

J. J. Sirvent\*, \*\*,  
A. Fortuño\*\*,  
A. Ortí\*\*\*,  
M. Olona\*, \*\*,  
S. Razquin\*, \*\*,  
A. Raventós\*, \*\*

# Valor pronóstico de los receptores hormonales, índice de proliferación celular (Ki-67) y factores clinicopatológicos en el carcinoma ductal infiltrante de mama. Estudio inmunohistoquímico de 192 pacientes

## Prognostic value of hormonal receptors, cell proliferation index (Ki-67) and clinicopathologic factors of invasive ductal carcinoma of the breast. An immunohistochemical study of 192 patients

### SUMMARY

**Objective.** *To evaluate the relationship between clinical, histological and immunohistochemical prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast.*

**Methods.** *Invasive ductal carcinoma from 192 patients were examined for clinical and histological variables, hormonal receptors and cell proliferation index (Ki-67). The estrogen and progesterone receptors were assessed according to the intensity of staining (I), with values from 0 to 3, and the percentage of positive cells (P). A histoscore was calculated by the formula  $(I + 1) \times P$  (range 0-400). Cases with histoscore value of over 100 were considered positive. The cell proliferation fraction (Ki-67) was assessed by counting 500 cells, expressing the number of positive cells as a percentage.*

**Results.** *Positive estrogen receptors stains were found in 64.24% of the tumours, whereas 49.12% were progesterone receptors positive. High cell proliferation index (>25%) was found in 21.87% of patients. The tumour size, number of mitosis, presence of necrosis and lymph node status have been shown independent prognostic factors in our statistical study.*

**Conclusions.** *Hormonal receptors and Ki-67 are not independent prognostic factors for both local recurrence and overall survival in our study. Only histological classical factors have been shown independent prognostic factors.*

### Palabras clave

*Receptores hormonales, Índice de proliferación celular, Ki-67, Cáncer de mama.*

### Key words

*Hormonal receptors, Cell proliferation index, Ki-67, Breast cancer.*

\* Hospital Universitario Joan XXIII. Tarragona.  
\*\* Facultad de Medicina. Universidad Rovira i Virgili. Reus (Tarragona).  
\*\*\* Hospital Verge de la Cinta. Tortosa (Tarragona).

Correspondencia:  
J. J. Sirvent Calvera.  
Servicio de Anatomía Patológica.  
Hospital Universitari Joan XXIII.  
Dr. Mallafre Guasch, 4.  
43007 Tarragona.  
E-mail: jjsc@fmcs.urv.es

## INTRODUCCIÓN

La determinación de los receptores hormonales (RH) y el índice de proliferación celular (IPC) se venía realizando siguiendo técnicas complejas de difícil aplicación en el trabajo rutinario de los laboratorios de anatomía patológica —carbón recubierto con dextrano (DCC) para los RH y la fracción en fase S con citometría de flujo para la proliferación celular.

Sin embargo, la aparición de los anticuerpos monoclonales (AcM) para los receptores de estrógenos (RE) primero y algunos años después para los receptores de progesterona (RP) permitieron la realización de técnicas inmunohistoquímicas para este tipo de determinaciones, si bien era preciso la utilización de tejido congelado, con buena correlación entre las técnicas inmunohistoquímicas y los métodos bioquímicos.<sup>1</sup>

El uso de enzimas hizo posible, aunque con mayor dificultad, la demostración de los RH en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina utilizando los mismos AcM.<sup>2-4</sup>

Con posterioridad han aparecido nuevas clonas de RH que han permitido, de una forma fiable, obtener buenos resultados en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina mediante el desensamblamiento antigénico por medio del calor (microondas, olla a presión, autoclave, esterilizador de biberones, etc.) y las preparaciones sumergidas en *buffer* citrato a pH 6 o pH 7,2.<sup>5</sup>

Una evolución similar ha sufrido la determinación del IPC. En un principio este tipo de estudios se determinaba por la fase S en citometría de flujo. La obtención de AcM para el Ki-67, proteína presente en todos los núcleos de las células que no están en fase de reposo (G<sub>0</sub>),<sup>6-8</sup> hizo posible el estudio en secciones de tejido, con buena correlación con la fase S.<sup>9,10</sup> Inicialmente también se hacía necesario el tejido congelado; sin embargo, ya es posible su realización en secciones de parafina con la única salvedad de un tratamiento más intenso de calor y una incubación más larga.

