

VALORACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO Y SU RELACIÓN CON OTROS FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA

ALDO REIGOSA^{1,2}, LESBIA CASTILLO³, VÍCTOR BARRIOS¹, CARLOS CALLEGARI¹, KARLA MOLINA¹, LUISA MORALES^{1,4}, TATIANA SUPERLANO¹, FELIPE SALDIVIA⁵

¹CENTRO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS Y BIOTECNOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO, ²DEPARTAMENTO DE MORFOFISIOPATOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE CARABOBO, ³DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, ⁴DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, ⁵INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO", VALENCIA, VENEZUELA.

RESUMEN

El significado del infiltrado inflamatorio intra y peritumoral en cáncer de mama es controversial. Con el objetivo de aplicar un sistema cuantitativo semiautomático para el cálculo del infiltrado inflamatorio y compararlo con otros factores pronósticos conocidos en el carcinoma invasor de la mama; se seleccionaron 124 pacientes diagnosticados y tratados en el Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño, entre los años 1987 y 1996. Este índice se relacionó con tamaño del tumor, número, estado de ganglios linfáticos axilares, tipo y grado histológico, estadio clínico y evolución de las pacientes. Se observó una leve asociación entre índice linfoidal y el estadio clínico ($P > 0,05$). Los parámetros útiles como factores pronósticos fueron el tamaño del tumor ($P < 0,01$), grado histológico ($P < 0,05$) estadio clínico ($P < 0,01$). En conclusión, en el presente estudio no se evidenció un valor pronóstico del infiltrado inflamatorio en el cáncer de mama.

PALABRAS CLAVE: Marcadores pronósticos, angiogénesis, morfometría del cáncer.

SUMMARY

The significance of the inflammatory infiltrate intra or peritumour in breast cancer is very controversial. With the objective to apply a semiautomatic quantitative system for the calculation of the inflammatory infiltrate, and compare it with other known prognostic factors in breast carcinoma we selected 124 patients diagnosed and treated in the Institute of Oncology Dr. Miguel Pérez Carreño, between the years 1987-1996. This index was related with the tumour size, number and lymphatic axilar node status, histological type and grade, clinical stage and the patient's evolution. We observed a slight relation between the lymphoid index and the clinical stage ($P > 0.05$). The utile parameters found with prognostic value were the tumour size ($P < 0.01$), histological grade ($P < 0.05$) and the clinical stage ($P < 0.01$). In conclusion, in this present study, the inflammatory infiltrate does not play any prognostic role in the breast carcinoma.

KEY WORDS: Prognostic markers, angiogenesis, morphometry in cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama ocupa el segundo lugar en Venezuela como causa de mortalidad por cáncer en las mujeres y su incidencia ha aumentando en los últimos años, no sólo en Venezuela sino a nivel mundial. En países desarrollados constituye la primera causa de muerte por cáncer en la mujer^(1,2).

Proyecto financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo.

Recibido: 22/01/2006 Revisado: 30/01/2006

Aceptado para publicación: 14/02/2006

Correspondencia: Dr. Aldo Reigosa
Universidad de Carabobo, Avenida Universidad,
Bárbula,

Valencia, Estado Carabobo, Venezuela

Tel.: 0(241) 866.6243 - E-mail: areigosa@uc.edu.ve

El comportamiento clínico, a veces impredecible de muchas neoplasias, ha estimulado la búsqueda de factores pronósticos con el fin de poder discriminar, dentro de un mismo estadio clínico, las pacientes que evolucionarán favorablemente de las que no; para así individualizar el tratamiento según sea el caso⁽³⁻⁶⁾. El cáncer de mama es una de estas neoplasias en la cual, se han realizado los mayores esfuerzos para la determinación de factores pronósticos útiles⁽⁷⁻⁹⁾.

En sistemas experimentales, se ha documentado la presencia de resistencia del huésped contra el desarrollo de neoplasias, sugiriendo que la inmunidad juega un papel clave en el desarrollo tumoral⁽¹⁰⁻¹²⁾. La infiltración linfocitaria intra y peritumoral es común en diferentes tumores humanos. Existe evidencia que en algunos tipos de cáncer, como los de cavidad oral, pulmón, estómago y en los melanomas malignos, la intensidad del infiltrado inflamatorio peri-tumoral (IIT) se relaciona con el pronóstico⁽¹³⁻¹⁵⁾.

La dificultad en la comprensión y significado del valor pronóstico del infiltrado, puede tener su origen en el hecho que las relaciones huésped-tumor son complejas. En el lado del carcinoma, es importante conocer que no se trata de un solo tipo de tumor, sino que el carcinoma mamario comprende un grupo heterogéneo de neoplasias con capacidades diferentes de dar metástasis. En el lado del huésped, la respuesta inmunitaria también varía, dependiendo de la edad, medio hormonal y factores genéticos, entre otros. Sería importante entonces comparar grupos lo más homogéneos posibles^(14,16-18).

