ARTÍCULO ORIGINAL

Rev Venez Oncol 2003;15(3):148-156

EXPRESIÓN DE PCNA Y KI-67 EN EL ADENOCARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE DE LA MAMA;

RELACIÓN CON ACTIVIDAD MITÓTICA Y VARIABLES MORFOLÓGICAS

LETICIA HAMANA Z, GINO ITALO BIANCHI

INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO DR. "JOSÉ A. O'DALY", FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, CARACAS. VENEZUELA

RESUMEN

El cáncer de mama ocupa en los países desarrollados el primer lugar en incidencia y mortalidad, en Venezuela ocupa el segundo lugar. En este trabajo analizamos las biopsias de cincuenta pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de mama, revisando como factor pronóstico el grado histológico del tumor tomando en cuenta una de sus variables: el conteo de mitosis por 10 campos de 400x, ya que ésta determina la actividad proliferativa del tumor, es por ello que queremos determinar en cual medida se comparan el método de conteo de mitosis en 10 campos de 400x y el índice mitótico con el conteo de células positivas a anticuerpos anti-antígeno nuclear de proliferación celular y anti-Ki-67, como una forma de predecir el comportamiento biológico de un tumor. Encontramos una relación estadísticamente significativa entre los tumores grado I y III y el porcentaje de expresión de anti-antígeno nuclear de proliferación celular y Ki-67

PALABRAS CLAVE: Mama, adenocarcinoma, índice mitótico, PCNA, Ki-67, inmunohistoquímica.

Recibido: 25/03/2003 Revisado: 15/04/2003
Aprobado para Publicación: 12/06/2003

Correspondencia: Dr. Gino Italo Bianchi
Instituto Anatomopatológico Dr. "José A. O'Daly",
Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
E-mail: gibi55@yahoo.com

SUMMARY

In developed countries breast cancer occupied the first place in incidence and mortality, in Venezuela this tumor occupied the second cause. In this work we analyzed 50 biopsies of patients with diagnostic of breast adenocarcinoma, we analyze and determine the role of histological grade how a prognostic factor in one of this variables: The count of mitosis for 10 fields of 400x, because it determines the proliferative activities of the tumor, for these reason we want to determine and compare in which measure the number of mitotic cells for 10 fields of 400x and the count of positive cells to anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-Ki-67 are used how a form to predict the biologic expression of a tumor. We found important relation with significance statistic between tumors grade I and III and in the percent of the expression to proliferating cell nuclear antigen and Ki-67.

KEY WORDS: Breast, adenocarcinoma, mitotic index, PCNA, Ki-67, immunohistochemistry.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de la mama es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo. En los países industrializados constituye la primera causa

de muerte por cáncer en la mujer, ocupando en Venezuela el segundo lugar [1]. Los factores pronósticos en el cáncer de la mama son características clínicas, morfológicas y biológicas, las cuales permiten predecir el curso clínico de esta enfermedad [2-9]. Dentro de los factores pronósticos ya establecidos o tradicionales, se encuentran el grado histológico del tumor [10-21], cuya importancia fue puesta de manifiesto por primera vez por Greenhough [12], y posteriormente por Bloom [15]. El grado histológico según la clasificación más usada (Scarff-Bloom-Richardson modificada por Elston), toma en cuenta tres variables histológicas tumorales a saber: a. La formación de túbulos, b. El pleomorfismo nuclear, c. El conteo de mitosis por 10 campos de 400x (Cuadro 1).

Esta última característica es una indicación de la actividad proliferativa del tumor, la cual, puede ser medida mediante otras técnicas, algunas sencillas, como la determinación del índice mitótico (número de mitosis/1 000 células tumorales) [22-37] y, otras más sofisticadas, tales como, el índice de timidina marcada, la determinación de células marcadas con bromodeoxiuridina, la citometría de flujo y, a través de métodos inmunohistoquímicos de antígenos asociados a células que están en el proceso de división tales como el PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) o el Ki-67 [22-48]. El propósito de este trabajo es el de determinar en cual medida se comparan el método de conteo de mitosis en 10 campos de 400x y, el índice mitótico con el conteo de células positivas a anticuerpos anti PCNA y anti Ki-67.

