

Indicadores de Prognóstico em Câncer de Mama com Axila Negativa: Receptor de Estrógeno e Expressão de P53 e de c-erbB-2

Prognostic Indicators In Lymph Node-Negative Breast Cancer: Estrogen Receptor and P53 and c-erbB-2 Protein Expression

Adriana Harter Teixeira Bolaséll, Cláudio Galleano Zettler, Jeferson Vinholes
Simone Márcia Machado, Cláudia Kliemann

RESUMO

Objetivo: avaliar o valor prognóstico do receptor de estrógeno e da expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 no câncer de mama com axila negativa.

Métodos: foi realizado estudo imuno-histoquímico em material incluído em parafina, do arquivo do Instituto de Pesquisas Cito-Oncológicas (IPCO) da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), de 50 casos de câncer de mama sem comprometimento dos linfonodos axilares, em mulheres menopausadas, tratadas na Irmandade da Santa Casa de Porto Alegre (ISCMPA) e no Hospital Santa Rita de Porto Alegre (HSR) de janeiro 1990 a dezembro de 1994. Para análise estatística foram utilizados os testes de χ^2 com correção de Yates, teste exato de Fisher e curvas de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier comparados pelo teste log rank. O seguimento médio das pacientes foi de 3,6 anos (3,1-4,5). Dos 50 casos, 14 apresentaram recidiva no período observado.

Resultados: a média de idade foi 61 anos (variação de 46 a 78 anos). A mastectomia radical modificada (MRM) foi realizada em 35 pacientes (70%) e 15 (30%) foram submetidas a setorectomia com esvaziamento axilar e posterior radioterapia. Metade das pacientes que apresentaram recidiva apresentaram-na nos três primeiros anos após o diagnóstico. O tamanho médio do tumor foi 2,8 cm (1,98-3,13) e o tipo histológico mais freqüente foi o carcinoma ductal infiltrante de tipo histológico não-especial (92%), conforme a graduação histológica de Bloom e Richardson, sendo 3 grau I (6,6%), 35 grau II (76%) e 8 grau III (17,4%); nos tumores que recidivaram não houve nenhum grau I, 9 (25,7%) eram grau II e 3 (37,5%) eram grau III. Em relação ao prognóstico, a taxa de intervalo livre de doença foi menor quando da associação de tumor pouco diferenciado (grau III) com receptor de estrógeno negativo ($p = 0,006$), p53 positivo ($p = 0,006$) e c-erbB-2 positivo ($p = 0,001$).

Conclusão: mulheres menopausadas com câncer de mama sem comprometimento dos linfonodos axilares tem pior prognóstico, em relação ao intervalo livre de doença, quando apresentam associação de tumor pouco diferenciado com RE negativo, p53 positivo e c-erbB-2 positivo.

PALAVRAS-CHAVE: Mama: câncer. Metástases. Receptor para estrógeno. Oncogenes. Câncer: prognóstico. Menopausa.

Instituto de Pesquisas Cito-Oncológicas Dr. Heitor Cirne Lima
Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre
Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e
Hospital Santa Rita de Porto Alegre
Correspondência:
Adriana Harter Teixeira Bolaséll
Rua Costa, 361/505
90110-270 – Porto Alegre – RS
Tel.: (51) 231-8791 - Fax (51) 231-1500
e-mail: bolasell@cpovo.net

Introdução

O câncer de mama é um grave problema de saúde em todo o mundo, atingindo as mulheres preferencialmente após os 40 anos de idade^{1,2}. Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer, o RS é o estado com o maior número de casos, com aproximadamente 8.250 eventos no-