Hoy día este tipo de estudios se utilizan de manera rutinaria en un laboratorio de anatomía patológica mínimamente dotado, incluyendo los resultados en los informes anatomopatológicos que sirven de ayuda al oncólogo clínico.

El motivo del presente trabajo es estudiar la posible significación pronóstica de los RH y el IPC por determinaciones inmunohistoquímicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado un total de 192 casos de carcinoma ductal infiltrante de mama (Hospital Virgen de la Cinta de Tortosa) de los años 1981 a 1992.

La pieza de tumorectomía era recibida en fresco en el laboratorio, envuelta en una gasa humedecida en suero fisiológico para confirmación histológica. Posteriormente una pequeña parte se congelaba en nitrógeno líquido y el resto era fijada en formol tamponado al 10% hasta un máximo de 18 horas.

El estudio clínico incluía edad de las pacientes, estado menstrual, tratamiento administrado, presencia de recidiva local o a distancia y muerte del paciente. Estos datos fueron obtenidos de la historia clínica y del Registro del Cáncer de la provincia de Tarragona.

### Características histopatológicas

Fueron estudiadas en secciones teñidas en hematoxilina-eosina. El grado histológico se determinó siguiendo los criterios establecidos por Bloom y Richardson,<sup>11</sup> modificados por Elston<sup>12</sup> y el tipo histológico siguiendo la clasificación de la OMS.<sup>13</sup>

Se tuvo en cuenta también el tamaño del tumor (en mm), la existencia de necrosis (valorada como positiva si existía necrosis en un 10% o más del componente infiltrante del tumor) y la presencia y número de ganglios linfáticos metastásicos.

### Estudio inmunohistoquímico

Los RH se han determinado en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina, previo tratamiento en *buffer* citrato a pH 6 en microondas a 700 W, durante 10 minutos, después de la desparafinización. Como AcM se ha utilizado el de la casa Biomeda a una dilución de 1:20 para los RE (Clona B30.1) y a 1:40 para los RP (Clona B31.1) y completado con un método ABC (Vector, EE. UU.). Se obtenía un histoscore por la valoración de la intensidad de la tinción (I) (0-3) y el número de células positivas expresado en porcentaje (P), según la fórmula  $(I + 1) \times P$ , con un rango de 0-400. Consideramos un caso positivo a partir de 100.

En cuanto al Ki-67, se ha utilizado el anticuerpo policlonal AO47 (Dako, Dinamarca), también en sec-

ciones de parafina, con el mismo desenmascaramiento, aunque durante 15 minutos y a una dilución 1:50, expresando en porcentaje el número de células positivas en 500 células.

### Análisis estadístico

- *Análisis descriptivo.* La media, desviación estándar (DE) y los valores máximo y mínimo se utilizaron para variables cuantitativas. Las variables categóricas se describieron en términos de frecuencia relativa y absoluta.
- *Análisis de supervivencia.* Las curvas de supervivencia se calcularon para la recidiva y muerte usando el método de Kaplan-Meier.
- *Análisis de factor predictivo.* Recidiva y muerte se utilizaron como variables independientes.
- *Análisis bivariable.* El análisis de riesgo proporcional de Cox se utilizó para calcular el riesgo relativo (RR) de las diferentes variables predictivas. El intervalo de confianza del 95% (IC95%) se calculó para cada RR. También se ha utilizado el test de Chi cuadrado para el estudio de variables categóricas o cualitativas y el análisis de la varianza para la correlación entre variables numéricas y categóricas.
- *Análisis multivariable.* El análisis de riesgo proporcional de Cox se usó para evaluar las variables predictivas independientes después de ser ajustadas. Los resultados se dan como RR con un 95% de IC.

