

Original

Proliferación celular cuantificada mediante el índice de actividad mitótica y PCNA en relación con el estado de los receptores hormonales en el cáncer de mama

M.J. Palomo-González, A. Gúezmes-Domingo, J. Pérez-Requena, M. Rego-González* y A. López-Muñoz**

Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz,

**Técnico Especialista de Anatomía Patológica, **Departamento de Histología, Facultad de Medicina de Cádiz.*

SUMMARY

Background: The relationship between cellular proliferation factors and ER/PR status in breast cancer was studied. Material and method: One hundred cases of breast cancer treated by lumpectomy/mastectomy were studied. Standard histological studies, mitotic activity index, PCNA and immunohistochemical and biochemical ER/PR determinations were carried out. Results: An inversely significant relationship was found between mitosis and ER/PR values (immunohistochemically and biochemically determined). A less significant inverse relationship was found between PCNA and steroid receptor status. Conclusions: Cellular proliferation and steroid receptors status are related parameters in an inverse fashion. The presence of steroid receptors indicate good differentiation and they contribute to control of tumor cell proliferation in breast cancer. Rev Esp Patol 1998; 31(3): 207-215.

Key words: Breast cancer - Proliferation indices - PCNA - Steroid receptors

RESUMEN

Introducción: En el presente trabajo se estudia la relación entre factores de proliferación celular y el estado de los receptores hormonales en el cáncer de mama. Material y método: El estudio se realizó sobre 100 casos de tumorectomía/mastectomía, efectuándose en todos ellos el estudio histopatológico rutinario, el índice de actividad mitótica, PCNA, y la determinación inmunohistoquímica y bioquímica de RE y RP. Resultados: Existió una relación inversa significativa entre el número de mitosis y el valor de los receptores hormonales, tanto determinados inmunohistoquímica como bioquímicamente. Se apreció una relación inversa con menor significación entre PCNA y RE/RP. Conclusiones: La proliferación celular y el estado de los receptores hormonales son parámetros relacionados de manera inversa, al ser estos últimos factores que indican una buena diferenciación y ejercen un control sobre la proliferación de las células tumorales. Rev Esp Patol 1998; 31(3): 207-215.

Palabras clave: Cáncer de mama- Mitosis - Índices de proliferación - PCNA - Receptores hormonales

INTRODUCCIÓN

La proliferación celular constituye un dato de marcada significación pronóstica en el carcinoma de mama. De hecho, la tasa proliferativa tumoral ha sido definida por algunos autores como el componente aislado de mayor valor pronóstico entre los parámetros histológicos, al considerarse que determina la velocidad de crecimiento tumoral (1).

El recuento mitótico o índice de actividad mitótica [cifra de mitosis contabilizadas en 10 campos de gran aumento (CGA)] y el índice mitótico (número de mitosis presentes en 1000 células tumorales) han sido parámetros tradicionalmente utilizados (2) en la cuantificación de la proliferación celular.

Cualquier sistema de recuento mitótico exige que la célula se halle en la fase M del ciclo celular, más específicamente en metafase o anafase, donde la mitosis resulta ópticamente reconocible. Sin embargo, existen numerosos factores que restan fiabilidad a estos sistemas (2).

El recuento mitótico se realiza con el objetivo de 400 aumentos en varios campos microscópicos consecutivos, seleccionando aquellos de mayor celularidad (3), preferiblemente en el frente de infiltración tumoral, habiendo sido propuesta por varios observadores (4) la utilización de controles de calidad mediante recuentos independientes.

El PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) es una proteína auxiliar de la polimerasa delta que desempeña un papel fundamental en el ciclo de proliferación celular, siendo detectable inmunohistoquímicamente desde la mitad de la fase G1 hasta el final de la fase S (5). Se ha considerado un parámetro fiable de proliferación celular (2), y diversos estudios (6) han demostrado una clara relación directa entre el PCNA y otros factores de proliferación, así como con el índice de actividad mitótica y con el grado histológico del tumor (7). Otros estudios no detectan una relación tan clara debido, entre otras razones, a que el PCNA interviene, además, en la reparación del DNA, expresándose por tanto en ocasiones fuera del ciclo mitótico (32, 33). Asimismo, las diferencias observadas entre el PCNA y el Ki67 se han atribuido a que el Ki67 es un marcador de proliferación celular más específico que el PCNA.

La cuantificación inmunohistoquímica del PCNA permite estudiar su heterogeneidad y su diferente distribución en el centro y en la periferia tumoral, datos cuya importancia ha sido reseñada por varios autores (8-10).

Aún está por determinar si el PCNA puede considerarse como factor aislado de significación pronóstica en el carcinoma de mama.

Por otro lado, se conoce el valor de la determinación de los receptores hormonales, tanto en la selección de pacientes candidatas a hormonoterapia como en la predicción de la supervivencia en los casos de cáncer de mama.

Los numerosos estudios que han tratado de relacionar la fracción de crecimiento tumoral con el estado de los receptores de estrógeno (RE) han obtenido resultados contradictorios (9-15, 29-31).