Algunos trabajos han sugerido, con resultados no siempre concluyentes, que lo importante no es la cantidad total del IIT, sino la cantidad específica de linfocitos T con actividad supresora citotóxica. Estas determinaciones son complejas y escapan de la práctica rutinaria en nuestro medio⁽¹⁸⁻²¹⁾. La asociación del IIT con la histiocitosis sinusal ganglionar linfática

también ha sido objeto de reportes con resultados variables⁽¹⁶⁾.

Diversos investigadores han dedicado sus esfuerzos en estudiar la morfometría del cáncer mamario como una herramienta de valor pronóstico, tomando en cuenta la celularidad, el índice de actividad mitótica y diversos parámetros nucleares; relacionándolos con el tamaño del tumor, el estado de los nódulos linfáticos axilares, el grado histológico del tumor y el estadio clínico⁽²²⁻²⁴⁾.

Por otro lado, Baak JP y col., señalan que las técnicas de morfometría no sólo proveen información pronóstica del paciente, sino que además, son relativamente económicas y fáciles de realizar, razón por la cual pueden ser aplicables en la mayoría de los laboratorios de patología⁽²²⁾.

El objetivo del presente trabajo es aplicar un sistema cuantitativo semiautomático para el cálculo del IIT y compararlo con otros factores pronósticos conocidos en el carcinoma invasor de la mama.

MÉTODOS

En el Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia, entre los años de 1987 y 1996, se diagnosticaron y trataron 356 pacientes con cáncer de mama. De ellas, a los propósitos del presente estudio, fueron seleccionados 124 pacientes que cumplieran los siguientes criterios: Sexo femenino; diagnóstico histológico de carcinoma ductal infiltrante sin otra especificación; tratamiento quirúrgico consistente en mastectomía en cualquiera de sus variedades (parcial oncológica, simple, radical modificada o radical, es decir, casos en los cuales se disponía del tumor en su totalidad); preparación histológica y/o bloque de parafina en condiciones aceptables, que contenga muestra del borde del tumor; pacientes sin quimioterapia neoadyuvante y pacientes con seguimiento de cinco años o más, con su debido registro en la historia médica,

a menos que se haya presentado recidiva, metástasis o fallecimiento en menos de ese tiempo.

El tamaño del tumor (medida de su diámetro mayor), número y estado de ganglios linfáticos axilares, tipo y grado histológico (calculado mediante el método de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston y Ellis)⁽²⁵⁾, se obtuvo del informe de biopsia respectivo. De la historia médica se recabó la información respecto al estadio clínico (sistema TNM), tratamiento y evolución de las pacientes.

Se procedió a la captura y digitalización de dos a cinco imágenes de cada caso, a 400x de magnificación, dependiendo de la celularidad. Las imágenes se almacenaron en formato de mapa de bits (bmp), de un tamaño de 640 x 480 píxeles, en color verdadero (RGB). Luego se guardaron en formato JPEG, para su posterior análisis. La determinación semiautomática en computadora del índice linfoide de cada caso, se realizó valiéndose del programa (software) llamado "Bronce", creado por uno de los autores (VB). La imagen a ser analizada se desplaza según cursores inferiores y laterales; con el ratón (mouse) se van contando las células inflamatorias y neoplásicas. Automáticamente aparece en la ventana correspondiente su número absoluto y relativo, calculándose luego el índice linfoide (infiltrado inflamatorio/células neoplásicas). El color del relleno de los círculos es diferente para cada uno de los tipos celulares en estudio. Se contó un mínimo de 200 células por caso. El índice linfoide se dividió en tres grupos, tomando en cuenta los valores menores y mayores.

Análisis estadístico de los cuadros aplicando correlación de Pearson.

RESULTADOS

De los 356 pacientes con cáncer de mama diagnosticados en el Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia, entre los

años de 1987 y 1996, los casos que reunieron los criterios de inclusión en el estudio sumaron 124, representando el 34,8 % del total de casos y por lo tanto una muestra representativa.

El rango de edad del total de pacientes osciló entre 20 a 91 años, con una media de 50,6 años. Los casos incluidos en el presente estudio presentaron un rango de 23 a 89 años, siendo la media de 51,2 años. El 45,97 % (n = 57) pacientes eran menores de 50 años y 54,03 % (n = 67) iguales o mayores de 50 años.

En cuanto al tamaño del tumor, la mayoría de los casos estudiados eran mayores de 5,1 cm (46 %), o entre 2,1 cm y 5 cm (42,7 %), sumando ambos grupos el 88,7 %.

Con respecto al estado nodal, presentaron metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos axilares 61 casos, representando el 49,2 %. En el 29,8 % de los casos (n = 37) no había metástasis ganglionares y en 26 casos (21 %) se encontró entre uno y tres ganglios positivos.

En cuanto al grado histológico, 8,9 % fueron clasificados como grado I, 66,1 % grado II y 25 % grado III.

El mayor número de casos se presentó en el estadio clínico IIB, con 31 casos (25 %), siguiendo en orden de frecuencia los estadios IIIA y IIA con 22,6 % y 17 %, respectivamente. Solo 4,8 % (n = 6) de las pacientes se presentaron en estadio I.

