

M. L. Lamelas*,
M. I. Enguita*,
J. Vázquez*,
J. C. Rodríguez*,
E. Plaza*,
A. M. Merino**,
F. Vizoso*

Análisis de la expresión del pepsinógeno C en metástasis ganglionares de carcinoma de mama

Analysis of pepsinogen C expression in lymph node metastases of breast cancer

SUMMARY

Here we analyzed in primary tumors and in metastatic axillary nodes of 30 breast cancer patients, by immunohistochemical assay, the tumoral expression of pepsinogen C, a protein normally expressed by gastric mucosa. Of the primary tumors, 16 (53,3%) showed a positive immunostaining for pepsinogen C and 17 (56,6%) patients showed a positive immunostaining in their tumoral lymph nodes. In addition, there was a significant positive relationship between the tumoral expression of pepsinogen C in the primary tumors and the metastatic lymph nodes ($p < 0.002$). However, only the tumoral expression of this protein in primary tumors achieved statistical significance ($p < 0.05$) as prognostic factor for favorable evolution to predict overall survival from patients.

*Servicios de Ginecología, Cirugía General, Anatomía Patológica y Anestesia y Reanimación. Hospital de Jove. Gijón.

**Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Cabueñes. Gijón.

Correspondencia:
F. Vizoso.
Servicio de Cirugía General.
Hospital de Jove.
Avda. Eduardo Castro, s/n.
33290 Gijón (Asturias).

Palabras clave

Pepsinógeno C, Metástasis ganglionares linfáticas, Cáncer de mama.

Key words

Pepsinogen C, Lymph node metastatic, Breast cancer.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se conoce poco acerca de los cambios específicos de la biología molecular del cáncer en general que ocurren en el proceso metastásico. En relación con el cáncer de mama, los escasos estudios comparativos sobre los carcinomas primarios y sus metástasis en nódulos linfáticos han demostrado que ambos compartimentos tumorales muestran un fenotipo similar en cuanto a su histopatología, actividad proliferativa,¹⁻⁵ receptores de estrógenos y de progesterona⁶⁻⁸ y expresión de oncógenes.^{3,9} Sin embargo, también se ha descrito la adquisición de algunas anormalidades en ganglios linfáticos metastásicos de carcinoma de mama, como

son un incremento de los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico¹⁰ o de la proteína de choque térmico HSP27.¹¹ Además, el número total de aberraciones genéticas detectadas exclusivamente en ese compartimento tumoral es más elevado que el observado únicamente en los tumores primarios.¹² Así pues, esa propensión a un número elevado de cambios genéticos en las localizaciones metastásicas sugiere la hipótesis de que la progresión de los carcinomas mamarios a los nódulos linfáticos está asociada con la adquisición de nuevos cambios genéticos que confieren un fenotipo más agresivo.

Por otra parte, no existe en la actualidad información acerca del comportamiento de las proteínas de secreción mamaria, como es el pepsinógeno C, en el

compartimento metastásico del cáncer de mama. El pepsinógeno C es una enzima proteolítica normalmente expresada por la mucosa gástrica e involucrado en la digestión de las proteínas en el estómago,¹³ pero también se ha demostrado que el epitelio de los quistes de mama y un porcentaje significativo de carcinomas de mama humanos muestran la capacidad de producir esta enzima.¹⁴ Además también se ha demostrado que la expresión tumoral del pepsinógeno C está asociada a un pronóstico favorable en el cáncer de mama¹⁵ y que es una de las pocas proteínas que son inducidas por andrógenos en células de cáncer de mama en cultivo.^{16, 17}

El objetivo de este estudio ha sido investigar la expresión de pepsinógeno C en metástasis ganglionares de cáncer de mama, la posible relación con su expresión en los tumores primarios y su significación pronóstica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

