus tres valores y dicotomizada en grado 1+2 vs. grado 3. La significación estadística obtenida en el último caso era ligeramente superior en el análisis univariado, pero su comportamiento en el análisis multivariado era idéntico al de la agrupación en grado 1 vs. grado 2+3.

El grado histológico se ha convertido, desde que fue propuesto por Bloom y Richardson, en uno de los pilares básicos de la valoración pronóstica en las pacientes con cáncer de mama. Su aceptación es prácticamente universal desde mediados de la década de los 80, y desde hace años es recomendado por la Organización Mundial de la Salud, dada su utilidad y su fácil aplicación a la clínica¹⁰⁷. Este hecho ha motivado una extensa literatura que analiza sus relaciones con otras variables clínico-patológicas, así como su valor pronóstico, especialmente en las pacientes con ganglios negativos.

En nuestro caso, el mayor grado histológico se correlaciona significativamente con todos los factores histopatológicos de dediferenciación y agresividad, presencia de necrosis tumoral, presencia de invasión linfática y vascular, y negatividad para los RE y para los RP. La mayoría de los autores que analizan las asociaciones del grado hallan los mismos resultados^{52,85,110,116,166,324}. También hallamos una asociación entre los grados altos y la aneuploidía, este hecho ha sido descrito tanto para el cáncer de mama en general^{134,329}, como para el subgrupo de ganglios negativos^{127,130}, aunque en algún caso, como el de Muss et al.¹³³ no se encuentra esta correlación, sin embargo, esta serie es corta (101 casos) y está probablemente seleccionada, a juzgar por la baja tasa de recurrencia (menor al 20%); la asociación del grado con la fase S sí está presente en este estudio, así como otros¹³⁰, nuestros resultados confirman esta relación. La correlación del grado alto con la positividad de la p53 que muestran nuestros resultados confirma la de varios estudios, tanto los que analizan la

p53 por inmunohistoquímica, como los que lo hacen por análisis genético^{160,266,276,277,284}.

En nuestras pacientes, el grado histológico es un factor pronóstico significativo en el análisis univariado para la supervivencia libre de metástasis y específica, no alcanzando la significación para la supervivencia libre de recurrencia. En el análisis multivariado este valor desaparece a causa de la inclusión en el modelo de la p53, si esta última variable no se analizara, el grado tumoral mantendría un valor significativo marginal ($p=0,06$) como factor pronóstico para la aparición de metástasis y para la mortalidad por cáncer de mama. Esta situación la hallamos también en la literatura; los estudios que hallan valor para el grado tumoral en el análisis multivariado no analizan la expresión de la p53^{52,85,89-91,99,102,175,178,228,325}; cuando la expresión de la proteína p53 es un factor pronóstico independiente, el valor del grado desaparece^{275, 277, 279, 280,284, 290, 303, 328}.

Aunque el sistema de gradación otorga igual valor a cada componente, varios autores hallan mayor significación estadística para la diferenciación tubular^{103,104}, el pleomorfismo nuclear^{98, 100, 101, 105, 174}, o el índice mitótico¹⁰⁶. Piera¹⁰⁷ halla un valor pronóstico importante e independiente de otros factores a la actividad mitótica, al analizar el número máximo de mitosis por campo de gran aumento, así, los tumores con más de 10 mitosis por campo presentan un riesgo relativo de muerte 4 veces mayor que en el caso contrario. En nuestro estudio, el análisis de los distintos componentes que forman el grado histológico muestra que todos ellos tienen una significación marginal en los diferentes sucesos. En ningún caso, su valor pronóstico supera el del grado histológico global, aunque no se ha analizado en detalle la actividad mitótica.

La principal crítica al uso del grado tumoral se basa en su baja reproducibilidad¹⁰⁸, aunque hay estudios¹⁰⁹ que demuestran una reproducibilidad entre diversos centros no familiarizados con su uso, la

determinación del grado histológico mantiene un amplio porcentaje de subjetividad.

5.4.8. TAMAÑO TUMORAL.

En los años 70 y en la primera mitad de los 80, años que abarca la de inclusión de casos en nuestra serie, el uso de la mamografía para el diagnóstico precoz no estaba fuertemente implantado en nuestro medio, de ahí que podamos considerar que nuestros casos se diagnosticaron mayoritariamente por presentar una tumoración palpable. Esto explica la distribución por tamaños que encontramos, con un 37,5% de casos con tumores pT1, un 55% de pT2 y un 7,5% de pT3, con menos de un 8% del global de las pacientes con tumores de diámetro menor a 1 centímetro. Esta situación es similar a la descrita por un estudio de la SEER ¹⁶ con casi 13.500 casos con ganglios negativos, diagnosticados entre 1977 y 1982, que reporta un 7,7% de pT1a-b, un 34,8% de pT1c, un 51,4% de pT2 y un 6,1% de pT3. En 177 pacientes con ganglios negativos, diagnosticadas consecutivamente en un solo centro, más cercano a nuestro medio y en un periodo de inclusión similar, Courdi et al. ¹⁴⁵ describen un 35% de tumores en estadio pT1, un 60% de pT2 y un 5% de tumores mayores de 5 cm. Cifras similares son las descritas por Aaltomaa et al. ³³⁰ en 251 pacientes con ganglios negativos consecutivas. Estas proporciones han variado en la última década a causa del diagnóstico precoz, con tasas de tumores pequeños mucho más elevadas ³¹⁵.

En nuestra serie, como en otros estudios ^{90, 122, 137}, el mayor tamaño tumoral se asocia al grado, a la necrosis y a la negatividad de receptores hormonales. Con respecto a la relación entre el tamaño y la ploidía hay divergencia de resultados entre los distintos autores, unos los relacionan ¹³², y otros no ¹³³, en nuestro caso encontramos una débil correlación entre los tumores mayores de 2 cm y la aneuploidía. También en nuestros casos hay

una asociación entre el tamaño mayor y una fase S más alta, al igual que en otros trabajos ^{122, 130, 137}. También hallamos una clara relación entre el mayor diámetro tumoral y la positividad para la proteína p53, al igual que Isola et al. ²⁷⁶ y Marks et al. ²⁹⁰, que la determinan por inmunohistoquímica, y que Elledge et al. ²⁸⁰ que la determinan por análisis genético, aunque en este caso la serie está limitada a tumores de 1 a 3 cm.

La relación entre el tamaño tumoral y el pronóstico en el cáncer de mama es un tema recurrente en la literatura médica desde el trabajo de Fisher et al. ⁸⁷, publicado hace 30 años. En esta serie de 2578 pacientes se describía que el incremento del tamaño tumoral se relacionaba con la probabilidad de recurrencia, particularmente en los tumores con ganglios negativos. En nuestro estudio, al dividirlo en tumores iguales o menores de 2 cm vs. tumores mayores de 2 cm, el tamaño es el principal indicador del pronóstico, tanto en el análisis univariado como en el multivariado. Este punto de corte es el que mayor significación estadística ofrece, y además coincide con la división que establece el sistema TNM, por lo que resulta de gran utilidad clínica. Las diferencias entre los tumores pT2 y pT3 son mínimas, por lo que se ha optado por unir las dos categorías.

El riesgo relativo de recurrencia se multiplica por 2,5 para las pacientes con tumores pT2-3 con relación a las pacientes con tumores pT1, mientras que el riesgo de morir se cuadruplica. Las diferencias entre ambos grupos se inician ya en el primer año, y las curvas siguen divergiendo durante todo el periodo de seguimiento.

El valor pronóstico del tamaño tumoral en las pacientes con ganglios negativos se confirma en la mayoría de los estudios que reúnan un número importante de enfermas y un amplio seguimiento. Así, Ficher et al. ³³¹ en su análisis de la población incluida en el estudio NSABP B-04, con un seguimiento medio de 15 años, encuentra que el tamaño mayor de 2 cm es uno de los principales indicadores pronósticos, resolviendo las dudas que los

mismos autores se planteaban al analizar las mismas pacientes con un seguimiento menor ³²; resultados similares son descritos por numerosos autores en series con más de 100 pacientes y un seguimiento mayor de 5 años ^{51, 86, 91, 106, 136, 137, 146, 147, 163, 175, 177, 181, 228, 230, 276, 288, 325}, en estos estudios el tamaño tumoral mantiene su valor pronóstico en el análisis multivariado frente a todo tipo de factores pronósticos, ya sean histopatológicos clásicos o nuevos factores biológicos y moleculares (HER-2/neu, Ploidía y fase S, p53, PCNA, y angiogenesis). En la mayoría de los estudios el punto de corte se determina en los 2 cm, ya sea por búsqueda de nivel de significación o por práctica clínica, aunque en algunos, como los de O'Reilly et al.¹³⁶ y Arriagada et al.¹⁸¹ se halla que el mejor valor discriminatorio es el de 1 cm.

Pocos autores no hallan un valor pronóstico independiente para el tamaño tumoral en pacientes con ganglios negativos. Entre ellos Sears et al.³⁵, aunque en su serie de 275 pacientes dominan ampliamente los tamaños mayores de 3 cm y Courdi et al.¹⁴⁵, donde solo se analiza la recurrencia.

Dado el incremento actual de los tumores diagnosticados con un tamaño igual o menor a 2 cm. , merced al auge de los programas de diagnóstico precoz, este subgrupo de pacientes merece un análisis específico. Al comparar los tumores mayores o menores de 1 cm. Hallamos diferencias notables en la evolución clínica, aunque el escaso número de casos con tumores pT1ab y los pocos sucesos (20 recurrencias y solo 9 muertes) no permiten hallar diferencias significativas. El pronóstico de los tumores pT1ab es excelente, con una supervivencia específica superior al 95% a los quince años de seguimiento, y una supervivencia libre de enfermedad superior al 90%. Los tumores pT1c tienen una tasa de supervivencia inferior en nueve puntos porcentuales. Esta diferencia entre los tumores pT1ab y pT1c ya ha sido descrita por Rosen et al.²⁶ en su serie de 474 pacientes con tumores pT1N0, donde la diferencia de supervivencia es de 17 puntos, también a 15 años, aunque en este caso se trata

mortalidad por todas las causas; este autor estima la curación estadística en el 80% de los tumores pT1ab y en el 70% en los tumores pT1c. Leitner et al.³³² y Arnesson et al.³³³ analizan el pronóstico concreto de los tumores pT1ab en 218 y 248 pacientes respectivamente, ambos coinciden en el excelente pronóstico del grupo, hallando que el principal factor pronóstico en este subgrupo sería el grado histológico. En nuestra corta serie, la determinación del grado no ofrece información pronóstica, por contra, la sobreexpresión de la proteína p53 es el único factor capaz de delimitar el pronóstico, con un 100% de supervivencia específica en los 17 casos con tumores pT1ab y p53 negativos.

5.5. – RECEPTORES HORMONALES.

5.5.1. – RECEPTORES ESTROGÉNICOS.

En el 79% de los casos en que se conocían, los receptores de estrógenos se determinaron per método bioquímico; en el 21% restante se determinaron por inmunohistoquímica, método que ha demostrado ser equiparable a la determinación por los métodos habituales³³⁴⁻³³⁶. Considerando positivos los valores ≥ 9 fmol/mg y $\geq 5\%$ de células marcadas, la tasa de positividad de los receptores estrogénicos es del 52,9%. Esta tasa es ligeramente inferior a la media de las reportadas por varios estudios en pacientes con ganglios negativos^{52, 91, 145, 170, 178, 181, 207, 212, 228, 236, 276, 288}, centrados o no en este factor, que van del 51 al 71%. Esta importante variación es atribuible a los distintos métodos empleados, los distintos puntos de corte para definir la positividad, y al hecho que en muchas series el porcentaje de RE desconocidos es muy amplio, llegando al 40% en alguna serie.

En nuestra serie, los receptores estrogénicos positivos se relacionan significativamente con la edad mayor y el estado postmenopáusico, con menor tamaño, menor grado, y ausencia de necrosis. Estas asociaciones son corroboradas por la literatura^{137, 166, 167}, y sugieren que los receptores de estrógenos pueden ser considerados marcadores biológicos del grado de diferenciación tumoral¹⁶⁹. También hemos hallado una clara relación con la euploidía y menor fase S, ya establecida por Wenger et al.¹²², en una amplísima serie de 127.000 casos, y por otros autores^{135, 131, 132}. No hemos podido confirmar la correlación con la expresión de la proteína HER-2/neu que hallan varios autores^{204, 209, 210, 230}, en cambio, si es altamente significativa la relación con la expresión de la p53, al igual que en las series de Cattoretti et al.²⁶⁶, Isola et al.²⁷⁶, Marks et al.²²⁹ y Rosen et al.²⁷⁸.

La relación entre los receptores de estrógenos y el pronóstico en el cáncer de mama es un tema muy controvertido. En nuestras pacientes, con más del 95% de valores conocidos y un largo seguimiento, no hallamos valor pronóstico significativo, si bien la diferencia global en la supervivencia se cifra en un 5% a favor de los RE positivos. La observación de la curva de recurrencia nos muestra que la diferencia a 5 años de seguimiento es del 7 - 8%, pero que va disminuyendo conforme pasa el tiempo hasta ser mínima a los 15 años. Esta situación explica que, cuando el seguimiento es limitado, los RE sean frecuentemente un factor pronóstico importante^{34, 36, 146, 171}, pero cuando el seguimiento es superior a los 5 años, no tienen valor pronóstico^{170, 176, 278, 290} o éste se pierde en el estudio multivariado^{52, 85, 137, 144, 145, 288}. Pichon et al.¹⁸³, estudiando 2.257 casos con un seguimiento medio de 8,5 años, hallan que los receptores estrogénicos mantienen su valor pronóstico independiente en el estudio multivariado, pero aplicando análisis dependientes del tiempo, el valor predictivo de los RE baja aproximadamente un 20% por año, perdiendo su valor tras ocho años de seguimiento.

Thorpe et al.¹⁸⁴ en un estudio donde analizaba el valor de los receptores de estrógenos en 952 pacientes postmenopáusicas, descubrió que las pacientes con valores altos de RE (>100 fmol/mg) tenían un pronóstico diferenciado del resto de las pacientes RE positivos, y similar al de los casos con RE negativos. En nuestro estudio, el comportamiento de este subgrupo de pacientes es el mismo; las 42 pacientes con valores superiores a 120 fmol/mg o porcentaje de tinción por inmunohistoquímica superior al 50% de las células tumorales, mayoritariamente postmenopáusicas, tienen una evolución clínica particularmente agresiva. Sancho-Garnier et al.¹⁸⁵ confirman los resultados, y sugieren que este comportamiento clínico se debe a la presencia de un producto modificado del gen que codifica los RE.

5.5.2. – RECEPTORES DE PROGESTERONA.

En todos los casos, la determinación de los receptores de progesterona se realizó mediante técnicas de inmunohistoquímica. Al igual que con los RE, esta técnica produce resultados equiparables^{337, 338} o superiores³³⁹ a la determinación por métodos bioquímicos. La tasa de positividad del 36% es similar a la descrita en otras series de pacientes con ganglios negativos^{135, 181, 207, 236}.