vos em 98. Segundo os dados de Ribas³, 53% dos casos, no RS, ocorrem entre os 41 e 60 anos, sendo que 75% são mulheres menopausadas. O número de fatores relacionados ao câncer, que vêm sendo avaliados para prever o prognóstico de pacientes com câncer de mama, tem crescido de forma impressionante nos últimos anos^{1,4}. Alguns aspectos histológicos, tamanho do tumor, receptores hormonais e estado dos linfonodos já são fatores estabelecidos⁴⁻⁹. A ploidia, fase S, fatores de crescimento, oncogenes e produtos de oncogenes estão em fase de pesquisa⁶⁻¹⁰. O interesse por fatores prognósticos tem sido estimulado pelo sucesso relativo da terapia adjuvante em estágios iniciais de câncer de mama¹¹⁻¹⁴. Atualmente não há um único fator prognóstico que possa ser usado isoladamente para o câncer de mama com axila negativa, então, qualquer fator ou combinação de fatores que indiquem corretamente quais as pacientes que estão destinadas à recorrência e quais as que não estão é de considerável importância, pois assim, pacientes destinadas à recorrência poderiam ser selecionadas para terapia sistêmica adjuvante, ao passo que aquelas com um risco menor poderiam ser poupadas da morbidade desse tratamento¹³.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no controle da proliferação das células neoplásicas pode identificar os fatores ligados ao processo regulatório, contribuindo para a compreensão dos mecanismos que agem na progressão do tumor¹⁵. Inúmeros trabalhos confirmam que as neoplasias que contêm receptor de estrógeno (RE) apresentam prognóstico mais favorável que as que não o possuem, com período de sobrevida maior e melhor resposta à terapia anti-hormonal^{11,13,14,16}. A frequência e a concentração do RE aumentam com a idade da paciente, ambos alcançando seus valores mais altos nas menopausadas^{9,17,18}.

O gene supressor tumoral p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17 e é um regulador negativo da proliferação tumoral. Acredita-se que aja bloqueando as células na fase G1 ou induzindo-as à apoptose. Quando sofre mutações (p53 mutante), adquire comportamento oposto, agindo como estimulador da divisão celular¹⁹. A expressão do gene mutante p53 pode ser detectada em 4 a 26% dos casos de câncer de mama *in situ* ou invasor, dependendo do critério de positividade²⁰⁻²⁴. Michalides et al.²⁵, num estudo anatomoclínico da superexpressão de p53 em uma série de 248 pacientes com câncer de mama operável, relataram ausência de significado prognóstico de forma isolada, mas quando associado a tumores pouco diferenciados e à ausência de RE houve forte correlação com di-

minuição do tempo livre de doença e sobrevida geral. Achados semelhantes a este foram encontrados por outros autores^{22,23}.

Os proto-oncogenes são genes normais envolvidos com crescimento celular e proliferação cujas formas mutantes promovem transformações neoplásicas¹⁷. Aproximadamente 25% dos tumores de mama mostram superexpressão de c-erbB-2^{26,27}. É mais frequentemente encontrado no componente intraductal do tumor que no invasivo⁹. Como uma variável isolada, está associada a mau prognóstico. Em pacientes com câncer de mama com axila negativa, c-erbB-2 não se mostrou um indicador prognóstico quando estudado de forma isolada, sendo dependente dos demais fatores prognósticos^{25,26,28}. Considerando os dados relatados na literatura e a importância de estudar fatores prognósticos que possam interferir no desfecho da doença, foram escolhidos três dos marcadores tumorais mais referidos na literatura (RE, p53 e c-erbB-2) para serem estudados na nossa população, correlacionando-os com características histológicas em pacientes menopausadas com câncer de mama com linfonodos axilares negativos.

Pacientes e Métodos

Este é um estudo clínico retrospectivo realizado com a revisão dos prontuários de 50 pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama sem comprometimento dos linfonodos axilares atendidas e tratadas na ISCMPA e HSR de Porto Alegre, de janeiro de 1990 a dezembro de 1994. Realizou-se estudo imuno-histoquímico do material incluído em parafina do arquivo do IPCO, usando-se a técnica da avidina-biotina-peroxidase. Utilizou-se anticorpo anti-receptor de estrógeno (mouse *anti-human*) produzido pela Dako Corporation (Cod. M7047 clone 105) na diluição 1:50, anticorpo anti-proteína p53 (mouse) produzido pela Dako Corporation (Cod. 7001 clone DO-7) na diluição 1:50 e anticorpo anti-proteína c-erbB-2 Immunotech (amostra cat. 11591 clone 3Bs) na diluição 1:30. Os cortes foram corados pelo método imuno-histoquímico e foram examinados ao microscópio convencional, sendo a leitura realizada pela observação da positividade ou não. Para o estudo do RE foi considerado positivo o achado de mais de 10% de núcleos corados (Figura 1), ao passo que para p53 e c-erbB-2 considerou-se positivo o achado de 5% de células reagentes coradas no núcleo e na membrana, respectivamente (Figuras 2 e 3). Realizou-se também revisão histológica de todos os