En este trabajo se incluyeron 30 mujeres con el diagnóstico histológico de carcinoma ductal infiltrante y con ganglios axilares positivos que fueron todas ellas tratadas quirúrgicamente en el Hospital de Jove de Gijón entre 1983 y 1991. Ninguna de ellas había sido previamente tratada ni presentaba signos de metástasis a distancia ni otra neoplasia maligna en el momento de su diagnóstico inicial y todas ellas fueron sometidas a mastectomía radical modificada. Las características de las pacientes y de sus tumores están expuestas en la tabla 1. La edad media de las pacientes fue de 61,5 años (intervalo: 28 y 90 años). El grado histológico de los tumores fue determinado de acuerdo a los criterios de Bloom y Richardson¹⁸, mientras que el estado de afectación de los ganglios linfáticos axilares fue evaluado histológicamente. El valor medio de ganglios axilares linfáticos aislados fue de 11,5 (intervalo: cuatro y 22) y el de ganglios metastásicos fue de siete (intervalo: uno y 21). Del total de las 30 pacientes, 20 recibieron radioterapia postoperatoria. Además, 15 recibieron terapia sistémica adyuvante con ciclofosfamida, metrotexato y 5-fluorouracilo y 18 fueron tratadas postoperatoriamente con tamoxifeno. Todas las pacientes fueron sometidas a estudios clínicos, radiológicos y biológicos cada tres meses durante el primer año y luego anual-

TABLA 1
CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES,
DE LOS TUMORES Y ANÁLISIS UNIVARIANTE
DE LA SUPERVIVENCIA TOTAL

Factor	N.º	Supervivencia total (% ± ES)		p
		2 años	5 años	
Estado menopáusico:				
— Premenopáusico	9	88 ± 10	53 ± 20	0,2481
— Postmenopáusico	21	76 ± 9	45 ± 11	
Tamaño tumoral:				
— T1	8	80 ± 17	40 ± 29	0,1249
— T2	8	75 ± 15	60 ± 18	
— T3	8	75 ± 15	62 ± 17	
— T4	6	75 ± 15	25 ± 15	
Grado histológico:				
— I	13	91 ± 7	32 ± 15	0,7935
— II	13	69 ± 12	60 ± 13	
— III	4	50 ± 25	50 ± 25	
Número ganglios metastásicos:				
— 1-3	11	81 ± 11	45 ± 15	0,3636
— 4-9	11	90 ± 8	57 ± 16	
— ≥ 10	8	62 ± 11	41 ± 20	
Pep C en tumores primarios:				
— < 120	14	73 ± 10	24 ± 11	0,0111
— ≥ 120	16	90 ± 8	70 ± 14	
Pep C en ganglios metastásicos:				
— Negativo	13	69 ± 12	16 ± 14	0,0710
— Positivo	17	88 ± 7	63 ± 11	

ES: error estándar.

mente. El período medio de seguimiento clínico fue de 50,7 meses. De las 30 mujeres con cáncer de mama incluidas en este estudio, 19 desarrollaron recurrencia tumoral y fallecieron todas ellas como consecuencia de ello. Finalmente, cuatro fallecieron de causas no relacionadas con el cáncer de mama.

Purificación de las proteínas y producción de anticuerpos

Para obtener anticuerpos contra el pepsinógeno C se purificó la proteína a partir de mucosa gástrica humana obtenida de autopsias de pacientes sin enfermedades gástricas siguiendo el método de Foltmann y Jensen¹⁹. La naturaleza y calidad del antígeno purificado se confirmó mediante determinación de su secuencia aminoterminal por degradación auto-

mática de Edman. El antisuero contra la proteína purificada fue obtenido en conejos blancos de Nueva Zelanda siguiendo el método descrito por Vaitukaitis.²⁰ A los conejos inmunizados les fue extraída la sangre 6 semanas después de la inyección de proteína y el suero obtenido fue dializado durante 24 horas a 4° C contra 20 mM de tampón de fosfato, pH 7,2. Entonces, el material dializado fue cromatografiado en columna de DEAE-celulosa equilibrada y eluido en el mismo tampón de fosfato y finalmente las fracciones que contuvieron IgG fueron recogidas y congeladas a -20° C hasta su utilización.

