

Fattori prognostico-predittivi e scelte terapeutiche nel carcinoma invasivo della mammella



Ann. Ital. Chir., LXX, 3, 1999

F. PUGLISI*, C. DI LORETO, C.A. BELTRAMI

Università degli Studi di Udine
Dipartimento di Ricerche Mediche e Morfologiche
Istituto di Anatomia Patologica
*Clinica Oncologica

Introduzione

Nel marzo 1995, in occasione della "5th International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer (St. Gallen, Svizzera)", un gruppo di esperti conveniva sul fatto che pazienti con un tasso di mortalità stimato al di sotto del 10% non dovrebbero essere candidate a ricevere alcuna forma di terapia adiuvante per il carcinoma mammario (30). Tale assunto traeva origine dai risultati dell'ultima metanalisi che ha riportato una riduzione proporzionale della mortalità pari al 20% e al 30%, rispettivamente con l'ormono – e con la chemioterapia (18). Tradotto in cifre assolute, il beneficio del trattamento adiuvante per la popolazione di donne il cui presunto tasso di mortalità è inferiore al 10%, sarebbe limitato a 2-3 pazienti ogni 100 trattate. Inoltre, l'esiguo vantaggio ottenibile con la terapia è controbilanciato dagli effetti collaterali della stessa. Pertanto, una corretta valutazione del rapporto costi-benefici si rende necessaria al fine di limitare il trattamento soltanto ai casi in cui la presunta efficacia sia tale da giustificarne il prezzo in termini di tossicità (1, 47, 51). A tal scopo, gran parte della ricerca degli ultimi anni è stata indirizzata verso l'identificazione di fattori prognostici e fattori predittivi di risposta alla terapia (1, 15, 51). I primi possono essere definiti come quelle caratteristiche cliniche, patologiche e biologiche, proprie della paziente o del tumore, che predicano la probabilità di recidiva o la sopravvivenza in pazienti non trattate. Di contro, i fattori predittivi sono quelle variabili cliniche, patologiche e biologiche valutate al fine di stimare la probabilità di risposta ai vari agenti terapeutici. Tuttavia, esistono dei requisiti fondamentali affinché l'impiego di un fattore prognostico o predittivo possa

Abstract

USE OF PROGNOSTIC AND PREDICTIVE FACTORS IN THE MANAGEMENT OF BREAST CANCER PATIENTS

Numerous pathologic and biologic factors have been assessed for their ability to predict clinical behaviour and response to therapy in breast cancer patients. Currently, traditional morphological features such as lymph node status, tumour size, histological type and tumour grade remain the leading prognostic factors. Steroid receptors are also important, but their main role consists in predicting response to hormonal therapy. Although several new indicators have been proposed to refine the value of the above-mentioned proven parameters, interpretation of their impact is not conclusive. In particular, immunohistochemical evaluation of p53, c-erbB-2 and MIB-1 appears to be potentially useful and considerable efforts are currently being made to technically and clinically validate them.

Key words: Breast cancer, prognostic factors, predictive factors.

Riassunto

Negli ultimi anni, diverse caratteristiche biologiche e patologiche del carcinoma mammario infiltrante sono state studiate al fine di valutarne il ruolo prognostico e predittivo. Ad oggi, i tradizionali parametri istopatologici del tumore (dimensioni, istotipo, grading, presenza/assenza di metastasi linfonodali) rimangono gli unici indicatori prognostici di provata efficacia. Lo stato dei recettori steroidei rappresenta il principale fattore predittivo di risposta alla terapia ormonale. Sebbene numerosi indicatori siano stati proposti allo scopo di migliorare la caratterizzazione biologico-clinica del carcinoma mammario, l'interpretazione del loro impatto prognostico-predittivo non è ancora conclusiva. In particolare, la valutazione immunohistochimica di p53, c-erbB-2 and MIB-1 appare promettente e diversi studi sono attualmente in corso per stabilirne l'affidabilità tecnica e la reale valenza clinica.

essere accettato nella pratica clinica (1). In primo luogo, le tecniche utilizzate per identificare il fattore in esame devono essere sufficientemente sensibili, specifiche e riproducibili. Inoltre, vi deve essere una validazione clinica mediante analisi multivariate che confermino il valo-

re indipendente del fattore specifico rispetto ad altri fattori di provata utilità (13). Gli studi clinici devono altresì assicurare un adeguato follow-up. Infatti, è stato riportato che durante il periodo di osservazione la relazione tra fattore prognostico e decorso clinico può essere soggetta a variazioni (32, 40, 64). Attualmente, sebbene siano stati studiati più di 100 potenziali fattori prognostico-predittivi, soltanto una minoranza di questi risponde ai succitati requisiti.