Los factores con que se correlacionan los receptores de progesterona son los mismos que con los receptores de estrógenos, edad, menopausia, tamaño tumoral, grado, necrosis, aneuploidía, fase S y proteína p53, asociándose siempre la positividad con los factores favorables. Diversos autores encuentran las mismas relaciones^{122, 137, 147, 160, 276, 290}.

Al igual que pasa con los RE, en nuestra serie los tumores con receptores de progesterona positivos tienden a tener un mejor pronóstico, en este caso hay una significación marginal para la supervivencia libre de

enfermedad a distancia y para la supervivencia específica. El papel pronóstico de los receptores de progesterona en las pacientes con ganglios axilares negativos queda poco claro en la literatura, ya que pocos trabajos analizan la cuestión. En general, los resultados son similares a los obtenidos con los RE; varios autores hallan un valor pronóstico independiente para los RP, especialmente en estudios con seguimiento corto^{36, 135, 137, 145, 148, 178}; en otras ocasiones, las diferencias iniciales van perdiendo valor con el tiempo, desapareciendo al realizar el análisis multivariado^{52, 85, 132, 165, 174, 175, 176, 183, 230, 288}, aunque en este caso su valor pronóstico parece mantenerse durante un periodo más prolongado^{165, 176}. De hecho, el valor pronóstico de los RP tiende a superar el de los RE^{135, 137, 145, 148}. La interacción entre positividad de receptores y la respuesta a un ulterior tratamiento hormonal cuando la enfermedad recurra, puede amplificar el valor pronóstico de los receptores hormonales, especialmente al analizar la supervivencia específica por cáncer³⁴⁰.

La determinación conjunta de los receptores de estrógenos y de progesterona no parece aumentar su valor pronóstico, el subgrupo RE+RP- se comporta clínicamente igual que los RP negativos, y la población más conflictiva, los tumores RE-RP+, es muy escasa, impidiendo sacar conclusiones sobre su comportamiento.

5.6. – CITOMETRÍA DE FLUJO.

Aunque la citometría de flujo es una técnica estandarizada, existen diferentes aspectos técnicos que pueden dificultar la interpretación de los resultados obtenidos. Generalmente se acepta que el análisis de las muestras parafinadas reduce la calidad de los histogramas, por lo que se aceptan coeficientes de variación más elevados que al estudiar tumores congelados¹²⁴. Pese a ello, una parte sustancial de las muestras no ofrecen resultados de ploidía o de cinética celular aceptables. La tasa de análisis no válidos varía en la literatura revisada, y en muchos casos no se reportan^{125, 128, 132-134, 329}, analizando todos los factores pronósticos solo en los tumores con muestras válidas para la citometría de flujo, lo que supone un importante sesgo por selección de pacientes. Los trabajos que siguen las recomendaciones de la Conferencia de Consenso en citometría de flujo¹²⁴, y por tanto describen el porcentaje de histogramas no válidos^{122, 125, 130, 131, 135, 136, 138, 140}, reportan una tasa de análisis de DNA válidos que varía entre el 85 y el 96% y una tasa de obtención de fase S, aceptable técnicamente, del 61 al 86%. En nuestro estudio, los histogramas válidos para el estudio de la ploidía son el 95%, pero la fase S solo es aceptable en el 60% de los casos. Este último porcentaje se debe a la gran cantidad de detritus celulares presentes en las muestras, probablemente debido al deterioro de muchas de las muestras archivadas, algunas de ellas con 15 años de antigüedad, y a que no se aceptaron como válidos los histogramas con coeficientes de variación superiores al 10%. Pese a que el análisis de la población en la que no se dispone de fase S no muestra diferencias significativas, excepto en la ploidía, respecto a la población en que se dispone resultados válidos, esta alta tasa de valores desconocidos resta fiabilidad al análisis de la serie con relación a este factor.

5.6.1. – PLOIDÍA.

La distribución de las distintas categorías respecto a la ploidía de nuestra serie muestra un 57,8% de tumores diploides, un porcentaje de tumores *near-diploides* (DI mayor de 1 y menor de 1,2) del 4,7%, siendo el total de aneuploides el 42,2% de los tumores. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Wenger et al.¹²² en el análisis de más de 127.000 casos; el hecho de que en esta serie se realizara en material congelado explica el mayor porcentaje global de aneuploidía en esta larga serie (47%), ya que en muestras parafinadas es muy difícil identificar los tumores hipodiploides¹²⁴. El porcentaje de aneuploides de nuestra serie cae dentro del rango de 41 – 49% que se extrae de varios de los trabajos publicados en pacientes con ganglios negativos^{127, 131, 137}, si bien en otros estudios el porcentaje es más alto, incluso superando el 60%^{126, 133, 135-137}. Sin embargo en muchas de estas series hay una clara selección de pacientes; así en la serie de Fisher et al.¹²⁹, basada en las pacientes del ensayo NSABP B-04, de las 1.665 pacientes que fueron randomizadas solo había material histológico disponible en la mitad, y de estas solo se pudo realizar la citometría en 398 pacientes, por tanto, los resultados se basan en solo una cuarta parte de la población estudiada; el sesgo que supone esta selección hace poco extrapolable los resultados.

Para analizar el factor ploidia se han agrupado los tumores *near-diploides* con los diploides. Esta agrupación se basa en la evolución clínica del grupo de pacientes con tumores cuyo DNA está comprendido entre 1 y 1,2 y es una de las conclusiones de la Conferencia de Consenso¹²⁴. Con esta dicotomización, el porcentaje de tumores euploides en nuestra serie es del 62,5% y el de aneuploides del 37,5%.

Como en varios estudios^{125, 127, 128, 130, 132, 134, 329}, nuestros resultados muestran una relación significativa entre los tumores euploides y el menor grado histológico, así como con la positividad de los receptores estrogénicos

y de progesterona. Estas asociaciones sugieren que la ploidía es también un marcador de diferenciación tumoral. No hemos podido encontrar la asociación que autores como Wenger et al.¹²² y Fisher et al.¹²⁹ hallan con el tamaño tumoral, si bien este resultado no es común en otros estudios^{133, 137}. Tampoco, en nuestra serie, hay una relación con la edad y el estado menstrual, o con la expresión de las proteínas HER-2/neu y p53 que si describen otros autores^{128, 137, 230, 275, 276}. Como en el caso de la tasa de aneuploides, la selección de pacientes que se hace en muchos estudios hace difícil sacar conclusiones definitivas. La correlación con la fase S se discutirá más adelante.

En nuestras pacientes, la presencia de la aneuploidía comporta claramente un mal pronóstico para todos los sucesos analizados, manteniendo su valor en el análisis multivariado, donde es el segundo factor en importancia para la supervivencia específica tras el tamaño tumoral. Las pacientes con tumores aneuploides tienen un riesgo de morir por su enfermedad que dobla el de las pacientes con tumores euploides. El estudio del índice de DNA como variable continua con transformación "*cubic spline*" muestra que este riesgo se centra básicamente en los tumores con índice de DNA situado entre 1,4 y 1,9. Este hecho da soporte a la agrupación de tumores diploides con los near-diploides.

Sin embargo, el estudio de las curvas de supervivencia nos permite apreciar un fenómeno similar al que ocurre con los receptores hormonales; a partir del octavo año de seguimiento las curvas de supervivencia libre de enfermedad correspondientes a tumores euploides y aneuploides tienden a converger, disminuyendo progresivamente la amplia diferencia porcentual entre ambas que se puede observar entre el cuarto y el octavo año, de hecho, a partir del octavo año no recurre ninguna de las pacientes con tumores aneuploides que permanecen en ese momento libres de enfermedad. Este efecto no es todavía apreciable en la curva de supervivencia específica, probablemente por el tiempo que transcurre entre

recurrencia y muerte. Parece lógico pensar que con un seguimiento más amplio, las diferencias de supervivencia entre euploides y aneuploides disminuyan todavía más, si bien es difícil que lleguen a converger.

La conferencia de Consenso¹²⁴ estableció que, pese a las diferencias halladas en varios estudios, la determinación de la ploidía no parecía tener suficiente discriminación pronóstica en el cáncer de mama como para recomendar su uso en la práctica clínica. Probablemente fue una conclusión precipitada, pero tuvo como consecuencia que desde entonces sean muy pocos los artículos publicados que analicen el valor de la ploidía. Este hecho justifica que la mayoría de los estudios sobre esta cuestión sean de finales de los años 80 y primeros años 90; en estos estudios todavía no estaban incorporados a la práctica investigadora los estrictos criterios que rigen el análisis de los factores pronósticos en el cáncer de mama, con lo que los sesgos por selección de pacientes son importantes. Esto explica las marcadas diferencias entre el valor adjudicado a la ploidía por diversos autores.

En el subgrupo de pacientes con ganglios negativos varios trabajos dan valor a la ploidía en el análisis multivariado. Ellis et al.³⁴¹, en una corta serie de 128 pacientes con un seguimiento medio de 10 años, hallan que la aneuploidía es un factor de mal pronóstico para la supervivencia específica, con un riesgo relativo de 2,25; Yuan et al.³⁴², Lewis¹²⁷ y Kallioniemi et al.³⁴³ describen resultados similares, pero el número de pacientes con ganglios negativos es también bajo; el artículo de Clark et al.³⁴⁴ que halla valor pronóstico a la ploidía es un estudio piloto con información y seguimiento muy limitados, y está basado en material congelado de banco de tumores. El mismo grupo de trabajo ha publicado otros estudios, basándose también en el material del banco de tumores de San Antonio refiriendo resultados completamente diferentes al aumentar el número de pacientes^{131, 135, 138}, por otra parte, aumentan también el sesgo al seleccionar pacientes de particular buen pronóstico (tumores RE+ y menores de 3 cm). Otros estudios

negativos son el de Sigurdsson et al.¹³⁷ en el que el seguimiento es corto y buena parte de las pacientes con ganglios negativos recibieron tratamiento complementario; los de Keyhani-Rofagha et al.¹²⁶ y de Toikkanen et al.³⁴⁵, con menos de 100 pacientes analizados. Finalmente Merkel et al.³⁴⁶ y Witzig et al.¹⁴⁰ publican estudios más amplios y con un mayor seguimiento en los que la ploidía tampoco es un factor pronóstico independiente, pero en ambos casos la citometría de flujo se analizó en una población seleccionada por la disposición de material.

Probablemente la determinación de la ploidía es un factor pronóstico de interés en el cáncer de mama con ganglios negativos, pero la dificultad de estandarización de metodologías y los múltiples sesgos de los estudios publicados hacen difícil extraer conclusiones definitivas sobre su valor concreto en el largo listado de factores pronósticos.

5.6.2. – FASE S.

La determinación de la fase S solo fue satisfactoria en el 59,8% de las pacientes, como ya se ha descrito, la causa fue la ausencia de suficiente tejido tumoral en la muestra (era necesario un mínimo del 20%) y especialmente a la frecuente presencia de residuos celulares que interferían el análisis. Este problema, habitual en las muestras parafinadas, puede solucionarse en parte mediante sofisticados paquetes de software que permiten eliminar estos residuos, sin embargo, en el momento de realizar el análisis de las muestras no estaban disponibles. La población seleccionada por el hecho de disponer de fase S válida solo difiere de la general en una mayor proporción de tumores diploides, ya que las principales dificultades técnicas se centran en los tumores hipodiploides y poliploides.

El valor medio de fase S obtenido en nuestro estudio es similar al descrito por Muss et al.¹³³, pero más alto que los habitualmente descritos en

la literatura; las dificultades técnicas y las variaciones ya descritas en la selección de las pacientes pueden explicar este hecho.

La Fase S se correlaciona estrechamente con la ploidía^{125, 128-131, 133, 135, 137, 138, 346}, de ahí que los valores medios obtenidos en euploides y aneuploides sean muy distintos en nuestro estudio. La fase S elevada se correlaciona también con los factores sugestivos de agresividad neoplásica, tamaño, grado, necrosis, negatividad de receptores y positividad de la p53, hallazgos todos habituales en la literatura^{122, 129-131, 133, 137, 275, 276}.

El análisis de la fase S separando tumores euploides y aneuploides, según lo aconsejado en la Conferencia de Consenso¹²⁴, resultó en valores poco o nada significativos, por lo que, al igual que otros autores^{135, 140, 276, 346}, se ha preferido buscar un punto de corte común. El análisis como variable continua tampoco mejoró los resultados obtenidos con la dicotomización usando el valor del 14% para todo el grupo.

Con las limitaciones ya citadas de la cinética celular en nuestro estudio, los resultados muestran un importante valor pronóstico de la fase S en el análisis univariado, sin embargo su valor desaparece en el análisis multivariado, desplazada probablemente por la ploidía y la p53, dada su intensa correlación. En este análisis el número de pacientes incluidos era limitado, por lo que no se puede descartar que con un número más amplio de casos la variable desplazada fuera la ploidía, como sucede en otros estudios^{125, 136, 137, 140}.

En general se acepta que la fase S es un buen discriminador pronóstico en las pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos^{128, 129, 135-140, 230, 276}. Sin embargo, la valoración que se hace de su utilidad varía mucho; para varios autores solo tiene valor en tumores diploides^{128, 135} o en aneuploides¹³⁸; Stal et al.¹³⁹ limitan su valor en tumores pT1, y Merkel et al.³⁴⁶ en tumores con grados 2 y 3.

Como en el caso de la ploidía, la fase S parece ser un buen factor pronóstico, pero en este caso la complejidad técnica hace más difícil la estandarización de su uso, y la recomendación es que cada centro determine sus propios valores de corte ¹²⁴.

5.7. – SOBREEXPRESIÓN DE HER-2/neu.

El 19,6% de los tumores estudiados presentaron sobreexpresión del oncogén HER-2/neu per técnicas de inmunohistoquímica (> 5% de células teñidas). Este porcentaje de positividad en pieza parafinada está dentro de los porcentajes descritos en la literatura para el grupo de ganglios negativos ^{201, 207, 215, 218, 227, 228, 288}, que oscilan entre el 15% y el 23,9%, si exceptuamos el sorprendente 44% obtenido por Rosen et al.²¹⁶. Por método de amplificación genética ^{205, 212, 217, 223}, la tasa de positividad es ligeramente superior (21 – 30%).

En nuestra serie, la sobreexpresión de HER-2/neu solo se correlaciona significativamente con la presencia de componente intraductal extenso y con la presencia de infiltrado linfoplasmocitario, mostrando una tendencia a asociarse con edades jóvenes. La sobreexpresión de HER-2/neu en tumores con extenso componente intraductal prácticamente dobla el de los tumores sin él. Esta asociación es frecuente en la literatura ^{207-209, 214}, y en ella se basa Allred et al.²⁰⁹ para hipotetizar que la disfunción del gen tiene especial importancia en los primeros pasos de la tumorigénesis en el epitelio mamario. La relación con la presencia de infiltrado linfoplasmocitario ha sido menos referida en la literatura ²¹⁴, y es difícil encontrar una explicación biológica. La relación con edades jóvenes o con la premenopausia no es habitual ^{208, 209}, y en la mayoría de las series no se confirma ^{202, 207, 212, 218, 227}. No hemos hallado ninguna correlación con el tamaño,

grado, receptores hormonales, ploidía, fase S o expresión de p53, presentes en diferentes publicaciones^{202, 207, 209, 210, 212, 214, 218, 228, 230}.