Preparación de las muestras y tinción inmunohistoquímica

Todos los tejidos fueron fijados durante 16 horas en formaldehído al 10%, tamponado con tampón fosfato 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, las muestras tisulares fueron deshidratadas mediante pases sucesivos en etanol a concentraciones crecientes hasta el 99,5% y finalmente se aclararon en xilol e incluyeron en parafina. Todos estos pasos se realizaron en un procesador automático Citadel 2000 (Shandon, Astmoor, Inglaterra).

La tinción inmunohistoquímica se realizó sobre cortes de 6 µm de los bloques de parafina siguiendo el método biotina-streptavidina mediante el sistema Supersensitive (Biogenex, San Ramon CA, EE. UU.). Para ello las muestras tisulares fueron previamente desparafinadas en estufa a 60° C durante 30 minutos y tras dos pases de 15 minutos en xilol se hidrataron por pases sucesivos en metanol a concentración decreciente y agua desionizada. La presencia de la enzima fue revelada con Fast Red en Tris-Buffer con Naftol-Fosfato, controlando el grado de tinción en la preparación de tumor utilizada como control positivo. La fosfatasa alcalina endógena fue bloqueada con levamisole (a dilución 1:50). El proceso de tinción fue detenido mediante lavado con agua destilada. Las preparaciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 30 segundos y haciéndose virar ésta con agua corriente. Finalmente las preparaciones fueron montadas en medio acuoso Aquatex (Merck, Darmstadt, Alemania).

Análisis de las tinciones

Una vez realizado el proceso de inmunotinción las preparaciones histológicas de los tumores primarios

correspondientes a las determinaciones del pepsinógeno C fueron analizadas de una manera semicuantitativa de acuerdo al procedimiento descrito por McCarty et al,²¹ basado en la intensidad (I) y el porcentaje de células teñidas (PC) para cada intensidad. Las diferentes intensidades obtenidas fueron clasificadas desde 0 (no tinción) hasta 3 (tinción muy intensa), mientras que para el porcentaje de células teñidas fueron utilizados agrupamientos del 10%. Para cada preparación histológica se obtuvo un valor designado como HSCORE,²¹ que fue calculado tras aplicar la siguiente fórmula: $HSCORE = \sum [(I + 1) \times PC]$. En la evaluación de las preparaciones histológicas correspondientes a la determinación de la proteína en los ganglios linfáticos metastásicos se consideraron como positivos si más del 10% de las células tumorales mostraban una tinción inmunohistoquímica positiva. Cada inmunotinción fue evaluada por dos observadores independientes sin ningún conocimiento de resultado clínico de las pacientes incluidas en el estudio. La reproductividad del método de clasificación alcanzó el 90%. Si se producían diferencias entre los observadores se alcanzaba una clasificación definitiva mediante consenso tras revisar en conjunto las preparaciones problemáticas.

Análisis estadísticos

El análisis de las diferencias entre los valores de HSCORE para el pepsinógeno C fue realizado mediante la prueba de Mann-Whitney y el análisis de varianza de Kruskal-Wallis. Las curvas de supervivencia total fueron calculadas en base al método de Kaplan-Meier²² y posteriormente comparadas mediante la prueba de log-rank.²³ Para ese análisis de supervivencia se consideró un dintel de los valores HSCORE para el pepsinógeno C de 120, previamente establecido por Vizoso et al.¹⁵ Los valores se expresan como la media ± error estándar (ES). El nivel de significación establecido fue del 95% (p < 0,05).

