

Lesiones proliferativas intraductales: aspectos inmunohistoquímicos

F. M. Regueira, J. Sola, I. Poveda, C. Pastor, P. Marti, G. Zornoza

Área de Patología Mamaria. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona

RESUMEN

Introducción: la difusión de la mamografía de cribado ha incrementado el diagnóstico de lesiones proliferativas. Dado que algunas lesiones proliferativas aumentan el riesgo de desarrollar un cáncer de mama, se ha incrementado el interés en las mismas. El cáncer de mama es probablemente el resultado de sucesivos cambios genéticos (cada uno con su correlación histológica) en la secuencia hiperplasia ductal atípica (HDA) a carcinoma.

El objetivo de este estudio es analizar la correlación entre las determinaciones inmunohistoquímicas (IHQ) de diferentes marcadores biológicos (receptores hormonales, Ki 67, p53, y c-erbB-2) y el diagnóstico de diferentes lesiones proliferativas ductales.

Material y métodos: se estudian mediante técnicas de IHQ la expresión en tejido mamario de receptores de estrógeno (RE), proliferación celular (Ki67), p53 y c-erbB-2 en 228 pacientes portadoras de: hiperplasia ductal atípica (HDA) en 28 casos, carcinoma intraductal CDIS en 60 casos, carcinoma intraductal con microinfiltración (T1mic) en 40 casos, carcinoma ductal infiltrante con CDIS extenso en 40 casos y CDI puro en 60 casos. Las lesiones benignas fueron clasificadas de acuerdo a los criterios de Page. El carcinoma intraductal se clasificó según su grado histológico (GH) y su patrón nuclear.

Resultados: la expresión de RE fue del 100% en las HDA y decrece hasta el 70% en CDIS y CDI. No se observa expresión de p53 y c-erbB2 en la HDA, pero aumenta con el desarrollo del cáncer de mama, especialmente con la presencia de infiltración. Un alto GH se asoció a tumores con RE-, alto índice de proliferación y sobreexpresión de p53 y c-erbB-2.

Conclusiones: en las etapas iniciales de la secuencia de lesiones proliferativas ductales no se observa expresión de p53 ni c-erbB2. Ambos marcadores se incrementan en el cáncer de mama en relación con el GH. Un alto índice de expresión de RE en las lesiones proliferativas iniciales, especialmente si se asocian a un alto índice de proliferación, podría justificar la utilización de tratamiento antiestrogénico.

Palabras clave: Hiperplasia epitelial atípica. Carcinoma intraductal. Carcinoma microinfiltrante. Carcinoma ductal infiltrante. Marcadores biológicos.

ABSTRACT

Background: breast screening has greatly increased the number of women diagnosed with proliferative breast disease. Recent studies have shown an association between benign breast diseases and subsequent breast cancer, hence have focussed on benign proliferative lesions. Breast cancer is probably the result of a series of genetic events (each with its own histologic correlation and sequence) from atypical ductal hyperplasia (ADH) to carcinoma.

The goal of this study was to determine the diagnostic value of immunohistochemical determinations of biological markers (hormonal receptors, Ki67, p53 and c-erbB-2 expression) in this sequence.

Methods: expression of estrogen receptors (ER), cellular proliferation (Ki67), p53 and c-erbB-2 were examined by immunohistochemistry in samples of breast tissue from 228 patients with varying mammary lesions: ADH (28 cases), ductal carcinoma in situ (60 cases), ductal carcinoma in situ with microinfiltration (40 cases), invasive ductal carcinoma with extensive CDIS (40 cases) and pure invasive ductal carcinoma (60 cases). A paraffin block was selected for immunohistochemical studies. DCIS was classified according to the Page's criteria and histologic grading of invasive carcinoma following criteria given by Scarff-Bloom-Richardson modified by Elston and Ellis.

Results: the ER expression was 100% in ADH but decreases down to 70% in DCIS and DCI. Expression for p53 and c-erbB-2 was not observed in ADH; but appears with the development of breast cancer: was observed in 21.7% in DCIS, 42.5% in DCIS-mic and 41.5% in pureDCI. High histological grade has been associated with estrogen receptor negativity, cellular proliferation, p53 and c-erbB-2 overexpression.