La sobreexpresión de HER-2/neu no ha tenido ningún valor pronóstico en nuestro estudio. Tampoco hubo diferencias al analizar niveles más altos de sobreexpresión que la del 5% de células marcadas. Solo en dos estudios con un seguimiento mayor de 5 años, con un número suficiente de pacientes, y que incluyan un análisis multivariado, se halla valor pronóstico para la sobreexpresión de HER-2/neu en el cáncer de mama con ganglios negativos. Kallioniemi et al.²³⁰, en 174 pacientes (pertenecientes a un grupo total de 319 casos) y con un seguimiento medio cercano a los 10 años, demuestran un valor pronóstico independiente para el oncogén solo en la supervivencia global. Quénel et al.²²⁸ analizan un grupo de 942 pacientes con un seguimiento medio de 7 años, de ellos 382 no tienen afectación ganglionar, en el análisis multivariado de la supervivencia libre de enfermedad hallan que la expresión de HER-2/neu es un factor pronóstico independiente, aunque con inferior potencia que el tamaño y el grado, no obtienen el mismo valor para la supervivencia específica. En el resto de los estudios, la expresión de HER-2/neu no tiene valor pronóstico^{204, 208, 214-218, 223, 288}, o lo pierde en el análisis multivariado^{207, 215, 227, 276}.

5.8.- SOBREENPRESIÓN DE p53.

5.8.1. - METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN. TASA DE POSITIVIDAD.

Las alteraciones del gen p53 se pueden analizar básicamente con dos métodos. El análisis genético por secuenciación o amplificación permite un conocimiento exacto de la tasa de mutaciones y del codón en que se producen estas, sin embargo son métodos complejos y costosos y de muy difícil aplicación a la práctica clínica; otro inconveniente es que no detecta los casos en que hay una acumulación de proteína p53 en el núcleo celular, que no se relaciona con una mutación en el gen p53, como puede suceder cuando se forman complejos con otras oncoproteínas²⁶¹. El análisis mediante inmunohistoquímica permite descubrir la acumulación de proteína anómala en el núcleo celular, aunque no puede detectar las mutaciones debidas a deleciones del gen; es un método más sencillo técnicamente y al que se está más habituado en los laboratorios de Anatomía Patológica. Al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos es habitual que la inmunohistoquímica obtenga unas tasas de positividad un 30% superiores a las mutaciones detectadas por análisis genético, y que por otra parte un 20 – 30% de las mutaciones no se traduzcan en una sobreexpresión de la proteína^{274,347}, sin embargo, el hecho que la determinación por inmunohistoquímica se correlacione igual o mejor con la evolución clínica de las pacientes hace pensar que hay alteraciones de la p53, que no se detectan por las técnicas habituales de estudio genético, que tienen su importancia en la función de la p53 y por tanto en el pronóstico del cáncer de mama^{268, 292}.

Si nos centramos en la inmunohistoquímica, el método de detección empleado en nuestro trabajo y en la mayor parte de los que estudian el valor pronóstico de la p53, hay que analizar los anticuerpos usados y ciertos

aspectos de la metodología. Por lo menos 13 anticuerpos monoclonales están disponibles en el mercado y varios estudios han comparado algunos de ellos ^{274, 291, 292, 348}. La tasa de positividad varía entre el 17 y el 46,6%; los que más altas tasas de positividad ofrecen son el Pab 1801 y el Pab 240, siendo además los que mejor se correlacionan con el pronóstico de las enfermas; el uso conjunto de ambos de ellos consigue mejorar discretamente los resultados. El anticuerpo monoclonal utilizado en nuestro estudio es el Pab 1801.

El análisis de las muestras parafinadas tiene como desventaja la escasa penetración de muchos reactivos, por lo que las tasas de positividad suelen ser menores que cuando se utiliza tejido fresco congelado, incluso se ha demostrado que el almacenamiento incorrecto de los bloques de parafina disminuye notablemente la tinción para la p53 ²⁷¹. Para superar este inconveniente es necesario realizar un tratamiento del material en microondas, con lo que se consigue que la penetración de los reactivos sea equiparable a la del tejido fresco. Sin este tratamiento, la tasa de positividad es más baja y la distribución de los reactivos irregular, lo que puede comportar interpretaciones erróneas de los resultados ³⁴⁸⁻³⁵².

La tasa de positividad obtenida en nuestras muestras ha sido del 39,9%, encontrándose en la parte alta del rango que diversos estudios reportan para pacientes con ganglios negativos ^{276, 277}, que es del 20% al 44%, esta variación es explicable por las diferentes poblaciones estudiadas, los distintos anticuerpos utilizados, y las variaciones técnicas ya citadas.

5.8.2. – CORRELACION CON OTROS FACTORES.

5.8.2.1. – Edad.

En nuestro estudio la sobreexpresión de la p53 no se correlaciona con la edad o el estado menstrual, esta correlación solo es descrita por pocos autores ^{281, 283, 285, 286}, frecuentemente restringiéndola a pacientes de edad menor de 35 años, lo que ha llevado a Walker et al.⁷⁹ a postular que esta asociación puede indicar inestabilidad genética en estas pacientes.

5.8.2.2. – Factores histopatológicos.

La baja tasa de positividad que hallamos en los carcinomas lobulillares coincide con el estudio de Rosen et al.²⁷⁸, donde solo el 8,5% de los tumores lobulillares eran positivos, extendiéndose esta baja tasa a los carcinomas ductales con componente lobular in situ. Este mismo autor, también halla relación con la infiltración linfoplasmocitaria. En nuestro estudio hay una asociación entre la positividad para la p53 y el mayor tamaño tumoral que confirma los resultados de Elledge et al.²⁸⁰, y Marks et al.²⁹⁰. Otros autores ^{276, 277} hallan una significación marginal a esta correlación. La correlación intensa con el grado o la necrosis está presente en la mayoría de las publicaciones ^{160, 220, 276-278, 283-286}, sugiriendo una mayor agresividad neoplásica en los tumores p53 positivos.

5.8.2.3. – Receptores hormonales.

La relación entre la expresión de la p53 y los receptores hormonales es altamente significativa, siendo mucho mayor su sobreexpresión en tumores RE negativos y/o RP negativos. Al igual que sucede con el grado, esta asociación es frecuentemente descrita por la mayoría de autores ^{160, 220, 276-278, 280, 281, 283, 285, 286, 290}. Esta asociación ha sido observada independientemente de que la determinación de los receptores se haya

realizado por métodos inmunohistoquímicos o bioquímicos, así como con varios métodos para detectar la expresión de la p53.

5.8.2.4. – Citometría de flujo.

No hemos hallado una correlación entre la expresión de la p53 y la ploidía, solo Elledge et al.²⁸⁰ en una serie altamente seleccionada, con tumores de tamaño comprendido entre 1 y 3 cm hallan esta asociación. La fase S en los tumores p53 positivos es significativamente más alta que en los tumores p53 negativos, estos resultados son consistentes con los de los autores que incluyen este factor en el análisis^{275, 276, 286}, corroborando las características agresivas y rápidamente proliferativas de los tumores que sobreexpresan p53.

5.8.2.5. – HER-2/neu.

Varios autores hallan una correlación entre la sobreexpresión de HER-2/neu y sobreexpresión de p53^{214, 220, 276}. En nuestro estudio esta asociación no está presente, y la tasa de doble positividad es muy baja (7%).

5.8.3. – VALOR PRONÓSTICO.

La valoración del nivel de positividad de la p53 es fundamental para estudiar su hipotético valor pronóstico. Nosotros hemos optado por utilizar un histocore en que se valora tanto la intensidad de la tinción como el porcentaje de células marcadas. Esto permite realizar un análisis buscando un punto de corte óptimo; toda puntuación por encima de 0 se relacionaba significativamente con la evolución clínica de las pacientes, sin embargo el punto de corte óptimo se situaba en el histocore > 2. El análisis de las pacientes con histocore de 1 mostró que las tasas de recurrencia y supervivencia de este grupo eran iguales o superiores a las pacientes con

histocore 0, sugiriendo que ambas forman parte del mismo grupo pronóstico, por lo tanto se ha adoptado como positivos los tumores con un histocore > 2 para realizar los análisis de supervivencia, con este punto de corte la tasa de positividad es del 33,1%. Este método es el usado por otros autores. Allred et al.²⁷⁵ también usan el mismo punto de corte, aunque en su caso la tasa de positividad se sitúa en el 50% de los tumores. O'Malley et al.²⁸⁹, usando también el histocore hallan la máxima significación en un histocore más alto, resultando positivos solo el 16%. En el resto de los estudios se toma como positivo un punto de corte arbitrario sobre el porcentaje de células marcadas que varía entre el 1% y el 75%, obteniendo tasas de positividad muy variadas; en la mayoría de casos el punto de corte se realiza entre el 10 y el 20% de núcleos positivos. En nuestro caso estas tasas son prácticamente equivalentes al punto de histocore seleccionado, pero no permiten incluir como positivos tumores con un porcentaje relativamente bajo de núcleos positivos pero cuya alta intensidad de tinción hace difícil considerarlos negativos.

Utilizando esta dicotomización, la sobreexpresión de la proteína p53 es un factor pronóstico significativo en el cáncer de mama con ganglios negativos, tanto en el análisis univariado como en el análisis multivariado. El riesgo relativo de tener una recurrencia o de morir por cáncer para una paciente con un tumor p53 positivo es respectivamente de 1,7 y 1,8, con relación a una paciente con un tumor p53 negativo, después de ajustarlo por los otros factores pronósticos independientes. La observación de las curvas de supervivencia, nos muestra que la separación entre los dos grupos se inicia rápidamente, manteniéndose separadas durante todo el seguimiento y sin que haya una tendencia a la convergencia tardía como ocurre con la ploidía.

Como sucede con otros factores pronósticos, la revisión de la literatura debe hacerse con cautela. Sumándose a la variación de anticuerpos monoclonales y puntos de corte usados, otros factores dificultan

la interpretación de los trabajos. Varios estudios se han realizado en poblaciones que incluyen pacientes con ganglios positivos y negativos, no diferenciando bien los resultados según este factor ^{160, 164, 220, 281}. Otros realizan una selección previa de la población en función del tamaño (solo T1N0 en el caso de Stenmark-Askmal et al.²⁸⁶, o tumores de 1 a 3 cm en el de Elledge et al.²⁸⁰), o de la disposición de material histológico ^{276-278, 284}. En muchos estudios el número de pacientes con ganglios negativos es inferior al de los 150 casos recomendables ^{164, 276, 277, 284, 285, 289, 290}, o el seguimiento medio es inferior a 5 años ^{160, 275, 281, 285}. Finalmente en tres estudios, una parte importante de las pacientes ha recibido tratamiento complementario sistémico ^{239, 283, 284}.

Se han considerado que cumplen un mínimo de criterios los estudios con más de 100 pacientes analizados y un seguimiento medio mayor de 3 años, y en los que se haya realizado un análisis multivariado. La *tabla 5.1* resume sus principales características y resultados.

INVESTIGADOR	ANTICUERPO	NUMERO DE PACIENTES	SEGUIMIENTO MEDIO (años)	% POSITIVIDAD p53	SUP. LIBRE ENFERMEDAD		SUP. GLOBAL	
					RR	p	RR	p
Thor et al. (277)	1801	127	7	24 (#)	2,7	0,018	2,8	0,057
Isola et al. (276)	CM1/250	289	8,5	14 (α)	—	—	2,7	< 0,0001
Allred et al. (275)	1801/240	700	4,5	52 (¥)	2,5	0,008	1,7	0,03
Barnes et al. (284)	CM1	103	8,6	19 (§)	—	0,009	—	< 0,001
Sivestrini et al. (279)	1801	256	6	44 (¶)	3,95	< 0,0001	3,1	0,0001
Elledge et al. (280)	SSCP (*)	200	6	14	2,2	0,02	—	—
Marks et al. (290)	1801	147	5	27 (#)	—	0,03	—	0,01
Beck et al. (160)	DO1	227	4	19 (†)	—	N.S.	—	N.S.
Rosen et al. (278)	1801	474	10	21,5 (†)	—	N.S.	—	N.S.
MacGrogan et al. (283)	DO7	398	9,8	32 (#)	—	N.S.	—	N.S.
Bevilaqqua et al. (303)	1801	211	6,5	28 (†)	2,82	0,025	2,35	0,0036
Barbareschi et al. (239)	DO7	178	5	17 (‡)	—	N.S.	—	N.S.

* SSCP: Single strand conformation polymorphism.

> 1% células marcadas; α > 20%; ¥ Histocore > 2; § > 75%; ¶ > 5%; † > 10%; ‡ > 15%.

N.S.: No significativo. RR: Riesgo relativo.

Tabla 5.1: Estudios que analizan el valor pronóstico de la p53 en ganglios negativos.

Como se puede observar, de las doce publicaciones ocho reportan resultados favorables a la p53 y cuatro no la consideran factor pronóstico independiente.

Beck et al.¹⁶⁰ estudian 462 pacientes con ganglios positivos y negativos, de ellas 227 no tienen afectación axilar. El material procede de un banco de tumores con 1200 casos y solo incluyen pacientes cuyo seguimiento sea superior a 30 meses, lo que ya establece un sesgo. Consideran positivos a los tumores con más de un 10% de células marcadas, con lo que la tasa de positividad en ganglios negativos es del 19,4%. La sobreexpresión de la p53 resulta un factor pronóstico significativo en el análisis univariado, perdiendo su valor en el multivariado, pero este se realiza con solo un 60% de las pacientes, que son las que tienen todos los parámetros analizados.

En el trabajo de Barbareschi et al.²³⁹ el número de casos es de 178 pacientes con ganglios negativos, pertenecientes a dos centros distintos, uno italiano y otro británico, con un seguimiento medio de 5 años. El 25% de las pacientes habían recibido tratamiento complementario con quimioterapia y/o hormonoterapia. La positividad para la p53 se establece arbitrariamente en la tasa del 15%. No obtienen valor pronóstico para la sobreexpresión de la p53, aunque el tratamiento complementario, presumiblemente en tumores de mayor grado, mayor tamaño y receptores estrogénicos negativos, probablemente desvirtúa en parte los resultados.

Rosen et al.²⁷⁸ analiza 474 pacientes con ganglios negativos provenientes de una base de datos de más de 1000 pacientes, sin que se informe de los criterios de selección. Las pacientes no recibieron tratamiento complementario y el seguimiento es largo, pero la principal crítica a este trabajo radica en la preparación de las muestras, ya que no se utiliza el tratamiento con microondas, sino el calentamiento en autoclave, como ya se

ha explicado, este hecho disminuye notablemente la penetración de los reactivos en el material parafinado, y por tanto la fiabilidad de los resultados.

