

CARACTERISTICAS DE LOS CARCINOMAS DE MAMA RECEPTORES DE ESTROGENOS NEGATIVOS Y RECEPTORES DE PROGESTERONA POSITIVOS DETERMINADOS POR INMUNOHISTOQUIMICA

ALBERTO S. SUNDBLAD, LIDIA CAPRARULO

Hospital Privado de Comunidad, Mar del Plata

Resumen En una serie de 256 carcinomas de mama, 22 (8,5%) expresaron receptores de progesterona (RP) en ausencia de receptores de estrógenos (RE). Estos casos parecen formar un grupo distintivo cuya biología aún no es bien conocida. Para contribuir a un mejor conocimiento de las características de estas neoplasias analizamos su asociación con diversos factores anatómo-patológicos e inmunohistoquímicos comparándolos con el resto de los tumores de la misma serie. Los resultados mostraron que factores favorables como el menor tamaño tumoral, la negatividad del compromiso de los ganglios axilares y los grados nuclear e histológico bajos se asociaron de manera decreciente con los grupos RE⁺ RP⁺, RE⁺ RP⁻, RE⁻ RP⁺, y RE⁻ RP⁻. Con respecto a la relación con características inmunohistoquímicas los tumores RE⁻ RP⁺, RE⁺ RP⁻ y RE⁻ RP⁺ se comportaron de manera similar, mientras que las neoplasias RE⁻ RP⁻ se diferenciaron del resto por la menor expresión de bcl-2 ($p = 0,0000$) y la mayor expresión de p53 ($p = 0,009$) y de MIB-1/Ki-67 ($p = 0,05$). No hubo diferencias significativas entre las cuatro poblaciones en la tasa de recidiva o metástasis ni en la supervivencia global. Se concluye que los tumores RE⁻ RP⁺ tendrían características biológicas intermedias entre los RE⁻ RP⁻ y los RE⁺ RP⁻.

Palabras clave: carcinoma de mama, receptores hormonales, inmunohistoquímica

La presencia de receptores de estrógenos (RE) en los carcinomas de mama se correlaciona con una mejor respuesta a la hormonoterapia¹. Esta acción terapéutica aumenta sus probabilidades de éxito cuando se detecta, además, la presencia de receptores de progesterona (RP)². Para la síntesis de RP se requiere de RE^{3,4} por lo que en teoría no podrían encontrarse tumores con RP sin RE. Sin embargo algunas publicaciones han demostrado la existencia de cierto número de casos con estas características⁵⁻⁹. Los autores de estas series analizaron las diferencias entre las determinaciones inmunohistoquímicas y las bioquímicas y estudiaron algunas características clínico-patológicas de estas neoplasias. En este

trabajo presentamos a 22 pacientes de una serie de 256 con cáncer de mama estadio I y II cuya determinación inmunohistoquímica mostró que eran RE⁻ RP⁺ y analizamos sus características clínico-patológicas poniendo énfasis en su relación con algunos potenciales factores pronósticos, tales como la presencia de antígeno carcinoembrionario¹⁰, del antígeno de proliferación celular Ki-67^{11,12} y de la expresión de los genes c-erbB-2¹³, p53¹⁴⁻¹⁶ y bcl-2¹⁷.

Material y métodos

Entre 1972 y 1984 se diagnosticaron y trataron en el Hospital Privado de Comunidad un total de 414 casos de carcinoma infiltrante de mama. De éstos fueron excluidos para este estudio 66 casos por estar en estadio III o IV, 52 casos por falta de seguimiento o de información clínica necesaria y 46 debido a condiciones inadecuadas del material anatomopatológico para realizar los estudios

Recibido: 7-II-1996

Aceptado: 18-VII-1996

Dirección postal: Dr. Alberto S. Sundblad, Hospital Privado de Comunidad, Córdoba 4545, 7600 Mar del Plata, Argentina

inmunoquímicos requeridos. Quedaron 256 casos que fueron incluidos en este estudio. De ellos, 206 habían sido tratados con mastectomía radical modificada, 38 con tumorectomía y disección axilar y 12 con mastectomía radical (Halsted). Ocho recibieron quimioterapia adyuvante y 193 radioterapia postoperatoria. Para este trabajo se consignaron el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, el tipo histológico, el grado histológico en los ductales y el grado nuclear en los ductales y en los lobulares. Por inmunohistoquímica se determinó la expresión de los genes c-erbB-2, p53 y bcl-2, del antígeno de proliferación Ki-67 mediante el anticuerpo MIB-1 y del antígeno carcinoembrionario (CEA). Se consignaron las recidivas o metástasis y la supervivencia global a los 5 años.