Conclusions: a p53 and c-erb-2 overexpression were not observed in the early stages of the sequence atypical hyperplasia-carcinoma. In the opposite side of the spectrum, both biological markers were increased in breast cancer in close relationship with high histological grade tumours.

Recibido: 23-04-07.

Aceptado: 04-06-07.

Correspondencia: Gerardo Zornoza Celaya. Área de Patología Mamaria. Clínica Universitaria de Navarra. Avda. Pío XII, 36. 31008 Pamplona. e-mail: gzornoza@unav.es

High ER expression detected in proliferative breast disease could justify an antiestrogenic treatment, especially when associated with high cellular proliferation,

Key words: Atypical ductal hyperplasia. Ductal carcinoma in situ. Microinvasion. Invasive ductal carcinoma. Biological markers.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de mama (CM) es la neoplasia femenina más frecuente en los países occidentales. La difusión de la mamografía de cribado está determinando un incremento en la detección no sólo de tumores establecidos, sino también de lesiones proliferativas, algunas de las cuales han sido etiquetadas como de carácter preneoplásico (1-3).

Hay evidencias que apuntan a que algunos CM se desarrollan, tras un largo periodo de tiempo, sobre ciertas lesiones proliferativas ductales preexistentes. Estas alteraciones intraductales se han dividido tradicionalmente (4) en tres grupos: hiperplasia ductal simple, hiperplasia ductal atípica (HDA) y carcinoma ductal *in situ* (CDIS); sin embargo, no en todos los casos se terminará desarrollando un CM. Por otro lado, los criterios morfológicos de diagnóstico diferencial entre algunos de estos subgrupos no están bien definidos. Múltiples estudios utilizando distintas técnicas, han analizado la expresión de diferentes marcadores biológicos en esta posible secuencia de lesiones proliferativas (5-8). Estos estudios de la bibliografía siempre se han realizado sobre formas aisladas de lesión proliferativa, mientras en nuestro estudio se incluyen todas y cada una de las posibles etapas, con una misma metodología.

El propósito de este estudio es la evaluación mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) de algunos marcadores biológicos de uso habitual como el índice de proliferación celular (Ki67), la expresión del receptor estrogénico (RE), de c-erbB-2 y p53, en el espectro de lesiones proliferativas, preinvasivas e invasivas, con el objeto de definir si estas técnicas pueden ayudar a diferenciar las distintas lesiones y predecir su evolución.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudian retrospectivamente 228 lesiones mamarias, correspondientes a 28 HDA, 60 CDIS, 40 CDIS con microinfiltración (T1mic), 40 carcinomas ductales infiltrantes (CDI) con componente de CDIS mayor del 50%, y 60 CDI puros (sin componente intraductal).

Se revisaron los cortes originales para confirmar los diagnósticos, seleccionando los más adecuados para el estudio IHQ; las técnicas de este estudio se resumen en la tabla I. Las lesiones proliferativas benignas se clasificaron siguiendo los criterios de Page (2), y los carcinomas según la clasificación de la WHO (9). Para la clasificación de los CDIS se han seguido los criterios de Lagios (10).

Tabla I. Perfil de técnicas de inmunohistoquímicas utilizada en el estudio de la mama

Marcador	Laboratorio	Referencia	Clon	Dilución
Estrógenos	Neomarkers	MS-354	1D5	1/200
Progesterona	Dako	M3569	PGg636	1/600
Ki67	Dako	M7240	MIB-1	1/300
C-erb-B2	Novocastra	NCL-CB11	CB11	1/300
p53	Novocastra	NCL-p53-DO7	DO7	1/1.200
Cadherina E	Zymed	18-0233	4A1C7	1/30

Se consideraron RE positivos aquellas lesiones que mostraron inmunorreactividad nuclear en más del 20% de las células. Se valoró la expresión de p53 como positiva en los casos en que existió tinción nuclear débil (< 10% de las células), o alta (\geq 10% de células); para el c-erbB-2 se han catalogado como positivos aquellos casos en los que la tinción de la membrana citoplasmática fue etiquetada con 3+ (en una escala de 0 a 3+). Para el índice Ki67 se calculó el valor medio en cada grupo, así como el porcentaje de casos con expresión > 15%.

