

M. I. Núñez\*, \*\*  
A. Ruibal\*, \*\*  
J. Arias\*\*\*  
A. Sánchez Salmón\*  
F. Rabadán\*\*  
A. Tejerina\*\*

# Estudio biológico de los carcinomas ductales infiltrantes de mama sin receptores de estrógenos\*

## Biological study of negative estrogen receptor infiltrating ductal carcinomas of the breast

### SUMMARY

*In order to know the behaviour of infiltrating ductal carcinomas of the breast (IDCs), estrogen receptor negative (ER-) classified according to the lymph node involvement (N), we have analyzed some clinical and biological parameters in 91 patients, whose 47 were N negative. Our results led us to suggest the following: 1) in N+ patients, IDCs ER- were associated with a greater tumor size, lower levels of progesterone receptor, higher concentrations of tissue type plasminogen activator (t-PA), cathepsin D and erbB-2 protein expression than those N-; likewise they had higher percentages of positivities for cathepsin D and c-erbB2 protein; 2) the N <= 3 patients, in relation to N- group, had the same biological behaviour than the N+ considered as a whole, suggesting an important role of that stage of invasiveness; 3) the N > 3 patients had lower concentrations of t-PA and were associated more frequently with S phase >14% than those N <= 3, and 4) there is a significant correlation between c-erbB-2 protein expression and number of positive lymph nodes.*

\* Laboratorio de Marcadores Biológicos Tumorales. Servicio de Medicina Nuclear. Hospital General de Asturias. Oviedo.

\*\* Centro de Patología de la Mama. Madrid.

\*\*\* Servicio de Cirugía General. Hospital Monte del Naranco. Oviedo.

Correspondencia:  
A. Ruibal Morell.  
Laboratorio de Fisiopatología de la Mama.  
Centro de Patología de la Mama.  
José Abascal, 40.

### Palabras clave

*Carcinoma de mama, Carcinoma ductal infiltrante, Receptores de estrógenos negativos, Adenopatías axilares, Parámetros clinicobiológicos.*

### Key words

*Breast carcinomas, Infiltrating ductal carcinoma, Negative estrogen receptors, Axillary lymph node involvement, Clinical and biological parameters.*

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama constituye el tumor femenino más frecuente y representa la segunda causa de mortalidad en la mujer. Dada la gran variabilidad clínica y la dificultad para poder predecir su comportamiento, se han estudiado numerosos parámetros con la finalidad de identificar aquellas características tumorales

que tuvieran una importante repercusión clínica. Destacan, entre ellos, el tipo histológico, tamaño, afectación axilar ganglionar, grado nuclear e histológico, edad en el momento del diagnóstico y los receptores esteroideos, constituyendo todos ellos los denominados «factores pronósticos clásicos». La invasión axilar tumoral (N) es un importante condicionante de la evolución posterior, de tal modo que la supervivencia se reduce conforme se incrementa el número de ganglios afectados,<sup>1</sup> habiéndose establecido en cuatro el dintel

\* Financiado en parte por el FIS n.º 96/1417.

separador de un riesgo diferente; de este modo se ha visto la supervivencia libre de enfermedad es superior en un 20-30% cuando el número de adenopatías afectadas es inferior a aquella cifra. Asimismo, la negatividad para los receptores de estrógenos (RE) se asocia en los casos N- con una menor supervivencia e intervalo libre de enfermedad,<sup>2</sup> una notable resistencia al tratamiento hormonal, una mayor propensión a diseminarse en vísceras y un incremento de la mortalidad.<sup>3</sup>

La menor frecuencia de los tumores hormonoindependientes ha determinado que no sean numerosos los estudios realizados sobre el comportamiento de diferentes parámetros biológicos y su posible valor para poder establecer subgrupos de riesgo, lo cual unido a su peor evolución clínica hacen de los mismos un grupo de enorme interés práctico. Con el objeto de profundizar en la fisiopatología de los tumores RE- y conocer qué factores podrían influir en su diseminación regional hemos realizado el presente trabajo.