RESULTADOS

Expresión de pepsinógeno C en los tumores mamarios primarios

La expresión del pepsinógeno C en los 30 carcinomas mamarios primarios fue analizada mediante tin-

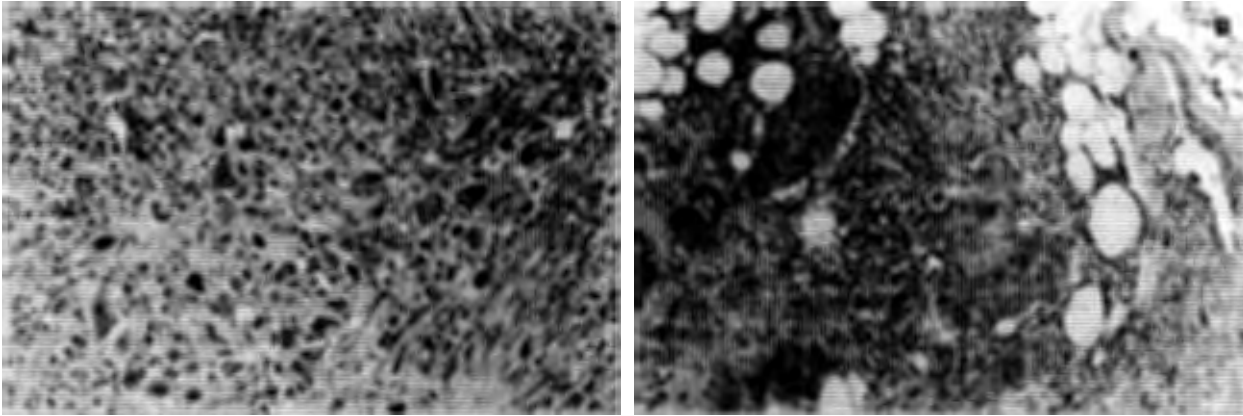


Fig. 1. A: Carcinoma mamario primario con tinción positiva para el pepsinógeno C (400x). B: Metástasis ganglionares de carcinoma de mama con tinción positiva para el pepsinógeno C (200x).

ción inmunohistoquímica con un anticuerpo elaborado contra la proteína purificada de mucosa gástrica. En los casos en que dicha tinción resultó positiva ésta se localizó en el citoplasma de las células tumorales. La figura 1 A muestra un caso representativo de tumores positivos para el pepsinógeno C. Los valores de HSCORE para la proteína variaron de 0 a 350 y su distribución está reflejada en la figura 2. Como en ella se indica, un total de 16 carcinomas mamaros (53,3%) mostraron una tinción inmunohistoquímica positiva para el pepsinógeno C, aunque existieron diferencias entre ellos en relación con la intensidad de tinción y porcentaje de células teñidas. Así, mientras que cuatro tumores exhibían una tinción débil (HSCORE < 100), cuatro mostraban una tinción moderada (100 < HSCORE < 200) y los restantes ocho mostraban una tinción fuertemente positiva para el pepsinógeno C (HSCORE > 200). El valor medio de HSCORE en el conjunto de los tumores fue de $91,5 \pm 19,9$.

Expresión de pepsinógeno C en los ganglios metastásicos

La expresión de pepsinógeno C en los ganglios axilares tumorales de las 30 pacientes del estudio fue determinada de forma similar a la expuesta en el apartado anterior. Un total de 17 mujeres (56,6%) mostraron una tinción inmunohistoquímica positiva para el pepsinógeno C en sus ganglios tumorales. Dicha tinción inmunohistoquímica fue de localización

intracitoplasmática en todas las células tumorales de los ganglios y de intensidad moderada. La figura 1 B muestra un caso representativo de ganglios tumorales positivos para el pepsinógeno C. Además, también cabe señalar que todos los ganglios axilares tumorales de cada paciente mostraron un mismo comportamiento en cuanto a la tinción inmunohistoquímica para el pepsinógeno C.