La relación entre receptores hormonales y factores de proliferación es compleja y se halla por determinar si son factores relacionados, pero independientes en el tiempo de evolución, o si se trata de factores dependientes entre sí.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio se ha llevado a cabo observando 100 casos de carcinoma de mama obtenidos mediante tumorectomía, cuadrantectomía o mastectomía recibidos en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz entre enero de 1992 y octubre de 1993.

En cada caso, la pieza quirúrgica fue tallada sistemáticamente, incluyéndose cortes representativos de la tumoración, piel, parénquima no tumoral y ganglios linfáticos.

Un fragmento tumoral de 1 cm³ o 500 mg, libre de grasa, se remitió ultracongelado en nitrógeno líquido a un laboratorio de referencia para la determinación bioquímica cuantitativa del contenido citosólico de RE y receptores de progesterona (RP) mediante el sistema de carbón recubierto por dextrano (DCC), siendo considerados positivos los valores superiores a 3 femtomoles/mg para los RE y mayores de 10 femtomoles/mg para los RP. De los 100 casos sólo en 94 pudo efectuarse el estudio mediante DCC, al no reunir los seis restantes las condiciones técnicas necesarias para el mismo (recepción de la muestra en fresco y/o tamaño tumoral suficiente).

Para la determinación inmunohistoquímica de los RE y RP se fijó un fragmento tumoral en Methacarn (metanol, cloroformo y ácido acético) y posteriormente en metanol, metilbenzoato y xilol, y se incluyó en parafina.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales frente al receptor de progesterona (anticuerpo monoclonal de ratón

tipo IgG1 Kappa, clon 1A6, Dako) y frente a la proteína asociada al receptor de estrógeno (p29) (anticuerpos monoclonales de ratón tipo IgG1, clon OR5D5 B11D 1E6, Laboratorios Biogenex).

La incubación del anticuerpo primario fue de 1 hora a temperatura ambiente para la proteína asociada al RE (dilución 1:40), y de 2 horas para el RP (dilución 1:40); la del anticuerpo secundario biotinilado fue de 30 minutos a 40 °C. Posteriormente se añadió el complejo avidina marcado con fosfatasa alcalina (20 minutos a 40 °C), y finalmente el sustrato/cromógeno fosfatasa/Fast Red (20 minutos a 40 °C). La contratinción se efectuó con hematoxilina acuosa de Mayer.

El estudio inmunohistoquímico se realizó en tandas de 10 casos cada una, en días diferentes, utilizando en cada una controles positivos y negativos correspondientes a casos de carcinoma de mama con inmunopositividad conocida (y corroborada también mediante DCC), incubándose para control negativo, sin anticuerpo primario.

El método inmunohistoquímico para la determinación del PCNA (PC10, Dako) constó de pasos similares con tiempos de incubación de 15 minutos para los anticuerpos primario (dilución 1:10) y secundario a 40 °C.

El índice de actividad mitótica se evaluó contabilizando el número de figuras mitóticas reconocibles (16), siendo consideradas como tales aquellas en las cuales no se evidenciaba la membrana nuclear y la cromatina se disponía en filamentos condensados situados en metafase/anafase o en agrupamientos separados de telofase (17). Para el recuento se seleccionaron las áreas de mayor celularidad de las zonas tumorales de invasión periférica, estudiando las mitosis presentes en 10 CGA.

La evaluación inmunohistoquímica de los RE y RP se efectuó cuantificando el número de células con inmunotinción positiva (expresado porcentualmente) y la intensidad predominante de la inmunotinción (1: débil, 2: media, 3: intensa) y aplicando la fórmula del HISTOCORE (18). La inmunotinción es nuclear en el caso de los RP y citoplasmática en la proteína asociada al RE.

$$\text{HISTOCORE: } [\text{Intensidad (1, 2, 3)+1}] \times \text{\% células positivas}$$

Se consideraron positivos los valores superiores a 100 (18).

La cuantificación del PCNA se llevó a cabo mediante análisis visual, con ayuda de una pantalla de video-

proyección Sony KP. Se consideraron positivas aquellas células que mostraban inmunotinción nuclear granular de intensidad 2-3, contabilizándose las presentes en 10 campos de 400 aumentos y calculando posteriormente su valor porcentual.

Para el análisis estadístico se aplicaron la prueba de χ^2 (para valores categorizados de mitosis y PCNA), la t de Student y la U de Mann-Whitney, el análisis de la varianza no paramétrica, la regresión lineal simple y la correlación lineal de Pearson cuando se trabajó con valores completos.

RESULTADOS

El número de figuras mitóticas osciló entre 0 y 42 por 10 CGA, con una media de $11,3 \pm 9,6$. Veinticinco casos presentaron entre 0 y 4 mitosis, 32 casos entre 5 y 10, y 43 de ellos más de 10 mitosis (Fig. 1).

El PCNA mostró un valor máximo de 71% y un valor mínimo de 0,2%; la media fue de $13,27 \pm 4,10$. La Fig. 2 ilustra la frecuencia de su distribución.

La subdivisión en grupos considerados de baja y alta tasa de proliferación, correspondientes a los menores y mayores de 12%, respectivamente, mostró 56 casos cuyo PCNA era <12% y 44 casos de PCNA >12% (Fig. 3).