En todos los casos el tejido fue fijado en formol buffer al 10% e incluido en parafina. Para inmunohistoquímica los cortes una vez desparafinados e hidratados fueron colocados en buffer de citrato de pH 6,0 y llevados a un horno de microondas¹⁸ siendo irradiados durante 12 minutos. A continuación se aplicó el anticuerpo primario según las especificaciones indicadas en la Tabla 1 incubándose durante 20 horas a 4° C seguido de anticuerpo secundario biotilado y de complejo avidina-biotina. El revelado se realizó con diaminobenzidina y se contrastó con hematoxilina. Para la evaluación de la inmunorreacción de los RE y RP se consideraron positivos los casos con tinción nuclear en más del 10% de las células neoplásicas. Un criterio similar se utilizó para la positividad de la proteína p53¹⁹. Para la interpretación de MIB-1 se estimaron como positivo los casos con más del 5% de células con núcleos teñidos inequívocamente²⁰. La positividad para bcl-2 y para CEA se evidenció por la coloración citoplasmática franca en la mayoría de las células neoplásicas.

Para el análisis estadístico se utilizó el test del chi cuadrado para tablas de contingencia de 2 x 2 con el fin de identificar la existencia de diferencias significativas en las características clínico-patológicas de las pacientes RE negativas/RP positivas en comparación con las restantes pacientes que sirvieron de grupo control. El análisis se realizó sobre los cuatro grupos formados en

base a los receptores hormonales: RE+ RP+, RE- RP+; RE+ RP- y RE- RP-. En ellos se examinó la incidencia de los factores estudiados y la evolución de la enfermedad.

Resultados

La edad promedio de las pacientes fue de 64,5 años (rango 33-85). Diecinueve pacientes (7,4%) era premenopáusicas y 237 (92,6%) postmenopáusicas. Los tipos histológicos pueden observarse en la Tabla 2. A los fines del análisis estadístico se los agrupó en dos categorías: de histología desfavorable, el ductal y el lobular, y de histología favorable, los restantes. Setenta y siete estaban en estadio I y 179 en estadio II. La determinación de receptores hormonales por inmunohistoquímica mostró que 166 de los 256 (64,8%) casos fueron receptores de estrógenos positivos. De éstos, 102 (39,8% del total) fueron receptores de progesterona positivos y 64 (25,0% del total) negativos. De los 90 (35,1%) casos receptores de estrógenos negativos, 68 (26,5% del total) fueron negativos para receptores de progesterona y 22 positivos. Este último grupo que representa el

TABLA 2.— Tipos histológicos

Tipo	n	%
Ductal	216	84,3
Lobular	16	6,2
Cribiforme	11	4,2
Medular	6	2,3
Mucinoso	3	1,1
Tubular	2	0,7
Papilar	2	0,7

TABLA 1.— Anticuerpos primarios utilizados en este estudio

Anticuerpo	Clon	Origen	Dilución
Receptores de estrógenos	ER1D5	AMAC	1:40
Receptores de progesterona	1A6	Novocastra	1:40
c-erbB-2	Policlonal	Triton	1:30
bcl-2	124	Dako	1:100
p53	DO7	Novocastra	1:100
MIB-1 (Anti-Ki-67)	MIB-1	AMAC	1:50
Anti-CEA	T84,66	H. Battifora	1:800

8,5% de toda la serie es el objeto de nuestro análisis.

La distribución de estos 22 casos de acuerdo al tipo histológico fue la siguiente: ductal 16 casos, lobular 3, cribiforme 2 y tubular 1.