casos, para uniformização diagnóstica, sendo utilizada a graduação de Bloom e Richardson para os casos de carcinoma ductal infiltrante de tipo histológico não-especial, em lâmina corada pela técnica de HE. Os casos selecionados foram fotografados ao fotomicroscópio de Zeiss Axioplan. A análise estatística os dados quantitativos foram descritos utilizando-se mediana (amplitude interquartil: P25-P75) e para os dados categóricos empregaram-se percentuais. Foi utilizada análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier, com comparação entre os grupos, utilizando-se o teste de χ^2 e *log rank test*. Foram elaboradas tabelas de contingência relacionando os grupos, com a frequência dos anticorpos observados na imuno-histoquímica. A frequência destes anticorpos foi expressa como percentual de casos e comparadas pelo teste de χ^2 com correção de Yates e teste exato de Fisher, quando necessário. Também foram calculados os riscos relativos (RR) com seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% utilizando-se método das séries de Taylor.

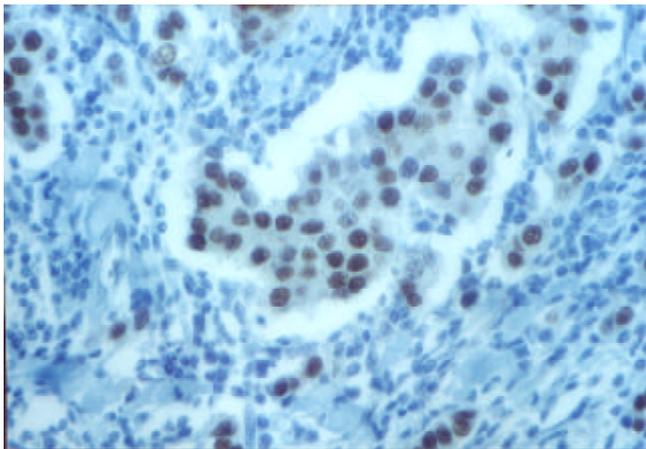


Figura 1 - Aspecto imuno-histoquímico de um tumor de mama com positividade para um receptor de estrógeno (núcleos corados em preto).

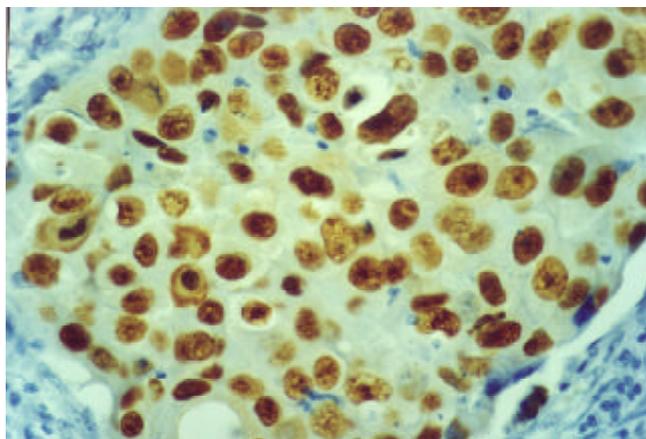


Figura 2 - Aspecto imuno-histoquímico de um tumor de mama com intensa positividade para proteína p53 (núcleos corados em marrom).