La concordancia entre la positividad y negatividad de los RE determinados por diferente método fue de un 88,2% (83 casos). Once (12,7%) fueron los casos discordantes, mostrando todos RE positivos con el método inmunohistoquímico y negativos con el bioquímico ($p < 0,001$; índice Kappa: 0,5629).

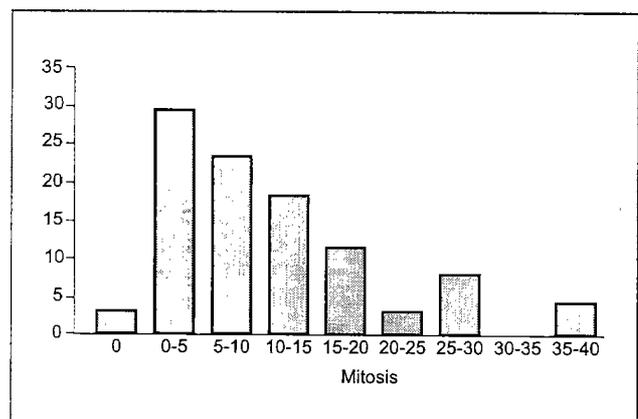


Figura 1. Distribución del índice de actividad mitótica por 10 CGA.

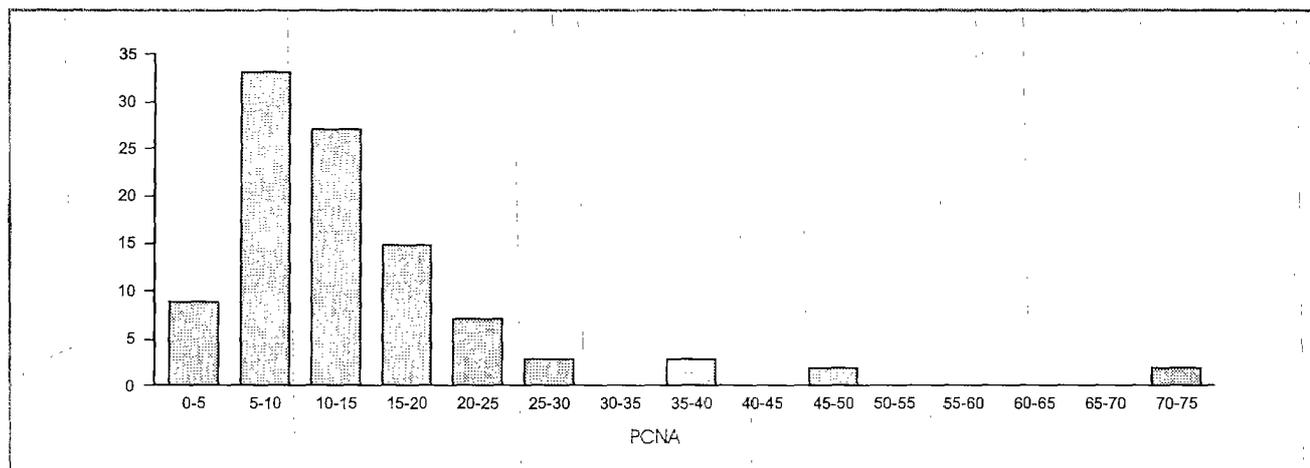


Figura 2. Distribución del PCNA (porcentaje de núcleos positivos).

De los 94 casos cuyos RP se determinaron por ambos métodos, 72 (76,5%) mostraron concordancia entre valores positivos y negativos del receptor. Existieron 21 casos discordantes (22,3%): 3 con RP positivos inmunohistoquímicamente y negativos bioquímicamente, y 19 (20,2%) DCC RP positivos y negativos con inmunohistoquímica.

El valor promedio del número de mitosis resultó mayor cuando los receptores hormonales fueron negativos, tanto los RE como los RP, determinados inmunohistoquímica y bioquímicamente.

El valor promedio de mitosis en los casos con RE bioquímicos positivos fue de $10,08 \pm 8,65$ mitosis por 10 CGA, y de $15,80 \pm 12,11$ cuando dichos receptores re-

sultaron negativos ($p < 0.05$). Cuando los RE se determinaron inmunohistoquímicamente el valor mitótico promedio en los casos con RE positivos fue de $11,14 \pm 9,79$ y de $12,60 \pm 6,58$ en los RE negativos ($p < 0.05$).

Los casos con RP positivos mostraron un promedio de mitosis de $8,54 \pm 6,74$, y de $7,57 \pm 5,45$ cuando se determinaron mediante métodos bioquímico e inmunohistoquímico, respectivamente ($p < 0.01$).

Las mitosis en los tumores con RP negativos fueron de $15,54 \pm 11,92$ y de $13,98 \pm 10,86$ (métodos bioquímico e inmunohistoquímico) ($p < 0.01$).

La relación entre el número de mitosis y el valor de los receptores hormonales categorizados mostró una disminución progresiva del índice de actividad mitótica en comparación con las cifras altas de RE y de RP (Fig. 4).