Relación entre la expresión tumoral de pepsinógeno C en los tumores primarios de mama y en los ganglios metastásicos

Los tumores mamaros primarios de las 17 pacientes con ganglios axilares tumorales positivos para el pepsinógeno C mostraron un valor medio de tinción inmu-

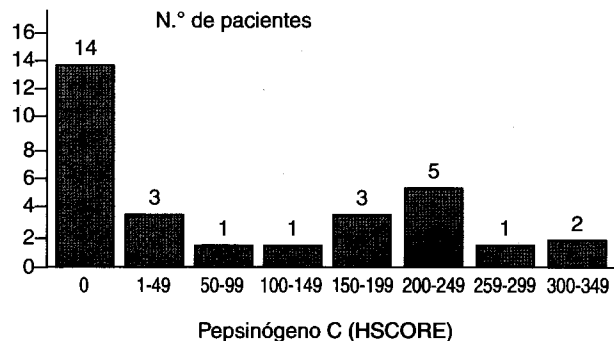


Fig. 2. Distribución de los valores de HSCORE obtenidos en el estudio de tinción inmunohistoquímica para el pepsinógeno C en 30 carcinomas primarios de mama.

nohistoquímica para el pepsinógeno C (HSCORE = $145 \pm 27,1$; mediana: 180; intervalo: 0-350) significativamente ($p = 0,002$) más elevado que el de los tumores primarios de las 13 pacientes con ganglios tumorales negativos para la enzima (HSCORE = $21,5 \pm 14,6$; mediana: 0; intervalo: 0-80). Sin embargo, cabe señalar que a pesar de esa asociación positiva de la expresión de pepsinógeno C en el tumor primario y en los ganglios metastásicos resultó llamativo observar que en cuatro casos (13,3%) existió una tinción positiva para la enzima en los ganglios tumorales, mientras en el tumor primario no se detectó ninguna tinción. Por otra parte, no se detectó ninguna asociación significativa entre los valores de tinción inmunohistoquímica para el pepsinógeno C en los tumores primarios o en los ganglios metastásicos y el número de éstos con afectación tumoral.

Expresión tumoral de pepsinógeno C y pronóstico

Durante el período de seguimiento clínico existieron 14 fallecimientos (100%) a consecuencia de la recurrencia tumoral en el grupo de las 14 pacientes con tumores primarios pepsinógeno C negativo, mientras que tan sólo cinco fallecimientos (31,2%) por el mismo motivo en el grupo de 16 pacientes con tumores primarios pepsinógeno C positivos. Como se puede observar en la figura 3 A y en la tabla 1 existieron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia determinadas para esos dos grupos de pacientes ($p = 0,01$).

Con relación al pronóstico de las pacientes en función de la expresión de pepsinógeno C en los ganglios metastásicos, las diferencias entre las curvas de supervivencia total determinadas para esos dos grupos de pacientes no fueron estadísticamente significativas como se puede observar en la figura 3 B y en la tabla 1.

DISCUSIÓN

Este estudio representa el primero en evaluar la expresión de pepsinógeno C en metástasis ganglionares de carcinoma de mama, ya que los estudios existentes hasta la fecha sobre la expresión tumoral de esta proteína habían sido realizados en los tumores primarios. Nuestro estudio demuestra la expresión de esta proteína en los ganglios linfáticos axilares metastásicos de un porcentaje significativo de pacientes con ganglios positivos. Además, dicha expresión tumoral es coincidente en la mayoría de los casos con la de los tumores primarios. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, parece tener más valor pronóstico la expresión de pepsinógeno C en este último compartimento tumoral.