La serie que estudian MacGrogan et al.²⁸³ se compone de 942 pacientes, de las que 398 no tienen afectación axilar. Aproximadamente el 20% de las pacientes con ganglios negativos recibieron tratamiento complementario con quimioterapia. Todo tumor con más de un 1% de células marcadas se considera positivo, con esta división la p53 es un factor pronóstico para ganglios negativos en el análisis univariado, no así en el multivariado, donde es desplazado por el grado. Para todo el grupo, y para el grupo de pacientes con ganglios positivos, la p53 si mantiene su valor en el análisis multivariado. El mismo autor refiere diferencias significativas entre los grupos con mayor o menor sobreexpresión de la p53, pero no se realiza el análisis multivariado con esta división, por lo que no se puede descartar que los resultados pudieran variar tomando como punto de corte un porcentaje mayor de células marcadas.

Entre las publicaciones que encuentran valor pronóstico a la sobreexpresión de la p53, la de Barnes et al.²⁸⁴, analiza solo 103 pacientes con ganglios negativos, tomando como positivos los tumores con más del 75% de células marcadas, con lo que gran parte de los tumores p53 positivos para otros autores quedan en el grupo de buen pronóstico. Thor et al.²⁷⁷, Isola et al.²⁷⁶ y Marks et al.²⁹⁰ analizan grupos de pacientes con ganglios positivos y negativos, los puntos de corte para la positividad de la p53 son más habituales. El subanálisis de los subgrupos con ganglios negativos muestra valor significativo independiente para la p53, así como para todo el grupo.

Elledge et al.²⁸⁰ utiliza una técnica de análisis genético (SSCP), en un grupo de pacientes altamente seleccionadas, con un tamaño tumoral entre 1 y 3 cm. El 14% de tumores con alteraciones genéticas muestran peor supervivencia libre de enfermedad con 6 años de seguimiento medio. Sin

embargo, la selección previa y el método de determinación hacen difícil comparar sus resultados con los de la literatura.

Los trabajos de Silvestrini et al.²⁷⁹, Bevilacqua et al.³⁰³ y Allred et al.²⁷⁵ analizan grupos compuestos solo de pacientes con ganglios negativos, con mayor número de pacientes, 276, 211 y 700 respectivamente, sin tratamiento sistémico alguno. Los tres autores utilizan el anticuerpo Pab1801, el mismo que en nuestro estudio, tomando como punto de corte cotas bajas de positividad, con lo que las tasas de tumores considerados positivos son altas. En los tres casos la sobreexpresión de la p53 obtiene valor pronóstico independiente, tanto para la supervivencia libre de enfermedad como para la supervivencia específica por cáncer de mama, acompañado del tamaño tumoral, la fase S, la angiogenesis o el índice de proliferación por timidina tritiada, según los diferentes estudios. Es dentro este grupo de trabajos, con metodología similar donde puede encuadrarse nuestro estudio, siendo los resultados parejos.

El subanálisis del grupo de tumores p53 positivos también muestra diferencias entre los casos con baja expresión y los casos con alta expresión. Este hallazgo, común en varios estudios^{275,283}, sugiere que la mayor positividad tal vez sea consecuencia de una mayor acumulación de mutaciones en diferentes poblaciones celulares intratumorales, lo que conllevaría un peor pronóstico para las pacientes con estos tumores.

5.9. – MODELOS PRONÓSTICOS.

Una vez determinados los factores pronósticos independientes se ha intentado buscar un sistema para trasladar su utilidad a la práctica clínica.

El método utilizado es la simple sumación de efectos de los tres factores pronósticos dependientes de la biología tumoral, el tamaño (pT1 vs. pT2-3), la ploidía (euploide vs. aneuploide), y la sobreexpresión de la p53 (p53 – vs. p53 +). La participación de la edad es más difícil de introducir en este modelo dada la curva de riesgo según la edad; en general se puede atribuir un mayor riesgo de recurrencia precoz, básicamente recidiva local, a las pacientes menores de 45 años. Del mismo modo las pacientes mayores de 70 años tienen un riesgo de mortalidad aumentado.

Como se puede observar en las diferentes curvas de supervivencia, se delimitan cuatro grupos con evoluciones clínicas muy distintas. Este modelo se ha comparado con el índice pronóstico de Nottingham y con la clasificación pronóstica emanada de la última conferencia de St. Gallen, delimitando mejor, para este grupo de pacientes, los diferentes grupos pronósticos

Hay un grupo de pronóstico excelente, con una supervivencia específica superior al 95% a 15 años, y que se compondría de tumores pT1, euploides y p53 negativos, en el cual la opción del tratamiento sistémico parece difícil de plantear. En los otros tres grupos, el pronóstico va empeorando a medida que se acumulan factores adversos. El grupo de riesgo bajo tiene una supervivencia del 75% a 15 años, tasa igual a la descrita clásicamente para el grupo global de pacientes con ganglios negativos; en este grupo parece sobradamente justificado la utilización de un tratamiento sistémico del tipo CMF y/o tamoxifeno.

Los otros dos grupos, riesgo medio y riesgo alto, tienen tasas de supervivencia más propias de pacientes con afectación axilar que sin ella. Parece lógico plantear en estas pacientes tratamientos complementarios más agresivos, con introducción de antraciclinas y/o taxanos, o regímenes con mayor nivel de intensidad o densidad de dosis.

Sea este u otro modelo, incluso si los factores pronósticos utilizados son otros, lo que parece claro es que el grupo de pacientes con ganglios negativos es heterogéneo, y que en él se engloban tanto pacientes con excelente pronóstico, con tasas de supervivencia iguales a las de la población general, como pacientes destinadas con alta probabilidad a morir por su enfermedad. La decisión de administrar o no tratamiento sistémico, y el tipo de éste, debe inevitablemente contemplar estos aspectos, y ajustarse al nivel de riesgo de cada paciente.

El grupo de tumores con tamaño igual o inferior a 2 cm y sin afectación axilar es el más frecuentemente hallado en los programas de diagnóstico precoz³⁵³, y por tanto la definición de factores pronósticos en este subgrupo es cada vez más importante.

En nuestro grupo de pacientes con tumores pT1, los únicos factores pronósticos que mostraban una significación, o una tendencia a ella fueron la división entre tumores mayores o menores de 10 mm y la sobreexpresión de la proteína p53. Con estos dos factores la clasificación pronóstica (ninguno, uno o dos factores adversos) muestra tres grupos, el primero (pT1ab y p53 negativa) muestra una supervivencia del 100% a 15 años, aunque el número de pacientes incluíbles en este grupo es muy bajo (17 casos); el tercer grupo (pT1c y p53 positiva) muestra una supervivencia cercana al 70% a 15 años, merecedora en el momento actual de tratamiento complementario; el grupo intermedio (pT1c y p53 negativa o pT1ab y p53 positiva) tiene una supervivencia superior al 90% a 15 años, y la opción de tratamiento es más

difícil de justificar, probablemente en pacientes jóvenes o con algún otro factor de riesgo asociado tenga que ser valorado.

Finalmente hemos intentado exponer gráficamente el diferente riesgo de recurrencia según la presencia de uno o más factores de riesgo, sin que necesariamente haya diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. Este análisis descriptivo, utilizado por McGuire et al.³⁵⁴ y Silvestrini et al.²⁴³ permite, cruzando los factores pronósticos particulares de una paciente con los del gráfico, hacerse una idea razonable del riesgo de esta paciente. Puede haber dificultades en ajustar exactamente los datos de una determinada paciente, pero en general se puede obtener la probabilidad de recurrir con un error del $\pm 5\%$.

5.10. – VARIACIÓN TEMPORAL DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS.

Gran parte de los trabajos realizados inicialmente sobre el tema de los factores pronósticos reportaban resultados con 5 años de seguimiento, incluyendo relativamente pocos sucesos. A medida que los datos maduran al aumentar el seguimiento y el número de eventos, muchos investigadores han llamado la atención sobre el papel cambiante de muchos teóricos factores pronósticos. Este hecho ha sido repetidamente objetivado con respecto al valor de los receptores estrogénicos^{165, 170, 176, 183}, pero también el análisis de otros factores muestra que hay cambios temporales^{88,99, 113, 182, 355-}

359

La curva de la tasa anual de recurrencia para este grupo de pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos muestra un pico de recurrencias en los primeros 2-3 años, con una lenta disminución posterior que se ve interrumpida por un segundo pico al principio de la segunda

década de seguimiento. Este segundo pico es de más dudosa existencia, ya que las recurrencias ocurridas en la segunda década son escasas, pudiendo elevar artificialmente las tasas anuales si se acumulan por azar en un periodo corto de tiempo. Sin embargo, las curvas mostradas por Demicheli et al.³⁵⁸ muestran una notable similitud, con un primer pico en los primeros dos años y un segundo pico alrededor del quinto año, al ser una población con una gran proporción de pacientes con ganglios positivos, es probable que los picos de recurrencia sucedan antes en el tiempo. Las curvas para pacientes con ganglios negativos de Saphner et al.³⁵⁹, basadas en 942 pacientes muestran la misma imagen que en nuestro estudio, un primer pico entre el año 1 y 3, con una tasa máxima de 7% en el segundo y tercer años, seguido por un descenso progresivo y un leve segundo pico a los 9-10 años, en este caso con una tasa máxima de recurrencia del 2%. Este autor refiere una tasa media de recurrencia del 5,52% para los 5 primeros años, y un 1,3% de tasa media para los años 6 a 12, discretamente inferiores a las nuestras, aunque buena parte de sus pacientes recibió tratamiento complementario con quimioterapia.

El análisis concreto de cada factor pronóstico muestra una división en dos grandes grupos. El primero, compuesto por la edad, los receptores hormonales, el grado histológico, la necrosis, la ploidía y la fase S muestran, con diferencias entre ellos, un valor pronóstico centrado en los primeros años de seguimiento, igualándose las tasas al aumentar el seguimiento. En el segundo, formado por el tamaño tumoral y la sobreexpresión de la p53, el valor pronóstico se extiende a todo el seguimiento realizado.

El valor de la edad ha sido analizado por Collett et al.³⁵⁶, hallando como en nuestro caso una desaparición de su efecto pronóstico más allá del quinto año. En nuestro caso es notable la diferencia entre las tasas de recurrencia observadas entre los dos grupos de edad en los primeros 4 años, probablemente a costa del mayor número de recurrencias locales en el grupo de edades jóvenes. El estado menopáusico es analizado por

Demicheli et al.³⁵⁸ y Saphner et al.³⁵⁹, sin que haya diferencias en ningún momento del seguimiento.

Las variaciones temporales del valor pronóstico de los receptores hormonales son las más estudiadas por todos los autores que han analizado este aspecto. El poder predictivo de los receptores es máximo en los primeros años de seguimiento (lo que explicaría el hecho de que en numerosos estudios fueran un poderoso factor pronóstico, al ser el seguimiento muy corto), posteriormente este valor va disminuyendo para acabar desapareciendo^{165, 170, 176, 182, 183, 357}, incluso cruzándose claramente las curvas, de tal manera que para Saphner et al.³⁵⁹ a partir del quinto año el factor adverso significativo es la positividad de los receptores estrogénicos. En nuestro estudio, los receptores estrogénicos nunca tienen poder pronóstico; en el caso de los receptores de progesterona tienen un importante valor pronóstico a los 3 y 5 años, perdiéndolo después progresivamente.

El grado histológico y la necrosis siguen patrones similares, valor pronóstico en los 3-5 primeros años y pérdida posterior de potencia estadística, similares resultados se observan en varios estudios^{113, 355}. La ploidía sigue un comportamiento similar, pero su valor se prolonga hasta el octavo año en nuestra serie, posteriormente la tasa de recurrencia de los tumores euploides es superior a la de los tumores aneuploides; la amplia diferencia inicial motiva que su valor estadístico independiente se mantenga al final del seguimiento, aunque hay una pérdida progresiva de valor pronóstico, siendo menor a los quince años de seguimiento que a los 5 o 10 años. La fase S sigue el mismo comportamiento, aunque el menor número de casos analizados no permite extraer conclusiones definitivas. Para Hilsenbeck et al.¹⁸² la fase S mantiene, e incluso aumenta, su valor con el paso del tiempo, igual resultados obtienen Daidone et al.³⁵⁷ analizando su equivalente, la fracción proliferativa por timidina tritiada.

Los factores citados hasta ahora son capaces de predecir las recurrencias tempranas, pero ninguno de ellos puede predecir las recurrencias tardías, es decir, las ocurridas después del quinto año. Los únicos con valor pronóstico en esta segunda parte del seguimiento son el tamaño tumoral, y, en menor medida, la sobreexpresión de la p53.

La sobreexpresión de la p53 mantiene su valor pronóstico en los cortes realizados a los 3, 5 y 10 años, así como al final del seguimiento. Si analizamos las curvas observamos que la tasa de recurrencia es siempre mayor para el grupo de tumores p53 positivos. , aunque las diferencias a partir del quinto año solo son marginalmente significativas. Solo Daidone et al.³⁵⁷ analizan este factor, llegando a la misma conclusión.

El tamaño tumoral es en nuestra serie el factor pronóstico con más potencia estadística en todos los momentos del seguimiento, y el único que alcanza la significación estadística como factor predictivo de las recurrencias tardías. Las curvas de las tasas de recurrencia muestran que los tumores mayores de 2 cm siempre tienen tasas más altas que los tumores pT1. Este comportamiento del tamaño tumoral es similar para los diferentes autores que han analizado la variación temporal de los factores pronósticos^{182, 355-359}.

La explicación más convincente de la causa de estas variaciones temporales la podemos hallar en la hipótesis de Hellman^{25, 177, 360}. Para este autor todos los tumores malignos de mama tienen dos componentes, que frecuentemente se solapan, la “virulencia”, entendida como la capacidad de proliferar rápidamente y por tanto de manifestarse clínicamente, y la “metastageneidad”, que equivaldría a la capacidad última de diseminarse a distancia. Dentro de este esquema, la capacidad de metastatizar vendría definida por el tamaño, siguiendo los modelos de Tubiana y Koscielny^{13, 142} y la mayor o menor afectación axilar. Con los resultados de nuestro estudio, la sobreexpresión de la p53 sería también un factor pronóstico de la capacidad de metastatizar.

Según este esquema, un tipo de tumores que tienen una alta virulencia, es decir, receptores negativos, grado alto, necrosis importante, y tal vez pacientes con edad joven, demostrará las metástasis rápidamente, incluso aunque la probabilidad última de metastatizar no difiera entre los diferentes grupos pronósticos. Esta capacidad de metastatizar dependerá al final del tamaño tumoral y de su carga de inestabilidad genética (¿p53?). El papel de la fase S y la ploidía es más difícil de establecer, aunque la lógica de este esquema los coloca también como marcadores de proliferación y diferenciación.