La correlación lineal entre las cifra de mitosis y los valores de los receptores hormonales, tanto expresados mediante sus valores completos como mediante su logaritmo en base 10, mostraron una relación lineal negativa estadísticamente significativa o próxima a la significación (Fig. 5).

Tumores con 10 o más mitosis por 10 CGA presentaban un mayor número de casos con receptores hormonales negativos que aquellos con cifras mitóticas entre 4 y 10, siendo menor aún el número de casos con receptores negativos entre los tumores con menos de 4 mitosis por 10 CGA (Tabla 1).

El valor promedio del PCNA en relación con la positividad y negatividad de los receptores hormonales se recoge en la Tabla 2.

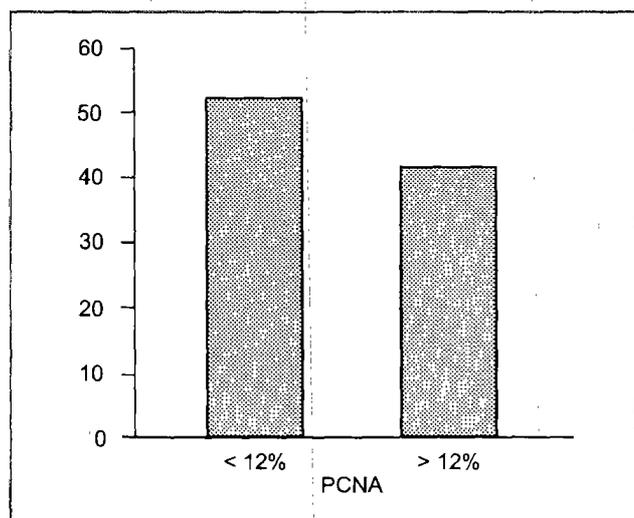


Figura 3. Distribución de casos según PCNA mayor o menor de 12%.

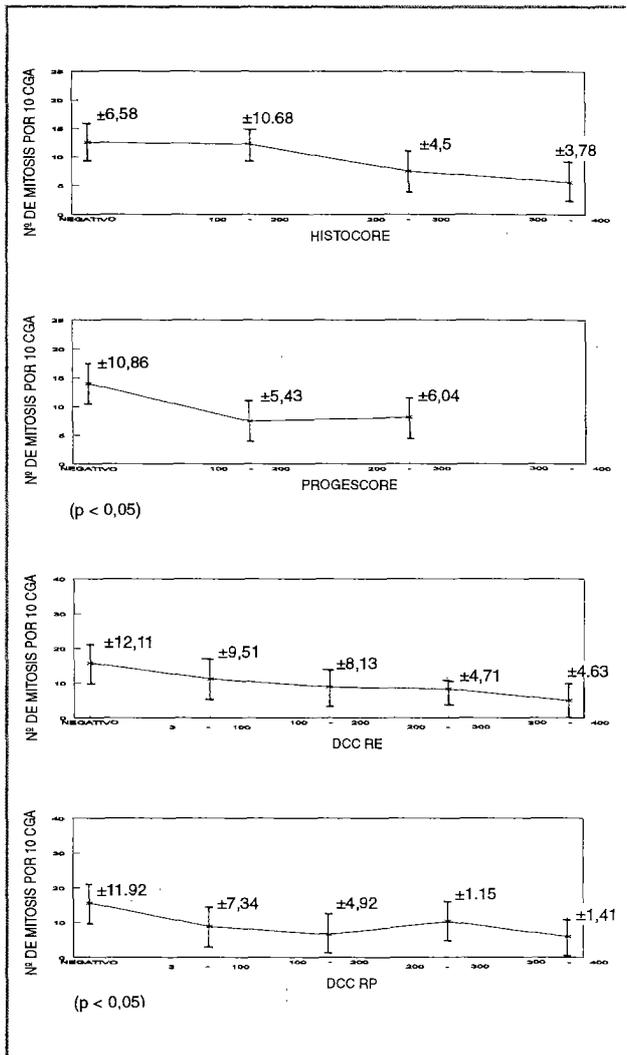


Figura 4. Relación entre el índice de actividad mitótica y los RH categorizados por grupos (análisis de la varianza no paramétrica). DCC RE y DCC RP en femtomoles/mg; HISTOCORE: valor inmunohistoquímico de RE; PROGSCORE: valor inmunohistoquímico de RP.

La Tabla 3 refleja la relación entre los valores categorizados del PCNA y la negatividad/positividad de los receptores. Tan sólo en la relación entre los RE inmunohistoquímicos y el PCNA agrupados en mayores y menores de 12%, y entre los RP determinados bioquímicamente y el PCNA categorizado en mayor y menor de 25%, los resultados fueron próximos a la significación estadística ($p=0.07$) en la relación RE/PCNA 12%, y estadísticamente significativos ($p<0.05$) en la relación RP bioquímicos/PCNA 25%, demostrando una mayor proporción de casos con receptores hormonales negativos entre los tumores con PCNA alto.