Cuadro 1. Expresión de PCNA y Ki-67 en el adenocarcinoma ductal infiltrante de la mama; relación con actividad mitótica y variables morfológicas. (Método semicuantitativo para determinar el grado histológico en el carcinoma de mama. Scarff-Bloom-Richardson modificada por Lestón).

Característica	Puntuación
Formación de túbulos:	
Mayoría del tumor (>75%)	1
Moderada (10,75%)	2
Escasa o nula (<10%)	3
Pleomorfismo nuclear:	
Pequeño, uniforme, regular	1
Moderado ≠ en el tamaño y variabilidad	2
Variación marcada	3
Conteo mitótico:*	
0-5	1
6-10	2
>11	3

*Se mide como número de mitosis en 10 campos de 40x. Depende del área del campo del microscopio (Histopathology 1991;19:403-410).

3-5 puntos: Grado I	Bien diferenciado
6-7 puntos: Grado II	Moderadamente diferenciado
8-9 puntos: Grado III	Poco diferenciado

MÉTODOS

En esta serie, la población en estudio estuvo constituida por 50 pacientes con adenocarcinoma ductal infiltrante de la mama, tratados con mastectomías y disección axilar, cuyas biopsias fueron estudiadas en el Instituto Anatomopatológico Dr. "José A. O'Daly". De los informes de biopsias correspondientes fueron tomados los datos referentes al tamaño del tumor, número de ganglios linfáticos en la disección axilar y, número de ganglios linfáticos metastásicos. En todos los casos fueron estudiados los cortes histológicos, teñidos con hematoxilina y eosina, utilizando un microscopio Nikon® modelo Labophot, a cuyo objetivo de 400x le corresponde un diámetro de campo

de 0,159 mm^3 [16]. Se determinó el grado histológico según la clasificación de Scarff-Bloom-Richardson modificada por Elston [7]. Para la identificación de las figuras mitóticas, se tomaron en cuenta los criterios de Van Diest [19] (Cuadro 2).

Cuadro 2. Expresión de Pcna y Ki-67 en el adenocarcinoma ductal infiltrante de la mama; relación con actividad mitótica y variables morfológicas. (Criterios para figuras mitóticas Van Diest).

* Ausencia de membrana nuclear, de forma tal que la mayoría de las células han pasado la profase.
* Extensiones "peludas" de material nuclear (cromosomas condensados), ya sea en grumos (inicio de la metafase), en un plano (metafase/ anafase), o en grumos separados (telofase),
* dos grupos de cromosomas paralelos, claramente separados, se cuentan como mitosis separadas.

El índice mitótico (número de mitosis por 1 000 células tumorales), se calculó de acuerdo al método de Simpson y col. [37], según el cual, para el conteo, el área del campo del microscopio se divide por una línea central, contándose los núcleos interceptados por esta línea (n), con la fórmula para el área de un círculo: $A= p.r^2$ (A= conteo estimado de células, r= n/2), se calcula la celularidad estimada, seleccionando el área más celular, con mitosis, con mínima necrosis y fibrosis; en la periferia del tumor, a un aumento de 400x. Se cuentan las figuras mitóticas en 10 campos consecutivos, los campos 1, 5 y 10 se utilizan para el conteo estimado de células, de estos tres campos se obtiene un promedio, el cual, se multiplica por 10. La relación del total de figuras mitóticas en 10 campos sobre el total de células presentes en los mismos 10 campos es el índice mitótico, y se expresa como el número de mitosis por mil (1 000) células [38,39] (Figura 1).

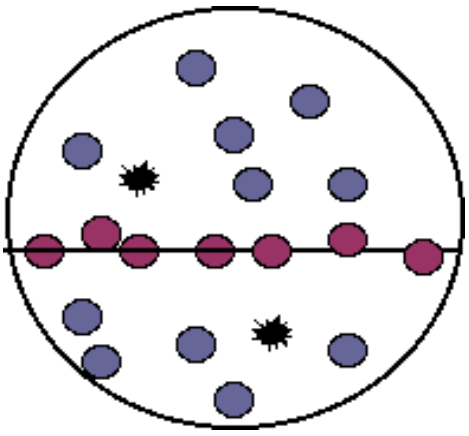

Figura 1. Representación esquemática del método de estimación del número de células por campo de 400x para determinar el índice mitótico (x1000), utilizando la fórmula del área de un círculo ($A= \pi.r^2$). r= n/2 - Hum pathol. 1992;23:608-611.