Lógicamente hay otras explicaciones para las variaciones temporales de los factores pronósticos, la más sencilla es que en los primeros años ocurrirían todos los tumores de mal pronóstico, con lo que en a partir del quinto año solo quedarían a riesgo tumores en los que predominarían los factores de buen pronóstico. Si así fuera, sería de esperar que sucediera lo mismo con todos los factores pronósticos, el comportamiento del tamaño tumoral y de la sobreexpresión de la p53 desequilibran este modelo simplista. Para el grupo de Daidone et al.³⁵⁷ la existencia de recaídas tardías se explicaría por la hipótesis del tumor “quiescente”, que sería el tumor diseminado de entrada pero sin actividad clínica, que, por un cambio del microclima tumoral, iniciaría un crecimiento más o menos rápido hasta alcanzar la fase clínica, aunque en el fondo, los factores que pronosticarían esta reactivación tardía del crecimiento tumoral serían los mismos que en la hipótesis de Hellman, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar.

6. – Conclusiones.

Del análisis de los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. – En este grupo de pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos la tasa de supervivencia específica se acerca al 70% a los 15 años. Podemos calcular la fracción de pacientes curadas en un 60-62%. La cuarta parte de la mortalidad se produce en la segunda década del seguimiento.
 2. – El tipo de cirugía o el uso de radioterapia complementaria no influye en la tasa de recurrencia o en la supervivencia.
 3. – La localización tumoral en cuadrantes internos y la edad menor de 45 años son los únicos factores predictores de una mayor probabilidad de recidiva local. Esta recidiva local no influye en la diseminación a distancia de la neoplasia y por tanto tampoco en la supervivencia.
 4. – La edad de las pacientes es un factor pronóstico independiente de la enfermedad. La aparición de metástasis y la mortalidad por la enfermedad aumenta progresivamente con la edad, especialmente a partir de los 65 – 70 años.
 5. – El tamaño tumoral patológico es el principal factor pronóstico en esta serie de pacientes. El riesgo de morir por cáncer de mama de las pacientes con tumores mayores de 2 cm cuadruplica el de las pacientes con tumores iguales o menores de 2 cm. Dentro del subgrupo de tumores pT1, los tumores mayores de 1 cm evolucionan peor que los tumores iguales o menores de 1 cm.
 6. – La presencia de grados histológicos altos o de necrosis importante implica un peor pronóstico, pero su valor se pierde durante el
-

seguimiento, no siendo factores pronósticos independientes a los 15 años de seguimiento.

7. – El resto de los parámetros histopatológicos: tipo histológico, componente intraductal, desmoplasia e infiltrado linfoplasmocitoide no son factores pronósticos en este grupo de pacientes. Hay una tendencia a que las pacientes cuyos tumores presentan invasión vascular y/o linfática evolucionen peor, pero no se alcanza la significación estadística.
 8. – La presencia de receptores estrogénicos no es un factor pronóstico en nuestras pacientes. En las pacientes postmenopáusicas, la presencia de positividad alta de receptores de estrógenos (> 100 fmol/mg) parece asociarse a un pronóstico peor que la positividad a niveles más bajos. Esta circunstancia es de difícil explicación y no puede descartarse que se trate de una aberración estadística.
 9. – La positividad para los receptores de progesterona implica un pronóstico favorable a corto plazo, pero al final del seguimiento no se alcanza una significación estadística.
 10. – La determinación de la ploidía en muestras parafinadas es una técnica factible. La calidad algo deficiente de los histogramas obtenidos no afectada sensiblemente al cálculo de la ploidía, pero la evaluación de la fracción celular proliferativa se ve seriamente dificultada.
 11. – La ploidía tumoral tiene un importante valor pronóstico, que se mantiene independiente de los otros factores. Los tumores con un índice de DNA menor a 1,2 tienen el mismo pronóstico que los tumores diploides, constituyendo el grupo de tumores euploides. El riesgo de presentar metástasis o de morir por cáncer de mama es prácticamente el doble en los tumores aneuploides que en los euploides.
-

12. – La presencia de una fase S alta (en nuestra serie mayor del 14%) es un potente factor pronóstico desfavorable en el análisis univariado. Su valor no es independiente en el análisis multivariado, pero no se puede descartar que este hecho se deba a que solo se conoce en un 60% de los casos.
 13. – La sobreexpresión de la oncoproteína HER-2/neu se halla en el 19,6% de los tumores analizados. Esta sobreexpresión no es un factor pronóstico en este grupo de pacientes con ganglios axilares negativos.
 14. – La tasa de sobreexpresión de la proteína p53, determinada por técnicas de inmunohistoquímica, es del 33,1% en nuestra serie.
 15. – Esta sobreexpresión se correlaciona con los teóricos factores de mal pronóstico: Tamaño mayor de 2 cm, grado histológico alto, presencia de necrosis, negatividad de receptores, aneuploidía y fase S alta.
 16. – La expresión anómala de la proteína p53 es un factor pronóstico independiente en este grupo de pacientes. El riesgo de recurrir o de morir por cáncer de mama se multiplica por 1,5 – 2 cuando hay sobreexpresión. Dentro de los tumores en que sé sobreexpresa la proteína p53, el mayor nivel de sobreexpresión implica peor pronóstico que niveles bajos.
 17. – El uso conjunto del tamaño tumoral, la ploidía y la sobreexpresión de la p53 permite formar grupos pronósticos diferenciados, con variaciones en la tasa de supervivencia a 15 años que varían entre el 97% para el grupo de mejor pronóstico y el 30% para el grupo de peor pronóstico. Esta clasificación pronóstica puede ayudar a decidir el uso de tratamiento sistémico complementario y la intensidad de éste.
-

18. – El estudio del comportamiento de los factores pronósticos a lo largo del tiempo sugiere que un grupo de ellos predicen la capacidad de metastatizar (tamaño y sobreexpresión de p53), y otro grupo (grado, necrosis, receptores, ploidía y fase S) indica la tasa de proliferación y diferenciación, determinando la precocidad de las recurrencias. Solo el tamaño tumoral y, en menor proporción, la sobreexpresión de la proteína p53 son capaces de predecir las recurrencias tardías (una tercera parte del total).

7. – Bibliografía.

- 1.- **Parkin DM, Laara E, Muir CS.** Estimates of the worldwide frequency of sixteen majors cancers in 1980. *Int J Cancer*,1988; 41: 184-197.
 - 2.- **Viladiu P, Izquierdo A, Beltran M et al. A.E.C.C. Registro del Cáncer de Girona, editor.** Epidemiología del Cáncer ginecológico y de mama en el área sanitaria de Girona. 1995.
 - 3.- **Brinton LA, Devesa SS.** Etiology and pathogenesis of Breast cancer. Epidemiologic factors. *Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editores. Diseases of the Breast. Lippincott-Raven. Philadelphia, 1996;7: 159-168.*
 - 4.- **Martos MC, Tomás C Gómez LI.** Incidencia del cáncer de mama y del aparato genital femenino en la provincia de Zaragoza. 1975-1984. *Med Clin (Barcelona)*, 1992; 99: 410-413.
 - 5.- **Borrás JM.** Metodologia i resultats del Registre Poblacional de Càncer de Tarragona (Tesis Doctoral). *Universitat Autònoma de Barcelona.* 1992.
 - 6.- **Bonfill X.** Anàlisi d'alguns aspectes rellevants del control del càncer al Valles Occidental.(Tesis doctoral). *Universitat Autònoma de Barcelona.* 1992, 1992.
 - 7.- **Izquierdo A, Viladiu P, Borrás JM, et al.** El riesgo de cáncer de mama en Cataluña. *Med Clin*, 1996; 107: 410-413.
 - 8.- **Borrás JM, Borrás J, Viladiu P, Bosch FX. Editores.** Epidemiologia i prevenció del càncer a Catalunya. 1975-1992. *Institut Català d'Oncologia. Servei Català de Salut.* 1997.
 - 9.- **Feuer EJ, Wun LM, Boring CC et al.** The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 892-897.
 - 10.- **Harris JR, Hellman S.** Natural history of breast cancer. *Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editores. Diseases of the Breast. Lippincott-Raven. Philadelphia, 1996; 12: 375-391.*
 - 11.- **Holland R, Veling S, Mravunac M et al.** Histologic multifocality of Tis, T1-2 breast carcinoma. *Cancer*, 1985; 56: 979-990.
 - 12.- **Koscielny S, Tubiana M Le MG et al.** Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer*, 1984; 49: 709-715.
 - 13.- **Tubiana M, Koscielny S.** Natural history of human breast cancer: Recent data and clinical implications. *Breast Cancer Res Treat*, 1991;18: 125-140.
-

14.- **Nemoto T, Vana J, Bedwani RN et al.** Management and survival of female breast cancer: result of a national survey by the American College of surgeons. *Cancer*, 1980; 45: 2917-2924.

15.- **Ciatto S, Cecchini S, Iossa A et al.** T category and operable breast cancer prognosis. *Tumori*, 1989; 75: 18-22.

16.- **Carter CL, Allen C, Henson DE.** Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer*, 1989;63: 181-187.

17.- **Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U.** Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer*, 1978; 41: 1170-1178.

18.- **Fisher B, Slack N, Ketrych D et al.** Ten year follow-up results of patients with carcinoma of the breast in a co-operative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy. *Surg Gynecol Obstet*, 1975; 140: 528-534.

19.- **Schottenfeld D, Nash AG, Robbins GF et al.** Ten-year results of the treatment of primary operable breast carcinoma: A summary of 304 patients evaluated by the TNM system. *Cancer*, 1976; 38: 1001-1007.

20.- **Veronesi U, Cascinelli N, Greco M et al.** Prognosis of breast cancer patients after mastectomy and dissection of internal mammary nodes. *Ann Surg*, 1985; 202: 702-707.

21.- **Fisher B.** Personal contributions to progress in breast cancer research and treatment. *Semin Oncol*, 1996; 23: 414-427.

22.- **Fisher B, Redmond C, Poisson R et al.** Eight-year results of a randomized trial comparing total mastectomy and lumpectomy with or without radiotherapy in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 1989; 320: 822-828.

23.- **Fisher B, Anderson S, Redmond C et al.** Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 1995; 333: 1456-1461.

24.- **Hellman S, Harris J.** The appropriate breast carcinoma paradigm. *Cancer Res*, 1985; 2: 339.

25.- **Hellman S.** The natural history of small breast cancer, David A. Karnofsky Memorial Lecture. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 2229-2234.

- 26.- **Rosen PP, Groshen S, Saigo PE et al.** A long-term follow-up study in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 1989; 7: 355-366.
- 27.- **Fisher B, Carbone P, Economou SG et al.** L-phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. A Report of early findings. *N Engl J Med*, 1975; 292: 117-122.
- 28.- **Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P et al.** Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med*, 1976; 294: 405-410.
- 29.- **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.** Effects of adjuvant tamoxifen and cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer. *N Engl J Med*, 1988; 319: 1681-1692.
- 30.- **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.** Treatment of early breast cancer. *Oxford University Press. Oxford. 1990.*
- 31.- **Nime FA, Rosen PP, Thaler HT et al.** Prognostic significance of tumor emboli in intramammary lymphatics in patients with mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1977; 1: 25-30.
- 32.- **Fisher ER, Redmond C, Fisher B.** Pathologic findings from National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol nº 4). VI. Discriminants for five-year treatment failure. *Cancer*, 1980; 46: 908-919.
- 33.- **Rosen PP, Saigo PE, Braun DW et al.** Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann Surg*, 1981; 193: 15-25.
- 34.- **Crowe JP, Hubay CA Pearson OH et al.** Estrogen receptor status as a prognostic indicator for stage I breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1982; 2: 171-176.
- 35.- **Sears HF, Janus C, Levy W et al.** Breast cancer without axillary metastases. Are there high-risk biologic subpopulations?. *Cancer*, 1982; 50: 1820-1827.
- 36.- **Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR et al.** Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res*, 1983; 43: 2985-2990.
- 37.- **National Cancer Institute.** Clinical Alert, Bethesda, Maryland: *National Cancer Institute; May 16-18. 1988.*
-

38.- **Fisher B, Redmond C, Dimitrov NV, et al.** A randomized trial evaluating sequential methotrexate and fluorouracil in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-negative tumors. *N Engl J Med*, 1989; 320: 473-478.

39.- **Fisher B, Costantino J, Redmond C, et al.** A randomized trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med*, 1989; 320: 479-484.

40.- **Mansour EG, Gray R, Shatila AH, et al.** Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer. An intergroup study. *N Engl J Med*, 1989; 320: 485-490.

41.- **The Ludwig Breast Cancer Study Group.** Prolonged disease-free survival after one course of perioperative adjuvant chemotherapy for node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 1989; 320: 491-496.

42.- **Pritchard KI.** Systemic adjuvant therapy for node-negative breast cancer: proven or premature?. *Ann Intern Med*, 1989; 111: 1-4.

43.- **Henderson IC.** Adjuvant systemic therapy: state of the art, 1989. *Breast Cancer Res Treat*, 1989; 14: 3-22.

44.- **McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, et al.** How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1990; 82: 1006-1015.

45.- **Carbone PP, Nixon DW, Fennely J, et al.** Adjuvant systemic therapy. *Cancer*, 1990; 65: 2108-2109.

46.- **Anónimo.** Early stage breast cancer. *Consensus Statement*, 1990; 8(6):1-19.

47.- **Hillner BE, Smith TJ.** Efficacy and cost effectiveness of adjuvant chemotherapy in women with node-negative breast cancer. A decision-analysis model. *N Engl J Med*, 1991; 324: 160-168.

48.- **Cooper MR.** The role of chemotherapy for node-negative breast cancer. *Cancer*, 1991; 67: 1744-1747.

49.- **Rosen PP, Groshen S, Kinne DW.** Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol*, 1991; 9: 1650-1661.

50.- **Fisher B, Redmond C, Wicckerham L, et al.** Systemic therapy in patients with node-negative breast cancer. A commentary based on two National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NAABP) clinical trials. *Ann Intern Med*, 1989; 111: 703-712.

51.- **Ciatto S, Cecchini S, Grazzini G, et al.** Tumor size and prognosis of breast cancer with negative axillary nodes. *Neoplasma*, 1990; 37:179-184.

52.- **Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G.** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer*, 1990; 65: 2121-2128.

53.- **Jotti GS.** Prognostic factors in resectable breast cancer. *Semin Oncol*, 1991; 18: 53-57.

54.- **McGuire WL.** NCI alert on node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1988; 12: 3-5.

55.- **Tandom AK, Clark GM, Chamness GC, et al.** Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med*, 1990; 322: 297-302.

56.- **Clark GM.** Prognostic and predictive factors. *Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editores Diseases of the Breast. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1996; 16: 461-485.*

57.- **Gasparini G, Pozza F, Harris AL.** Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 1206-1219.

58.- **Page DL.** Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol*, 1991; 15: 334-349.

59.- **Climent MA.** Expresión del oncogen Her-2/Neu, p53 y otros factores clínico-patológicos en el cáncer de mama con afectación ganglionar axilar.(Tesis doctoral). *Universitat Autònoma de Barcelona. 1996.*

60.- **McGuire WL.** Breast cancer prognostic factors: Evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst*, 1991; 83: 271-272.