En nuestro estudio las cifras de PCNA y mitosis mostraron una asociación entre ambas, tanto en sus valores cuantitativos como categorizados (χ^2 y análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis), aunque dicha asociación no alcanzó significación estadística ($p>0.05$). La regresión lineal presentó un coeficiente de correlación de 0,10 con un intervalo de confianza del 95% entre $-0,10$ y $0,29$, lo que indica que existe una relación lineal directa positiva débil entre ambas variables, aunque no es significativa.

DISCUSIÓN

Existen numerosos datos biológicos que demuestran la participación directa de la cinética celular en la respuesta a los tratamientos hormonales en el cáncer de mama.

Muchos estudios han verificado la relación existente entre los receptores hormonales y la actividad proliferativa tumoral tanto *in vivo*, utilizando la incorporación de timidina tritiada (19), como estudiando el contenido en receptores esteroideos y la actividad proliferativa en el cáncer de mama operable (20). Estos datos sugieren la posibilidad de que tumores con RE positivos y una alta incorporación de timidina pueden ser resistentes a las hormonas, y que tumores con escasa capacidad proliferativa muestran una mayor respuesta a la hormonoterapia.

Esto significa que tumores con una alta proliferación pueden haber escapado al control ejercido por las hormonas sobre su crecimiento, pudiendo ocurrir éste sin precisar estímulo hormonal para promoverlo o controlarlo (14).

Otros autores defienden que la cinética celular influye sobre el contenido en RE, habiéndose demostrado mediante experimentos de sincronización celular que la síntesis de RE y RP ocurre durante todas las fases del ciclo celular, con predominio en G1 y G2, mostrando decremento de dicha síntesis durante la fase S, y que, por otro lado, la síntesis de DNA y la proliferación celular tienen lugar preferentemente en las células tumorales con RE negativos (8).

Si bien el marcador utilizado en nuestro estudio no es el verdadero RE nuclear sino la proteína asociada al RE (p29), hemos considerado su positividad y sus valores como equivalentes dada la existencia de estudios que avalan dicha equivalencia, no sólo en la relación entre p29 y RE determinados inmunohistoquímicamente, sino