El porcentaje de positividad de los antígenos Ki-67 y PCNA, se calculó utilizando secciones histológicas del tumor consecutivas a las usadas en la histología convencional y se empleó la técnica de la estreptavidina biotina peroxidasa.

Todos los datos característicamente mencionados fueron ingresados a una base de datos y analizados estadísticamente, para lo cual, se empleó el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró un valor estadístico significativo si $p< 0,05$ y altamente significativo si $p< 0,01$ [49,50].

RESULTADOS

Al analizar los datos obtenidos, encontramos que 13 casos evaluados (26 %) fueron grado histológico I, 14 casos (28 %) grado II y, 23 casos (46 %) grado III. Se realizó el conteo de mitosis en 10 campos de 400x, encontrándose valores entre 0 en tumores grado I o II y 30, en un caso grado III (Cuadro 3). El índice mitótico (por 1 000) varió entre 0,000 en tumores grado I y II y, 16,049 en un caso grado III. La celularidad tumoral observada en 10 campos de 400 x varió entre 430 y 9620 células (Cuadro 4). El porcentaje de positividad para PCNA estuvo comprendido entre 14,5 % en un caso grado I y, 83 % en un caso grado III. El porcentaje de positividad para el antígeno Ki-67 estuvo comprendido entre 4 % en un caso grado II y 78 % en un caso grado III.

Tanto para el PCNA como para el Ki-67, la inmunopositividad estuvo confinada al núcleo de la célula, observándose un patrón difuso o granular con diferentes grados de inmunomarcaje, desde leve a marcado.

Al analizar el tamaño tumoral, encontramos que el diámetro mayor de los tumores varió entre 2 cm y 19 cm. De los 50 casos examinados, 34 (68 %) mostraron metástasis a ganglios linfáticos axilares y 16 casos (32 %), no mostraron metástasis, encontrando hasta 19 ganglios linfáticos comprometidos por el tumor.

Cuando analizamos el coeficiente de correlación de Pearson, en cuanto al porcentaje de positividad para el PCNA, encontramos una correlación positiva, estadísticamente significativa, con el conteo de mitosis en 10 campos de 400x ($r = 0,551$, $p = 0,000$) y con el índice mitótico ($r = 0,568$, $p = 0,000$), no hubo correlación con el tamaño tumoral ($r = 0,113$, $p = 0,434$) y con el número de ganglios linfáticos axilares con metástasis ($r = 0,029$, $p = 0,845$). Por su parte, el Ki-67 se correlacionó significativamente con el conteo de mitosis en 10 campos de 400x ($r = 0,568$, $p = 0,000$) y, con el índice mitótico ($r = 0,350$, $p = 0,013$); no encontrándose correlación con el tamaño tumoral ($r = 0,005$, $p = 0,972$) y las metástasis a ganglios linfáticos ($r = 0,177$, $p = 0,230$). Al evaluar el grado histológico, encontramos correlación estadísticamente significativa, entre los tumores con grado histológico III y los porcentajes de expresión del PCNA y Ki-67 en los mismos; mientras que no se obtuvo correlación estadísticamente significativa entre los tumores de grado histológico I o II y, el porcentaje de expresión del PCNA y Ki-67 (Cuadro 5).

Cuadro 3. Distribución de las pacientes según el N° de mitosis en 10 campos de 400x.

N° de mitosis	N°	%
0	7	14
0-5	19	38
6-10	9	18
>10	15	30
Total	50	100

Cuadro 4. Distribución según la celularidad en 10 campos de 400x y el grado histológico.

N° de células	Grado I	Grado II	Grado III	Total	%
<1 000	1	1	2	4	8
1 000-3 000	6	10	13	29	58
3 000-6 000	3	2	7	12	24
>6 000	3	1	1	5	10
Total	13	14	23	50	100

Cuadro 5. Relación entre el porcentaje de positividad para PCNA y Ki-67 y las variables morfológicas

Anticuerpos (%)		Mitosis en 10 campos de 400x	Índice mitótico (X1000)	Tamaño tumoral	Gl con Mt
PCNA	r	0,551	0,388	0,113	0,029
	p	0,000	0,005	0,434	0,845
Ki-67	r	0,568	0,350	0,005	0,177
	p	0,000	0,013	0,972	0,230

r: Coeficiente de correlación de Pearson.
PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.
GL: Ganglio linfático.
MT: Metástasis.