Se analizaron los distintos factores biológicos en cada una de las lesiones proliferativas, de forma independiente y en función del grado nuclear (GN) en los CDIS según criterios de Lagios (2) y del grado histológico (GH) en las formas infiltrantes, siguiendo los criterios de Bloom (11).

Con los valores correspondientes a la expresión, y la media (x) en el índice de Ki67, se realizaron comparaciones entre los distintos parámetros analizados utilizando la t de student: valores con una $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Las características de la serie (edad, tamaño tumoral, estado ganglionar axilar, GN/GH se resumen en la tabla II; en ella se incluye el número de CDIS tipo comedo en cada grupo analizado.

En la tabla III se exponen los valores de expresión de Ki67, p53, c-erbB-2 y RE en cada una de las lesiones analizadas. El Ki67 en sus valores medios, aparece progresivamente creciente desde un 3,4% en la HDA, hasta el 35,5% para el CDI ($p < 0,05$). No se observó expresión de las proteínas p53 y c-erbB-2 en los casos de HDA. El porcentaje de expresión de p53 mostró variaciones desde el 21,7% en el CDIS al 42,5% en el T1mic ($p < 0,05$). Se observó expresión de c-erbB-2 en el 23,3% de los CDIS, aumentando significativamente ($p < 0,05$) cuando se añade infiltración (CDIS-mic, CDI+CDIS), observándose en el 28,3% de los CDI puros. Estas mismas determinaciones se analizaron en el grupo de tumores portadores de CDIS subtipo comedo (Tabla IV), apreciándose una más

Tabla II

	HDA	CDIS	CDIS + mic	CDIS + CIS	CDI
Nº Casos	28	60	40	40	60
Nº "comedos"	-	19	17	17	-
Edad x	55,5	51,1	51,2	48,6	49,5
pT (cm)	-	2,6	2,4	2,0	1,9
pN +	-	0	0	17	28
G. Histológico					
I		17*	3	1	1
II		30*	27	16	32
III		13*	10	23	27

*Grado nuclear.

Tabla III. Estudio inmunohistoquímico

Lesión mamaria	Nº	Ki67 (1)		p53 (2)		erbB2 (3)		RE + (4)	
		x	> 15%	Débil/Alto	3 +	> 20%			
HDA	28	3,4	0%	0	0	0	100%		
CDIS	60	13,5	41,6%	21,7%	23,3%	70%			
CDIS + mic	40	32,6	52,5%	42,5%	37,5%	72,5%			
CDI + CIS	40	34,4	67,5%	41,5%	37,5%	72,5%			
CDI	60	35,5	70%	29,7%	28,3%	70%			

1: media de valores; 2: expresión débil o alta; 3: expresión catalogada como +++;
4: Valor > 20%.

Tabla IV. Tumores con componentes "CDIS comedo"

Lesión mamaria	Nº Comedo	Ki67 (1)	p53 (2)	erbB2 (3)	RE + (4)
CDIS	19	22,8	36,9	42,1	52,7%
CDIS + mic	17	34,6	42,2	47,1	42,2
CDI + CIS	17	48,2	52,8	47,1	52,9

1: media de valores; 2: % con expresión débil o alta; 3: % con expresión de 3+;
4: R. Estrog. > 20%.

alta expresión de p53 y c-erbB-2, un más alto índice de Ki67 y una más baja expresión de RE en comparación con el total de la serie y especialmente con los casos asociados a CDIS tipo no-comedo ($p < 0,05$).

En la tabla V se exponen los índices de expresión de los factores analizados, en función del GN en los CDIS y del GH en los carcinomas infiltrantes. Los valores tanto de Ki67, como de expresión de p53 y c-erbB-2, se muestran progresivamente crecientes en función del grado; por

el contrario, la expresión de RE muestra una correlación inversa. El estudio de los valores de RE mostró correlación con significación estadística ($p < 0,05$) al ser analizado con respecto al índice Ki67 y la expresión de c-erbB-2, pero no con la expresión de p53.