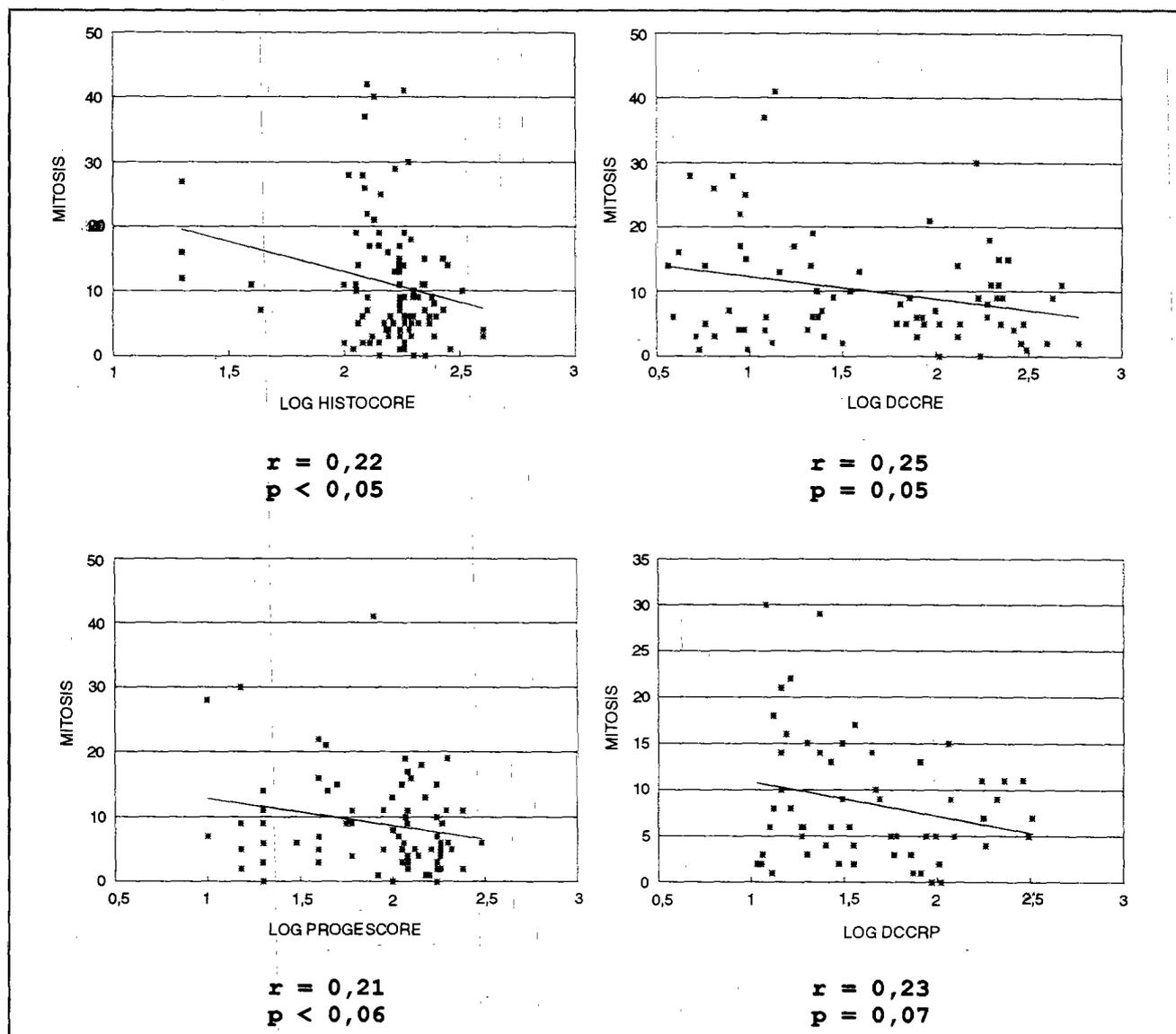


Figura 5. Relación entre el índice de actividad mitótica y los receptores hormonales (relación lineal simple). DCC RE y DCC RP en femtomoles/mg; HISTOCORE: valor inmunohistoquímico de RE; PROGSCORE: valor inmunohistoquímico de RP.

también mediante DCC RE (25). Por otro lado, la síntesis de la proteína p29 depende directamente de la integridad funcional de los RE, siendo por tanto un factor cuya presencia puede considerarse que refleja la cantidad y funcionalidad de los RE presentes en la célula.

Nuestro estudio pone de manifiesto una estrecha asociación entre la actividad mitótica en el cáncer de mama y el estado hormonal del mismo. Así, hemos detectado una relación inversa significativa entre el índice de actividad mitótica y las cifras de los receptores hormonales,

considerados cuantitativamente y según su positividad y negatividad. Estos resultados fueron similares cuando se utilizó el método inmunohistoquímico para la determinación hormonal y cuando dicha determinación se hizo por el método bioquímico.

Estos resultados coinciden con los descritos por Stierer (28), que detectó una asociación similar entre la actividad mitótica y los RE y RP, describiendo además una mayor intensidad de inmunotinción de los receptores hormonales en los casos con una tasa mitótica menor.

Tabla 1. Relación entre la positividad y la negatividad de los receptores hormonales y el índice de actividad mitótica categorizado (prueba de χ^2).

Mitosis	HISTOCORE positivo/negativo	DCC RE positivo/negativo	PROGESCORE positivo/negativo	DCC RP positivo/negativo
0-3	19/1	15/4	11/9	14/5
4-10	36/1	33/2	19/18	25/10
>10	35/8	26/14	12/31	18/22
p		<0.01	<0.05	<0.05

Tabla 2. Valores promedio de PCNA en relación con la positividad y negatividad de los receptores hormonales determinados por el método bioquímico e inmunohistoquímico (t de Student y U de Mann-Whitney).

	HISTOCORE positivo	HISTOCORE negativo	DCC RE positivo	DCC RE negativo
PCNA (%)	12,72±10,20	12,88±5,98	13,48±10,79	11,06±5,98
	PROGESCORE positivo	PROGESCORE negativo	DCC RP positivo	DCC RP negativo
PCNA (%)	13,47±13,20	12,21±6,5	14,13±11,9	11,19±5,6

Tabla 3. Relación entre los valores categorizados de PCNA y la positividad/negatividad de los receptores (prueba de χ^2 y prueba exacta de Fisher).

PCNA (%)	HISTOCORE positivo/negativo	DCC RE positivo/negativo	PROGESCORE positivo/negativo	DCC RP positivo/negativo
0-12	53/3	42/10	24/32	42/10
>12	37/7	32/10	18/26	25/17
p	0.07			
0-4,5	12/1	8/3	8/5	7/4
>4,5	78/9	66/17	34/53	50/33
0-25	84/10	68/20	38/56	51/37
>25	6/0	6/0	4/2	6/0
p				<0.05
0-4,5	12/1	8/3	8/5	7/4
4,5-12	41/2	34/7	16/27	25/16
>12	37/7	32/10	18/26	25/17

Gaffney y cols. (3) describieron una relación inversa en los carcinomas de mama entre el estado de los RE y RP y el índice mitótico, detectando que la gran mayoría de tumores con un índice mitótico bajo mostraban positividad para ambos receptores. Sin embargo, no apreciaron que la concentración de los receptores guardara relación ni con el índice mitótico ni con la fracción de la fase S.

Para algunos autores (1) la asociación entre la alta tasa proliferativa y las bajas concentraciones hormonales se

relaciona a su vez con el grado histológico, que suele ser superior en los tumores con mayor número de mitosis.

La capacidad proliferativa tumoral determina en gran medida no sólo la velocidad de crecimiento tumoral sino también su pronóstico global. Así, los trabajos de Bies-terfeld y de Miller describen una asociación estrecha entre la tasa mitótica y el pronóstico, fundamentalmente en los casos sin metástasis axilares (21).

Otros estudios encuentran una asociación entre la actividad mitótica y el número de metástasis axilares (3, 22, 23).

En numerosos trabajos (9, 11, 14, 19, 24, 26) la tasa proliferativa tumoral determinada mediante marcadores inmunohistoquímicos (Ki67, PCNA) o timidina tritiada se han estudiado en relación con los receptores hormonales en el cáncer de mama.