La significación estadística se estableció para  $p < 0,05$ .

El estudio estadístico se realizó con el programa de BMDP.<sup>14</sup>

## RESULTADOS

### Hallazgos clínicos e histopatológicos

Las características clínicas e histopatológicas de las pacientes se describen en la tabla 1. La edad media en el momento del diagnóstico fue de 60 años (DE: 12,9; rango: 27-90). El estado menstrual se conocía en 179 pacientes, de las que el 84,9% eran postmenopáusicas (12 o más meses desde la última menstruación).

### Estudio inmunohistoquímico

La positividad tanto para los RH como para el Ki-67 se observaba en el núcleo de las células (Figs. 1, 2, 3 y 4).

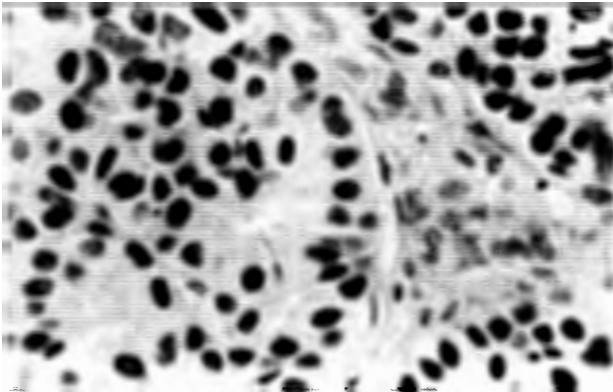
En la tabla 1 se encuentra el análisis descriptivo, con expresión de los casos positivos tanto para los

TABLA 1  
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS  
E INMUNOHISTOQUÍMICAS

---

<i>Edad</i>	
— < 50:	39.
— 50-69:	98
— ≥ 70:	55
<i>Menopausia</i>	
— Sí:	152.
— No:	27.
— No se conoce:	13.
<i>Mitosis</i>	
— Baja:	110.
— Moderada:	56
— Alta:	26
<i>Tamaño tumoral</i>	
— ≤ 20:	72.
— 21-50:	88.
— > 50:	15.
— No se conoce:	17.
<i>Diferenciación tumoral</i>	
— I:	90.
— II:	73.
— III:	29.
<i>Necrosis</i>	
— Ausencia:	129.
— Presencia:	57.
— No se conoce:	6.
<i>Adenopatías</i>	
— 0:	72.
— 1-3:	49.
— > 3:	36.
— No se conoce:	35.
<i>Receptores de estrógenos</i>	
— Positivos:	115
— Negativos:	64.
— No se conoce:	13.
<i>Receptores de progesterona</i>	
— Positivos:	84.
— Negativos:	87.
— No se conoce:	21.
<i>Ki-67</i>	
— ≤ 15:	118.
— 16-25:	32.
— > 25:	42.

---



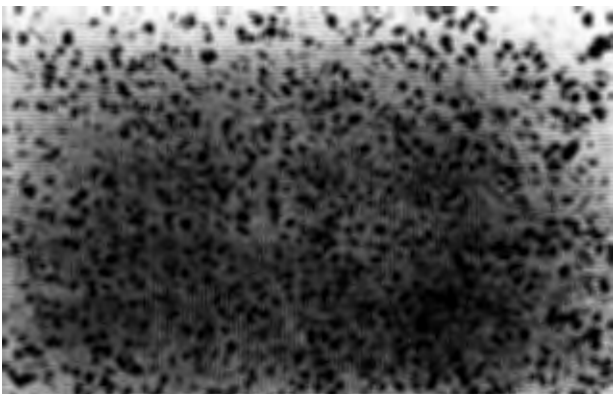
**Fig. 1.** Receptores de estrógenos. Intensa positividad nuclear en el 50% de las células (valor 3) (ABC, 400x).

RE (64,24%) como para los RP (49,12%), considerando los casos positivos aquellos con histoscore superior a 100. La distribución de los casos para el Ki-67 se ha llevado a cabo en tres grupos, dependiendo de si eran menores o igual a 15, que corresponderían a valores bajos (61,45%); entre 16 y 25, que serían valores medios (16,66%), y aquellos casos con valores superiores a 25 o IPC altos (21,87%).