DISCUSIÓN

La difusión de la mamografía de cribado está determinando un aumento en la detección de lesiones mamarias proliferativas, premalignas y carcinomas. En la tumorigénesis mamaria se admite una progresión secuencial desde la proliferación intraductal benigna al CDIS, y finalmente al CDI (12,13). Parece claro que existen ciertas lesiones mamarias que predisponen al futuro desarrollo de un CM no invasivo o invasivo (1,14,15), aunque no todos los CDI seguirán esta secuencia. No obstante persiste una cierta confusión en la definición de estas lesiones, generando como recoge Tresserra (16) múltiples clasificaciones que obligan a una unificación de criterios y a la adopción de una misma terminología y de un único modelo de clasificación.

Mediante técnicas de IHQ se han estudiado distintos marcadores biológicos en un intento de esclarecer algunos de los acontecimientos ocurridos en esta secuencia. A la luz de los conocimientos actuales, la expresión de RE, de oncogenes como p53 y HER-2, y la actividad proliferativa, son los marcadores más utilizados como posibles factores predictores del potencial neoplásico de las lesiones proliferativas mamarias.

Los estrógenos con su acción mitogénica, juegan un papel fundamental en la proliferación del epitelio mamario (17,18). Es bien conocido el papel que la expresión de los receptores hormonales, especialmente de RE, tienen sobre el crecimiento del CM, pero está peor estudiado este aspecto durante las etapas de proliferación premaligna y maligna preinvasiva.

Los cambios genéticos en la carcinogénesis parecen ser una combinación entre la activación de algunos oncogenes y la pérdida de genes supresores. El gen supresor p53 puede tener un importante papel en la evolución de las lesiones premalignas. Su mutación contribuye al desa-

Tabla V

Estudio	CDIS* 60 casos				CDIS mic 40 casos				CDI + CDIS 40 casos				CDI 60 casos				Total 200 casos			
	Ki67	p53	erbB	RE	Ki67	p53	erbB	RE	Ki67	p53	erbB	RE	Ki67	p53	erbB	RE	Ki67	p53	erbB	R
G.H.-I (22 casos)	4,9	0	0	94,1	6,7	0	0	100	7	0	100	100	6	0	0	100	5,3	0	4,5	95,4
G.H.-II (105 casos)	12,0	23,3	26,7	70	15,4	40,7	33,3	81,5	16,2	12,5	31,2	87,5	27,9	50	12,5	84,4	18,3	34,3	24,8	80
G.H.-III (73 casos)	28,4	46,1	46,1	38,5	25,5	60	60	40	47,3	52,2	43,5	60,9	45,5	33,3	48,1	40,3	48,1	45,2	47,9	49,3

* Grado nuclear; Ki67: Media de valores; p53: % con expresión débil o alta; c-erbB2: % con expresión de 3+; RE: > 20%.

rollo y progresión de las lesiones a través de una interferencia en la reparación del DNA y tal vez por una detención de la muerte celular. La mutación del p53 es la alteración más frecuente en el CM, observándose en el 15-50% de los CDI (19); sin embargo no está precisado el momento en el que aparece esta alteración en el curso de la carcinogénesis mamaria. La inactivación del gen puede ser detectada por distintas técnicas, existiendo en opinión de Chakravart (20), una buena concordancia entre su expresión detectada por IHQ y el análisis del DNA, si bien la detección del p53 por IHQ no es necesariamente un indicador de su mutación, pudiéndose observar tinciones ligeras por incremento de la proteína normal en algunos casos de HDA e incluso en el epitelio mamario normal que rodea a un carcinoma, tal vez como respuesta fisiológica a alguna otra alteración molecular en el ciclo celular (19). La alteración del c-erbB2 está relacionada con un incremento de la proliferación, un peor pronóstico clínico y una alteración en la respuesta a ciertas terapéuticas (21,22), y se ha descrito su posible papel favorecedor de la motilidad celular (21), facilitando la invasión y la metástasis. La identificación de una posible alteración de este gen se ha realizado (23,24) mediante técnicas de IHQ, PCR, y FISH, demostrándose una concordancia aceptable entre ellas.