En la Tabla 3 se puede observar que el grupo de pacientes RE⁻ RP⁺ se ubicó por su asociación con factores pronósticos clinicopatológicos entre

los casos RE⁺ RP⁻ y los RE⁻ RP⁻ siendo éstos los que se asociaron con factores menos favorables. En el extremo más favorable quedaron los tumores RE⁺ RP⁺. Con referencia al estado menstrual, se destaca que la incidencia de tumores RE⁻ RP⁺ fue significativamente mayor en las pacientes premenopáusicas (p = 0,04). Cuando se analizó la asociación con los factores estudiados por

TABLA 3.— Relación entre receptores hormonales y características clínico-patológicas

Factor	Total n (%)	RE ⁺ RP ⁺ n (%)	RE ⁺ RP ⁻ n (%)	RE ⁻ RP ⁺ n (%)	RE ⁻ RP ⁻ n (%)
Tamaño tumoral					
Hasta 2 cm	90 (36,0)	44 (43,1)	26 (40,6)	6 (27,3)	14 (20,6)
Más de 2 cm	166 (64,0)	58 (56,9)	38 (59,4)	16 (72,7)	54 (79,4)
Ganglios linfáticos					
Negativos	152 (59,4)	62 (60,8)	35 (54,7)	12 (54,5)	43 (63,2)
Positivos	104 (40,6)	40 (39,2)	29 (45,3)	10 (45,5)	25 (36,8)
Tipo histológico					
Favorable	24 (9,4)	12 (11,8)	6 (9,3)	2 (9,0)	4 (5,9)
Desfavorable	232 (90,6)	90 (88,2)	58 (90,7)	20 (91,0)	64 (94,1)
Estado menstrual					
Premenopáusicas	19 (7,4)	5 (5,0)	4 (6,3)	5 (22,8)*	5 (7,4)*
Postmenopáusicas	237 (92,6)	97 (95,0)	60 (93,7)	17 (77,2)	63 (92,6)
£ Grado histológico					
Bajo (1 y 2)	121 (56,0)	58 (67,4)	30 (55,5)	9 (56,3)	24 (40,0)
Alto (3)	95 (44,0)	28 (32,5)	24 (44,4)	7 (43,7)	36 (60,0)
¥ Grado nuclear					
Bajo (1 y 2)	113 (48,7)	55 (58,5)	31 (53,4)	7 (36,8)	20 (32,7)
Alto (3)	119 (51,3)	39 (41,5)	27 (46,6)	12 (63,2)	41 (67,2)
c-erbB-2					
Negativo	197 (76,9)	78 (76,5)	52 (81,2)	19 (86,4)	48 (70,6)
Positivo	59 (23,1)	24 (23,5)	12 (18,8)	3 (13,6)	20 (29,4)
p53					
Negativo	219 (85,5)	93 (91,2)	59 (92,6)	21 (95,5)	46 (67,3)
Positivo	37 (14,5)	9 (8,8)	5 (7,8)	1 (4,5)**	22(32,4)**
bcl-2					
Negativo	155 (60,5)	42 (41,2)	36 (56,3)	13 (59,1)	64 (94,1)
Positivo	101 (39,5)	60 (58,8)	28 (43,8)	9 (40,9) [#]	4 (5,9) [#]
MIB-1/Ki-67					
Negativo	200 (78,1)	85 (83,3)	52 (81,2)	19 (86,4)	44 (64,7)
Positivo	56 (21,9)	17 (16,7)	12 (18,8)	3(13,6)&	24(35,3)&
CEA					
Negativo	110 (43,0)	36 (35,3)	31 (48,4)	11 (50,0)	32 (47,1)
Positivo	146 (57,0)	66 (64,7)	33 (51,6)	11 (50,0)	36 (52,9)

£ Sólo para los ductales (n = 216)

¥ Sólo para los ductales y los lobulares (n = 232)

* p = 0,04, * p = 0,009, # p = 0,0000, & p = 0,05

inmunohistoquímica se encontró que respecto de la expresión de bcl-2 la diferencia fue decreciendo en los tres primeros grupos hasta llegar a un escalón marcado de expresión entre los tumores RE⁻ RP⁺ y los RE⁻ RP⁻ que fue 9/22 y 4/68 respectivamente ($p = 0,0000$). También entre estos dos grupos hubo diferencias en la expresión de p53 con 1/22 para los RE⁻ RP⁺ y 22/68 para los RE⁻ RP⁻ ($p = 0,009$) y en menor medida para la expresión de Ki-67/MIB-1 ($p = 0,05$). El c-erbB-2

y el CEA no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

En la Tabla 4 se muestran los resultados del análisis de factores asociados a sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida global (SG). De allí surge que el estado de los ganglios linfáticos fue el más significativo ($p = 0,0000$ para ambos) seguido del tamaño del tumor ($p = 0,001$ para SLE y $p = 0,0001$ para SG). La tabla 5 permite ver una tendencia decreciente en los porcentajes de SLE