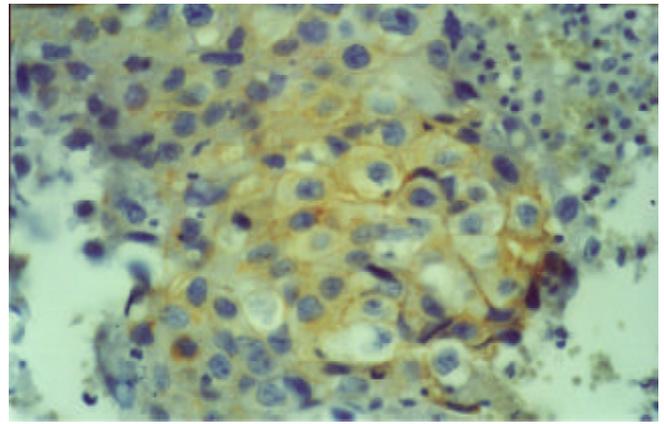


Figura 3 - Aspecto imuno-histoquímico de um tumor de mama com positividade para c-erbB-2 (membranas coradas em bege).

Resultados

A mastectomia radical modificada foi realizada em 35 pacientes (70%), ao passo que as outras 15 (30%) foram submetidas a setorectomia com esvaziamento axilar e posterior radioterapia. O tempo de seguimento médio foi de 3,6 anos e quatorze pacientes apresentaram recidiva. Neste período o tamanho médio dos tumores foi 2,8 cm (1,98-3,13). Doze pacientes tinham tumor com diâmetro menor que 2 cm (24%), e em 38 (76%) o tumor media 2 cm ou mais. O percentual geral de positividade para RE foi 50%, de p53 14% e de c-erbB-2 18%, representando 25, 7 e 9 casos, respectivamente. O carcinoma ductal invasor de tipo histológico não-especial foi encontrado em 46 pacientes (92%). O estudo do grau de diferenciação histológica pela graduação de Bloom e Richardson, nos casos de carcinoma ductal, mostrou que 3 casos foram classificados como grau I (6,6%), 35 grau II (76%) e 8 grau III (17,4%) entre os casos que apresentaram recidiva, não houve nenhum classificado como grau I, mas 9 deles receberam grau II (25,7%) e 3 grau III (37,5%). Os sítios mais frequentes de metástases foram os ósseos com 35,7%.

Dos 25 casos com RE positivo, 5 (20%) apresentaram recidiva. Na análise estatística não se encontrou diferença significativa em relação à positividade do RE e o risco de recidiva ($p = 0,403$) (Tabela 1 - Figura 4). Relacionando-se a positividade do RE com grau de diferenciação histológica, encontramos 3 (100%) casos classificados como grau I, 19 (54,3%) grau II e apenas 1 (12,5%) grau III ($p = 0,006$) (Figura 5). Dos tumores com expressão da proteína p53 ($n = 7$), 2 (28,6%) apresentaram recidiva ($p = 0,692$) (Tabela 1 - Figura 4). Quando p53 foi estudado conjuntamente com o grau de diferenciação histológica, observamos

que havia sido negativo em todos os casos grau I, positivo em 3 (8,6%) grau II e em 4 (50%) grau III ($p = 0,006$) (Figura 5). A expressão da proteína c-erbB-2 foi positiva em 9 casos, sendo que 3 (33,3%) apresentaram recidiva ($p = 0,993$) (Tabela 1 - Figura 4). Quando relacionamos c-erbB-2 com grau de diferenciação histológica, não encontramos nenhum caso positivo em tumores com grau I, 3 (8,6%) nos casos com grau II e 6 (75%) nos casos com grau III ($p = 0,001$) (Figura 5).

Tabela 1 - Fatores associados com recidiva.

variável	sim %	não %	RR	p
RE negativo	36,0	20,0	0,55 (0,22-1,43)	0,403
p53 positivo	28,6	27,9	1,02 (0,29-3,63)	0,692
c-erbB-2 positivo	33,3	26,8	1,24 (0,43-5,56)	0,176