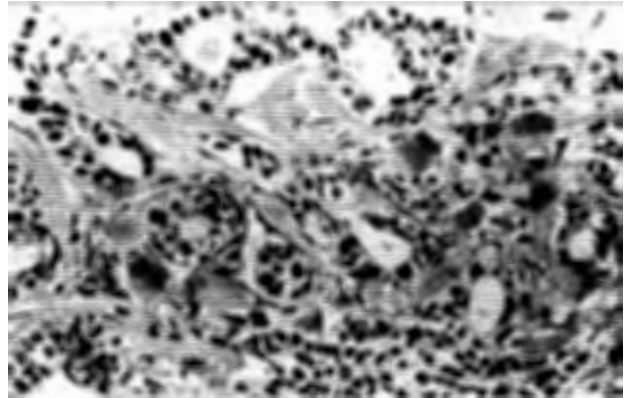
### Seguimiento clínico

El seguimiento medio de las pacientes fue de 72,4 meses (DE: 48; rango: 0,2-186). En este tiempo se produjeron 55 fallecimientos por el cáncer de mama y 16 pacientes que murieron por otras causas.

Las curvas de recidiva y supervivencia según los subgrupos de Ki-67 se muestran en las figuras 5 y 6.



**Fig. 2.** Receptores de progesterona. Positividad intensa (valor 3) en la práctica totalidad de las células (ABC, 100x).

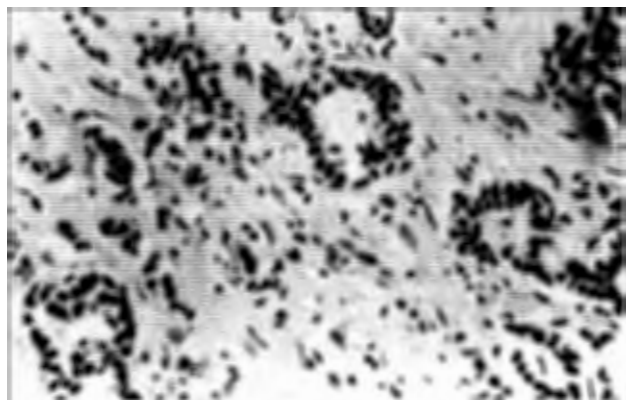


**Fig. 3.** Ki-67. Tumor con un IPC bajo (8%) (ABC, 250x).

Las figuras 7 y 8 corresponden a las curvas de recidiva y supervivencia de las pacientes con ganglios negativos y ganglios positivos.

En el estudio bivariable el número de mitosis se ha relacionado de forma significativa tanto con los RH como con el Ki-67. También se han observado diferencias entre los RE y la presencia de necrosis, así como entre el tamaño tumoral y el Ki-67 (tabla 2). Al estudiar el grado de positividad del Ki-67 de forma cuantitativa también existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias correspondientes a la presencia/ausencia de necrosis, además del tamaño tumoral y del número de mitosis (tabla 3).

Los resultados del análisis bivariable de riesgos proporcionales de Cox se expresan en la tabla 4; en ella puede observarse la significación estadística, en cuanto a la recidiva, del número de mitosis,



**Fig. 4.** Ki-67. Tumor que muestra IPC alto (43%) (ABC, 250x).

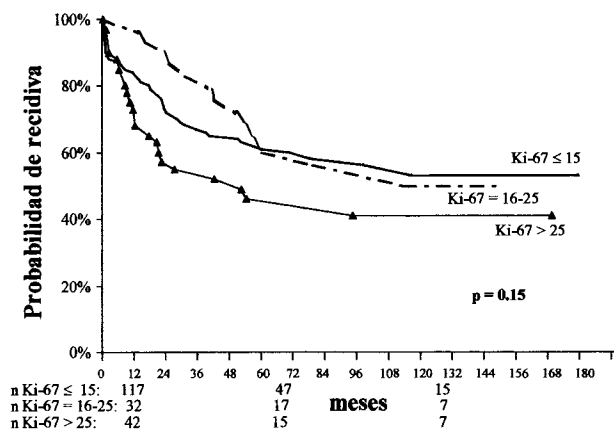


Fig. 5. Curva de recidiva en una población de 192 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama según los subgrupos de Ki-67.