La HDA se caracteriza por una proliferación de células epiteliales dentro del conducto mamario generalmente con más de tres capas, que presentan algunas, pero no todas, las características morfológicas del CDIS (4). Esta imprecisión en la definición determina una cierta dificultad para el diagnóstico diferencial, especialmente entre la HDA y algunas formas de CDIS de bajo grado (25,26). La distinción entre ambas es importante, pues mientras la HDA es únicamente una lesión de riesgo y no precisa un tratamiento especial, el CDIS puede ser un precursor directo del CDI, y como tal debe ser tratado (27). Por otro lado, el CDIS no es una enfermedad única, sino un grupo heterogéneo de lesiones con evolución dispar.

Hemos encontrado positividad para los RE en el 100% de las HDA, porcentaje de expresión que disminuye en el CDIS y en CDI. Allred (28) observa también una correlación inversa desde la lesión proliferativa benigna al CDI. Shaaban (26) señala que esta alta expresión de RE en las lesiones proliferativas benignas puede determinar un alto riesgo de malignización si se presenta asociado a un más alto índice de proliferación (en nuestra serie todas las HDA mostraron un índice de Ki67 < 5%). Por otro lado Fuqua (29) encontró una mutación del gen RE en el 30% de las lesiones hiperplásicas mamarias, mutación que determina un incremento de la respuesta funcional ante los estrógenos. Todos ellos son hallazgos que pueden justificar en empleo en estos casos de un tratamiento antiestrogénico (20,30).

En nuestro estudio, la expresión de RE en el CDIS fue significativamente inferior en el grupo de los CDIS comedo, no observándose diferencias entre los CDIS de bajo grado y la HDA y como ha señalado Baqai (31), confirmamos que la negatividad de los RE muestra una

relación significativa con el alto GN, el Ki67 y la positividad para p53 y c-erbB-2.

Nizze (6) estudia ambos receptores (RE y RP) en tejido normal, proliferaciones benignas y epitelio maligno, observando que la coexistencia de RE - RP+ en el epitelio benigno, definen un grupo de lesiones con bajo riesgo, mientras que la asociación RE+ RP- puede determinar un fenotipo de alto riesgo para la posterior malignización.

El índice de proliferación en el epitelio mamario se ha cifrado en un 2% (32) e inferior al 5% para la HDA (33,34). Hemos observado un Ki67 progresivamente creciente en la HDA, CDIS de bajo y alto grado (3,4, 4,9 y 28,4%), valores similares a los descritos por otros autores (33-35).

Con excepción del síndrome de Li-Fraumeni, no se han encontrado alteraciones del p53 en el epitelio mamario normal. En nuestra serie, como en otras muchas (36-40), no hemos encontrado sobreexpresión del p53 en la HDA, y tampoco en los CDIS de bajo grado; se ha observado en el 21,7% de los CDIS, valor similar al descrito por Polyack (41). Se han publicado estudios (42-44) en los que se describen distintas alteraciones de este gen en la HDA, aunque algunas de ellas procedían de piezas de resección en las que coexistía un CM. Se trataría de una alteración muy precoz en la cadena de carcinogénesis mamaria. La ausencia o bajo índice de expresión en los CDIS de bajo grado, la hacen poco útil en el diagnóstico diferencial con la HDA, pero su presencia en esta lesión, como señala Rohan (45), implicaría un incremento del riesgo de CM.

No se ha descrito sobreexpresión del c-erbB-2 en las células tubulo-lobulillares normales y rara vez en la HDA (24,33,34,46); por el contrario, se ha encontrado en el 10% de los CDIS no comedo y en el 60% de los CDIS comedo (47,48). En nuestro estudio no hemos encontrado expresión en la HDA, y sí en el 26,2% de CDIS (42,1% en los subtipo comedo y ausente en los de bajo GN). Algunos estudios han señalado que la sobreexpresión de la proteína c-erbB-2 ocurre en la transición de HDA a CDIS (23,46,49,50), confirmando que se trata de un evento precoz en la transformación maligna. Su estudio no tiene valor en el diagnóstico diferencial entre la HDA y el CDIS de bajo grado, aunque sí en los otros grados (27), refiriendo Stark (24) que su hallazgo en lesiones proliferativas puede ser un exponente del riesgo de un posterior carcinoma.