Nella presente rassegna, prenderemo in esame i fattori patologici e biologici la cui efficacia nel predire la prognosi e la risposta alla terapia del carcinoma mammario è universalmente accettata. Inoltre, verranno inclusi nella trattazione anche quei fattori la cui utilità appare particolarmente promettente, sebbene siano necessari ulteriori studi prima di approvarne l'impiego definitivo nella pratica clinica.

Caratteristiche istopatologiche

Stato linfonodale

La valutazione della presenza o assenza di metastasi ai linfonodi ascellari rappresenta il principale fattore prognostico in pazienti con carcinoma mammario infiltrante (10, 21). L'esame clinico dei linfonodi è tuttavia inaffidabile, essendo riportate percentuali di falsi negativi e di falsi positivi rispettivamente pari al 38,6% e al 27,3% (22). Pertanto, un'accurata analisi istologica è fondamentale per definire lo stato linfonodale. Per quanto attiene alla rimozione dei linfonodi per l'esame istologico, alcuni centri raccomandano la dissezione ascellare completa (*lymph node clearance*) (9), mentre altri suggeriscono l'escissione di un numero limitato di linfonodi (*sampling*) al fine di ridurre la morbilità in termini di linfedema e di ipomobilità della spalla (61). Tuttavia, è importante sottolineare che minore è il numero di linfonodi esaminati, maggiore è il rischio di un'errata stadiazione (8). Per tale motivo, la maggior parte degli autori è concorde nel considerare adeguata la rimozione di almeno 10 linfonodi (3).

Nelle diverse serie studiate (35), la sopravvivenza a lungo termine è risultata nettamente superiore nel gruppo di pazienti senza coinvolgimento linfonodale. In particolare, è stata dimostrata una sopravvivenza del 65-80% a 10 anni nei casi con linfonodi negativi e del 25-48% in quelli con evidenza istologica di metastasi linfonodali.

Inoltre, in assenza di terapia sistemica con intento adiuvante, la probabilità di ricaduta a 10 anni è risultata del 24% per i casi senza interessamento dei linfonodi e del 76% per quelli con linfonodi ascellari positivi (23).

Oltre all'informazione sulla presenza di metastasi, anche il numero dei linfonodi coinvolti riveste importanza prognostica. Una relazione inversa con la sopravvivenza è stata osservata valutando il numero dei linfonodi sia

come variabile continua (10, 24, 42) che stratificando le pazienti secondo categorie arbitrarie (24). A fini pratici, nella maggior parte dei trial clinici, l'analisi statistica viene condotta operando una suddivisione in quattro gruppi distinti: assenza di metastasi linfonodali; 1-3 linfonodi positivi; 4-10 linfonodi positivi; > 10 linfonodi positivi.

La questione sull'utilità clinica dell'informazione relativa alla presenza di micrometastasi linfonodali (metastasi occulte) rimane ancora irrisolta. Una recente revisione della letteratura sull'argomento (17), ha riportato un'ampia variabilità fra i vari studi nella scelta del cut-off per la distinzione tra micro- e macrometastasi (range, 0,2-2 mm). Nelle diverse casistiche, con l'esecuzione di sezioni seriate dei linfonodi e l'impiego di tecniche di immunoistochimica e di biologia molecolare, è stata evidenziata la presenza di metastasi occulte in una percentuale variabile dal 9 al 33% (17, 43). Sebbene il valore prognostico delle micrometastasi sia stato confermato da studi prospettici con adeguato follow-up (17, 38), il reale significato in termini di rapporto costi-benefici deve essere ancora stabilito.

Dimensioni tumorali

Le dimensioni tumorali rappresentano un fattore prognostico indipendente rispetto allo stato linfonodale (57). La misurazione clinica del diametro tumorale è tuttavia inaccurata, essendo riportato un accordo clinico-patologico soltanto nel 58% dei casi (63). La valutazione radiologica è più precisa di quella clinica e l'ecografia rappresenta la tecnica più accurata per la misurazione preoperatoria delle dimensioni del tumore (25). Dal punto di vista anatomo-patologico, la neoplasia viene dapprima misurata macroscopicamente sul campione operatorio a fresco e rilevando le tre dimensioni. Dopo la fissazione, l'estensione della componente invasiva deve essere confermata microscopicamente (36, 51).