## MÉTODOS

El grupo estudio incluyó 91 mujeres afectas de carcinomas ductales infiltrantes (CDIs) de mama receptor de estrógenos negativos (RE-) que se clasificaron en función del estadio clínico del siguiente modo: 20 en estadio I, 37 en IIa, 25 en IIb, cinco en IIIa y cuatro en IIIb; asimismo, 24 eran pre y 67 postmenopáusicas y 47 no presentaron afectación axilar ganglionar. Los parámetros clinicobiológicos analizados, así como los métodos utilizados fueron los siguientes: edad, estado menopáusico, focalidad, multicentricidad, tamaño, número de adenopatías, grado histológico, grado nuclear, receptor de estrógenos (RE. EIA Abbott, EE. UU.), de progesterona (RP. EIA Abbott, EE. UU.), pS2 (IRMA. CIS Biointernacional, Francia), cathepsina D (IRMA. CIS Biointernacional, Francia), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR. RDL. Viennalab, Austria), proteína oncogénica neu (EIA. Oncogene, EE. UU.), activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP. Boehringer Mannheim, Alemania), fase de síntesis celular (fase S) y ploidía, ambas medidas por CMF mediante el sistema Fasdcam de Bencton Dickinson (EE. UU.). Todos los indicadores biológicos se determinaron en el citosol, excepto el EGFR y la proteína neu (sólo posible en 44 casos) que lo fueron en la membrana celular. Las muestras tisulares fueron tratadas siguiendo el

TABLA 1  
PARÁMETROS CLINICOBIOLOGICOS EN LOS QUE SE OBSERVARON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS TRAS LA PRUEBA DE MANN WHITNEY

Parámetro	N- (47 casos)			N+ (44 casos)	
	Interv.	Mediana	p	Interv.	Mediana
RP .....	0,1-360	6,0	0,032	0,1-312	1,8
Catepsina D ...	1,5-126	34,3	0,031	5,8-107	52,4
t-AP .....	0,1-242	2,6	0,020	0,1-37,1	4,2
Neu-membr.* ..	708-80.808	3.414	0,014	1.903-310.583	47,27
Tamaño .....	0,2-5,0	2,0	0,042	0,6-13	2,3

\* N.º de casos en N-: 28. N.º de casos en N+: 16. pt: percentil. RP: fmol/mg prt. Catepsina D: pmol/mg prt. t-PA: ng/mg prt. Neu-membrana: NHU/mg prt. Tamaño: cm.

protocolo de la EORTC (ver 4) y cada una de ellas fue dosificada por duplicado. Los coeficientes de variación intra e interensayo no sobrepasaron el 6 y 11%, respectivamente, y los resultados de los diferentes parámetros biológicos se expresaron en función de los miligramos de proteína, citosólica o de membrana, determinada por el método de Bradford. El análisis estadístico se realizó mediante el programa BMDP3. Tras observarse que los diferentes parámetros biológicos no seguían una distribución normal se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas, así como la del Chi cuadrado. En consecuencia, los resultados se han expresado mediante el intervalo, mediana y los percentiles 25 y 75.

## RESULTADOS

En las tablas 1 y 2 se expresan los resultados obtenidos con los diferentes parámetros clinicobiológicos en las 91 pacientes afectas de CDIs-RE negativos y clasificadas en función de la existencia o no de

TABLA 2  
PARÁMETROS CLINICOBIOLOGICOS CON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (PRUEBA DE CHI CUADRADO) EN LOS PORCENTAJES DE POSITIVIDADES OBSERVADOS ENTRE LAS PACIENTES N- Y N+

Parámetro	N-	p	N+
Catepsina D > 50 pmol/mg prt. ....	11/47	0,003	22/44
Neu-membrana > 3.500 NHU/mg prt. ..	13/28	0,010	14/16
Tamaño > 5 cm .....	0/47	0,059	4/44

TABLA 3

DISTRIBUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS DIFERENTES PARÁMETROS CLINICOBIOLOGICOS CON SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA CON LA PRUEBA DE MANN WHITNEY EN LOS GRUPOS N- Y N1-3

Parámetro	N- (47 casos)			N1-3 (20 casos)	
	Interv.	Mediana	p	Interv.	Mediana
RP .....	0,1-360	6,0	0,055	0,1-35,9	1,3
Catepsina D ...	1,5-126	34,3	0,045	13,8-104,6	51,3
t-AP .....	0,1-242	2,6	0,002	0,6-37,1	5,4
Neu-membr.* ..	708-80.808	3.414	0,073	1.903-50.478	4.008

\* N.º de casos en N1-3: nueve.

afectación axilar ganglionar. Tal como se puede observar en ellas, los tumores N+ cursaron en relación a los N- con mayores concentraciones de catepsina D (p: 0,03184), t-AP (p: 0,02001) y proteína neu (p: 0,01405), mientras que las de los receptores de progesterona fueron menores (p: 0,03249). También pudimos comprobar que los casos con afectación axilar ganglionar se asociaron con un mayor tamaño (p: 0,04225), cursando además con un superior porcentaje de positividad para la catepsina D (p: 0,00323) y proteína neu (p: 0,01091).