el tamaño tumoral, la necrosis en el componente infiltrante del tumor y la presencia de ganglios linfáticos metastásicos. Para la supervivencia global existe significación estadística del grado de diferenciación, el tamaño tumoral, la necrosis, la presencia de ganglios linfáticos metastásicos y el Ki-67 ( $\leq 15$ , 16-25 y  $> 25$ ). No se observó significación para los RH.

En la tabla 5 se expresan los resultados del análisis multivariable. Puede apreciarse que el número de mitosis y la presencia de ganglios linfáticos son los únicos factores pronósticos independientes para la recidiva, mientras que para la supervivencia global son factores pronósticos independientes el tamaño

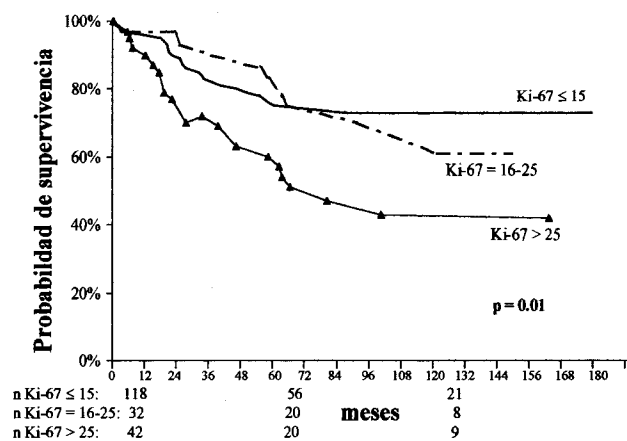


Fig. 6. Curva de supervivencia en una población de 192 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama según los subgrupos de Ki-67.

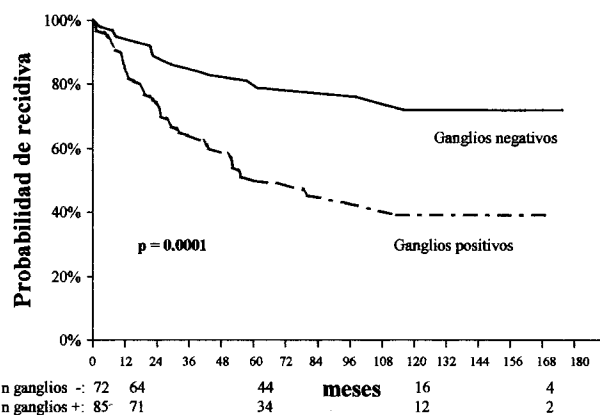


Fig. 7. Curva de recidiva en una población de 192 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama según los subgrupos de ganglios positivos y negativos.

tumoral, la necrosis y la presencia de ganglios linfáticos metastásicos. Sin embargo, no obtuvimos significación estadística ni para los RH ni para el Ki-67.

## DISCUSIÓN

En nuestro trabajo aparecen factores con significación estadística, ya clásicos en la literatura, como pueden ser el tamaño tumoral y la presencia de ganglios linfáticos para la supervivencia global y los ganglios linfáticos metastásicos en el caso de la recidiva. Estos factores pueden encontrarse referidos en la literatura con cierta frecuencia, incluso recientemente.<sup>15, 16</sup> Menos estudiado ha sido el encontrar o no necrosis