La grandezza tumorale è direttamente correlata con una maggiore probabilità di metastasi ai linfonodi regionali e con una minore sopravvivenza libera da malattia e globale (28, 58). Sebbene l'importanza prognostica delle dimensioni tumorali sia stata dimostrata sia in presenza che in assenza di metastasi linfonodali, nei casi senza coinvolgimento dei linfonodi il parametro "grandezza" risulta di particolare interesse al fine di identificare le pazienti a maggiore o minor rischio di ricaduta. In pazienti con tumori uguali o inferiori al centimetro e in assenza di metastasi linfonodali, è stata riportata una sopravvivenza libera da malattia superiore al 90% a 5 anni (41, 44). In un'ampia serie studiata da Rosen e collaboratori (58, 59), presso il Memorial Sloan-Kettering Cancer Center di New York, pazienti con tumori pT1a,b (< 1 cm) hanno mostrato un tasso di ricadute e una sopravvivenza globale a 20 anni, rispettivamente del 12 e dell'80%. Lo studio ha anche riscontrato una diffe-

renza significativa nella sopravvivenza delle pazienti con tumore pT1a,b rispetto alle pazienti con tumore pT1c (> 1 cm e < 2 cm).

Il riconoscimento dell'eccellente prognosi che caratterizza i tumori di piccole dimensioni enfatizza ulteriormente l'importanza della diagnosi precoce e dello screening. Peraltro, uno dei parametri utilizzati per il controllo di qualità dei programmi di screening è proprio la percentuale di carcinomi invasivi diagnosticati al di sotto dei 15 mm (requisito minimo: 50% di tutti i casi).

Grado istologico

L'evidenza che, in pazienti con carcinoma mammario, il grado di differenziazione tumorale rappresenta un importante fattore prognostico esiste da più di settanta anni (31, 48).

In letteratura sono stati riportati diversi metodi per la valutazione del grado istologico. In particolare, mentre alcuni autori hanno utilizzato la combinazione di caratteristiche nucleari, citologiche e architetturali del tumore (7, 20, 48), altri hanno privilegiato l'analisi di quelle nucleari (5, 6).

Tuttavia, nonostante vari studi abbiano dimostrato la relazione tra grado istologico tumorale e sopravvivenza, la scarsa riproducibilità dei diversi sistemi adottati ha decretato il limitato utilizzo di tale parametro come fattore prognostico. Pertanto, nel 1991, Elston ed Ellis (Nottingham, Inghilterra) hanno proposto un nuovo sistema che introduceva criteri più stretti allo scopo di migliorare l'accordo inter - ed intraosservatore nella definizione del grado tumorale (20). Tale sistema prevede la valutazione combinata di tre variabili distinte: la formazione di strutture tubulari, le caratteristiche (pleomorfismo e dimensioni) nucleari e il numero delle mitosi. La somma del punteggio (da 1 a 3) assegnato a ciascuno di questi tre parametri permette di individuare tre classi (grado 1: punteggio finale da 3 a 5, grado 2: punteggio finale da 6 a 7, grado 3: punteggio finale da 8 a 9) alle quali corrisponde una diversa prognosi. Infatti, è stato dimostrato che la sopravvivenza a 10 anni è dell'85% in pazienti con tumori "grado 1". Di contro, meno del 45% delle pazienti con tumori "grado 3" è vivo a 10 anni (20). Recentemente, diversi studi hanno riportato un'elevata riproducibilità con la corretta adozione dei criteri proposti dal gruppo di Nottingham (26, 56). Tali risultati fanno del sistema di *grading* secondo Elston ed Ellis uno fra i più validi fattori prognostici attualmente disponibili. Tuttavia, è opportuno sottolineare che per una corretta valutazione del grado istologico è necessario che i campioni tumorali siano ben fissati. Infatti, è noto che la conta mitotica risente di eventuali ritardi nella fissazione, con una riduzione del numero delle mitosi superiore al 50% se il campione tumorale non viene messo in formalina entro 6 ore dall'intervento chirurgico (60).

Istotipo

La definizione dell'istotipo tumorale costituisce un fattore prognostico indipendente rispetto allo stato linfonodale, alle dimensioni tumorali e al grado istologico (19). Alcune varianti morfologiche del carcinoma mammario, i cosiddetti "tipi speciali", sono caratterizzate da un comportamento clinico estremamente favorevole. Fra queste, il carcinoma mucinoso puro, il tubulare puro e il cribriforme invasivo sono associati con una sopravvivenza a 10 anni superiore all'80% (49). Tuttavia, anche nell'era mammografica, gli istotipi speciali costituiscono una minoranza, rappresentando complessivamente il 20-30% di tutti i carcinomi invasivi della mammella.