Tras observar las peculiaridades clinicobiológicas entre los pacientes N- y N+ quisimos centrarnos exclusivamente en estos últimos. Tal como se puede observar en las tablas 3 y 4 el subgrupo N1-3 respecto al N- cursó con mayores concentraciones (p < 0,05) de catepsina D, t-AP y proteína neu, así como con menores de receptor de progesterona; también aquellos pacientes presentaron mayores porcentajes de positividad para la catepsina D (p: 0,04692) y la proteína neu (p: 0,03885), es decir, se apreciaron casi los mismos cambios biológicos que se habían constatado entre los subgrupos N- y N+. Los pacientes con N > 3 presentaron exclusivamente, con respecto a N ≤ 3, menores concentraciones de t-AP (i: 0,1-11,2; mediana: 3,5 vs i: 0,6-37,1; mediana: 5,4; p: 0,01918), así como una tendencia a asociarse con una fase de síntesis celular superior al 14% (4/19 vs 0/17; p: 0,07632).

## DISCUSIÓN

Los carcinomas ductales infiltrantes (CDIs) de mama representan el tipo histológico más frecuente

TABLA 4

PORCENTAJE DE POSITIVIDADES CON SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (PRUEBA DE CHI CUADRADO) DE DIFERENTES PARÁMETROS BIOLÓGICOS ENTRE LOS SUBGRUPOS N- Y N1-3

Parámetro	N-	p	N+
Catepsina D + (> 50 pmol/mg prt) ...	11/47	0,046	10/20
Neu-membrana + (> 3.500 NHU/mg prt) .....	13/28	0,038	8/9

(75%) en la clínica diaria y a menudo cursan con afectación ganglionar axilar, lo que incide directamente en su pronóstico.<sup>1,5</sup> Otro parámetro que condiciona su evolución posterior son los receptores de estrógenos, cuya positividad en estadio I constituye un factor pronóstico con el tamaño tumoral, determinando su presencia un incremento superior al 10% en el intervalo libre de enfermedad y algo menor en la supervivencia.<sup>2</sup> Es interesante resaltar también la existencia de una correlación inversa entre las concentraciones de RE y la mortalidad por aquellos tumores,<sup>3</sup> lo que confiere una gran importancia práctica a su negatividad. Son numerosos los trabajos que analizan el comportamiento de diferentes parámetros en los carcinomas de mama,<sup>6-8</sup> nosotros hemos querido centrarnos exclusivamente en los casos RE negativos por ser menos frecuentes, pero más interesantes biológicamente.

Al clasificar los 91 CDIs RE- en función de la presencia o no de afectación axilar ganglionar pudimos observar que los casos positivos se asociaron con menores concentraciones de RP y mayores de catepsina D, t-AP y proteína neu. Asimismo, los tumores N+ cursaron con mayores porcentajes de positividad (> 50 pmol/mg prt) para la catepsina D y proteína neu (> 3.500 NHU/mg prt), presentando también un mayor tamaño (p: 0,04225). El descenso de las concentraciones de RP observada en los casos N+ frente a los N- podría ser el exponente de la menor dependencia hormonal que se aprecia conforme los tumores mamarios evolucionan, así como de una mayor indiferenciación celular, puesto que estos receptores se correlacionan inversa y significativamente con el tamaño del tumor, grado de anaplasia y pleomorfismo nuclear.<sup>9,10</sup> En pacientes N- se ha comprobado que el porcentaje de recidivas a los 5 años es del 11% para los tumores < 2 cm, del 22% cuando oscilan entre 2 y 3 y del 24% cuando exceden de los

5 cm.<sup>9</sup> Aunque el valor pronóstico del tamaño tumoral parece ser menor del esperado cuando se analizan series con períodos de seguimiento superiores a los 10 años, el hallazgo de un menor tamaño en los casos sin afectación axilar ganglionar (i: 0,2-5,0; mediana: 2 vs i: 0,6-13; mediana: 2,3 cm; p: 0,04225) apoya que aquéllos puedan tener un mejor comportamiento y evolución. Hemos observado una correlación inversa y significativa entre las concentraciones de RP y el tamaño (r: -0,5986) en los casos N+, lo cual explicaría el comportamiento anteriormente citado para ambos parámetros en las pacientes con o sin afectación axilar.