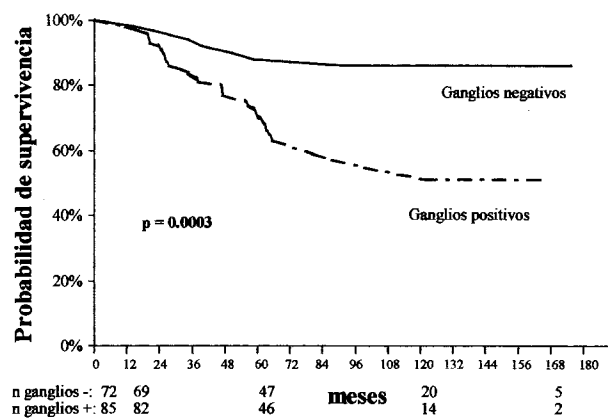


Fig. 8. Curva de supervivencia en una población de 192 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama y ganglios positivos y negativos.

TABLA 2  
ASOCIACIÓN DE PARÁMETROS CATEGORIZANDO RECEPTORES Y KI-67

	Receptores estrógenos			Receptores progesterona			Ki-67			
	+	-	p	+	-	p	≤ 15	16-25	> 25	p
<b>Mitosis</b>			0,003			0,0002				0,002
— Bajo .....	75	28		58	39		79	16	15	
— Moderado ..	30	21		23	26		28	13	14	
— Alto .....	9	15		3	21		10	3	11	
<b>Tamaño tumoral</b>			NS			NS				0,02
— ≤ 20 .....	46	23		35	28		52	11	9	
— 21-50 .....	51	32		36	45		47	15	26	
— > 50 .....	9	5		5	8		9	5	1	
<b>Ganglios</b>			NS			NS				NS
— Sí .....	46	19		30	32		45	13	14	
— No .....	51	33		39	41		51	16	18	
<b>Necrosis</b>			0,03			NS				NS
— Presencia ..	103	51		74	72		103	28	32	
— Ausencia ...	9	12		8	13		13	4	6	

NS: no significativo.

en el componente infiltrante del tumor y, sin embargo, es una de las características más fáciles de determinar y que parece tener mayor significación en la supervivencia global de las pacientes.<sup>17</sup>

TABLA 3  
COMPARACIÓN DE KI-67 UTILIZANDO MEDIAS, DESVIACIÓN ESTANDAR (DE) Y ANÁLISIS DE VARIANZA

	KI-67		p
	Media	DE	
<b>Mitosis</b>			
— Bajo .....	11,2	10,9	0,0002
— Moderado .....	17,4	14,8	
— Alto .....	24,5	18,5	
<b>Tamaño tumoral</b>			
— ≤ 20 .....	11,7	10,6	0,03
— 21-50 .....	18,6	17,3	
— > 50 .....	11,9	11,4	
<b>Ganglios</b>			
— Sí .....	15,1	14,4	NS
— No .....	15,8	14,5	
<b>Necrosis</b>			
— Presencia .....	13,7	12,8	0,02
— Ausencia .....	20,1	17,2	

NS: no significativo.

Los RH, fundamentalmente los RE, se han utilizado en el cáncer de mama para la selección de pacientes con estadios avanzados para el tratamiento hormonal, como factor pronóstico y como valoración del tratamiento hormonal coadyuvante. La predicción de la respuesta a un tratamiento hormonal sería el papel más importante de los RH.<sup>18, 19</sup>

A la hora de analizar los resultados de los RH, ni los RE ni los RP tienen significación estadística. En la literatura esto no siempre es así y de hecho los oncólogos utilizan los resultados inmunohistoquímicos de los RH como indicador de pacientes tributarias de tratamiento antihormonal y en estudios inmunohistoquímicos al menos los RE parecen relacionar-

TABLA 4  
RESULTADOS DEL ANÁLISIS BIVARIABLE DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX

Variables	Recidiva RR (CI95%)	Supervivencia RR (CI95%)
Grado de diferenciación (I/II/III) .....	NS	1,43 (1,02-2,01)
Mitosis (baja/moderada/alta) .....	1,37 (1,04-1,82)	NS
Tamaño tumoral (≤ 20/21-50/> 50) ..	1,95 (1,36-2,80)	1,84 (1,21-2,79)
Necrosis (presencia/ausencia) .....	1,32 (1,05-1,67)	1,42 (1,09-1,84)
Ganglios linfáticos (±) .....	1,99 (1,45-2,75)	2,17 (1,45-3,23)
Ki-67 (≤ 15/16-25/> 25) .....	NS	1,52 (1,12-2,05)

NS: no significativo.