Le variabili grado istologico e istotipo sono ritenute estremamente associate tra loro, essendo entrambe espressioni della differenziazione tumorale. Per tale motivo, ci si è chiesti se la valutazione del grado istologico avesse un valore prognostico aggiuntivo nel caso di tumori ad istotipo speciale, per lo più valutati come "grado 1", o nel caso di tumori ad istotipo lobulare, prevalentemente valutati come "grado 2". La risposta a tale quesito è arrivata da uno studio condotto su una serie di 1529 pazienti (49). Gli autori hanno dimostrato che, talvolta, gli istotipi speciali possono presentarsi come "grado 2" ed essere associati ad una prognosi peggiore (sopravvivenza del 60-80% a 10 anni) rispetto a quella stimata sulla base della sola valutazione morfologica. Lo stesso studio ha evidenziato che i carcinomi lobulari possono essere caratterizzati da un grado differente dal "grado 2", e pertanto un'analisi congiunta istotipo/grado è richiesta per una migliore definizione prognostica (49).

Invasione vascolare

La presenza di emboli neoplastici in spazi vascolari (ematologici e linfatici) è associata ad una ridotta sopravvivenza e ad una maggiore probabilità di ricaduta locale (50). L'analisi di tale parametro, come per il grado istologico, richiede l'applicazione di criteri rigidi per ottimizzare la riproducibilità inter - ed intraosservatore (51). Inoltre, una buona fissazione del materiale è fondamentale per minimizzare l'incidenza di artefatti.

In analisi multivariata, la valutazione della presenza di invasione vascolare alla periferia o nelle adiacenze del tumore primitivo si è rivelata di importanza prognostica, indipendentemente dallo stato linfonodale, dalle dimensioni tumorali, dal grado istologico e dall'istotipo (50). Per di più, l'invasione vascolare è associata ad un aumentato rischio di ricaduta locale in pazienti che hanno ricevuto una chirurgia conservativa e di ricaduta sulla cicatrice in pazienti sottoposte a mastectomia (45, 50). In alcuni centri, quindi, la rilevazione dell'invasione vascolare rappresenta, insieme al coinvolgimento tumorale dei margini di resezione e alla presenza di un'estesa componente intraduttale (14), uno dei parametri che

indirizzano verso un'appropriate estensione dell'intervento chirurgico.

Indicatori biologici

Recettori steroidei

Diversi studi hanno valutato il ruolo dei recettori estrogenici (RE) come fattori prognostici e predittivi di risposta all'endocrinoterapia (16). Gli studi in cui l'analisi delle proteine recettoriali è stata effettuata con il metodo biochimico hanno mostrato un'associazione, seppur debole, tra positività del tumore per i RE e sopravvivenza (12). Viceversa, un'importante relazione è stata dimostrata tra espressione dei RE e risposta alla terapia ormonale. In particolare, una riduzione del 20-30% nel tasso di mortalità e di ricadute è stata osservata in pazienti trattate con intento adiuvante e il cui tumore esprimeva i RE (18). Il valore dello stato recettoriale come fattore predittivo è stato confermato anche in pazienti con carcinoma mammario avanzato, con percentuali di risposta del 60% nei casi con positività per i RE (12). Un beneficio dall'ormonoterapia adiuvante è stato osservato anche nel 10% di pazienti con negatività biochimica per i RE mentre fino ad un terzo dei casi RE-positivi sono risultati non responsivi al trattamento ormonale. Queste discrepanze sono state in parte attribuite alla scarsa sensibilità e specificità del metodo biochimico, gravato principalmente da problemi di campionamento e di effetto diluizionale da parte dello stroma (34).

Recentemente, la disponibilità di anticorpi monoclonali di seconda generazione, attivi su materiale incluso in paraffina, ha in parte consentito di superare i succitati problemi (34). Inoltre, gli studi che hanno confrontato l'analisi biochimica con quella immunoistochimica hanno dimostrato una buona concordanza tra le due metodiche (12, 34).

Il valore prognostico-predittivo dei RE valutati immunoistochimicamente è stato ampiamente studiato. Tuttavia, i trial disponibili non consentono un'agevole interpretazione dei risultati. Infatti, nella maggior parte delle serie studiate, non è stata riportata la percentuale di pazienti trattate con la terapia ormonale. I pochi studi disegnati per analizzare il valore predittivo dell'espressione dei RE (1) hanno mostrato tassi di risposta all'ormonoterapia pari a circa il 70% fra le pazienti con tumori RE-positivi. Viceversa, circa l'85% dei casi RE-negativi sono risultati non responsivi alla terapia endocrina. Tali dati sottolineano l'utilità della valutazione immunoistochimica dei RE nel predire la risposta all'endocrinoterapia. Ciononostante, in una percentuale di casi non trascurabile, i dati immunoistochimici non riflettono la reale responsività alla terapia. I risultati falsi positivi (assenza di risposta all'ormonoterapia in presenza di positività immunoistochimica per i RE) sono

stati in parte attribuiti all'esistenza di varianti dello *splicing* dei RE che vengono regolarmente traslate ma non sono funzionalmente attive (27). Viceversa, varianti dello *splicing* prive del dominio responsabile del legame anticorpo monoclonale-proteina recettoriale spiegherebbero parte dei risultati falsi negativi (risposta alla terapia in presenza di negatività per i RE) (27).