DISCUSIÓN

La proliferación tumoral es un factor pronóstico importante, y se asocia inversamente con la sobrevida en pacientes con carcinoma de mama. El conteo de figuras mitóticas en 10 campos de 400x, a pesar de ser el método más antiguo, fácil, rápido y menos costoso para estimar proliferación tumoral, tiene como inconvenientes la variabilidad en el tamaño del campo de un microscopio a otro, en la celularidad de los especímenes y, en el tamaño de la célula tumoral, así como también, los tumores con marcada desmoplasia, necrosis e inflamación, en los cuales, hay menos células evaluables por campo y, dan la falsa impresión de tener pocas mitosis.

También el tipo de fijador y el tiempo transcurrido para la fijación, así como, la variabilidad inter-observador [19-54]. Por estas razones, Simpson y col. [37], desarrollaron un método de conteo de figuras mitóticas, tomando en cuenta la celularidad del tumor. Por otra parte Van Diest y col. [19], sugirieron criterios para reconocer figuras mitóticas, disminuyendo así la variabilidad inter-observador.

En la actualidad, se han implementado métodos de inmunohistoquímica para medir proliferación tumoral, los cuales tienen la ventaja de mantener la arquitectura tisular y celular, son sencillos, rápidos, relativamente económicos y reproducibles entre los diferentes laboratorios, además muestran medidas del contenido de ADN comparables con las obtenidas por citometría de flujo [55].

El Ki-67, en un principio, tuvo como desventaja que solo podía ser realizado en tejido fresco, por lo cual, se han desarrollado anticuerpos anti-Ki-67, tales como, el MIB1 que pueden ser empleados en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina [9]. McCormick señaló al MIB 1 como un marcador confiable de proliferación celular, lo cual, fue apoyado por Barbareschi y col. [41,56,57].

Pierre y col. [22], reportaron un marcador denominado Ki-S2, cuyo valor elevado expresa una disminución de la población celular en fase G1 y, pobre pronóstico. El PCNA, es una proteína que sirve como cofactor de la ADN polimerasa delta, durante la síntesis de ADN en

el ciclo celular, puede ser detectado en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina y, es un marcador de proliferación celular [57].

En este estudio, encontramos grados variables de positividad para PCNA y Ki-67, con marcaje exclusivamente nuclear y ocasionalmente citoplasmático. Se ha sugerido que la localización de la inmunopositividad varía de acuerdo a la fase del ciclo celular; la positividad citoplasmática puede atribuirse a la reacción mezclada del anticuerpo con un epítope citoplasmático o con el Ki-67 asociado al ARNm, o simplemente, por sobre tinción [43]. Por otra parte, la falta de nutrientes y oxígeno influyen en la expresión del Ki-67.

Nosotros demostramos que existe una correlación estadísticamente significativa entre el conteo de mitosis en 10 campos de 400x y el índice mitótico por 1 000, tanto con el PCNA como con el Ki-67, lo cual, reafirma la idea de que el conteo de mitosis, sigue siendo el método más ventajoso. El índice mitótico por su parte, es un método fidedigno, siempre y cuando, se utilicen los criterios adecuados.

Weidner y col.[58], encontraron, también, correlación entre el índice de figuras mitóticas, el conteo de mitosis y el Ki-67, sugiriendo que los tres valores estiman la tasa de proliferación tumoral, siendo para ellos el menos preciso, el conteo de figuras mitóticas en 10 campos de 400x.

Keshgegian y Cnaan [59], en 1994, evaluaron el conteo de figuras mitóticas tanto en 10 campos de 400x como también por 1 000 células, fracción en Fase S (citometría de flujo), Ki-67, MIB1 y PCNA, encontrando que el conteo mitótico elevado se asoció al igual que el MIB1 a los otros marcadores de proliferación y, con otros factores pronósticos tales como, alto grado histológico, ausencia de receptores hormonales y aneuploidía del tumor, concluyendo que los mejores marcadores de proliferación son el conteo de figuras mitóticas y el MIB1. Estos autores, también encontraron que tanto el PCNA como el Ki-67 se correlacionan directamente con el grado histológico y la aneuploidía del tumor, pero no con otros factores pronósticos. También encontraron falta de correlación entre tamaño tumoral, edad del paciente y marcadores de proliferación.