TABLA 4.— Análisis de factores asociados a sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida global (SG)

Factor	n	SLE		n	SG	
		(%)	p		(%)	p
Tamaño tumoral						
Hasta 2 cm	77/90	(85,6)		87/90	(96,7)	
Más de 2 cm	111/166	(66,9)	0,001	131/166	(78,9)	0,0001
Ganglios linfáticos						
Negativos	130/152	(85,5)		141/152	(92,8)	
Positivos	58/104	(55,8)	0,0000	77/104	(74,0)	0,0000
Tipo histológico						
Favorable	21/24	(87,5)		22/24	(91,6)	
Desfavorable	167/232	(71,9)	0,1	196/232	(84,4)	0,3
Estado menstrual						
Premenopaus.	13/19	(68,4)		15/19	(84,2)	
Postmenopaus.	175/237	(73,8)	0,6	203/237	(85,6)	0,4
Grado histológico						
Bajo (1 y 2)	93/121	(76,8)		109/121	(90,0)	
Alto (3)	63/95	(66,3)	0,06	75/95	(78,9)	0,01
Grado nuclear						
Bajo (1 y 2)	91/113	(80,5)		104/113	(91,0)	
Alto (3)	77/119	(64,7)	0,007	95/119	(79,8)	0,01
c-erbB-2						
Negativos	151/197	(76,6)		175/197	(88,8)	
Positivos	37/59	(62,7)	0,03	43/59	(72,9)	0,002
bcl-2						
Negativos	104/155	(67,1)		125/155	(80,6)	
Positivos	84/101	(83,2)	0,004	93/101	(92,1)	0,01
MIB-1/Ki-67						
Negativos	148/200	(74,0)		174/200	(87,0)	
Positivos	40/56	(71,4)	0,7	44/56	(78,6)	0,1
p53						
Negativos	165/219	(75,3)		190/219	(86,8)	
Positivos	23/37	(62,2)	0,09	28/37	(75,7)	0,07
CEA						
Negativos	91/110	(82,7)		97/110	(88,2)	
Positivos	97/146	(66,4)	0,003	121/146	(84,9)	0,2

TABLA 5.— Relación entre receptores hormonales y sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida global SG

Factor	S L E		S G	
	n	%	n	%
RE ⁺ RP ⁺	79/102	77,5	91/102	89,2
RE ⁺ RP ⁻	49/64	76,6	55/64	85,9
RE ⁻ RP ⁺	16/22	72,7	20/22	90,9
RE ⁻ RP ⁻	44/68	64,7	52/68	76,5

y una distribución más irregular en los de SG pero ambos sin diferencias significativas entre los cuatro grupos.

Discusión

Es aceptado que la síntesis de los receptores de progesterona es regulada por los receptores de estrógenos²¹, sin embargo la existencia de tumores RE⁻ RP⁺ ha sido reconocida por varios autores⁵⁻⁹. En nuestra serie hemos encontrado el 8,5%, porcentaje algo superior a los publicados previamente que varió entre 2 y 6%. En algunos de estos trabajos la determinación fue realizada por métodos bioquímicos^{8,9} mientras que en otros se agregó en forma simultánea el método inmunohistoquímico con el anticuerpo H222 para RE⁵⁻⁷ y PgR-ICA para RP. En la presente serie para el estudio de los RE se utilizó el anticuerpo ER1D5 y el PGR-1A6 para RP, los que por tener distinta sensibilidad y especificidad²² permitiría explicar la diferente proporción de tumores RE⁻ RP⁺. Por otra parte se acepta en la actualidad que el método inmunohistoquímico es tanto o más confiable que los métodos bioquímicos²³.

La frecuencia con que los tumores RE⁻ RP⁺ se asocian con diversas características clínico-patológicas ha hecho que se los pueda considerar un grupo distintivo dentro de los tumores de mama⁷. En nuestra serie encontramos que factores pronósticos favorables como el menor tamaño tumoral, la negatividad de los ganglios linfáticos axilares, el tipo histológico favorable, y los grados histológico y nuclear bajos se asociaron de una manera decreciente en los grupos RE⁻ RP⁺, RE⁻

RP⁻, RE⁻ RP⁺ y RE⁻ RP⁻, en coincidencia con otra serie⁷ en la que se hallaron características similares.