La inmensa mayoría de las investigaciones sobre parámetros de la biología tumoral de los carcinomas de mama se han centrado en la expresión de esos factores en los tumores y, en general, se asume que el comportamiento de esos parámetros es similar en las metástasis ganglionares linfáticas regionales o a distancia. Sin embargo, esa hipótesis no ha sido probada en la mayoría de los casos, incluyendo la proteí-

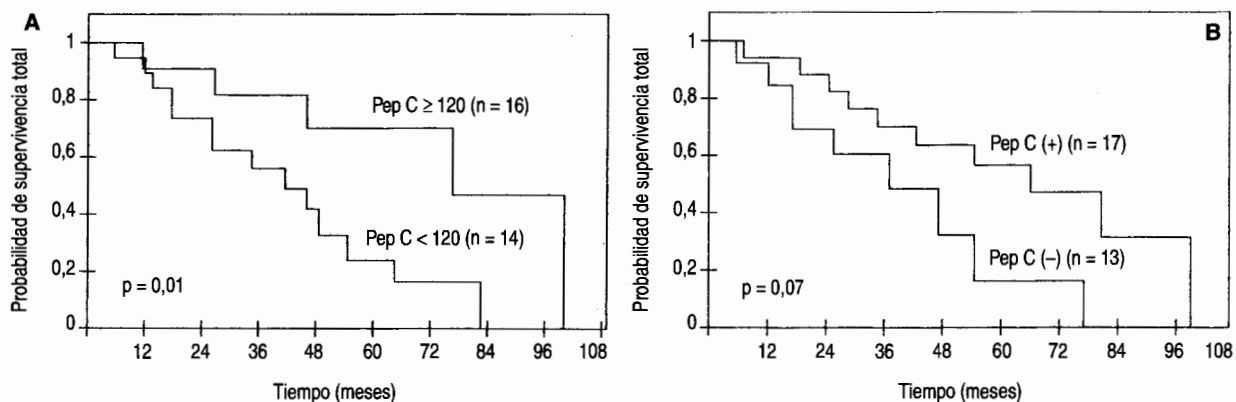


Fig. 3. Supervivencia total en función de los valores de pepsinógeno C en los tumores primarios de mama (A) y en los ganglios metastásicos (B).

na de nuestro estudio, que se expresa por un porcentaje significativo de carcinomas mamarios primarios y tiene importancia pronóstica.¹⁵ En este sentido nuestros resultados sobre la expresión de pepsinógeno C en los tumores primarios confirman observaciones previas de nuestro grupo acerca de la producción de esa proteína por un porcentaje significativo de carcinomas de mama.¹⁵ Además también de acuerdo a esos estudios previos observamos la existencia de una amplia variabilidad individual de los valores de tinción inmunohistoquímica (HSCORE) en los tumores primarios positivos para el pepsinógeno C.

El análisis inmunohistoquímico también nos ha permitido una evaluación morfológica de la expresión tumoral del pepsinógeno C en los ganglios linfáticos metastásicos. Así pudimos comprobar cómo a diferencia del tumor primario, donde en la mayoría de los casos existió una heterogeneidad intratumoral en cuanto a la expresión de la proteína, la tinción inmunohistoquímica fue uniforme y homogénea en todos los casos de ganglios metastásicos. Ello sugiere que los clones de células del tumor primario que colonizan los ganglios linfáticos regionales muestran un mismo fenotipo en cuanto a la producción de esta proteína.

En referencia a la relación entre la expresión de la proteína por el tumor primario y las metástasis ganglionares, nuestros resultados demuestran que el hallazgo más común es el de la producción simultánea de la proteína en esos dos compartimentos tumorales, que ocurrió en el 86,6% de los casos. Además, el valor medio de la expresión de pepsinógeno C en los tumores primarios fue significativamente más elevada en los casos de ganglios metastásicos pepsinógeno C-positivos en relación con los tumores primarios de pacientes con ganglios negativos para la proteína. Así pues, nuestros resultados están en la línea de otros estudios que demuestran una relación positiva entre el tumor primario y las metástasis de diversos parámetros de la biología tumoral del cáncer de mama, como son el contenido de DNA e índices de proliferación celular,^{24, 25} oncógenes,^{3, 9} receptores de estrógenos²⁶ y de progesterona.²⁵

Sin embargo, también pudimos comprobar en nuestro estudio que en un 13,3% de casos existió una absoluta discordancia de la expresión de pepsinógeno C entre el tumor primario y sus metástasis ganglionares. Además pudimos observar dos situaciones diferentes de esa discordancia. Por una parte, la pérdida absoluta de la expresión de esa proteína

en las metástasis ganglionares cuando el tumor primario mostraba la producción de la misma. Y por otra, la ganancia de la peculiaridad biológica de expresar esa proteína en las metástasis ganglionares cuando el tumor primario no mostraba capacidad de producirla. Así pues, ello resulta indicativo de la complejidad del proceso de la progresión maligna del cáncer de mama, a través del cual las células cancerosas pueden perder o bien adquirir nuevas capacidades funcionales.