Diferentes autores han detectado una relación inversa entre el Ki67 y la tasa de RE determinados tanto bioquímica (12-14, 24) como inmunohistoquímicamente (11, 26). Otros trabajos, como el de McGurrin y cols. (14), no han encontrado una asociación entre Ki67 y DCC RE, pero sí apreciaron que los tumores con una tasa muy alta de Ki67 resultaron RE negativos.

Paradiso (19) encontró una relación inversa similar entre el índice de incorporación de timidina tritiada y los RE estudiados bioquímicamente. Por último, Romain (27) describe hallazgos similares en relación a los RP.

El PCNA, que en distintos trabajos (7, 9, 10) ha mostrado una asociación significativa con el pronóstico (9), las tasas de supervivencia global (7, 31) y el grado histológico (7, 10, 29-31), en la literatura revisada ha demostrado una relación variable con el estado de los receptores hormonales en el cáncer de mama (7, 29-31). Magno y cols. (9) encontraron una asociación débil, no significativa, entre el PCNA y el estado hormonal agrupando los valores de PCNA en mayores y menores de 4,5%. Betta y cols. (29) describieron una relación inversa significativa entre el PCNA (considerando la línea de corte en el 50%) y los RE determinados mediante la proteína pS2. Haerslev y cols. (31) encontraron una relación inversa similar con el estado hormonal cuando consideraron altas las cifras de PCNA >25%.

Los resultados de nuestro estudio fueron similares a los descritos por Magno y cols. (9), evidenciando únicamente una asociación débil no significativa entre los RE y RP y el PCNA categorizado en mayor y menor del 4,5%. Sin embargo, detectamos una relación inversa entre los RE y RP, determinados tanto inmunohistoquímica como bioquímicamente, y el PCNA cuando consideramos valores altos de PCNA los mayores de 12% y bajos aquellos inferiores a 12%. Esta relación resultó estadísticamente significativa en el caso de los RE inmunohistoquímicos.

Nuestros hallazgos sugieren que, considerando el punto de corte de la categorización del PCNA en el 12%, se obtiene la mejor relación entre dicho índice de proliferación y los receptores hormonales. Asimismo, indican que la relación entre el PCNA y los receptores resul-

ta más significativa cuando éstos se determinan inmunohistoquímicamente que cuando se estudian por el método bioquímico. Los mejores resultados obtenidos con la categorización del PCNA superior e inferior al 12% nos hacen pensar que dicho punto de corte, apenas descrito en la literatura revisada, puede resultar bastante adecuado en la separación entre tumores de alta y baja tasa proliferativa, afirmación que habrá de comprobarse con estudios más amplios.

La ausencia de asociación significativa entre el PCNA y las mitosis puede estar relacionada con la doble función que ha demostrado tener el PCNA, interviniendo no solamente en el ciclo de proliferación celular sino también en los mecanismos de reparación del DNA (32, 33), motivo por el que el PCNA y las mitosis no pueden considerarse parámetros biológicamente superponibles.

Los marcadores de proliferación celular han demostrado estar involucrados no sólo en el curso clínico del carcinoma de mama, sino además en su capacidad de respuesta a la terapia hormonal, pudiendo ser considerados por tanto marcadores de sensibilidad a las hormonas. Esto nos obliga a estudiarlos e incluirlos en los informes histopatológicos de todo cáncer de mama a fin de aportar al oncólogo toda la información disponible con la que evaluar la agresividad de cada tumor y diseñar su estrategia terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Biesterfeld S, Noll I, Noll E, Wohltmann D, Böcking A. *Mitotic frequency as prognostic factor in breast cancer*. Hum Pathol 1995; 26: 47-52.
2. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. *Clinical application of morphology and immunocytochemical assessments of cell proliferations*. Am J Clin Pathol 1992; 97(5) (Editorial).
3. Gaffney EV, Venz-Williamson TL, Hutchinson G, Biggs PJ, Nelson KM. *Relationship of standardized mitotic indices to other prognostic factors in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med 1996; 120: 473-477.
4. Ellis PSJ, Whitehead R. *Mitosis counting: A need for reappraisal*. Hum Pathol 1981; 12: 3-4.
5. Triviño-López A, Carbajo-Pérez E, López-Muñoz A, Claros-González I, Herrero-Zapatero A. *El antígeno de proliferación celular. Respuestas complejas a un apelativo simple*. Patología 1994; 27: 343-347.
6. García RL, Coitera MD, Gown AM. *Analysis of proliferative grade using PCNA/CYCLIN monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues*. Am J Pathol 1989; 134(4): 733-739.
7. Taham SR, Neuberger DS, Dieffenbach A, Yacoub L. *Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by Proliferating Cell Nuclear Antigen score*. Cancer 1993; 71: 3552-3559.