La catepsina D junto al pepsinógeno C forma parte de la familia de las aspartil proteasas y fue identificada en 1987 como la glucoproteína estrogendependiente de 52 kDa. Es estimulada por los estrógenos, pero puede ser secretada también por carcinomas mamarios hormonoindependientes, no correlacionándose generalmente con la edad, adenopatías axilares, tamaño y grado de diferenciación histológico. Numerosos autores han demostrado que altas concentraciones citosólicas de esta proteasa son indicadoras de un peor pronóstico tanto en ausencia como en presencia de adenopatías axilares asociadas,<sup>11-13</sup> si bien estudios inmunohistoquímicos la asocian con un peor comportamiento sólo cuando su localización es estromal.<sup>14, 15</sup> Nosotros hemos observado mayores niveles citosólicos de la proteasa en los casos N+ frente a los N-, lo cual concuerda con lo descrito por otros autores<sup>16-18</sup> y ello, unido a que también hayamos constatado un mayor porcentaje de positividad (11/47 vs 22/44; p: 0,00323) de catepsina D en los casos N+, así como una ausencia de diferencias en la fase de síntesis celular entre ambos subgrupos tumorales, hecho observado también por Montcourrier et al,<sup>19</sup> nos induce a pensar que la proteasa está jugando un papel en la invasión regional tumoral, acompañándose de un peor pronóstico,<sup>18</sup> aunque nosotros no lo podamos precisar en estos momentos. Cuando comparamos el subgrupo N ≤ 3 con el N > 3 no apreciamos diferencias significativas en la concentración citosólica de la proteasa ni tampoco las observamos cuando establecimos subgrupos (< 3; N4-10 y N > 10) en función del número de adenopatías afectadas (datos no mostrados), pero sí se constataron al comparar las concentraciones (p: 0,04531) y los porcentajes de positividad (p: 0,04692) de los grupos N- y N1-3 (tablas 3 y 4),

todo lo cual nos induce a pensar que el efecto de la enzima en la invasión ocurre sólo en las fases iniciales, jugando posiblemente un papel importante otras proteasas conforme aquélla avanza, opinión compartida también por otros autores.<sup>16, 20</sup>

El activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP) es una serínproteasa y en los carcinomas de mama sus concentraciones citosólicas se correlacionan directamente con los RE y RP, así como con parámetros clinicobiológicos indicadores de un mejor comportamiento.<sup>21, 22</sup> Nosotros hemos apreciado mayores cifras del mismo en los casos N+ que en los N-, lo cual dado que los tumores son RE- nos sugiere el papel de esta proteasa en la progresión regional del tumor. Apoya esto la existencia de mayores concentraciones en los casos N1-3 que en los N- (p: 0,00281), si bien constatamos posteriormente un descenso significativo de sus niveles cuando se superaron los tres ganglios afectados. Merece destacarse la existencia de una correlación inversa y significativa (r: -0,6466) entre el t-AP y el tamaño tumoral.

El gen erbB2/HER2/neu es un oncogén de la familia erbB que codifica una proteína de 185 kDa, estructuralmente relacionada con el EGFR y su función es la de un receptor con actividad tirosín quinasa intrínseca. Desde que en 1987 Slamon et al<sup>23</sup> comprobaron su valor como factor pronóstico en casos N+, son numerosos los trabajos realizados mediante diferentes técnicas en los carcinomas mamarios, mereciendo destacarse la existencia de una relación entre la amplificación/sobreexpresión del oncogén y el grado,<sup>24</sup> mitosis, aneuploidía,<sup>25</sup> pleomorfismo nuclear, hormonoindependencia y capacidad proliferativa,<sup>26</sup> si bien su correlación con la afectación axilar ganglionar<sup>23, 27, 28</sup> y tamaño<sup>29</sup> es discordante. Nosotros hemos comprobado (tabla 1) mayores concentraciones y porcentaje de positividad de la proteína neu en los casos N+ respecto a los N-, constatándose también en los casos con afectación axilar una correlación significativa entre aquélla y el número de adenopatías, no sólo en los casos neu positivo (r: 0,63173), como también habían observado Dittadi et al<sup>30</sup> entre otros, sino también en el subgrupo considerado globalmente (r: 0,60793). Las pacientes N1-3 cursaron con superiores porcentajes (p: 0,03885) y concentraciones (p: 0,07334) frente a los casos N-, y asimismo también constatamos mayores cifras en los casos N > 3 (i: 2884-310583; mediana: 6819) que en los N < 3 (i: 1903-50478; mediana: 4008), que no alcan-