Por todo ello, dado que la mayoría de las HDA no desarrollarán un carcinoma, tiene interés valorar aquellas en las que coexistan aspectos como expresión de RE, alto índice de Ki67 o expresión de p53 y c-erbB2, ya que puede ser la primera manifestación de un alto riesgo para el desarrollo de un carcinoma.

La asociación de CDIS con microinfiltración (definida por la AJCC como T1mic), se ha descrito con una incidencia entre el 5 y el 26% de los CDIS (51,52), incidencia que está en íntima relación con la minuciosidad con la que se realice el estudio microscópico; en este sentido se-

ñala Ellis (53), que en la práctica es difícil en un examen rutinario realizar un completo y exhaustivo estudio de todo el espécimen, más si este es extenso.

Hemos observado que la expresión de RE en el CDIS (70%) es muy similar a la observada en el CDIS-mic y en el CDI y significativamente más baja en los CDIS subtipo comedo (52,7%), especialmente para los T1mic, forma tumoral en la que predominan los CDIS comedo. La discordancia en la expresión de RE entre la HDA y el CDIS parece sugerir que el desarrollo neoplásico se va haciendo progresivamente más independiente de las influencias hormonales normales. Como cabía esperar, los valores de Ki67 muestran un incremento progresivo a lo largo de la secuencia de lesiones y es más significativo en aquellos casos en los que coexistía componente de CDIS del subtipo comedo, o los catalogados como de alto grado, cualquiera que sea el subgrupo de tumor analizado.

Se observa una expresión progresivamente creciente de la p53, especialmente alta en aquellos carcinomas en los que coexistió componente intraductal de tipo comedo y/o alto GH. Como en el nuestro, existen estudios sobre el estado del p53 en el CDIS (32,35,38) que confirman su alteración en relación directa con el grado de diferenciación, siendo el índice de sobreexpresión bajo en los CDIS de bajo grado, y significativamente más alto en las lesiones tipo comedo o de alto grado: se trataría de una alteración aparecida en una etapa previa a la infiltración. Mientras Kang (43) advierte de su escasa influencia sobre la progresión invasiva del CM, otros autores (54) han señalado que la presencia de la proteína p53 mutada en el CDIS y en el componente intraductal de un carcinoma infiltrante parece avalar un papel inductor en la carcinogénesis.

No encontramos sobreexpresión de c-erbB2 en las formas de proliferación inicial (HDA y CDIS de bajo grado); pero esta aparece ya en el CDIS de Grado II y es significativamente más alta en el carcinoma infiltrante asociado a componente intraductal (T1mic y CDI con CDIS extenso), especialmente en los que asientan sobre el subtipo comedo, confirmado su distinto patrón de crecimiento y mayor agresividad. De cualquier forma, en opinión de Xu (23) y Latta (55), son necesarias otras alteraciones moleculares para que se inicie la invasión.