En esta serie, tampoco se pudo demostrar una correlación entre el PCNA y el Ki-67 con el tamaño tumoral y el número de ganglios axilares con metástasis. Resultados similares encontraron Aranda y Laforga [32], quienes evidenciaron una buena correlación entre el conteo mitótico, índice mitótico, PCNA y MIB1, concluyendo, en su estudio, que el conteo mitótico es el método más seguro para el análisis de proliferación celular en la práctica rutinaria.

Haerslev y Jacovsen [40], sí encontraron correlación entre PCNA y metástasis a ganglios linfáticos, también coinciden en correlacionar PCNA con numerosas mitosis y alto grado histológico, sugiriendo que valores elevados de PCNA se asocian con períodos libres de recaída más cortos y pobre sobrevida. Frierson [60], encontró correlación entre el PCNA con tamaño tumoral, grado histológico y conteo mitótico, no así con otras variables morfológicas, por lo cual, sugirió que el PCNA es un parámetro pronóstico potencialmente importante. Schmmelpenning, coincidió con Frierson, al encontrar correlación positiva entre el PCNA y bajo grado de diferenciación, aneuploidía e inmunorreactividad para c-erbB-2, siendo negativa la correlación con metástasis ganglionares y tamaño tumoral.

Algunos autores como Thomas y col. [45], no consideran al PCNA como un buen marcador de proliferación, debido a que no encontraron correlación entre el PCNA y otros factores pronósticos, ni relación con sobrevida y recurrencia; la carencia de asociación es explicada por varias razones, entre ellas, el hecho de que el PCNA es sensible al tiempo de fijación, la falta de regulación en su expresión y su tiempo de vida media prolongado, que

puede permitir su detección inmunohistoquímica en células que recientemente han culminado el ciclo celular, por otro lado el PCNA, puede estar involucrado, no sólo en la proliferación celular, sino también, en la reparación del ADN.

Leonardi y col. demostraron la falta de correlación entre el PCNA y otras variables morfológicas e inmunohistoquímicas, no así con el Ki-67, concluyendo que éste y el PCNA, no son iguales. Schmitt, y col. [46], estudiaron 27 casos de cáncer de mama sin encontrar una relación significativa del PCNA con grado histológico, índice mitótico e inmunorreactividad para receptores de estrógeno, concluyendo que esto pudo ser debido a lo escaso de la muestra y, por otro lado, a efectos de fijación; a su vez, la falta de correlación con el índice mitótico puede ser explicada ya que ambos representan diferentes fases del ciclo celular [48].

A pesar de que algunos trabajos de la literatura son controversiales, y del auge de la inmunohistoquímica, nosotros demostramos que el conteo de mitosis sigue siendo el método más importante, sencillo y económico para estimar la proliferación tumoral y, por tanto, un factor pronóstico valedero por sí solo. La estimación de las mitosis se correlaciona significativamente, independientemente del método utilizado para su contaje, con el PCNA y el Ki-67 los cuales son marcadores de proliferación tumoral, y por ende son marcadores pronósticos importantes cuyo valor puede predecir el comportamiento de una neoplasia dada.

REFERENCIAS

1. Capote LG. Epidemiología del cáncer de la glándula mamaria. En: Hernández G A, editor. Avances en mastología. Caracas 1996.p.170-181.
2. Stevenson N. Carcinoma primario de la mama: aspectos morfológicos pronósticos y el estadio clínico. Trabajo especial de investigación para optar al título de especialista en Anatomía Patológica. Caracas: Universidad Central de Venezuela. 1995.
3. Rosen PP, Oberman HA. Invasive carcinoma. En: Rosen PP, Oberman HA, editores. Atlas of tumor pathology. Tumors of the mammary gland. Armed Forces Institute of Pathology. Washington D.C 1993.p.157-168.
4. Rosen PP. Invasive duct carcinoma and morphological pronostic markers. En: Rosen P P, editor. Breast Pathology. Filadelfia: Lippincott- Raven. Publishers; 1996.p.275-290.
5. Tavassoli F. Infiltrating duct carcinoma. En: Tavasoli F, editor. Pathology of the breast. Connecticut: Appleton &Lange; 1999.p.403-407.
6. Azzopardi JG, Chepick OF, Hartmann WH, Jafarey NA, Llombart-Bosch A, Ozzello L, et al. The World health organization histological tiping of breast tumors. 2ª edición. Am J Clin Pathol 1982;78:806-816.
7. Elston W, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow. Histopathology 1991;19:403-410.
8. Grases P, Tresserra F. Factores pronósticos en el cáncer de mama. En: Grases P, Tresserra F, editores. Patología de la glándula mamaria. Bases para el diagnóstico morfológico. Instituto Anatomopatológico, Facultad de Medicina, UCV. Caracas 1998.p.103-112.
9. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. Am J Clin Pathol 1995;104:42-49.
10. Bianchi G. Mastectomías por carcinomas en el Instituto Anatomopatológico. Estudio de parámetros morfológicos. Rev Venez Oncol 1998;10(2):44-66.
11. Elston W, Ellis I. Pathology and breast screening. Histopathology 1990;16:109-118.