Un approccio che sembra promettente per migliorare la predittività di risposta all'ormonoterapia consiste nell'analisi combinata dei RE con molecole la cui sintesi è regolata dagli estrogeni (recettori progesteronici, pS2, bcl2) (29, 52). In tal modo è infatti possibile ottenere un'informazione più accurata sulla funzionalità recettoriale.

Misure di proliferazione cellulare

Diversi studi hanno dimostrato un'associazione tra prognosi e tasso di proliferazione cellulare del tumore. La frazione di cellule proliferanti può essere determinata mediante diverse tecniche; fra queste, lo studio dell'incorporazione di precursori nel DNA di recente sintesi (labeling-index) (62), la citometria a flusso (12) e la determinazione immunoistochimica di antigeni nucleari associati alla proliferazione (33).

In particolare, la determinazione della frazione di cellule in fase S, effettuata mediante citometria a flusso, è prossima al raggiungimento dei requisiti necessari per l'inserimento nella pratica clinica (2).

Fra gli anticorpi utilizzati in immunoistochimica, l'anticorpo MIB-1, attivo su campioni di tessuto inclusi in paraffina, appare particolarmente promettente per un futuro impiego routinario (1).

Va infine ricordato che la conta mitotica, valutata in microscopia ottica su sezioni colorate con ematosilina ed eosina, rimane un metodo economico ed ugualmente efficace per la stima della proliferazione cellulare (46). Sebbene in passato tale approccio sia stato abbandonato perchè ritenuto poco riproducibile, è oggi opinione comune che una corretta e standardizzata applicazione dei criteri per la determinazione delle mitosi possa migliorare il grado di concordanza inter- ed intraosservatore.

Oncogeni e geni oncosoppressori

Diversi oncogeni e geni oncosoppressori, insieme con i loro prodotti, sono stati proposti come potenziali fattori prognostici e/o predittivi nel carcinoma della mammella. In particolare, p53 e c-erbB-2 sono fra i più studiati.

Il gene oncosoppressore p53 agisce come un regolatore del ciclo cellulare (39). In seguito ad insulti a carico del DNA, i livelli della proteina codificata da tale gene aumentano per consentire l'arresto nella fase G1 del ciclo cellulare e la riparazione dei danni subiti dal genoma.

Se ciò non accade, la proteina p53 agisce come fattore promotore l'apoptosi, assicurando che il difetto genetico non venga perpetuato nella progenie cellulare. Alterazioni del gene p53 sono state riportate nella maggior parte dei tumori umani. Le mutazioni puntiformi rappresentano le anomalie più frequentemente riscontrate e determinano la sintesi di una proteina inattiva caratterizzata da un'emivita più lunga rispetto alla controparte normale (37). In tal modo, l'accumulo nucleare della proteina mutata può essere rilevato mediante analisi immunohistochimica e l'immunoreattività per p53 viene utilizzata come indicatore indiretto della presenza di mutazione genetica. Nella maggior parte degli studi che hanno indagato il ruolo prognostico di p53 nel carcinoma mammario, una stretta relazione è stata dimostrata tra espressione immunohistochimica della proteina e decorso prognostico sfavorevole (1). Tuttavia, a dispetto dell'enorme mole di studi sull'argomento, i dati a favore di un impiego routinario di p53 non sono ancora conclusivi (4).

L'oncogene c-erbB-2, altrimenti noto come HER2/neu, codifica per una glicoproteina transmembrana appartenente alla famiglia dei recettori per i fattori di crescita (54). L'amplificazione genica determina l'iperespressione della proteina ed entrambi questi eventi sono associati ad una cattiva prognosi nel carcinoma mammario infiltrante (1). Un'attenta analisi della letteratura, tuttavia, ha suggerito che le implicazioni cliniche dell'iperespressione di c-erbB-2 sono legate più al suo ruolo predittivo che a quello prognostico (55). Infatti, gli studi che hanno valutato la sopravvivenza in pazienti trattate con chemioterapia o con endocrinoterapia, hanno mostrato una prognosi peggiore fra i casi con iperespressione tumorale per il c-erbB-2 (55).