En conclusión, la difusión de la mamografía de cribado está determinando un incremento en el diagnóstico de lesiones proliferativas intraductales. En la secuencia desde HDA hasta el CDI se observa una progresiva elevación del índice de proliferación celular, con un descenso en la expresión de RE. Esta alta expresión de RE en los estadios iniciales, especialmente si se asocia a un índice de proliferación elevado, obliga un mayor control y justifica la posible utilización de tratamiento antiestrogénico. En las etapas proliferativas iniciales no se observa expresión de p53 o c-erbB2, no permitiendo que estos parámetros sean valorados para el diagnóstico diferencial. En las etapas de CDIS y CDI, ambos factores se elevan progresivamente en relación con el GH y la aparición de infiltración, sugiriendo un papel inductor de la progresión tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Dupont WD, Paget DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985; 312: 146-51.
- Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast: A long-term follow-up study. *Cancer* 1985; 55: 2698-708.
- Carter CL, Corle DY, Micozzi MS, Schatzkin A, Taylor PR. A prospective study of the development of breast cancer in 16692 women with benign breast disease. *Am J Epidemiol* 1989; 128: 467-77.
- Tavassoli FA, Hoeller H, Rosai J, Holland R, Ellis IO. Intraductal proliferative lesions. In: F. A. Tavassoli. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumors. IARC; 2002
- Leal CB, Schmitt FC, Bento MJ, Maia NC, Lopes CS. Ductal carcinoma in situ of the breast: Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 1995; 75: 2123-31.
- Nizze H, Al-Thobhni AK, Terpe H. Steroid hormone receptor profile of normal, benign and malignant female breast epithelium: An immunohistochemical análisis of 325 biopsies. *Breast J* 1998; 3: 159-64.
- Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP. Oestrogen receptor expression in the normal and the precancerous breast. *J Pathol* 1999; 188: 237-44.
- Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol* 1999; 187: 272-8.
- Green FL, Page DL, Fleming ID. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging Manual. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2002. p. 223-40.
- Lagios MD. Duct carcinoma in situ: Pathology and treatment. *Surg Clin North Am* 1990; 70: 853-71.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-10.
- Jensen RA, Dupont WD, Page DL. Diagnostic criteria and cancer risk of proliferative breast lesions. *J Cell Biochem* 1993; 17: 59-64.
- Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM, Mansel RE. The clinical behaviour of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer* 1997; 80: 1740-5.
- Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* 1990; 65: 518-29.
- Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RV. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: An update of the 1985 consensus statement. *Cancer Committee of the College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 1053-5.
- Tresserra F, Grases PJ, Garrido M. Lesiones hiperplásicas y preinvasivas precursoras del cáncer de mama: Desde la epiteliiosis hasta la neoplasia ductal intraepitelial. *Rev Senología Pat Mam* 2006; 19: 162-4.
- Lippman ME, Dickson RB. Steroids, anti-steroids, growth factor and cancer. Mechanism of normal and malignant breast epithelial growth regulation. *J Steroid Biochem* 1989; 34: 107-21.
- Shekhar MP, Nangia-Marker P, Wolman SR, Tait L, Heppner GH, Visscher DW. Direct action of estrogen on sequence of progression of human preneoplastic breast disease. *Am J Pathol* 1998; 152: 1129-32.
- Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M, Andrulis IL. P53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Nat Cancer Inst* 2001; 93: 700-4.
- Chakravart G, Redkar A, Mitras I. A comparative study of detection of p53 mutations in human breast cancer by flow cytometry, simple-strand conformation polymorphism and genomic sequencing. *Br J Cancer* 1996; 74: 1181-7.
- De Potter CR. The neu-oncogen: More than a prognostic factor? *Human Pathol* 1994; 25: 1264-8.
- Ravdin PM, Chamnes GC. The c-erbB-2 proto-oncogen as a prognostic and predictive marker in breast cancer: A paradigm for the development of the other macromolecular markers-a review. *Gene* 1995; 159: 19-27.
- Xu R, Perle MA, Inghrami G, Chan W, Delgado Y, Feiner H. Amplification of Her-2/neu gene in Her-2/neu-overexpressing and nonexpressing breast carcinomas and their synchronous benign, premalignant and metastatic lesions detected by FISH in archival material. *Mod Pathol* 2002; 15: 116-24.