12. Greenhough RB. Varyng degrees of malignancy in cancer of the breast. J Cancer Res 1925;9:452-463.

13. Patey RW, Scarff RW. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. Lancet 1928;1801-1804.

14. Scarff R W, Handley RS. Prognosis in carcinoma of the breast. Lancet 1938;2:582-583.

15. Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast. Cancer 1957;11:359-377.

16. Ellis PS, Whitehead R. Mitosis counting a need for reappraisal. Hum Pathol 1981;12:3-4.

17. Thunnissen FB, Ambergen A W, Koss M, Travis WD, O´leary TJ, Ellis IO. Mitotic counting in surgical pathology: Samplin bias, heterogeneity and statistical uncertainty. Histopathology 2001;39:1-8.

18. Baak J. Mitosis counting in tumors. Hum Pathol 1990;21:683-685.

19. Van Diest PJ, Baak JP, Matze-Cok P, Van Galen CM, Kurver PH, Bellot SM, et al. Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: Results form the multicenter morfhometric mammary carcinoma project. Hum Pathol 1992;23:603-607.

20. Camp R, Rimm E, Rimm D. A high number of tumor free asilary lymph nodes from patients with lymph node negative breast carcinoma is associated with poor outcome. Cancer 2000;88:108-113.

21. Moorman P, Hamza A, Marks J, Olson J. Prognostic significance of the number of lymph nodes examined in patients with lymph node-negative breast carcinoma. Cancer 2001;91:2258-2262.

22. Pierre R, Olson H, Heidebrecht H, Ferno M, Baldetorp B, Parwaresh R. Concurrent overexpression of p53 and C-erbB-2 correlates qith accelerated cycling and concomitant poor prognosis in node-negative breast cancer. Hum Pathol 2001;32:311-319.

23. Jacobs T, Gown A, Yaziji H, Barnes M, Schmitt S. Her-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by inmunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. Am J Clin Pathol 2001;113(2):251-258.

24. Jensen V, Ladekarl M. Inmunohistochemical quantitation of estrogen receptors and proliferative activity in oestrogen receptor positive breast cancer. J Clin Pathol 1995;48:429-432.

25. Barnes D, Hanby A. Oestrogen and progesterone receptors in breast cancer: Past, present and future. Histopathology 2001;38:271-274.

26. Zafrani B, Monset E. High sensitivity and specificity of inmunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: Comparison with biochemical determinations in a prospective study of 793 cases. Histopathology 2000;37:536-545.

27. Schmitt F. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. En: Alves V, Bacchi C, Vassallo J, editores. Manual de Inmunohistoquímica. Sao Paulo: Sociedad Brasileira de Patología; 1999.p.30-43.

28. Quinn C, Wright N. The Clinical assement of proliferation and growth in human Tumors: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. J Pathol 1990;160:93-102.

29. Chang J, Ormerod M, Powles Y, Allred D, Ashley S, Dowsett M, et al. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. Cancer 2000;89:2145-2152.

30. Fernandez P, Jares P, Campo E, Cardesa A. Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer. J Clin Pathol Mol Pathol 1998;51:305-309.

31. Gillett CE, Barnes DM. Cell cycle. J Clin Pathol Mol Pathol 1998;51:310-316.

32. Aranda FI, Laforca JB. Cellular proliferation in breast ductal infiltrating carcinoma. Correlation with clinical and histopathological variables. Pathol Res Pract 1997;193:683-688.