TABLA 5  
RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIABLE  
DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX

Variables	Recidiva RR (CI95%)	Supervivencia RR (CI95%)
Mitosis (baja/moderada/alta) .....	2,12 (1,10-4,12)	NS
Tamaño tumoral ( $\leq 20/21-50/> 50$ ) ..	NS	1,84 (1,21-2,79)
Necrosis (presencia/ausencia) .....	NS	1,50 (1,01-2,22)
Ganglios linfáticos ( $\pm$ ) .....	2,01 (1,43-2,82)	2,40 (1,54-3,72)
Receptores estrógenos ( $\pm$ ) .....	0,66 (0,33-1,34)	0,68 (0,27-1,67)
Receptores progesterona ( $\pm$ ) .....	1,04 (0,58-1,86)	0,95 (0,46-2,01)
Ki-67 ( $\leq 15/16-25/> 25$ ) .....	0,85 (0,59-1,22)	0,95 (0,63-1,42)

NS: no significativo.

se con mejor pronóstico.<sup>15, 20</sup> No obstante, la mayoría de autores recomiendan no basar el probable tratamiento de una paciente con ganglios negativos sólo en base a la presencia o ausencia de RH.<sup>19</sup>

En nuestra serie no hemos demostrado la significación pronóstica del IPC utilizando el Ki-67. Solamente muestra un RR mayor para la supervivencia en el estudio bivariable, aunque no aparece como factor pronóstico independiente en el análisis multivariable. En estudios previos<sup>5</sup> e incluso en éste habíamos encontrado una relación inversa entre los RH y el Ki-67, pero esta relación, como vemos, no tiene significación pronóstica, incluso en grupos de pacientes con ganglios negativos.<sup>21</sup> Sin embargo, el IPC podría tener significado de recidiva precoz en aquellos casos con Ki-67 alto.<sup>20, 22</sup> En ocasiones el IPC es el mejor indicador del pronóstico del cáncer de mama, y de hecho la determinación del IPC mejora, en gran manera, la capacidad del clínico para identificar pacientes con riesgo bajo o alto de presentar recidiva y probablemente de necesitar o no tratamiento coadyuvante, al menos en pacientes con ganglios negativos y cifras de proliferación celular menor o mayor del 5-10%,<sup>9, 23, 24</sup> aunque en algunos estudios se ha utilizado para la valoración análisis de imagen.<sup>16</sup> Otros autores, no obstante, encuentran la relación en pacientes con ganglios positivos.<sup>25</sup>

En resumen, en nuestro trabajo aparecen como factores pronósticos independientes aquellos que lo habían sido ya de forma clásica: tamaño tumoral, el número de mitosis en el grado de diferenciación, la necrosis y la existencia de ganglios linfáticos metastásicos. De todas maneras, las determinaciones inmunohistoquímicas para RH y el IPC no han sido significativas. Probablemente la utilización de dife-

rentes AcM y variaciones de la técnica inmunohistoquímica pueden explicar las diferencias que existen en la literatura.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a M. T. Salvadó, M. M. Barberà y R. Risa su magnífico apoyo técnico.

## RESUMEN

**Objetivo.** Valorar la relación entre los factores pronósticos clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos en el carcinoma ductal infiltrante de mama.

**Material y métodos.** Se estudiaron variables clínicas e histológicas, receptores hormonales e índice de proliferación celular (Ki-67) en 192 pacientes con carcinoma ductal infiltrante. Los receptores de estrógenos y progesterona fueron medidos de acuerdo con la intensidad de la tinción (I), con valores comprendidos entre 0 y 3, y el porcentaje de células positivas (P). Se calculó un histoscore para la fórmula  $(I + 1) \times P$  (rango: 0-400). Los casos con un valor de histoscore por encima de 100 fueron considerados positivos. El índice de proliferación celular (Ki-67) fue medido contando 500 células, expresando el número de células positivas en porcentaje.