zaron la significación estadística por el reducido número de pacientes incluidos en ambos subgrupos (siete y nueve pacientes, respectivamente); sin embargo, Borg et al<sup>31</sup> observan mayores porcentajes de positividad conforme se incrementa el número de ganglios afectados. Lo anteriormente descrito unido a la relación entre la expresión de este gen y la proliferación celular<sup>26</sup> y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-AP) a la existencia de mayor porcentaje de positividad con fase S > 14% en los tumores N > 3 vs N ≤ 3 (4/19 vs 0/17; p: 0,07632), así como al hecho de que un ligando del neu (heregulina) induce la síntesis de ciertas moléculas de adhesión (ICAM-1), lo que puede repercutir en la morfología, grado de diferenciación y capacidad metastásica de las células que lo expresan<sup>32</sup> permiten suponer que el oncogén neu juega un papel importante en la metastatización de los carcinomas mamarios RE negativos. Apoya lo anterior el hecho de que se ha comprobado la utilidad de la dosificación sérica del neu como indicador de la existencia de metástasis,<sup>33-36</sup> sobre todo cuando el tumor primitivo era RE-.<sup>37</sup>

Nuestros resultados nos inducen a las siguientes consideraciones: a) los carcinomas ductales infiltrantes de mama RE- con afectación axilar ganglionar cursaron frente a los N- con un mayor tamaño, menores cifras de RP, superiores concentraciones de activador del plasminógeno tipo tisular, catepsina D y proteína oncogénica neu, así como con elevados porcentajes de positividad de las dos últimas; b) el paso de N- a N ≤ 3 presentó, a excepción del tamaño, el patrón anteriormente citado, lo cual puede traducir una gran importancia biológica, y c) la proteína oncogénica neu se correlacionó significativamente con el número de adenopatías afectadas.

## RESUMEN

Con objeto de conocer el comportamiento de los carcinomas ductales infiltrantes de mama receptor de estrógenos negativos (RE-) clasificados en función de la existencia o no de afectación ganglionar axilar hemos estudiado el comportamiento de diferentes parámetros clinicobiológicos en 91 pacientes, de las cuales 47 cursaron sin adenopatías. Los resultados obtenidos nos inducen a las siguientes consideraciones: 1) los casos con afectación axilar ganglionar (N+) cursaron frente a los N- con un mayor

tamaño, menores cifras de receptor de progesterona, superiores concentraciones de activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP), catepsina D y proteína oncogénica neu, así como con superiores porcentajes de positividad para las dos últimas; 2) el paso de N- a N ≤ 3 presentó, a excepción del tamaño, el patrón anteriormente citado, lo cual permite sugerir una gran importancia biológica; 3) los pacientes con N > 3 cursaron, con respecto a los N ≤ 3, con menores concentraciones de t-AP y una tendencia a presentar una fase S superior al 14%, y 4) la proteína oncogénica neu se correlacionó significativamente con el número de adenopatías afectadas.

## AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a los doctores M. I. Matínez, A. Alba y M. T. Allende, del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital General de Asturias, por la ayuda prestada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Carter CL, Allen C, Henson D. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7.
2. McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, Chamness GC, Clark GM. How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (commentaries).
3. Sheck LI, Godolphin W. Survival with breast cancer: the importance of estrogen receptor quantify. *Eur J Clin Oncol* 1989;25:243-50.
4. Ruibal A, Fernández Liana B, Alba A, Núñez MI, Martínez MI, Allende MT. Cyfra 21.1 cytosolic levels in breast diseases. Correlation with other clinical and biological parameters. *Int J Biol Markers* 1996;11:90-2.
5. Quiet C, Ferguson D, Weichselbaum M, et al. Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow up. *J Clin Oncol* 1995; 13:1144-51.
6. Foekens JA, Peters HA, Portengen H, Noordegraaf E, Berns EMJJ, Klijn JGM. Cell biological prognostic factors in breast cancer: a review. *J Clin Immunol* 1991; 14:184-95.
7. Pinder SE, Ellis IO, Elston CW. Prognostic factors in primary breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1995;41:981-3.
8. Spyrtos F, Martin PM, Haceme K, et al. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1266-72.
9. Ruibal Morell A. El cáncer de mama: biología y marcadores tumorales. Madrid: Ene Ediciones; 1996. p. 6-16.
10. Page DL. Prognostic and breast cancer. Recognition of lethal and favourable prognosis types. *Am J Surg Pathol* 1991;15:334-49.
11. Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Seminars in Cancer Biology* 1990;1:153-60.