Variáveis estudadas como indicador prognóstico independente

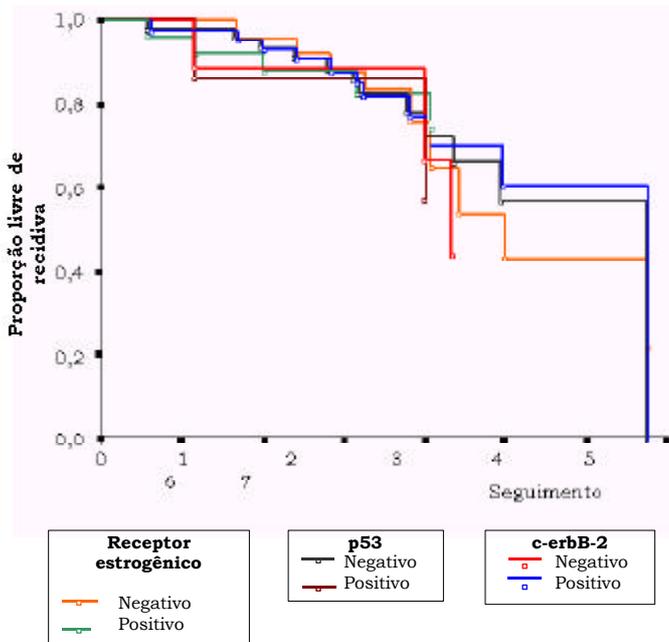


Figura 4 - Curvas de Kaplan-Meier comparando a ocorrência de recidiva em grupos RE positivo e negativo ($p = 0,403$), p53 positivo e negativo ($p = 0,692$) e c-erbB-2 positivo e negativo ($p = 0,993$)

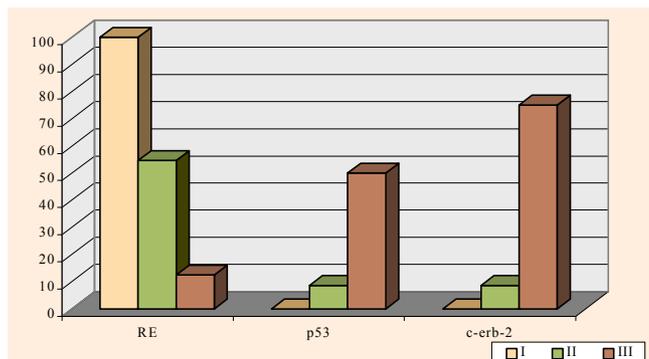


Figura 5 - Relação da positividade do RE ($p = 0,006$), p53 ($p = 0,006$) e c-erbB-2 ($p = 0,001$) com o grau de diferenciação tumoral.

Discussão

Nos últimos anos, o número de fatores prognósticos para o câncer de mama tem crescido de modo significativo. Porém, nos casos de câncer de mama em estágios iniciais, com linfonodos axilares negativos, os resultados dos trabalhos têm sido divergentes. Com o objetivo de investigar o valor destes marcadores no comportamento do câncer de mama em nossa população, foram estudados 50 casos de câncer de mama com linfonodos axilares negativos, em pacientes menopausadas tratadas na ISCMPA e no HSR de Porto Alegre no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1994. Das 50 pacientes selecionadas, 14 (28,6%) sofreram recidiva, local ou a distância, durante o tempo da pesquisa, sendo que metade delas a fez nos três primeiros anos após o diagnóstico.

Nesta pesquisa o percentual de positividade do RE foi de 50%, semelhante ao encontrado na literatura^{16,17}. A ausência do RE mostrou-se indicador para mau prognóstico somente quando associado a tumores pouco diferenciados. Este achado é concordante com o encontrado na literatura, que mostra maior positividade em pacientes pós-menopáusicas e em tumores bem diferenciados^{16,17}. Observaram-se ainda maior sobrevida e maior intervalo livre de doença em pacientes com RE positivo quando comparadas com as com tumores de mama com RE negativo e tumores pouco diferenciados^{11,13,17}.