33. Kujari HP, Collan YU, Atkin, NB. Use of the mitotic counts for the prognosis and grading of breast cancer. Method evaluation study. Pathol Res Pract 1994;190:593-599.

34. Biesterfeld S, Noll I, Noll E, Wohltmann D, Bocking A. Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer. Hum Pathol 1995;26:47-52.

35. Bergers E, Jannink I, Van Diest P, Cuesta M, Meyer S, Van Mourik J, et al. The influence of fixation delay on mitotic activity and flow cytometric cell cycle variables. Hum Pathol 1997;28:95-100.

36. Going JJ, Efficiently estimated histologic cell counts. Hum Pathol 1994;25:333-336.

37. Simpson J, Dutt L, Page D. Expression of mitosis per thousand cells and cell density in breast carcinomas: A proposal. Hum Pathol 1992;23:608-611.

38. O´Leary T, Steffes M. Can you count on the mitotic index? Hum Pathol 1996;27:147-151.

39. Linden M, Torres F, Kubus J, Zarbo R. Clinical aplication of morfhologic and inmunocytochemical assessments of cell proliferation. Am J Clin Pathol 1992;97(Suppl):4-19.

40. Haerslev T, Jacobsen G. Proliferating cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. Virchows Arch 1994;424:39-46.

41. McCormic D, Chong H, Hobbs, C, Datta, C, Hall P. Detection of the Ki67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. Histopathology 1993;22:355-360.

42. Wiley J, Sons. Inmunohistological detection of tumor growth fraction (Ki67 Antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. J Pathol 1992;168:85-87.

43. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: Its use in histopathology Histopathology. 1990;17:489-503.

44. Rudolph P, Heidebrecht H. Inmunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node negative breast cancer. Nath Cancer Inst 1999;91:271-278.

45. Thomas M, Noguchi M, Kitagawa H, Kinoshita K, Miyasaki I. Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labeling index in breast carcinoma. J Clin Pathol 1993;46:525-528.

46. Schmitt FC, Pereira EM, Andrade LM, Torresan M, Lucca L. The Proliferating Cell Nuclear Antigen Index in Breast Carcinomas does not correlate with Mitotic Index and estrogen receptos inmunoreactivity. Pathol Res Pract 1994;190:786-791.

47. Siitonen SM, Isola JJ, Rantala IS, Helin, H. Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis. Am J Clin Pathol 1993;99:226-231.

48. Dervan P, Buckley C. PCNA counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki67 results in fresh tissue. Am J Clin Pathol 1992;97:21-29.

49. Hassard T. Understanding biostatisitics. Mosby Year Book; 1991.

50. Thomas JK, Waitman W. Applied regression methods to biological science. Elservie Ed. Netherlands 1996.

51. Donhuijsen K, Schmidt U, Hirch H, Van Beuningen D, Budach V. Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. Hum Pathol 1990;21:709-714.

52. Gillett C, Barnes D, Camplejohn R. Comparison of three cell cycle associated antigens as markers of proliferative activity and prognosis in breast carcinoma. J Clin Pathol 1993;46:1126-1128.

53. Hilsenbeck S, Allred G. Improved methods of estimating mitotic activity in solid tumors. Hum Pathol 1992;23:601-602.

54. Jannink I, Van Diest P, Baak A. Comparison of the Prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: Classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. Hum Pathol 1995;26:1086-1092.

55. Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am J Pathol 1990;136:1115-1124.

56. Barbareschi M, Girlando S, Mauri F, Forti S, Ecche C, Mauri F, et al. Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki67 antibodies in breast carcinomas. Am J Clin Pathol 1994;102:171-175.

57. Leong A, Vinyuvat S, Suthipintawong C, Milios J. A comparative study of cell proliferation markers in breast carcinomas. J Clin Pathol Mol Pathol 1995;48:83-87.

58. Weidner N, Moore D, Vartanian R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"- reactive MIB1 antibody. Hum Pathol 1994;25:337-342.

59. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki67 and MIB-1. Am J Clin Pathol 1995;104:42-49.

60. Frierson HF. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas: Comparison with clinical and pathologic variables. Mod Pathol 1993;(6):290-293.