Nuestros resultados también están de acuerdo con estudios previos de nuestro grupo que demuestran que la expresión de pepsinógeno C por los tumores primarios está asociada con un pronóstico favorable de la enfermedad.¹⁵ El mecanismo por el cual la expresión de pepsinógeno C por los tumores primarios de mama están asociados a una menor agresividad tumoral parece estar en relación con una mayor diferenciación morfológica de los tumores positivos para la proteína,¹⁵ pero también pueden estar en relación con la hipótesis de que la expresión tumoral de esta proteína puede resultar indicativa de tumores que muestran una vía específica de respuesta hormonal. En este sentido existen datos que sugieren una hormonodependencia de los tumores de mama positivos para el pepsinógeno C, ya que se ha demostrado que los andrógenos, así como también los glucocorticoides, estimulan la expresión de pepsinógeno C en células cancerosas de mama en cultivo.¹⁶ Además, una explicación adicional de porqué el pepsinógeno C, al contrario de otras enzimas proteolíticas en patología tumoral, no está asociado a lesiones de evolución desfavorable procede de la observación de que esta enzima es secretada como un precursor de alto peso molecular que requiere un pH muy bajo para desempeñar su activación proteolítica.¹⁴ Puesto que esas condiciones ácidas son muy difíciles de alcanzar en el medio extracelular del cáncer mamario, parece muy poco probable que el pepsinógeno C presente actividad proteolítica funcional en el cáncer de mama y, por tanto, facilite la expansión tumoral.

Sin embargo, nuestros resultados también demuestran que la expresión de pepsinógeno C por los ganglios axilares metastásicos no alcanza significación estadística como factor pronóstico. Ese hallazgo sugiere también la importancia de las peculiaridades biológicas del tumor primario más que las de las metástasis ganglionares regionales en la evolución de la enfermedad. Pero serán necesarios estudios futuros

para confirmar los resultados de este trabajo, así como para valorar el posible significado biológico y clínico de la expresión del pepsinógeno C en el ámbito de la progresión tumoral en metástasis a distancia y recurrencias locales del cáncer de mama.

RESUMEN

En este estudio analizamos en los tumores primarios y en ganglios axilares metastásicos de 30 mujeres con cáncer de mama, mediante análisis inmunohistoquímico, la expresión tumoral del pepsinógeno C, una proteína normalmente expresada por la mucosa gástrica. De los tumores mamarios primarios, 16 (53,3%) mostraron una tinción inmunohistoquímica positiva para el pepsinógeno C, mientras que 17 (56,6%) lo hicieron en sus ganglios linfáticos tumorales. Además existió una relación significativamente positiva entre la expresión tumoral de pepsinógeno C en los tumores primarios y los ganglios metastásicos ($p < 0,002$). Sin embargo, sólo la expresión tumoral de esa proteína en los tumores primarios alcanzó significación estadística ($p < 0,05$) como factor pronóstico de evolución favorable para predecir la supervivencia de las pacientes.