Stenmark-Askmal et al.²⁹ estudaram 205 pacientes com câncer de mama com linfonodos axilares negativos, encontrando 11% de positividade para p53 em mulheres que apresentavam RE negativo e grau III, correlacionando tais achados com pior prognóstico. A associação entre a proteína p53 com o prognóstico de pacientes com câncer de mama e axila negativa também foi estudada por Iwaya et al.²⁴, no Japão, que relataram um estudo de tipo controle entre 32 mulheres que tiveram recidiva precoce de câncer de mama e 122 pacientes sem recidiva. Foram analisados o tamanho do tumor, a idade e a data da cirurgia (tempo de seguimento superior a 13 anos). No estudo imuno-histoquímico de p53 e de c-erbB-2 encontraram significado prognóstico somente quando houve a associação de p53 com tumores pouco diferenciados, com a tendência ao aparecimento de recidiva, o mesmo não acontecendo em relação a c-erbB-2.

Neste trabalho o percentual de expressão de p53 foi de 14%, sendo de 28,6% entre os casos que recidivaram; metade destes tumores eram indiferenciados e nenhum era bem dife-

renciado. Ao estudo estatístico ficou evidenciado pior prognóstico na associação de p53 com tumores pouco diferenciados, com conseqüente diminuição no intervalo livre de doença. Estes achados são compatíveis com os encontrados por outros autores^{30,31}.

Rosen et al.²⁶ não encontraram valor prognóstico para c-erbB-2 em 440 casos de câncer de mama com axila negativa, em um seguimento de 119 meses. Achados semelhantes também foram relatados por Gusterson et al.²⁸ em 1506 pacientes num seguimento de 10 anos, no qual c-erbB-2 não teve interferência no prognóstico, quando analisado isoladamente. Neste trabalho, o percentual de positividade de c-erbB-2 (18%) coincide com o encontrado na literatura²⁸. Como fator prognóstico independente, c-erbB-2 não mostrou significância estatística, porém quando associado com tumores pouco diferenciados (grau III), apresentou 75% de positividade, mostrando-se um indicador forte para mau prognóstico ($p = 0,001$).

Revisando os resultados obtidos por vários pesquisadores, pôde-se observar que não há uma uniformidade em relação ao significado dos fatores prognósticos conhecidos com o câncer de mama com axila negativa. Porém, é interessante que o resultado obtido nesta investigação mostrou uma associação entre os marcadores tumorais (RE, p53 e c-erbB-2) e tumores pouco diferenciados da mama. Estes achados reforçam a suposição de que há uma tendência ao pior prognóstico em pacientes com tumores pouco diferenciados quando associados à ausência do RE e à presença de p53 e de c-erbB-2.

SUMMARY

Purpose: *to evaluate the prognostic value of estrogen receptor and p53 and c-erbB-2 proteins in lymph node-negative breast cancer.*

Methods: *an immunohistochemical study was made in paraffin-embedded tissues from the file of the Instituto de Pesquisas Cito-Oncológicas of the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre of fifty cases of postmenopausal women, who were treated at the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre and at the Santa Rita Hospital from 1990 to 1994. For statistical analysis χ^2 with Yates correction, as well as exact Fisher tests were used and Kaplan Meier curves compared with log-rank test. The mean follow-up of the patients was 3.6 years (3.1-4.5). Of the 50 cases, 14 showed recurrence during the period of follow-up.*

Results: *the mean age was 61 years (46-78). Modified radical mastectomy was performed in 35 patients (70%)*

and 15 (30%) were submitted to lumpectomy/axillary dissection and postoperative radiation therapy. Fifty percent of the patients who showed recurrence did it in the first three years after the diagnosis. The mean size of the tumor was 2.8 cm (1.98-3.13) and the most frequent histological type was invasive ductal carcinoma of no special type (92%), according to the Bloom and Richardson graduation, 3 being stage I (6.6%), 35 stage II (76%) and 8 stage III (17.4%). In the tumors with recurrence, there was no grade I, 9 stage II (25.7%) and 3 stage III (37.5%). In relation to the prognosis, the disease-free interval was less when there was association of a poorly differentiated tumor with negative estrogen receptor ($p = 0.006$), positive p53 ($p = 0.006$) and positive c-erbB-2 ($p = 0.001$).