61.- **Dhingra K, Hortobagyi N.** Critical evaluation of prognostic factors. *Semin Oncol*, 1996; 23: 436-445.

62.- **Noyes RD, Spanos WJ, Montague ED.** Breast cancer in women aged 30 and under. *Cancer*, 1982; 49: 1302-1307.

- 63.- **Salvadori B, Greco M, Clemente C, et al.** Prognostic factors in operable breast cancer. *Tumori*, 1983; 69: 477-484.
- 64.- **Chevalier B, Mosseri V, Dauce JP, et al.** A prognostic score in histological node negative breast cancer. *Br J Cancer*, 1990; 61: 436-440.
- 65.- **de la Rochefordiere A, Asselain B, Campana F, et al.** Age as prognostic factor in premenopausal breast cancer. *Lancet*, 1993; 341: 1039-1043.
- 66.- **Fowle BL, Schultz DJ, Overmoyer B, et al.** The influence of young age on outcome in early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994; 30: 23-33.
- 67.- **Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, et al.** Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 888-894.
- 68.- **Albain KS, Allred DC, Clark GM.** Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials?. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1994; 6: 35-42.
- 69.- **Mueller CB, Ames F, Anderson GD.** Breast cancer in 3558 women: age as a significant determinant in the rate of dying and causes of death. *Surgery*, 1978; 83: 123-132.
- 70.- **Rutqvist LE, Wallgren A.** The influence of age on outcome in breast cancer. *Acta Radiol Oncol*, 1983; 22: 289-294.
- 71.- **Host H, Lund E.** Age as prognostic factor in breast cancer. *Cancer*, 1986; 57: 2217-2221.
- 72.- **Adami HO, Malaker B, Meirik O, et al.** Age as a prognostic factor in breast cancer. *Cancer*, 1985; 56: 898-902.
- 73.- **Adami HO, Malaker B, Holmberg L, et al.** The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med*, 1986; 315: 559-563.
- 74.- **Sears HF, Janus C, Levy W, et al.** Breast cancer without axillary metastases. Are there high-risk biologic subpopulations?. *Cancer*, 1982; 50: 1820-1827.
- 75.- **Dawson PJ, Ferguson DJ, Karrison T.** The pathological findings of breast cancer in patients surviving 25 years after radical mastectomy. *Cancer*, 1982; 50: 2131-2138.
-

76.- **Solin LJ, Fowle B, Schultz DJ, Goodman RL.** Age as a prognostic factor for patients treated with definitive irradiation for early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1989; 16: 373-381.

77.- **Crowe JP, Gordon NH, Shenk RR. et al.** Age does not predict breast cancer outcome. *Arch Surg*, 1994; 129: 487-488.

78.- **Gnant M, Taucher S, Steger G, Jakesz R.** Young age (less than 25 years) at diagnosis of breast cancer is an independent adverse risk factor. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol*, 1996; 15: A172.

79.- **Walker RA, Lees E, Qebb MB, Dearing SJ.** Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer*, 1996; 74: 1796-1800.

80.- **Fisher CJ, Egan MK, Smith P, et al.** Histopathology of breast cancer in relation to age. *Br J Cancer*, 1997; 75: 593-596.

81.- **Kollias J, Elston CW, Ellis IO, et al.** Early-onset breast cancer. Histopathological and prognosis considerations. *Br J Cancer*, 1997; 75: 1318-1323.

82.- **Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R, et al.** Breast cancer in the medial half. Results of 1978 National Survey of the American College of Surgeons. *Cancer*, 1983; 51: 1333-1338.

83.- **Ellis IO, Galea M, Broughton N, 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: 479-489.

84.- **Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea et al.** Pathological prognostic factors in breast cancer. IV. Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology*, 1995; 27: 219-226.

85.- **Fisher ER, Anderson S, Redmon C, Fisher B.** Pathologic findings from the National Surgical adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer*, 1993; 71: 2507-2514.

86.- **Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L.** Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 1993; 11: 2090-2100.

87.- **Fisher B, Slack NH, Bross IDJ, et al.** Cancer of the breast: Size of neoplasm and prognosis. *Cancer*, 1969; 24: 1071-1080.

- 88.- **Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, et al.** Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol*, 1989; 7: 1239-1251.
- 89.- **Huseby RA, Ownby HE, Frederick J, et al.** Node-negative breast cancer treated by modified radical mastectomy without adjuvant therapies: variables associated with disease recurrence and survivorship. *J Clin Oncol*, 1988; 6: 83-88.
- 90.- **Rosner D, Lane WW.** Should all patients with node-negative breast cancer receive adjuvant therapy ? Identifying additional subsets of low risk patients who are highly curable by surgery alone. *Cancer*, 1991; 68:1482-1494.
- 91.- **Rosner D, Lane WW.** Predicting recurrence in axillary-node negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1993; 25: 127-139.
- 92.- **Davis BW, Gelber R, Goldhirsch , et al.** Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol*, 1985; 16: 1212-1218.
- 93.- **Contesso G, Rouesse J, Petit JY, Mouriesse H.** The anatomopathological factors of prognostic value in breast cancer. *Bull Cancer*, 1977; 64: 525-536.
- 94.- **Freedman LS, Edwards DN, McConnell EM, Downham DY.** Histological grade and other prognostic factors in relation to survival of patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 1979; 40: 44-55.
- 95.- **Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, et al.** The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-roussey. *J Clin Oncol*, 1987; 5: 1378-1386.
- 96.- **Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M.** Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer*, 1991; 68: 2142-2149.
- 97.- **Elston CW, Ellis IO.** Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991; 19: 403-410.
- 98.- **le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, et al.** Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR): an improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinoma. *Cancer*, 1989; 64: 1914-1921.
-

- 99.- **Fisher ER, Sass R, Fisher B.** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol nº 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer*, 1984; 53: 712-723.
- 100.- **Rank F, Dombernowsky P, Jespersen BV, et al.** Histologic malignancy grading of invasive ductal breast carcinoma. A regression analysis of prognostic factors in low-risk carcinomas from a multicenter trial. *Cancer*, 1987; 60: 1299-1305.
- 101.- **Stierer M, Rosen H, Weber R.** Nuclear pleomorphism, a strong prognostic factor in axillary node-negative small invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1992; 20: 109-116.
- 102.- **Ciatto S, Bonardi R, Bianchi S.** Nuclear grading and prognosis in node negative breast cancer. *Neoplasma*, 1992; 39: 167-170.
- 103.- **Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al.** Histological assessment of the prognostic factors in female breast cancer. *Oncology*, 1992; 49: 1-8.
- 104.- **Garne JP, Aspegren K, Linell F, et al.** Primary prognosis factors in invasive breast cancer with especial reference to ductal carcinoma and histologic malignancy grade. *Cancer*, 1994; 73: 1438-1448.
- 105.- **Schumacher M, Schmoor C, Sauerbrei W, et al.** The prognostic effect of histological tumor grade in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1993; 25: 235-245.
- 106.- **Clayton F.** Pathologic correlates of survival in 378 lymph node-negative infiltrating ductal breast carcinomas. Mitotic count is the best single predictor. *Cancer*, 1991; 68: 1309-1317.
- 107.- **Piera JM.** Valor pronóstico del DNA celular en el cancer de mama con ganglios negativos. Correlación con características clínicas y patológicas. (Tesis Doctoral). *Universitat Autònoma de Barcelona*. 1992.
- 108.- **McGuire WL.** Estrogen receptor versus nuclear grade as prognostic factors in axillary node negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 1988; 6: 1071-1072.
- 109.- **Dalton LW, Page DL, Dupont WD.** Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer*, 1994; 73: 2765-2770.
- 110.- **Bauer TW, O'Ceallaigh D, Eggleston JC, et al.** Prognostic factors in patients with stage I, estrogen receptor-negative carcinoma of the breast. A clinicopathologic study. *Cancer*, 1983; 52: 1423-1431.
-

- 111.- **Shekk LL, 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: 5565-5569.
- 112.- **Joensuu H, Toikkanen S.** Identification of subgroups with favorable prognosis in breast cancer. *Acta Oncol*, 1992; 31: 293-301.
- 113.- **Gilchrist KW, Gray R, Fowle B, et al.** Tumor necrosis is a prognostic predictor for early recurrence and death in lymph node-positive breast cancer: A 10-year follow-up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol*, 1993; 11: 1929-1935.
- 114.- **Lee AKC, DeLellis RA, Silverman ML, et al.** Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. *J Clin Oncol*, 1990; 8: 1457-1465.
- 115.- **Clemente GG, Boracchi P, Andreola S, et al.** Peritumoral lymphatic invasion in patients with node-negative mammary duct carcinoma. *Cancer*, 1992; 69: 1396-1403.
- 116.- **Pinder SE, Ellis IO, Galea M, et al.** Pathological prognostic factors in breast cancer.III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1994; 24: 41-47.
- 117.- **Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, et al.** The prognostic value of lymphatic and Blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer*, 1995; 76: 1772-1778.
- 118.- **Gasparini G, Meli S, Panizzoni GA, et al.** Peritumoral lymphatic vessel invasion compared with DNA ploidy, proliferative activity, and other pathologic features as prognostic indicators in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1992; 20: 195-204.
- 119.- **Saigo PE, Rosen PP.** The application of immunocytochemical stains to identify endothelial lined channels in mammary carcinoma. *Cancer*, 1987; 59: 51-54.
- 120.- **Silverberg SG, Chitale AR.** Assessment of significance of proportions of intraductal and infiltrating tumor growth in ductal carcinoma of the breast. *Cancer*, 1973; 32: 830-837.
- 121.- **Schnitt SJ, Connolly JL, Harris JR, et al.** Pathologic predictors of early local recurrences in stage I and II breast cancer treated by primary radiation therapy. *Cancer*, 1984; 53: 1049-1057.
-

- 122.- **Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, et al.** DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1993; 28: 9-20.
- 123.- **Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, et al.** Guidelines for the implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry*, 1993; 14: 472-477.
- 124.- **Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, et al.** Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 1993; 28: 55-59.
- 125.- **Stal O, Wingren S, Carstensen J, et al.** Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in relation to estrogen receptor content and clinicopathological variables in primary breast cancer. *Eur J Clin Oncol*, 1989; 25: 301-309.
- 126.- **Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV, Farrar WB, et al.** Is DNA ploidy and independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma?. *Cancer*, 1990; 65: 1577-1582.
- 127.- **Lewis WE.** Prognostic significance of flow cytometric DNA Analysis in node-negative breast cancer patients. *Cancer*, 1990; 65: 2315-2320.
- 128.- **Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ.** DNA index and S-Phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer*, 1990; 66: 331-340.
- 129.- **Fisher B, Gunduz N, Costantino J, et al.** DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. Relation of ploidy and S-phase fraction to outcome of patients in NSABP B-04. *Cancer*, 1991; 68: 1465-1475.
- 130.- **Bosari S, Lee AKC, Tahan SR, et al.** DNA flow cytometric analysis and prognosis of axillary lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer*, 1992; 70: 1943-1950.
- 131.- **Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, et al.** DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer*, 1988; 61: 420-427.
- 132.- **von Rosen A, Rutqvist LE, Carstensen J, et al.** Prognostic value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to tumor size, nodal status, and estrogen receptor content. *Breast Cancer Res Treat*, 1989; 13: 23-32.
- 133.- **Muss HH, Kute TE, Case LD, et al.** The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer*, 1989; 64: 1894-1900.
-

- 134.- **Fallenius AG, Franzen SA, Auer GU.** Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. *Cancer*; 1988; 62:521-530.
- 135.- **Clark GM, Dressler LG, Owens MA, et al.** Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med*, 1989; 320: 627-633.
- 136.- **O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, et al.** Node-negative breast cancer: Prognostic subgroups defined by tumor size and flow cytometry. *J Clin Oncol*, 1990; 8: 2040-2046.
- 137.- **Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, et al.** Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 1990; 322: 1045-1053.
- 138.- **Clark GM, Mathieu MC, Owens M, et al.** Prognostic significance of S-phase fraction in good-risk node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 1992; 10: 428-432.
- 139.- **Stal O, Dufmats M, Hatschek T, et al.** S-phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 1993; 11: 1717-1722.
- 140.- **Witzig TE, Ingle JN, Cha SS, et al.** DNA ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer*, 1994; 74: 1752-1761.
- 141.- **Peiró G, Lerma E, Climent MA, Seguí MA, et al.** Prognostic value of S-phase fraction in lymph node-negative breast cancer by image and flow cytometric analysis. *Mod Pathol*, 1997; 10: 216-222.
- 142.- **Tubiana M, Pejovic MJ, Renaud A, et al.** Kinetic parameters and the course of the disease in breast cancer. *Cancer*, 1981; 47: 937-943.
- 143.- **Silvestrini R, Daidone MG, Gasparini G.** Cell kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Cancer*, 1985; 56: 1982-1987.
- 144.- **Silvestrini R, Daidone MG, Di Fronzo G, et al.** Prognostic implication of labelling index versus estrogen receptors and tumor size in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1986; 7: 161-169.
- 145.- **Courdi A, Hery M, Dahan E, et al.** Factors affecting relapse in node-negative breast cancer. A multivariate analysis including the labelling index. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1989; 25: 351-356.
- 146.- **Silvestrini R, Daidone MG, Valagussa P, et al.** Cell Kinetics as a prognostic indicator in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1989; 25: 1165-1171.
-

- 147.- **Silvestrini R, Daidone MG, Del Bino G, et al.** Prognostic significance of proliferative activity and ploidy in node-negative breast cancers. *Ann Oncol*, 1993; 4: 213-219.
- 148.- **Silvestrini R, Daidone MG, Luisi A, et al.** Biologic and clinicopathologic factors as indicators of specific relapse types in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 1995; 13: 697-704.
- 149.- **Silvestrini R, Daidone MG, Luisi A, et al.** Cell proliferation in 3800 node-negative breast cancers: consistency over time of biological and clinical information provided by 3H-thymidine labelling index. *Int J Cancer*, 1997; 74: 122-127.
- 150.- **Gerders J, Schwab U, Lemke H, et al.** Production of mouse-monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 1983; 31: 13-20.
- 151.- **Key G, Petersen JL, Becker MHG, et al.** New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of parafin wax sections. *J Clin Pathol*, 1993; 46: 1080-1084.
- 152.- **Cattoretti G, Becker MHG, Key G, et al.** Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 1992; 168: 357-363.
- 153.- **Bouzubar N, Walker RJ, Griffiths K, et al.** Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer*, 1989; 59: 943-947.
- 154.- **Brown RW, Allred DC, Clark GM, et al.** Prognostic significance and clinical-pathological correlations of cell-cycle kinetics measured by Ki-67 immunocytochemistry in axillary node-negative of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 1990; 16:191.
- 155.- **Weikel W, Beck T, Mitze M, et al.** Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat*, 1991; 18: 149-154.
- 156.- **Wintzer HO, Ziffel I, Schulte-Monting J, et al.** Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*, 1991; 67: 421-428.
- 157.- **Sahin AA, Ro J, Ro JY, et al.** Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. *Cancer*, 1991; 68: 549-557.
-

- 158.- **Veronese SM, Gambacorta M, Gotardi O, et al.** Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer*, 1993; 71: 3926-3931.
- 159.- **Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, et al.** Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer*, 1993; 68: 579-583.
- 160.- **Beck T, Weller EE, Weikel W, et al.** Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with the proliferation marker, MIB-1. *Gynecol Oncol*, 1995; 57: 96-104.
- 161.- **Railo M, Lundin J, Haglund C, et al.** Ki-67, p53, ER-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol*, 1997; 36: 369-374.
- 162.- **Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjanen K.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in axillary lymph node negative breast cancer. *Anticancer Res*, 1993; 13: 533-538.
- 163.- **Bianchi S, Paglierani M, Zampi G.** Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in lymph node-negative breast cancer patients. *Cancer*, 1993; 72: 120-125.
- 164.- **Domagala W, Striker G, Szadowska A, et al.** p53 protein and Vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma. Relationship with survival and sites of metastases. *Eur J Cancer*, 1994;30A: 1527-1534.
- 165.- **Spyratos F, Hacene K, Tuniana M, et al.** Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary infiltrating ductal breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1262 patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1989;25: 1233-1240.
- 166.- **Fisher ER, Redmond CK, Liu H, et al.** Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. *Cancer*, 1980; 45: 1447-1452.
- 167.- **Elwood JM, Godolphin W.** Oestrogen receptors in breast tumours. Associations with age, menopausal status and epidemiological and clinical features in 735 patients. *Br J Cancer*, 1980; 42: 635-644.
- 168.- **Clark GM, Osborne CK, McGuire WL.** Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol*, 1984; 2: 1021-1028.
-

169.- **Fisher ER, Osborne CK, McGuire WL, et al.** Correlation of primary breast cancer histopathology and estrogen receptor content. *Breast Cancer Res Treat*, 1981; 1: 37-41.