REFERENCIAS

1. Feichter GE, Kaufmann M, Müller A, Haag D, Eckhardt R, Goerttler K. DNA index and cell cycle analysis of primary breast cancer and synchronous axillary lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 1989;13:17-22.
2. Daidone MG, Silvestrini R, Valentinis B, Persici P, Mezzanotte G, Squicciarini P, et al. Proliferative activity of primary breast cancer and of synchronous lymph node metastases evaluated by 3H-thymidine labelling index. *Cell Tissue Kinet* 1990;23:401-8.
3. Tommasi S, Giannella C, Paradiso A, Barletta A, Mangia A, Simone G, et al. HER-2/neu gene in primary and local metastatic axillary lymph nodes in human breast tumors. *Int J Biol Markers* 1992;7:107-13.
4. Chang DB, Yang PC, Chang KJ, Luh KT, Kuo SH. Comparison of DNA stemline and cell kinetics between primary breast cancer and its lymph node metastasis. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:32-8.
5. Goodson W, Ljung BM, Moore D, Mayall B, Waldman FM, Chew K, et al. Tumor labeling indices of primary breast cancers and their regional lymph node metastases. *Cancer* 1993;71:3914-9.
6. Andersen J, Poulsen HS. Relationship between estrogen receptor status in the primary tumor and its regional and distant metastases. An immunohistochemical study in human breast cancer. *Acta Oncol* 1988;27:761-5.
7. Agthoven T van, Timmermans M, Dorssers LCJ, Hensen-Logmans SC. Expression of estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptors in primary and metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 1995;63:790-3.
8. Umekita Y, Sagara Y, Yoshida H. Estrogen receptor mutations and changes in estrogen receptor and progesterone receptor protein expression in metastatic or recurrent breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:27-32.
9. Moffett BF, Baban D, Bao L, Tarin D. Fate of clonal lineages during neoplasia and metastasis studied with an incorporated genetic marker. *Cancer Res* 1992;52:1737-43.
10. Mori T, Morimoto T, Komaki K, Monden Y. Comparison of estrogen receptor and epidermal growth factor receptor content of primary and involved nodes in human breast cancer. *Cancer* 1991;68:532-7.
11. Storm FK, Mahvi DM, Gilchrist KW. Heat shock protein 27 overexpression in breast cancer lymph node metastasis. *Ann Surg Oncol* 1996;3:570-3.
12. Nishizaki T, De Vries S, Chew K, Goodson III WH, Ljung BM, Thor A, et al. Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1997;19:267-72.
13. Samloff IM. Peptic ulcer: the many proteinases of aggression. *Gastroenterology* 1989;96:586-95.
14. Sánchez LM, Freije JMP, Merino AM, Vizoso F, Foltmann B, López-Otín C. Isolation and characterization of a pepsin C zymogen produced by human breast tissues. *J Biol Chem* 1992;267:24725-31.
15. Vizoso F, Sánchez LM, Díez-Itza I, Merino AM, López-Otín C. Pepsinogen C is a new prognostic marker in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:54-61.
16. Balbín M, López-Otín C. Hormonal regulation of the human pepsinogen C gene in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996;271:1575-81.
17. Haagensen DE, Stewart P, Dille WG, Wells SA. Secretion of breast gross cystic disease fluid proteins by T47D breast cancer cells in culture-modulation by steroid hormones. *Breast Cancer Res Treat* 1992;23:77-86.
18. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;11:359-77.
19. Foltmann B, Jensen AL. Human progastricsin. Analysis of intermediates during activation into gastricsin and determination of the amino acid sequence of the propeptide. *Eur J Biochem* 1982;128:63-70.
20. Vaitukaitis JL. Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. *Methods Enzymol* 1981;73:46-52.
21. McCarty KS Jr, Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res* 1986;46:4244-8.
22. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
23. Mantel N, Myers M. Problems of convergence of maximum likelihood iterative procedures in multiparameter situations. *J Am Stat Assoc* 1971;66:484-91.
24. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989;320:627-33.
25. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A. Indicators of prognosis in node negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322:1045-53.
26. Hartveit F, Maartmann-Moe H, Stoa KF, Tangen M, Thorsen T. Early recurrence in estrogen receptor negative breast carcinomas. A preliminary report. *Acta Chir Scand* 1980;146:93-5.