Conclusion: *postmenopausal women with lymph node-negative breast cancer showed worse prognosis in relation to disease-free interval when they presented poorly differentiated tumor associated with negative estrogen receptor, positive p53 and positive c-erbB-2.*

KEY WORDS: *Breast: cancer. Metastasis. Estrogen receptor. Oncogenes. Cancer: prognosis. Menopause.*

Referências

1. Menke CH, Biazus JV, Cavalheiro JA. Patologia maligna da mama. In: Freitas F, Menke CH, Rivoire W, Passos EP, editores. Rotinas em Ginecologia. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p.241-56.
2. Tavani A, Braga C, La Vecchia C, Negri E, Russo A, Franceschi S. Attributable risks for breast cancer in Italy: education, family history, reproductive and hormonal factors. *Int J Cancer* 1997; 70:159-63.
3. Ribas V. A contribuição da imuno-histoquímica na detecção do receptor de estrógeno e do p53 em punção-biópsia do câncer de mama [dissertação]. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre/Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; 1999.
4. Osborne CK. Prognostic factor for breast cancer: have they met their promise? *J Clin Oncol* 1992; 10:679-82.
5. Rosen PP, Grooshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11:2090-100.
6. Davis AR. Breast cancer: the search for new prognostic markers. *Br J Biomed Sci* 1996; 53:157-61.
7. Dhingra K, Hortobagyi GN. Critical evaluation of prognostic factors. *Semin Oncol* 1996; 23:436-45.

8. Bianchi S, Calzolari A, Vezzosi V, et al. Lack of the prognostic value of p53 protein expression in node-negative breast cancer. *Tumori* 1997; 83:669-72.
9. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1997; 47:28-51.
10. Velanovich V. Biological tumor markers, lymph node status and decision about adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Am Surg* 1997; 63:330-3.
11. Sertoli MR, Bruzzi P, Pronzato P, et al. Randomized cooperative study of perioperative chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13:2712-21.
12. Stal O, Stenmark-Askmal M, Wingren S, et al. p53 expression and the result of adjuvant therapy of breast cancer. *Acta Oncol* 1995; 34:767-70.
13. Clahsen PC, van de Velde CJ, Julien JP, et al. Improved local control and disease-free survival after perioperative chemotherapy for early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:745-53.
14. Swedish Breast Cancer Cooperative Group. Randomized trial of two versus five years adjuvant tamoxifen for postmenopausal early stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1543-9.
15. O'Malley FP, Saad Z, Kerkvliet N, et al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erbB-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum Pathol* 1996; 27:955-63.
16. Wyss P, Rageth JC, Unger C, Hochuli E. Prognostic and therapeutic significance of steroid receptors in invasive breast cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1992; 52:611-6.
17. Rosen PP. Biological markers of prognosis. In: Rosen PP, editor. *Breast Pathology*. 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997. p.295-319.
18. Lethaby AE, Mason BH, Harvey VJ, Holdaway IM. Survival of women with node-negative breast cancer in the Auckland region. *N Z Med J* 1996; 109:330-3.
19. Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res* 1991; 57:257-72.
20. Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, Toner PG. c-erbB-2 oncogene product expression depends on tumour type and is related to oestrogen receptor and lymph node status in human breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 1993; 189:261-6.
21. Hurlimann J. Prognostic value of p53 protein and expression in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1993; 189:996-1003.
22. Allred DC, Clark GM, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:200-6.
23. Lipponen P, JI H, Aaltomaa S, Syrjänen S, Syrjänen K. p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 1993; 55:51-6.
24. Iwaya K, Tsuda H, Fukutomi T, Tsugane S, Suzuki M, Hirohashi S. Histologic grade and p53 immunoreaction as indicators of early recurrence of node-negative breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27:6-12.
25. Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, et al. A clinicopathological study on over expression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 73:728-34.
26. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node-negative breast cancer. *Cancer* 1995; 75:1320-6.
27. Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, et al. neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:1340-9.
28. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10:1049-56.
29. Stenmark-Askmal M, Stäl O, Olsen K. South-East Sweden Breast Cancer Group. p53 as a prognostic factor in stage I breast cancer. *Br J Cancer* 1995; 72:715-9.
30. Bosari S, Lee AK, Viale G, Heatley GJ, Coggi G. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinoma with long-term follow-up. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421:291-5.
31. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi O-P. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1109-14.