170.- **Aamdal S, Borner O, Jorgensen O, et al.** Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer*, 1984; 53: 2525-2529.

171.- **Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, et al.** Steroid hormone receptors as prognostic indicators in primary breast cancer. *Breast cancer Res Treat*, 1986; 7 Suppl: 91-97.

172.- **Klintonberg C, Stal O, Nordenskjold B, et al.** Proliferative index, cytosol estrogen receptor and axillary node status as prognostic predictors in human mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 1986; 7 Suppl: 99-106.

173.- **Clark GM, Wenger CR, Beardslee S, et al.** How to integrate steroid hormone receptor, flow cytometry, and other prognostic information in regard to primary breast cancer. *Cancer*, 1993; 71(6 Suppl): 2157-2162.

174.- **Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, et al.** Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res*, 1987; 47: 6126-6133.

175.- **Mathiesen O, Bonderup O, Carl J, et al.** The prognostic value of estrogen and progesterone receptors in female breast cancer. A single centre study. *Acta Oncol*, 1991; 30: 691-695.

176.- **Tsangaris TN, Knox SM, Cheek JH.** Tumor hormone receptor status and recurrences in premenopausal patients with node-negative breast carcinoma. *Cancer*, 1992; 69: 984-987.

177.- **Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S.** Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 1995; 13: 1144-1151.

178.- **Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R.** 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: 1076-1087.

179.- **Clark GM, McGuire WL.** Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol*, 1988; 15(Suppl 1): 20-25.

180.- **McGuire WL, Clark GM.** Role of progesterone receptors in breast cancer. *Semin Oncol*, 1985; 12(1Suppl 1): 12-16.

181.- **Arriagada R, Rutqvist LE, Skoog L, et al.** Prognostic factors and natural history in lymph node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1992; 21: 101-109.

182.- **Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, et al.** Paradoxical decreases in prognostic utility as datasets mature: time-dependent lack of proportional hazards in prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1996; 37(Suppl): 35.

183.- **Pichon MF, Broet P, Magdelenat H, et al.** Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. *Br J Cancer*, 1996; 73: 1545-1551.

184.- **Thorpe SM, Christensen IJ, Rasmussen BB, Rose C.** Short recurrence-free survival associated with high oestrogen receptor levels in the natural history of postmenopausal, primary breast cancer. *Eur J Cancer*, 1993; 29A: 971-977.

185.- **Sancho-Garnier H, Delarue JC, Mouriessse H, et al.** Is the negative prognostic value of high oestrogen receptor (ER) levels in postmenopausal breast cancer patients due to a modified ER gene product?. *Eur J Cancer*, 1995; 31A: 1851-1855.

186.- **Foekens JA, Rio MC, Sequin P, et al.** Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res*, 1990; 50: 3832-3837.

187.- **Foekens JA, van Putten WL, Portengen H, et al.** Prognostic value of PS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J Clin Oncol*, 1993; 11: 899-908.

188.- **Gion M, Mione R, Pappagallo GL, et al.** pS2 in breast cancer: alternative or complementary tool to steroid receptor status? Evaluation of 446 cases. *Br J Cancer*, 1993; 68: 374-379.

189.- **Spyratos F, Andrieu C, Hacéne K, et al.** pS2 and response to adjuvant hormone therapy in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 1994; 68: 394-397.

190.- **Thor AD, Koerner FC, Edgerton SM, et al.** pS2 expression in primary breast carcinomas: relationship to clinical and histological features and survival. *Breast Cancer Res Treat*, 1992; 21: 111-119.

- 191.- **Cappelletti V, Coradini D, Scanziani E, et al.** Prognostic relevance of pS2 status and proliferative activity in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer*, 1992; 28A: 1315-1318.
- 192.- **Ravdin PM.** Evaluation of cathepsin D as a prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1993; 24: 219-226.
- 193.- **Têtu B, Brisson J, Cote C, et al.** Prognostic significance of cathepsin D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer*, 1993; 55: 429-435.
- 194.- **Gasparini G, Boracchi P, Bevilacqua P, et al.** A multiparametric study on the prognostic value of epidermal growth factor receptor in operable breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 1994; 29: 59-71.
- 195.- **Ravdin PM, Tandom AK, Allred DC, et al.** Cathepsin D by western blotting and immunohistochemistry: failure to confirm correlation with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 467-474.
- 196.- **O'Donoghue AE, Poller DN, Bell JA, et al.** Cathepsin D in primary breast carcinoma: adverse prognosis is associated with expression of cathepsin D in stromal cells. *Breast Cancer Res Treat*, 1995; 33: 137-145.
- 197.- **Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, et al.** Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res*, 1992; 52: 6101-6105.
- 198.- **Janicke F, Schmitt M, Pache L, et al.** Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1993; 24: 195-208.
- 199.- **Duffy MJ, Reilly D, McDermott E, et al.** Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. *Cancer*, 1994; 74: 2276-2280.
- 200.- **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al.** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987; 235: 177-182.
- 201.- **Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, et al.** c-erb-2 expression in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer*, 1988; 58: 453-457.
- 202.- **van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, et al.** Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med*, 1988; 319: 1239-1245.
-

- 203.- **Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K, et al.** Amplification of c-erb-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. *Lancet*, 1986; 765-766.
- 204.- **Tandom AK, Clark GM, Chamness GC, et al.** HER-2/neu oncogene and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1989; 7: 1120-1128.
- 205.- **Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, et al.** Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 1993; 11: 1936-1942.
- 206.- **Porter PL, García R, Moe R, et al.** C-erb-2 oncogene protein in in situ and invasive lobular breast neoplasia. *Cancer*, 1991; 68: 331-334.
- 207.- **Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al.** Prognostic importance of c-erb-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study. *J Clin Oncol*, 1992; 10: 1049-1056.
- 208.- **Allred DC, Clark GM, Tandom AK, et al.** HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol*, 1992; 10: 599-605.
- 209.- **Allred DC, Clark GM, Molina R, et al.** Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol*, 1992; 23: 974-979.
- 210.- **Wright C, Angus B, Nicholson S, et al.** Expression of c-erb-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res*, 1989; 49: 1087-2090.
- 211.- **Ro JS, el-Naggar A, Ro JY, et al.** c-erb-2 amplification in node-negative human breast cancer. *Cancer Res*, 1989; 49: 6941-6944.
- 212.- **Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al.** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Bowel Project: prognostic significance of c-erb-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol*, 1990; 8: 103-112.
- 213.- **Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H.** Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol*, 1992; 10: 1044-1048.
- 214.- **Lipponen HJ, Aaltomaa S, Syrjanen S, Syrjanen K.** c-erb-2 oncogene related to p53 expression, cell proliferation and prognosis in breast cancer. *Anticancer Res*, 1993; 13: 1147-1152.
-

- 215.- **Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, et al.** Prognostic significance of c-erb-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer*, 1993; 67: 625-629.
- 216.- **Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, et al.** Immunohistochemical detection of HER-2/neu in patients with axillary node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. *Cancer*, 1995; 75: 1320-1326.
- 217.- **Clark GM, McGuire WL.** Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res*, 1991; 51: 944-948.
- 218.- **Schonborn I, Zschesche W, Spitzer E, et al.** C-erb-2 overexpression in primary breast cancer: independent prognostic factor in patients at high risk. *Breast Cancer Res Treat*, 1994; 29: 287-295.
- 219.- **Têtu B, Brisson J.** Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer*, 1994; 73: 2359-2365.
- 220.- **Poller DN, Hutchings CE, Galea M, et al.** p53 protein expression in human breast carcinoma: relation to expression of epidermal growth factor receptor, c-erb-2 protein overexpression, and oestrogen receptor. *Br J Cancer*, 1992; 66: 583-588.
- 221.- **Molina R, Filella X, Seguí MA, et al.** Oncogenic proteins and prognostic correlations in breast cancer. *In Vivo*, 1993; 7: 585-589.
- 222.- **Ravdin PM, Chamness GC.** The c-erb-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers. A review. *Gene*, 1995; 159: 19-27.
- 223.- **Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al.** Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989; 244: 707-712.
- 224.- **Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, et al.** Correlation between c-erb-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res*, 1991; 51: 556-567.
- 225.- **Molina R, Ciocca DR, Tandom AK, et al.** Expression of HER-2/neu oncoprotein in human breast cancer: a comparison of immunohistochemical and western blot techniques. *Anticancer Res*, 1992; 12: 1965-1971.
-

226.- **Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al.** Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int-2 and c-erb-2/ear-1. *Cancer Res*, 1989; 49: 3104-3108.

227.- **Gasparini G, Gullick WJ, Bevilacqua P, et al.** Human breast cancer: prognostic significance of the c-erb-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy, and conventional pathologic features. *J Clin Oncol*, 1992; 10: 686-695.

228.- **Quénel N, Waffart J, Bonichon F, et al.** The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat*, 1995; 35: 283-291.

229.- **Thor AD, Schwartz LH, Koerner FC, et al.** Analysis of c-erb-2 expression in breast carcinomas with clinical follow-up. *Cancer Res*, 1989; 49: 7147-7152.

230.- **Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, et al.** Association of c-erb-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer*, 1991; 49: 650-655.

231.- **Sauer R, Schauer A, Rauscheker HF, et al.** Therapy of small breast cancer: a prospective study on 1036 patients with special emphasis on prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992; 23: 907-914.

232.- **Seguí MA, Climent MA, Molina R, et al.** Tumor size, ploidy and p53 expression are important prognostic factors in node-negative breast cancer. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol*, 1995; 15: A166.

233.- **Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al.** c-erb-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*, 1994; 330: 1260-1266.

234.- **Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al.** c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol*, 1996; 14: 2702-2708.

235.- **Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al.** Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 1996; 14: 737-744.

236.- **Fox SB, Smith K, Hollyer J, et al.** The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1994; 29:41-19.

- 237.- **Nicholson RI, McClelland RA, Gee JMW, et al.** Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 1994; 29: 117-125.
- 238.- **Baselga J, Mendelsohn J.** The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 1994; 29: 127-138.
- 239.- **Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, et al.** Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma. A study with long-term follow-up. *Hum Pathol*, 1996; 27: 1149-1155.
- 240.- **Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, et al.** The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1994; 86:499-504.
- 241.- **Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S.** Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol*, 1994; 145: 1191-1198.
- 242.- **Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, et al.** Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol*, 1995; 177: 49-55.
- 243.- **Silvestrini R, Benini E, Veneroni S, et al.** p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 1996; 14: 1604-1610.
- 244.- **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al.** p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991; 253: 49-53.
- 245.- **Koshland DE Jr.** Molecule of the year. *Science*, 1993; 262: 1953.
- 246.- **Chang F, Syrjänen S, Syrjänen K.** Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol*, 1995; 13: 1009-1022.
- 247.- **Lane DP, Crawford LV.** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979; 278: 261-263.
- 248.- **Linzer DI, Levine AJ.** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 1979; 17: 43-52.
- 249.- **Baker SJ, Markowitz S, Fearson ER, et al.** Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 1990; 249: 912-915.
-

- 250.- **Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al.** Mutation in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 1989; 342: 705-708.
- 251.- **Malkin D, Li FP, Strong LC, et al.** Germ line p53 mutations in a familiar syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 1990; 250: 1233-1238.
- 252.- **Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, et al.** Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature*, 1990; 348: 747-749.
- 253.- **Lane DP.** p53, guardian of the genome. *Nature*, 1992; 358:15-16.
- 254.- **Vogelstein B, Kinsler KW.** p53 function and dysfunction. *Cell*, 1992; 70: 523-526.
- 255.- **Marx J.** How p53 supresses cell growth. *Science*, 1993; 262: 1644-1645.
- 256.- **Pietenpol JA, Vogelstein B.** Tumour suppressor genes. No room at the p53 inn. *Nature*, 1993; 365: 17-18.
- 257.- **Leonard CJ, Canman CE, Kastan MB.** El papel de p53 en el control del ciclo celular y la apoptosis: implicaciones para el cáncer. *De Vita VT, Hellman S, Rosemberg SA, editores: Avances en Oncología 1995. Lippicont-Raven. Philladelphia. 1995; 3: 53-63.*
- 258.- **Levine AJ, Momand J, Finlay CA.** The p53 tumour supressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-456.
- 259.- **Chang F, Syrjänen S, Kurvinen K, et al.** Tumorigenesis associated with the p53 tumor supressor gene. *Br J Cancer*, 1993; 68: 653-661.
- 260.- **Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al.** Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res*, 1994; 54: 1298-1304.
- 261.- **Levine AJ.** The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses. *Virology*, 1990; 177: 419-426.
- 262.- **Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al.** The mdm-2 oncogene products forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 1992; 69: 1237-1245.
- 263.- **Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, et al.** Molecular abnormalities of mdm2 and p53 in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res*, 1994; 54: 794-799.
-