Il limite principale legato alla valutazione immunohistochimica dei recettori steroidei, della proteina p53, del prodotto del gene c-erbB-2 e di altri marcatori biologici consiste nell'assenza di una standardizzazione nel metodo di analisi. Diversi laboratori, hanno infatti utilizzato anticorpi differenti e la scelta dei valori soglia è stata valutata arbitrariamente dai vari gruppi (1).

Conclusioni

Il carcinoma della mammella è caratterizzato da spiccata eterogeneità di comportamento biologico e clinico (35, 53). Pertanto, l'individuazione di fattori prognostici che possano predire con maggiore accuratezza il decorso della malattia e la sopravvivenza costituisce una delle principali sfide della ricerca oncologica. Le situazioni in cui l'impiego di fattori prognostici risulta particolarmente utile possono essere riassunte in tre punti fondamentali (11):

1. Identificazione delle pazienti a prognosi eccellente per le quali non è indicata alcuna forma di trattamento adiuvante;

2. Identificazione delle pazienti a prognosi particolarmente sfavorevole per le quali può essere indicato un trattamento più aggressivo;

3. Guida nella scelta del trattamento (es. chemioterapia vs ormonoterapia).

Attualmente, i parametri patologici tradizionali (stato linfonodale, dimensioni tumorali e grado istologico) rimangono gli unici fattori di provata rilevanza prognostica. Fra i fattori predittivi che possono guidare le scelte terapeutiche, l'unico indicatore la cui efficacia sia stata avvalorata è rappresentato dallo stato recettoriale. Tuttavia, altri marcatori biologici appaiono molto promettenti ma la standardizzazione dei metodi per la loro valutazione è necessaria prima di autorizzarne l'impiego nella pratica clinica.

Bibliografia

- 1) Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M.: *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. Mod Pathol, 11:155-68, 1998.
- 2) American Society of Clinical Oncology: *Clinical practice guidelines for the use of tumour markers in breast and colorectal cancers*. J Clin Oncol, 14:2843-77, 1996.
- 3) Axelsson C.K., Mouridsen H.T., Zedeler K.: *Axillary dissection of level I and II lymph nodes is important in breast cancer classification. The Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG)*. Eur J Cancer, 28A:1415-8, 1992.
- 4) Barbareschi M.: *Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas. A review of the literature involving over 9,000 patients*. Appl Immunohistochem, 4:106-16, 1996.
- 5) Black M.M., Barclay T.H.C., Hankey B.F.: *Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor*. Cancer, 36:2048-55, 1975.
- 6) Black M.M., Speer F.D.: *Nuclear structure in cancer tissues*. Surg Gynecol Obstet, 105:97-102, 1957.
- 7) Bloom H.J.C., Richardson W.W.: *Histological grading and prognosis in breast cancer*. Br J Cancer, 11:359-77, 1957.
- 8) Boova R.S., Bonanni R., Rosato F.E.: *Patterns of axillary nodal involvement in breast cancer: Predictability of level one dissection*. Ann Surg, 196:642-644, 1982.
- 9) Cabanes P.A., Salmon R.J., Vilcoq J.R., Durand J.C., Fourquet A., Gautier C., Asselain B.: *Value of axillary dissection in addition to lumpectomy and radiotherapy in early breast cancer. The Breast Carcinoma Collaborative Group of the Institut Curie*. Lancet, 339:1245-48, 1992.
- 10) Carter C.L., Allen C., Henson D.E.: *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer, 63:181-7, 1989.
- 11) Clark G.M.: *Do we really need prognostic factors for breast cancer?* Breast Cancer Res Treat, 30:117-26, 1994.
- 12) Clark G.M.: *Prognostic and predictive factors*. In: Harris J.R., Lippman M.E., Morrow M., Helmann S. (eds) *Diseases of the breast*