La mayor incidencia de tumores RE⁻ RP⁺ en premenopáusicas coincidiría de manera indirecta con Keshgegian⁷ quien observó este inmunofenotipo en pacientes más jóvenes en comparación con los otros inmunofenotipos de receptores hormonales.

Del análisis de los factores determinados por inmunohistoquímica se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de bcl-2, p53 y Ki-67/MIB-1 entre los tumores RE⁻ RP⁺ y los tumores RE⁻ RP⁻. El gen bcl-2 es probablemente regulado por los receptores de estrógenos²⁴. Fuqua²⁵ encontró en las neoplasias RE⁻ RP⁺ delección del exon 5 en los receptores de estrógenos. Estas formas truncadas de receptores tendrían alteradas su función transcripcional pero mantendrían su capacidad de modular la síntesis de receptores de progesterona. Podría postularse que mantendrían también la regulación de la actividad transcripcional del gen bcl-2, lo que permitiría explicar la mayor expresión de este gen. Con respecto a la asociación entre la presencia de mutación de p53 y ausencia de receptores hormonales, esto ya fue observado por Cattoretti y colab²⁶. A su vez trabajos previos han encontrado una relación inversa entre expresión de p53 y de bcl-2^{16,27}, la que estaría relacionada con la participación del gen p53 en la regulación del mecanismo de apoptosis²⁸. La constatación de mayor actividad proliferativa en tumores RE⁻ RP⁻, que ya fuera referida en otras series^{29,30} se traduce en este caso en una mayor expresión del antígeno Ki-67.

Algunos estudios previos han sugerido el potencial carácter oncogénico de los RE truncados³¹ o una mayor agresividad tumoral en las neoplasias portadoras de estos receptores²⁵. En esta serie, como en otras³²⁻³⁵ los receptores hormonales no tuvieron carácter pronóstico respecto de la evolución de la enfermedad, pero en coincidencia con un trabajo anterior⁷, la presencia de receptores se asoció a varios indicadores de favorable evolución, lo que nos permitiría ubicar a los tumores RE⁻ RP⁺ en una posición intermedia entre los RE⁺ RP⁺ y los RE⁻ RP⁻.

Summary

Immunohistochemical characteristics of mammary carcinomas with estrogen-negative and progesterone-positive receptors

In a series of 256 mammary carcinomas, 22 (8.5%) were positive for progesterone receptors (PR) and negative for estrogen receptors (ER). These cases seem to belong to a distinctive group with a biologic behavior not well understood. In order to contribute to a better understanding of such tumors, their association with different pathologic and immunohistochemical factors were compared with those of the rest of the tumors of the series. The results were that favorable factors such as smaller size, negative axillary lymph nodes and low histologic and nuclear grades were decreasingly associated with tumors that were ER⁺ PR⁺; ER⁺ PR⁻; ER⁻ PR⁺; and ER⁻ PR⁻. In relation to immunohistochemical features, tumors that were ER⁺ PR⁺; ER⁺ PR⁻ and ER⁻ PR⁺ behaved in a similar way, whereas ER⁻ PR⁻ tumors were different from the rest because fewer expressed bcl-2 (p = 0.0000) and had a greater expression for p53 (p = 0.009) and MIB-1/Ki-67 (p = 0.05). No significant differences were found between the four populations in recurrence rate or metastases, nor overall survival. In conclusion, these findings show that tumors that are ER⁻ PR⁺ might have biological characteristics somewhere in between ER⁺ PR⁺ and ER⁻ PR⁻.

Bibliografía

1. Bezwoda WR, Esser JD, Dansey R, Kessel I, Lange M. The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 867-72.
2. Osborne K, Yochmowitz M, Knight W, McGuire W. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2884-8.
3. May FEB, Johnson MD, Wiseman LR, Wakeling AE, Kastner P, Westley BR. Regulation of progesterone receptor mRNA by oestradiol and antioestrogens in breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 1035-41.
4. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987; 51: 941-51.
5. Kiang DT, Kollander R. Breast cancer negative for estrogen receptor but positive for progesterone receptor, a true entity? *J Clin Oncol* 1987; 5: 662-6.
6. Pichon MF, Milgrom E. Oestrogen receptor negative-progesterone receptor positive phenotype in 1,211 breast tumors. *Br J Cancer* 1992; 65: 895-7.