**Resultados.** En 64,24% de los tumores se encontró tinción positiva para los receptores de estrógenos, mientras que el 49,12% fueron receptores de progesterona positivos. En 21,87% de los pacientes se encontró un índice de proliferación celular alto ( $> 25\%$ ). El tamaño tumoral, el número de mitosis, la presencia de necrosis y el estado ganglionar fueron factores pronósticos independientes en nuestro estudio estadístico.

**Conclusiones.** Los receptores hormonales y el Ki-67 no son factores pronósticos independientes para la recidiva y la supervivencia global en nuestro estudio. Sólo los factores histológicos clásicos se han mostrado como factores pronósticos independientes.

## REFERENCIAS

1. Parl FF, Posey YF. Discrepancies of the biochemical and immunohistochemical estrogen receptor assays in breast cancer. *Hum Pathol* 1988;19:960-6.
2. Andersen J. Determination of estrogen receptors in

- paraffin-embedded tissue. Techniques and the value in breast cancer treatment. *Acta Oncol* 1992;31:611-27.
3. Sirvent JJ, Salvadó MT. Receptores de estrógenos en cáncer de mama. Estudio inmunohistoquímico en material congelado e incluido en parafina. *Clin Invest Gin Obst* 1990;17:180-6.
  4. Sirvent JJ, Salvadó MT, Vidal A, Santacatalina L. Cáncer de mama. Estudio inmunohistoquímico de receptores de progesterona en tejido congelado e incluido en parafina. *Rev Senología y Patol Mam* 1992;5:58-61.
  5. Sirvent JJ, Santafé M, Salvadó MT, Alvaro T, Raventós A, Palacios J. Hormonal receptors, cell proliferation fraction (Ki-67) and c-erbB-2 amplification in breast cancer. Relationship between differentiation degree and axillary lymph node metastases. *Histol Histopathol* 1994;9:563-70.
  6. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;99:32-8.
  7. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wecker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-5.
  8. Schrape S, Jones DB, Wright DH. A comparison of three methods of determination of growth fraction in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 1987;55:283-6.
  9. Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:585-92.
  10. Goodson WH, Moore DH, Ljung BM, Chew K, Florendo C, Mayall B, et al. The functional relationship between *in vivo* bromodeoxyuridine labeling index and Ki-67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;49:155-64.
  11. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;11:359-77.
  12. Elston CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. En: Page DL, Anderson TJ, eds. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1988. p. 300-11.
  13. World Health Organization. *Histological typing of breast tumours. International Histological Classification of Tumours (vol. 2)*. Geneva: World Health Organization; 1981.
  14. Dixon WJ. *BMDP Statistical software (vols. 1 y 2)*. Berkeley: University of California Press; 1991.
  15. Kuenen-Boumeester V, Van der Kwast TH, Claasse CC, Look MP, Liem GS, Klijn JG, et al. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer* 1996;32A:1560-5.
  16. Pietilainen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjänen K. The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:687-92.
  17. Gilchrist KW, Gary R, Fowle B, Tormey DC, Taylor SG. 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;11:1929-35.
  18. Harris J, Morrow M, Norton L. Malignant tumors of the breast. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 1557-607.
  19. Elledge RM, McGuire WL, Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Sem Oncol* 1992;19:244-53.
  20. Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, Von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol* 1997;36:369-74.
  21. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselmann B, Kuhn W, Ulm K, et al. Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer. *Anticancer Res* 1998;18:2187-97.
  22. Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello O, Bonetti A, et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer* 1997;74:433-7.
  23. Rudolph P, Alm P, Heidebrecht HJ, Bolte H, Ratjen V, Baldetorp B, et al. Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:271-8.
  24. Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K, et al. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br J Cancer* 1997;75:1525-33.
  25. Domagala W, Markiewski M, Harezga B, Dukowicz A, Osborn M. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate determined by the MIB-1 antibody in breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin Cancer Res* 1996;2:147-54.