12. Thorpe SM, Rochefort H, García M, et al. Association between high concentration of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989;69:6008-14.
13. Spyrtatos F, Brouillet JP, Deprenne A, et al. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989;2:1115-8.
14. Nadji M, Fresno M, Nassiri M, Conner G, Herrero A, Morales AR. Cathepsin D in host stromal cells, but not in tumor cells, is associated with aggressive behavior in node-negative breast cancer. *Hum Pathol* 1996;27:890-5.
15. Joensuu H, Toikkanen S, Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer. *Br J Cancer* 1995;71:155-9.
16. Gion M, Mione R, Dittadi R, Romanelli M, Pappagallo L, Capitano G. Relationship between cathepsin D and other pathological and biological parameters in 1,752 patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:671-7.
17. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990;332:297-302.
18. Namer M, Ramaioli A, Fontana X, et al. Prognostic value of total cathepsin D in breast tumours. *Breast Cancer Res Treat* 1991;19:85-93.
19. Montcourrier P, Manageat PH, Salazar G, Morisset M, Sahuquet A, Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles. *Cancer Res* 1990;56:6045-54.
20. Pujol P, Maudelonde T, Daures JP, et al. A prospective study of the prognostic value of cathepsin D levels in breast cancer cytosol. *Cancer* 1993;71:2006-12.
21. Rella C, Coviello M, Quaranta M, Paradiso A. Tissue-type plasminogen activator as marker of functional steroid receptors as marker of functional steroid receptors in human breast cancer. *Thromb Res* 1993;64:209-20.
22. Duffy MJ, O'Grady P, Deveney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HR. Tissue-type plasminogen activator, a new prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 1988;8:1348-9.
23. Slamon DJ, Clark JM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 neu oncogene. *Science* 1987;235:177-81.
24. Quénel N, Wafflard 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;35:283-91.
25. Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin HH, Isola JJ. Association of c-erbB-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;49:650-5.
26. Scorilas A, Yotis J, Stravolemos K, et al. c-erbB-2 overexpression may be used as an independent prognostic factor for breast cancer patients. *Anticancer Res* 1995;15:1543-8.
27. Rio MC, Bellocq JP, Gairard B, et al. Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancer in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:9243-7.
28. Barnes DM, Lammie GA, Millis RR, Gullick WJ, Allen DS, Altman DJ. An immunohistochemical evaluation of c-erbB2 expression in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 1989;58:448-52.
29. Giai M, Roagna R, Ponzone R, Bortoli M, Dati C, Sismondi P. Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Res* 1994;14:1441-50.
30. Dittadi R, Donisi PM, Brazzale A, Marcato R, Spina M, Gion M. Immunoenzymatic assay of erbB2 protein in cancer and non malignant breast tissue. Relationship with clinical and biochemical parameters. *Anticancer Res* 1992;12:2005-10.
31. Borg A, Baldetorp B, Fernö M, et al. ErbB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid receptor positive breast cancer. *Cancer Letters* 1994; 81:137-44.
32. Bacus SS, Gudkov AV, Zeineick CR, et al. Neu differentiation factor (heregulin) induces expression of intercellular adhesion molecule 1: implications for mammary tumors. *Cancer Res* 1993;53:5251-61.
33. Allende MT, Fernández-Fernández M, Fernández Llana B, Ruibal A. Comportamiento del oncogén neu (c-erbB2/HER-2) en tumores mamarios. Correlación con otros parámetros tisulares. En: Lacal JC, Barbacid M, eds. *Avances de la investigación oncológica española*. Madrid: Farmaindustria. Serie Científica; 1993. p. 297-316.
34. Narita T, Funashashi H, Satoh Y, Takagi H. C-erbB2 protein in the sera of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:97-102.
35. Fontana X, Ferrari P, Namer M, Peysson R, Salamon C, Cussiere F. c-erbB2 gene amplification and serum level of c-erbB2 oncoprotein at primary breast cancer diagnosis. *Anticancer Res* 1994;14:2099-104.
36. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A, Jager W. Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1997;43:87-95.
37. Molina R, Jo R, Filella X, et al. Serum levels of c-erbB2 (HER-2/neu) in patients with malignant and non malignant diseases. *Tumor Biol* 1997;18:188-96.