7. Keshgegian AA. Biochemically estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 240-4.
8. Vihko R, Janne O, Kontula K, Syrjala P. Female sex steroid receptor status in primary and metastatic breast carcinoma and its relationship to serum steroid and peptide hormone levels. *Int J Cancer* 1980; 26: 13-21.
9. Sarrif AM, Durant JR. Evidence that estrogen-receptor-negative, progesterone-receptor-positive breast and ovarian carcinomas contain estrogen receptor. *Cancer* 1981; 48: 1215-20.
10. Esteban JM, Felder B, Ahn C, et al. Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer* 1994; 74: 1575-83.
11. Wintzer HO, Zipfel I, Sculte-Mönting J, Hellerich U, von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991; 67: 421-8.
12. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 3926-31.
13. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler D. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994; 74: 381-400.
14. Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, Syrjanen S, Syrjanen K. p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 1993; 55: 51-6.
15. Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 11: 845-54.
16. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993; 24: 469-76.
17. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fonzo G, Rilke F, Veronesi U. The bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499-504.
18. Pellicer EM, Sundblad A. Recuperación de antígenos por horno de microondas. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 129-32.
19. Lohmann D, Rubri Ch, Schmitt M, Graeff H, Hofler H. Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation in breast cancer. Occurrence of false-positives and false-negatives. *Diagn Mol Pathol* 1993; 2: 36-41.
20. Sundblad A, Tamayo R. Expresion de MIB-1/Ki-67 y de bcl-2 en el carcinoma gástrico. *Acta Gastroent Latinoamer* 1995; 25: 67-72.
21. Horwitz KB, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *J Biol Chem* 1978; 253: 2223-8.

22. Pellicer EM, Sundblad A. Evaluation antibodies to estrogen receptors. *Applied Immunohistochem* 1994; 2: 141.
23. Battifora H. Immunocytochemistry of hormone receptors in routinely processed tissues: the new gold standard. *Appl Immunohistochem* 1994; 2: 143-5.
24. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 9: 135-9.
25. Fuqua SAW. Estrogen receptor mutagenesis and hormone resistance. *Cancer* 1994; 74: 1026-9.
26. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p 53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41: 178-83.
27. Chan WK, Poulson R, Lu QL, Patel K, Gregory W, Fisher CJ, Hanby AM: bcl-2 expression in invasive mammary carcinoma: correlation with apoptosis, hormone receptors and p53 expression *J Pathol* 1993; 169 (Suppl): 138.
28. Hoffman B, Lierberman DA. Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene* 1994; 9: 1807-12.
29. Gillett CE, Barnes DM, Camplejohn RS. Comparison of three cell cycle associated antigens as markers of proliferative activity and prognosis in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46: 1126-8.
30. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 3926-31.
31. Levin E, Caruso S, Actis AM. Factores de transcripción y diversidad proliferativa de las células neoplásicas. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 589-95.
32. Andersen J, Rhorpe SM, King WJ, Rose C, Christensen I, Rasmussen BB, Poulsen HS. The prognostic value of immunohistochemical estrogen receptor analysis in paraffin-embedded and frozen sections versus that of steroid-binding assays. *Eur J Cancer* 1990; 26: 442-9.
33. Nomura Y, Miura S, Koyama H, Enomoto K, Kasumi F, Tamamoto H, Kimura M, Tominaga T, Lino H, Morimoto T, et al. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer. A univariate and multivariate analysis of 3089 Japanese patients with breast cancer from the study group for the Japanese Breast Cancer Society on hormone receptors and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1992; 69: 153-64.
34. McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *New Engl J Med* 1992; 326: 1756-61.
35. Tsangaris TN, Knox SM, Cheek JH. Tumor hormone receptor status and recurrences in premenopausal patients with node-negative breast carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 984-7.

- - - -

What is man anyhow? What am I? and what are you?

¿Qué es el hombre al fin? ¿Qué soy yo? y ¿Qué eres tu?

Walt Whitman (1819-1892)

Leaves of Grass