24. Stark A, Hulka BS, Joens S. HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 267-74.
25. Simmons RM, Osborne MP. The evaluation of high risk and pre-invasive breast lesions and the decision process for follow up and surgical intervention. *Surg Oncol* 1999; 8: 55-65.
26. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 2002; 160:597-604.
27. Masood S, Dee S, Goldstein JD. Immunohistochemical analysis of progesterone receptors in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 59-63.
28. Allred DC, Mogsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocrine-Related cancer* 2001; 8: 47-61.
29. Fuqua SA, Witschke C, Zhang ZX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, et al. A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res* 2000; 60: 4026-9.
30. Fisher B, Costantino JP, Wickerman DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, et al. Tamoxifene for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Nat Cancer Inst* 2005; 97: 1652-62.
31. BaqaiAQAI T, Shousha S. Oestrogen receptor negativity as a marker for high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology* 2003; 42: 440-7.
32. Schmitt FC. Multistep progression from an estrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1995; 31: 2049-52.
33. De Potter CR, Van Daele S, Van De Vijver MJ, Pauwels C, Maertens G, De Boever J, et al. The expression of the neu oncogen product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology* 1989; 15: 351-62.
34. Mohsin SK, Hilsenbeck SG, Allred DC. Estrogen receptors and growth control in premalignant breast disease. *Modern Pathol* 2000; 13: 28 A (Abstract N° 145).
35. Poller DN, Silverstein MJ, Galea M, Locker AP, Elston CW, Bılamay RW, et al. Ductal carcinoma in situ of the breast: A proposal for a new simplified histological classification association between cellular proliferation and c-erbB-2 protein expression. *Modern Pathol* 1994; 7: 257-62.
36. Davidoff AM, Kerms BJ, Pence JC, Marks JR, Iglehart JD. P53 alterations in all stages of breast cancer. *J Surg Oncol* 1991; 48: 260-7.
37. Umekita Y, Tsakasaki T, Yoshida H. Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, non-invasive and invasive mammary carcinoma: An immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1994; 424: 491-4.
38. Chitemerere M, Andersen TI, Hom R, Karlsen F, Borrensen AL, Nesland JM. TP53 alterations, atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treatment* 1996; 41: 103-9.
39. Raja PB, Scott DJ, Perry RH, Griffith CDM. P53 protein expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Breast Cancer Research Treatment* 1997; 42: 283-90.
40. Done SJ, Arneson NC, Ozelik H, Redston M, Andrulis IL. p53 protein accumulation in non-invasive lesions surrounding p53 mutation positive invasive breast cancers. *Breast Can Res Treat* 2001; 65: 111-8.
41. Polyak K. Molecular alterations in ductal carcinoma in situ of the breast. *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 92-6.
42. Kandel SQ, Li H, Oselik H, Rohan T. P53 protein accumulation and mutations in normal and benign breast tissue. *Int J Cancer* 2000; 87: 73-8.
43. Kang JH, Kim SJ, Noh DH, Choe KJ, Lee ES, Kang HS. The timing and characterization of p53 mutations in progression from atypical ductal hyperplasia to invasive lesions in the breast cancer. *J Mol Med* 2001; 79: 648-55.
44. Keohavong P, Gao WM, Mady HH, Kambour-Shakir A, Melhem MF. Analysis of p53 mutations in cells taken from paraffin-embedded tissue sections of ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia of the breast. *Cancer Letters* 2004; 212: 121-30.
45. Rohan TE, Hartwick W, Miller AB, Jandel RA. Immunohistochemical detection of c-erbB-2 and p53 in benign breast disease and breast cancer risk. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90: 1262-9.
46. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factor change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Human Pathol* 1992; 23: 974-9.
47. Berardo MD, O'Connell PO, Allred DC. Biologic characteristics of premalignant and preinvasive breast disease. In: *Hormone-dependent Cancer* (pp 1-23). New York: Eds JR Pasqualini; 1996.
48. Poller DN, Roberts EC, Bel JA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: Relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. *Human Pathol* 1993; 24: 463-8.
49. Liu ET, Thro AD, He M, Effert P, Iglehart D, Frye RA, et al. The HER-2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in-situ carcinomas of the breast. *Oncogene* 1992; 7: 1027-32.
50. Lodato RF, Maguire HC, Greene MI, Weiner DB, Li Volsi VA. Immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 oncogene expression in ductal carcinoma in-situ and atypical ductal hyperplasia of the breast. *Mod Pathol* 1990; 3: 449-54.
51. Silverstein MJ, Lagios MD. Ductal carcinoma in situ with microinvasion. In: Silverstein MJ. *Ductal carcinoma in situ of the breast*. 2nd edition. Baltimore: Lippcott; 2002. p. 534-29.
52. Adamovich TL, Simmons RM. Ductal carcinoma in situ with microinvasion. *Am J Surg* 2003; 186: 112-6.
53. Ellis IO, Tavassoli FA. Microinvasive carcinoma. In: Tavassoli FA. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: IARC; 2003.
54. Harn HJ, Shen KL, Yueh KC, Ho LI, Yu IC, Chiu SC, et al. Apoptosis occurs more frequently in intraductal carcinoma than in infiltrating duct carcinoma of human breast cancer and correlates with altered p53 expression: Detected by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated DUTP-FITC nick and labeling. *Histopathology* 1997; 31: 534-9.
55. Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Mally FP. The role of HER2/neu overexpression in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2002; 15: 1318-25.