- st. Lippincott-Raven Publishers Philadelphia, 1996, pp. 461-85.
- 13) Collan Y., Kuopio T., Auranen A., Linna M.: *Prognostication of breast cancer by multivariate methods*. Adv Clin Path, 1:269-73, 1997.
- 14) Connolly J.L., Boyages J., Nixon A.J., Peirò G., Gage I., Silver B., Recht A., Harris J.R., Schnitt S.T.: *Predictors of breast recurrence after conservative surgery and radiation therapy for invasive breast cancer*. Mod Pathol, 11:134-9, 1998.
- 15) Donegan W.L.: *Tumor-related prognostic factors for breast cancer*. CA Cancer J Clin, 47:28-51, 1997.
- 16) Donegan W.L.: *Prognostic factors: Stage and receptor status in breast cancer*. Cancer, 70:1755-1764, 1992.
- 17) Dowlatshahi K., Fan M., Snider H.C., Habib F.A.: *Lymph node micrometastases from breast carcinoma. Reviewing the dilemma*. Cancer, 80:1188-97, 1997.
- 18) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: *Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 death among 75,000 women*. Lancet, 339:1-15, 71-85, 1992.
- 19) Ellis I.O., Galea M., Broughton N., Locker A., Blamey R.W., Elston C.W.: *Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 20:479-89, 1992.
- 20) Elston C.W., Ellis I.O.: *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, 19:403-10, 1991.
- 21) Fisher B., Bauer M., Wickerham D.L., Redmond C.K., Fisher E.R., Cruz A.B.: *Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP update*. Cancer, 52:1551-7, 1983.
- 22) Fisher B., Wolmark N., Bauer M., Redmond C., Gebhardt M.: *The accuracy of clinical nodal staging and of limited axillary dissection as a determinant of histologic nodal status in carcinoma of the breast*. Surg Gynecol Obstet, 152:765-772, 1981.
- 23) Fisher B.: *Some thoughts concerning the primary therapy of breast cancer*. Recent Results Cancer Res, 57:150-163, 1976.
- 24) Fisher E.R., Anderson S., Redmond C., Fisher B.: *Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project Protocol B-06: 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants*. Cancer, 71:2507-2514, 1993.
- 25) Fornage B.D., Toubas O., Morel M.: *Clinical, mammographic, and sonographic determination of preoperative breast cancer size*. Cancer, 60:765-771, 1987.
- 26) Frierson H.F., Wolber R.A., Berean K.W., Franquemont D.W., Gaffey M.J., Boyd J.C., Wilbur D.C.: *Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading system for infiltrating ductal carcinoma*. Am J Clin Pathol, 103:195-8, 1995.
- 27) Fuqua S.A., Wolf D.M.: *Molecular aspects of estrogen receptors variants in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 35:233-41, 1995.
- 28) Galea M.H., Blamey R.W., Elston C.W., Ellis I.O.: *The Nottingham Prognostic index in primary breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 22:207-19, 1992.
- 29) Gee J.M.W., Robertson J.F.R., Ellis I.O., Willsher P., McClelland R.A., Hoyle H.B., Kyme S.R., Finlay P., Blamey R.W., Nicholson R.I.: *Immunohistochemical localization of bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy*. International Journal of Cancer, 59:619-28, 1994.
- 30) Goldhirsch A., Wood W.C., Senn H., Glick J.H., Gelber R.D.: *Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 87:1441-5, 1995.
- 31) Greenough R.B.: *Varying degrees of malignancy in cancer of the breast*. J Cancer Res, 9:453-63, 1925.
- 32) Hacene K., Ledoussal V., Rouesse J., Brunet M.: *Predicting distant metastases in operable breast cancer patients*. Cancer, 66:2034-43, 1990.
- 33) Haerslev T., Jacobsen G.K., Zedeler K.: *Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat, 37:101-13, 1996.
- 34) Hanna W., Mcready D.R., Chapman J.W., Mobbs B.G., Trudeau M.E.: *The predictive value of ERICA in breast cancer recurrence. A univariate and multivariate analysis*. Mod Pathol, 6:748-54, 1993.
- 35) Harris J.R., Helmann S.: *Natural history of breast cancer*. In: Harris J.R., Lippman M.E., Morrow M., Helmann S. (eds) *Diseases of the breast*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, pp.375-391.
- 36) Henson D.E., Oberman H.A., Hutter R.V.P.: *Practice protocol for the examination of specimens removed from patients with cancer of the breast. A publication of the Cancer Committee, College of American Pathologists*. Arch Pathol Lab Med, 121:27-33, 1997.
- 37) Iggo R., Gatter K., Bartek J., Lane D., Harris A.L.: *Increased expression of mutant forms of 53 oncogene in primary lung cancer*. Lancet, 335:675-9, 1990.
- 38) International (Ludwig) Breast Cancer Study Group: *Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers*. Lancet, 335:1565-1568, 1990.
- 39) Lane D.: *p53: the guardian of the genome*. Nature, 358:15-6, 1992.
- 40) Lipponen P., Aaltomaa S., Eskelinen M.: *The changing importance of prognostic factors in breast cancer during long term follow-up*. Int J Cancer, 51:698-702, 1992.
- 41) Merkel D.E., Winchester D.J., Goldschmidt R.A., August C.Z., Wruck D.M., Rademakera W.: *DNA flow cytometry and pathologic grading as prognostic guides in axillary lymph node-negative breast cancer*. Cancer, 72:1926-1932, 1993.
- 42) Nemoto T., Vana J., Bedwani R., Baker H.W., McGregor F.H., Murphy G.P.: *Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons*. Cancer, 45:2917-24, 1980.
- 43) Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K., Inaji H., Imaoka S., Koyama H.: *The detection of breast carcinoma micro*

- metastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*, 74:1595-1600, 1994.
- 44) O'Reilly S.M., Camplejohn R.S., Barnes D.M., Millis R.R., Rubens R.D., Richards M.A.: *Node-negative breast cancer: Prognostic subgroups defined by tumor size and flow cytometry*. *J Clin Oncol*, 8:2040-2046, 1990.
- 45) O'Rourke S., Galea M.H., Morgan D., Euhus D., Pinder S., Ellis I.O., Elston C.W., Blamey R.W.: *Local recurrence after simple mastectomy*. *Br J Surg*, 81:386-9, 1994.
- 46) Page D.L., Simpson J.F.: *Measure of proliferation in breast cancer: practicality and utility*. *Breast*, 6:169-170, 1997.
- 47) Page D.L.: *Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types*. *Am J Surg Pathol*, 15:334-49, 1991.
- 48) Patey D.H., Scarff R.W.: *The position of histology in the prognosis of cancer of the breast*. *Lancet*, 1:801-4, 1928.
- 49) Pereira H., Pinder S.E., Sibbering D.M., Galea M.H., Elston C.W., Blamey R.W., Robertson J.F.R., Ellis I.O.: *Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should be a typer or a grade? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma*. *Histopathology*, 27:219-26, 1995.
- 50) Pinder S.E., Ellis I.O., Galea M., O'Rourke S.O., Blamey R.W., Elston C.W.: *Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up*. *Histopathology*, 24:41-7, 1994.
- 51) Pinder S.E., Elston C.W., Ellis I.O.: *Prognostic factors and management of primary breast cancer*. *Adv Clin Path*, 1:5-12, 1997.
- 52) Predine J., Spyrtos F., Prud'homme J.F., Andrieu C., HACE-NE K., Brunet M., Pallud C., Milgrom E.: *Enzyme-linked immunosorbent assay of pS2 in breast cancers, benign tumors, and normal breast tissues: Correlation with prognosis and adjuvant hormone therapy*. *Cancer*, 69:2116-2123, 1992.
- 53) Puglisi F., Beltrami C.A.: *Storia naturale del carcinoma mammario*. In Bresadola F., Anania G. (eds) *La mammella operata per carcinoma: aspetti multidisciplinari*. Guido Gnocchi editore, Napoli, 1998, pp. 7-17.
- 54) Rajkumar T., Gullick W.J.: *The type I growth factor receptors in human breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 29:3-9, 1994.
- 55) Revillion F., Bonneterre J., Peyrat J.P.: *ErbB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance*. *Eur J Cancer*, 34:791-808, 1998.
- 56) Robbins P., Pinder S., De Klerk N., Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C.: *Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserver agreement*. *Hum Pathol*, 26:873-9, 1995.
- 57) Rosen P.P., Groshen S., Kinne D.W., Norton L.: *Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up*. *J Clin Oncol*, 11:2090-2100, 1993.
- 58) Rosen P., Groshen S., Saigo P.E., Kinne D.W., Helmann S.: *Pathological prognostic factors instage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: A study of 644 patients with median follow-up of 18 years*. *J Clin Oncol*, 7:1239-1251, 1989.
- 59) Rosen P., Groshen S., Saigo P.E., Kinne D.W., Hellman S.: *A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma*. *J Clin Oncol*, 7:355-366, 1989.
- 60) Start R.D., Flynn M.S., Cross S.S., Rogers K., Smith J.H.: *Is the grading of breast carcinomas affected by a delay in fixation?* *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathology*, 419:475-7, 1991.
- 61) Steele R.J.G., Forrest A.P.M., Gibson T.: *The efficacy of lower axillary sampling in obtaining lymph node status in breast cancer: a controlled randomized trial*. *Br J Surg*, 72:368-9, 1985.
- 62) Weidner N., Moore D.H., Ljung B.M., Waldman F.M., Goodson W.H., Mayall B., Chew K., Smith H.S.: *Correlation of bromodeoxyuridine (BRDU) labelling of breast carcinoma with mitotic figure content and tumor grade*. *Am J Surg Pathol*, 17:987-94, 1993.
- 63) Yorkshire Breast Cancer Group.: *Critical Assessment of the clinical TNM system in breast cancer*. *Br Med J*, 281:134-6, 1980.
- 64) Yoshimoto M., Sakamoto G., Ohashi Y.: *Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer*. *Cancer*, 72:2993-3001, 1993.

Autore corrispondente:

Dott. Fabio PUGLISI
 Università di Udine
 Dipartimento di Ricerche Mediche e Morfologie
 Clinica Oncologica
 P.azzale SM Misericordia
 33100 UDINE