8. Aaltomaa S, Lipponen P, Papinaho S, Syrjänen K. *Proliferating Cell Nuclear Antigen (PC10) immunolabelling and other proliferation indices as prognostic factors in breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol 1993; 119(5): 228-294.
9. Magno WB, Hirschfield L, Bhuiya T, Harrison G, Mir R. *Correlation of proliferative index (PCNA reactivity and Ki67 reactivity) in primary breast carcinoma with hormone status, lymph node status and disease-free survival*. Conn Med 1992; 56(12): 667-669.
10. Siitonem SM, Isola JJ, Rantala IS, Helin HJ. *Intratumoral variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by Proliferating Cell Nuclear Antigen immunohistochemistry using monoclonal antibody 19A2 and a new antigen retrieval technique has a prognostic impact in archival paraffin embedded node-negative breast cancer*. Am J Pathol 1993; 142(4): 1081-1089.
11. González-Cámpora R, Gómez A, Mora J y cols. *Relación entre fracción de crecimiento tumoral, estado de receptores esteroideos y variables clínicas e histopatológicas en el cáncer de mama*. Patología 1991; 24: 39-45.
12. Meyer JS, Prey MU, Babcock DS, McDivit RW. *Breast carcinoma cell kinetics, morphology, stage and host characteristics. A thymidine labelling study*. Lab Invest 1986; 54: 41-51.
13. Helin ML, Helle MJ, Helin HJ, Isola JJ. *Proliferative activity and oestroid receptors determined by immunohistochemistry in adjacent frozen sections of 102 breast carcinomas*. Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 854-857.
14. McGurrin J, Doriá MI, Dawson PJ, Karrison T, Stein HD, Kranklin WA. *Assessment of tumor cell kinetics by immunohistochemistry in carcinoma of breast*. Cancer 1987; 59: 1744-1750.
15. Barnard NJ, Hall PA, Lemdine NR, Kadar N. *Proliferative index in breast carcinoma in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables*. J Pathol 1987; 152: 278-295.
16. Baak JPA, Van Dop H, Kurver PHJ y cols. *The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer*. Cancer 1985; 56: 374-382.
17. Van Diest PJ, Baak JPA, Matze-Cok P. *Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancers specimens*. Hum Pathol 1992; 23: 603-607.
18. Sirvent JJ, Salvadó MT. *Receptores de estrógenos en el cáncer de mama. Estudio inmunohistoquímico en material congelado e incluido en parafina*. Clin Invest Gin Obst 1990; 17(5): 180-186.
19. Paradiso A, Tommasi S, Mangia A, Loruso V, Simone G, De Lena M. *Tumor-proliferative activity, progesterone receptor status, estrogen receptor level and clinical outcome of E-R positive advanced breast cancer*. Cancer Res 1990; 50: 2958-2962.
20. Silvestrini R, Daidone MG, Bertuzzi A, Di Fronzo G. *Relationship between estrogen receptors and cellular proliferation*. Recent Results Cancer Res 1984; 91: 163-168.
21. Miller WR. *Prognostic factors in breast cancer (Guest editorial)*. Br J Cancer 1992; 66: 775-776.
22. Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjänen K. *Prognostic value of cell proliferation in breast cancer as determined by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining*. Anticancer Res 1992; 12(4): 1281-1286.
23. Gasparini G, Dal Fior S, Pozza F, Vevilaqua P. *Correlation of growth fraction by Ki67 immunohistochemistry with histologic factors and hormone receptors in operable breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat 1989; 14: 329-336.
24. Bacus S, Goldschmidt R, Chin D, Moran G, Weinberg D, Bacus JW. *Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers*. Am J Pathol 1989; 135(5): 783.
25. Marsigliante S, Greco S, Biscozzo L y cols. *Transcriptionally active non-ligand binding oestrogen receptors in breast cancer*. Cancer Lett 1992; 66(3): 183-191.
26. Smyth CM, Benn DE, Reeve TS. *An enzyme immunoassay compared with a ligand-binding assay for measuring progesterone receptors in cytosols from breast cancers*. Clin Chem 1988; 34: 1116-1118.
27. Romain S, Christensen IJ, Chinot O y cols. *Prognostic value of cytosolic thymidine kinasa activity as a marker of proliferation in breast cancer*. Int J Cancer 1995; 61(1): 7-12.
28. Stierer M, Rosen H, Weber R, Hannak H, Spona J, Tücher H. *Immunohistochemical and biochemical measurements of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer*. Ann Surg 1993; 218(1): 13-21.
29. Betta PG, Bottero G, Pavesi M, Pastormerlo M, Bellinger D, Tallarida F. *Cell proliferation in breast carcinoma assessed by PCNA grading and its relationship to other prognostic variables*. Surg Oncol 1993; 2(1): 59-63.
30. Frierson HF. Jr. *Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas: Comparison with clinical and pathological variables*. Mod Pathol 1993; 6(3): 290-294.
31. Haerslev T, Jacobsen GK, Zadeler K. *Correlation of growth fraction by Ki67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat 1996; 37(2): 101-113.
32. Morris GF, Bischoff JR, Mathews MB. *Transcriptional activation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by p53*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(2): 895-899.
33. Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS. *Homologous regions of Fen1 and p21Cip1 complete for binding to the same site on PCNA: A potential mechanism to coordinate DNA replication and repair*. Oncogene 1997; 14(19): 2313-2321.