- 264.- **Kovach JS, McGovern RM, Cassady JD, et al.** Direct sequencing from touch preparations of human carcinomas: analysis of p53 mutations in breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1991; 83: 1004-1009.
- 265.- **Osborne RJ, Merlo GR, Mitsudoni T, et al.** Mutations in the p53 gene in primary human breast cancers. *Cancer Res*, 1991; 51: 6194-6198.
- 266.- **Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, et al.** p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer*, 1988; 41: 178-183.
- 267.- **Mudenda B, Green JA, Green B, et al.** The relationship between serum p53 autoantibodies and characteristics of human breast cancer. *Br J Cancer*, 1994; 69: 1115-1119.
- 268.- **Allred DC, Elledge R, Clark GM, Fuqua SAW.** The p53 tumor-suppressor gene in human breast cancer. *Dickson RB, Lippman ME, editores: Mammary tumorigenesis and malignant progression. Kluwer Academic Publishers. Boston. 1994; 4: 51-62.*
- 269.- **Chitemere M, Anderson TI, Holm R, et al.** TP53 alterations in atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 1996; 41: 103-109.
- 270.- **Rajan PB, Scott DJ, Perry RH, Griffith CD.** p53 protein in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 1997; 42: 283-290.
- 271.- **Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, et al.** Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1996; 88: 1054-1059.
- 272.- **Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, et al.** p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *Int J Cancer*, 1992; 50: 528-532.
- 273.- **Wynford-Thomas D.** p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Patol*, 1992; 166: 329-330.
- 274.- **Thorlacius S, Thorgilsson B, Björnsson J, et al.** Tp53 mutations and abnormal p53 protein staining in breast carcinomas related to prognosis. *Eur J Cancer*, 1995; 31A: 1856-1861.
- 275.- **Allred DC, Clark GM, Alledge R, et al.** Accumulation of mutant p53 is associated with increased proliferation and poor clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 200-206.
-

- 276.- **Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP.** 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: 1109-1114.
- 277.- **Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, et al.** Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1992; 84: 845-855.
- 278.- **Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, et al.** p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. *J Clin Oncol*, 1995; 13: 821-830.
- 279.- **Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, et al.** p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 965-970.
- 280.- **Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, et al.** Prognostic significance of p53 alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1993; 26: 225-235.
- 281.- **Caleffi M, Teague MW, Jensen RA, et al.** p53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer*, 1994; 73: 2147-2156.
- 282.- **Gohring UJ, Scharl A, Heckel C, et al.** p53 protein in 204 patients with primary breast carcinoma. Immunohistochemical detection and clinical value as a prognostic factor. *Arch Gynecol Obstet*, 1995; 256: 139-146.
- 283.- **MacGrogan G, Bonichon F, de Mascarel I, et al.** Prognostic value of p53 in breast invasive ductal carcinoma: an immunohistochemical study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat*, 1995; 36: 71-81.
- 284.- **Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, et al.** Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis?. *Hum Pathol*, 1993; 24: 469-476.
- 285.- **Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W.** Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer*, 1993; 72: 3641-3647.
- 286.- **Stenmark-askmalm M, Stal O, Olsen K, et al.** p53 as a prognostic factor in stage I breast cancer. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Br J Cancer*, 1995; 72: 715-719.
- 287.- **Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, et al.** p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer*, 1993; 55: 51-56.
-

- 288.- **Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al.** Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 454-466.
- 289.- **O'Malley FP, Saad Z, Kerkvliet N, et al.** The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erb-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum Pathol*, 1996; 27: 955-963.
- 290.- **Marks JR, Humphrey PA, Wu K, et al.** Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as a prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg*, 1994; 219: 332-341.
- 291.- **Horne GM, Anderson JJ, Tiniakos DG, et al.** p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma: a comparison of four antibodies for immunohistochemistry. *Br J Cancer*, 1996; 73: 29-35.
- 292.- **Elledge RM, Clark GM, Fuqua SAW, et al.** p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Res*, 1994; 54: 3752-3757.
- 293.- **Smith H.** Tumor-suppressor genes in breast cancer progression. *Dickson RB, Lippman ME, editores. Mammary tumorigenesis and malignant progression. Kluwer Academic Publishers. Boston*, 1994; 5: 79-96.
- 294.- **Berns EM, de Klein A, van Putten WL, et al.** Association between RB-1 gene alterations and factors of favourable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. *Int J Cancer*, 1995; 64: 140-145.
- 295.- **Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, et al.** Expression of retinoblastoma gene protein (Rb) in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *Eur J Cancer*, 1995; 31A: 329-333.
- 296.- **Hennessey C, Henry JA, May FE, et al.** Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 1991; 83: 281-285.
- 297.- **Sawan A, Lascu I, Veron M, et al.** NDP-K/nm23 expression in human breast cancer in relation to relapse, survival, and other prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol*, 1994; 177: 27-34.
- 298.- **Gasparini G, Harris AL.** Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*, 1995; 13: 765-782.
-

- 299.- **Weidner N, Semple SP, Welch WR, et al.** Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 1991; 324: 1-8.
- 300.- **Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al.** Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1992; 84: 1875-1887.
- 301.- **Toi M, Kashitani J, Tominaga T.** Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer*, 1993; 55: 371-374.
- 302.- **Van Hoef MEHM, Knox WF, Dhesi SS, et al.** Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer*, 1993; 29A: 1141-1145.
- 303.- **Bevilacqua P, Barbareschi M, Verderio P, et al.** Prognostic value of intratumoral microvessel density, a measure of tumor angiogenesis, in node-negative breast carcinoma. Results of a multiparametric study. *Breast Cancer Res Treat*, 1995; 36: 205-217.
- 304.- **Heimann R, Ferguson D, Powers C, et al.** Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1996; 88: 1764-1769.
- 305.- **Costello P, McCann A, Carney DN, et al.** Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. *Hum Pathol*, 1995; 26: 1181-1184.
- 306.- **Goulding H, Nik Abdul Rashid NF, Robertson JF, et al.** Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: An important factor in prognosis?. *Hum Pathol*, 1995; 26: 1196-1200.
- 307.- **Page DL, Jensen RA.** Angiogenesis in human breast carcinoma: what is the question. *Hum Pathol*, 1995; 26: 1173-1174.
- 308.- **Azzopardi JG, Chepick OF, Hartmann WH, et al.** The World Health Organization histological typing of breast tumors. Second edition. *Am J Clin Pathol*, 1982; 78: 806-816.
- 309.- **Clark GM.** Do we really need prognostic factors for breast cancer?. *Breast Cancer Res Treat*, 1994; 30: 117-126.
- 310.- **Johnson TP, Ford L, Warnecke RB, et al.** Effects of a National Cancer Institute Clinical Alert on breast cancer practice patterns. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 1783-1788.
-

-
- 311.- **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.** Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31.000 recurrences and 24.000 deaths among 75.000 women. *Lancet*, 1992; 339: 1-15.
- 312.- **Rajagopal S, Goodman PJ, Tannock IF.** Adjuvant chemotherapy for breast cancer: discordance between physicians' perception of benefit and the results of clinical trials. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 1296-1304.
- 313.- **Ahmann DL.** Status of adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Cancer*, 1984; 53(3 Suppl): 724-728.
- 314.- **Henderson IC, Hayes DF, Parker LM, et al.** Adjuvant systemic therapy for patients with node-negative tumors. *Cancer*, 1990; 65(9 Suppl): 2132-2147.
- 315.- **Hakama M, Holli K, Isola J, et al.** Aggressiveness of screen-detected breast cancers. *Lancet*, 1995; 345: 221-224.
- 316.- **Harris JR, Hellman S.** Observations on survival curve analysis with particular reference to breast cancer treatment. *Cancer*, 1986; 57: 925-928.
- 317.- **Ciatto S, Bonardi R.** Is breast cancer ever cured? Follow-up study of 5623 breast cancer patients. *Tumori*, 1991; 77: 465-467.
- 318.- **Joensuu H, Toikkanen S.** Cured of breast cancer?. *J Clin Oncol*, 1995; 13: 62-69.
- 319.- **Gamel JW, Meyer JS, Feuer E, Miller BA.** The impact of stage and histology on the long-term clinical course of 163.808 patients with breast carcinoma. *Cancer*, 1996; 77: 1459-1464.
- 320.- **Clark GM, Sledge GW, Osborne CK, et al.** Survival from first recurrence: Relative importance of prognosis factors in 1.015 breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 1987; 5: 55-61.
- 321.- **Fisher B, Wolmark , Redmond C, et al.** Findings from NSABP Protocol No. B-04: comparison of radical mastectomy with alternative treatments. II. The clinical and biologic significance of medial-central breast cancers. *Cancer*, 1981; 48: 1863-1872.
- 322.- **Knorr KL, Hilsenbeck SG, Wenger CR, et al.** Making the most of your prognostic factors: presenting a more accurate survival model for breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1992; 22: 251-262.
- 323.- **Hastie T, Sleeper L, Tibshirani R.** Flexible covariate effects in the proportional hazards model. *Breast Cancer Res Treat*, 1992; 22: 241-250.
-

- 324.- **Rosen PP.** Invasive mammary carcinoma. *Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editores Diseases of the Breast. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1996; 13: 393-444.*
- 325.- **Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, et al.** Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol, 1992; 10: 696-705.*
- 326.- **Carlomagno C, Perrone F, Lauria R, et al.** Prognostic significance of necrosis, elastosis, fibrosis and inflammatory cell reacyion in operable breast cancer. *Oncology, 1995; 52: 272-277.*
- 327.- **Barbareschi M, Dalla Palma P, Bevilacqua P, et al.** Invasive node-negative breast carcinoma: multivariate analysis of the prognostic value of peritumoral vessel invasion compared with that of conventional clinico-pathologic features. *Anticancer Res, 1994; 14(5B): 2229-2235.*
- 328.- **Fresno M, Molina R, Pérez del Río MJ, et al.** p53 expression is of independent predictive value in lymph node-negative breast carcinoma. *Eur J Cancer, 1997; 33: 1268-1274.*
- 329.- **Owainati AA, Robins RA, Hinton C, et al.** Tumour aneuploidy, prognostic parameters and survival in primary breast cancer. *Br J Cancer, 1987; 55: 449-454.*
- 330.- **Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al.** Prognostic factors in axillary node-negative breast carcinomas. *Eur J Cancer, 1991; 27: 1555-1559.*
- 331.- **Fisher ER, Costantino J, Fisher B, Redmond C.** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. *Cancer, 1993; 71(6 Suppl): 2141-2150.*
- 332.- **Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, et al.** Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer, 1995; 76: 2266-2274.*
- 333.- **Arnesson LG, Smeds S, Fagerberg G.** Recurrence-free survival in patients with small breast cancer. An analysis of cancers 10 mm or less detected clinically and by screening. *Eur J Surg, 1994; 160: 271-276.*
- 334.- **Charpin C, Martin PM, DeVictor B, et al.** Multiparametric study of estrogen receptor immunocytochemical assay in 400 human breast carcinomas: Analysis of estrogen receptor distribution heterogeneity in tissues and correlations with dextran coated charcoal assays and morphological data. *Cancer Res, 1988; 48: 1578.*
-

- 335.- **Andersen J, Poulsen HS.** Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue. *Cancer*, 1989; 64: 1901.
- 336.- **Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, et al.** Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients. *Cancer Res*, 1989; 49: 1052.
- 337.- **Pertschuk LP, Feldman JG, Eisenberg KB, et al.** Immunocytochemical localization of progesterone receptor in breast cancer with monoclonal antibody. *Cancer*, 1988; 62: 342.
- 338.- **Berardo M, Clark GM, De Moor C, et al.** Prognostic and predictive properties of immunohistochemical progesterone receptors in breast cancer. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol*, 1995; 14: A139.
- 339.- **Gasparini G, Pozza F, Dittadi R, et al.** Progesterone receptor determined by immunocytochemical and biochemical methods in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1992; 118: 557-563.
- 340.- **Saez S, Cheix F, Asselain B.** Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1983; 3: 345.
- 341.- **Ellis CN, Frey ES, Burnette JJ, et al.** The content of tumor DNA as an indicator of prognosis in patients with T1N0M0 and T2N0M0 carcinoma of the breast. *Surgery*, 1989; 106: 133-138.
- 342.- **Yuan J, Hennessy C, Corbett IP, et al.** Node negative breast cancer: the prognostic value of DNA ploidy for long-term survival. *Br J Surg*, 1991; 78: 844-848.
- 343.- **Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, et al.** Tumour DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*, 1987; 56: 637-642.
- 344.- **Clark GM, Dressler LG, Owens MA, et al.** Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med*, 1989; 320: 627-633.
- 345.- **Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P.** Nuclear DNA content as a prognostic factor in T1-2N0 breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1990; 93: 471-479.
- 346.- **Merkel DE, Winchester DJ, Goldschmidt RA, et al.** DNA flow cytometry and pathologic grading as prognostic guides in axillary lymph node-negative breast cancer. *Cancer*, 1993; 72: 1926-1032.
-

- 347.- **Sjogren S, Ingana M, Norberg T, et al.** The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst*, 1996; 88: 173-182.
- 348.- **Resnick JM, Cherwitz D, Knapp D, et al.** A microwave method that enhances detection of aberrant p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Arch Pathol Lab Med*, 1995; 119: 360-366.
- 349.- **Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, et al.** Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections. *Hum Pathol*, 1994; 25: 263-270.
- 350.- **Igarashi H, Sugimura H, Maruyama K, et al.** Alteration of immunoreactivity by hydrated autoclaving, microwave treatment, and simple heating of paraffin-embedded tissue sections. *AMPIS*, 1994; 102: 295-307.
- 351.- **Tenaud C, Negoescu A, Labat-Moleur F, et al.** p53 immunolabeling in archival paraffin-embedded tissues: optimal protocol based on microwave heating for eight antibodies on lung carcinomas. *Mod Pathol*, 1994; 7: 853-859.
- 352.- **Shin HJ, Kalapurakal SK, Lee JJ, et al.** Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stores slides with and without microwave heating. *Mod Pathol*, 1997; 10: 224-230.
- 353.- **Cady B, Stone MD, Schuler JG, et al.** The new era in breast cancer. Invasion, size, and nodal involvement dramatically decreasing as a result of mammographic screening. *Arch Surg*, 1996; 131: 301-308.
- 354.- **McGuire WL, Tandom AK, Allred DC, et al.** Prognosis and treatment decisions in patients with breast cancer without axillary node involvement. *Cancer*, 1992; 70: 1775-1781.
- 355.- **Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, et al.** The changing importance of prognostic factors during long-term follow-up. *Int J Cancer*, 1992, 51; 698-702.
- 356.- **Collett K, Maehle BO, Skjarerven R, Hartveit F.** Lymph node-negative breast cancer: the prognostic role and time dependency of age, tumor diameter and mean nuclear area. *Oncology*, 1994; 51: 323-328.
- 357.- **Daidone MG, Silvestrini R, Benini E, Luisi A.** Biologic variables could predict specific relapse types in node-negative breast cancer. *Anticancer Res*, 1995; 15(5A): 1825.
-

358.- **Demicheli R, Abbattista A, Miceli R, et al.** Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat*, 1996; 41: 177-185.

359.- **Saphner T, Tormey DC, Gray R.** Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol*, 1996; 14: 2738-2746.

360.- **Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S.** Natural history of node-positive breast cancer: the curability of small cancers with a limited number of positive nodes. *J Clin Oncol*, 1996; 14: 3105-3111.