El tiempo de seguimiento osciló entre 2 y 96 meses, con media de 51,4 meses. Las pacientes que presentaron recidiva, metástasis o fallecieron debido a la enfermedad, se clasificaron como de evolución desfavorable. El 50,8 % de los casos fue de evolución favorable versus 49,2 % con evolución desfavorable (Cuadro 1).

La relación de las variables pronósticas entre sí, revela en general valores estadísticamente significativos entre ellas (Cuadro 2). La edad sólo presentó correlación con el tamaño del tumor, en el sentido que a menor edad, mayor fue el tamaño tumoral.

Cuadro 1. Características clínicas y patológicas de las pacientes

| | | |
|------------------|---------------------------|--------------|
| Edad | < 50 años | 57 (45,97 %) |
| | ≥ 50 años | 67 (54,03 %) |
| Tamaño del tumor | > 5,1 cm | 46 % |
| | Entre 2,1 y 5 cm | 42,7 % |
| | < 2 cm | 11,3 % |
| | > 4 ganglios linfáticos | 61 (49,2 %) |
| (metástasis) | 1-3 ganglios linfáticos | 26 (21%) |
| | Sin metástasis ganglionar | 37 (29,8 %) |
| | Grado histológico | |
| I | I | 8,9 % |
| | II | 66,1 % |
| | III | 25 % |
| Estadio clínico | I | 6 (4,8 %) |
| | II A | 21 (17 %) |
| | II B | 31 (25%) |
| | III A | 28 (22,6 %) |
| | III B | 19 (15,3%) |
| Evolución | IV | 19 (15,3%) |
| | favorable | 50,8 % |
| | desfavorable | 49,2 % |

El Cuadro 3 presenta la relación entre el índice linfoide y sus elementos constitutivos, es decir, el conteo absoluto y objetivo de linfocitos y el conteo absoluto de células neoplásicas, con todas las demás variables del presente trabajo. El número de células

Cuadro 2. Relación entre las variables pronósticas reconocidas del cáncer de mama

| Variables | Evol | Ghist | EstCl | Gan | Tamt |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Edad | 0,083 | -0,206 | -0,023 | -0,015 | -0,215* |
| TamT | 0,330** | 0,252* | 0,586** | 0,373** | |
| Gan | 0,159 | 0,116 | 0,567** | | |
| EstCl | 0,289** | 0,276** | | | |
| Ghist | 0,235* | | | | |

(*): $P < 0,05$. (**): $P < 0,01$. TamT: tamaño del tumor medido en su diámetro mayor. Gan: estado de ganglios linfáticos axilares homolaterales. EstCl: estadio clínico. Ghist: grado histológico. Evol: evolución.

neoplásicas sólo se relacionó con el número de células del infiltrado inflamatorio, siendo ésta una relación positiva, a mayor cantidad de células neoplásicas por campo, mayor tendencia de haber más células inflamatorias. El número absoluto de linfocitos se relacionó, como era de esperar, con el índice linfoide, ya que representa el numerador en su cálculo. Con respecto a los parámetros pronósticos, solo hubo una leve relación entre el índice con el estadio clínico. Esta relación fue positiva, a mayor índice mayor estadio clínico, lo cual significa mayor proporción de células inflamatorias con respecto a las neoplásicas. No hubo relación con alguna de las otras variables pronósticas.

Cuadro 3. Relación del índice linfoide con otras variables pronósticas reconocidas del cáncer de mama

| | Edad | TamT | Gan | EstCl | Ghist | Evol | Nº linf | Nº cl |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| Ind.L | -0,057 | -0,045 | 0,143 | 0,209* | -0,058 | 0,008 | 0,793** | -0,145 |
| NºclT | -0,016 | -0,037 | -0,167 | -0,021 | 0,083 | -0,113 | 0,336** | |
| Nºlinf | -0,107 | -0,088 | 0,007 | 0,121 | -0,057 | -0,107 | | |

(*): $P < 0,05$. (**): $P < 0,01$. Ind.L: índice linfoide. NºclT: conteo absoluto de células neoplásicas en imágenes. Nºlinf: conteo absoluto de linfocitos en imágenes. TamT: tamaño del tumor medido en su diámetro mayor. Gan: estado de ganglios linfáticos axilares homolaterales. EstCl: estadio clínico. Ghist: grado histológico. Evol: evolución

DISCUSIÓN

El interés principal del presente estudio es analizar el papel que desempeña el infiltrado inflamatorio en el cáncer de mama, aplicando un sistema cuantitativo semiautomático para el cálculo del IIT y su comparación con otros factores pronósticos conocidos.

El índice linfoide representa una medida objetiva que relaciona el número absoluto de células inflamatorias con el número absoluto de células neoplásicas. En este estudio sólo se asoció con el estadio clínico, con un valor de correlación de Pearson de $r=0,209$ y $P<0,05$, lo cual, indica que presenta significado estadístico bajo. Esta relación positiva es interesante, indica que el infiltrado inflamatorio aumenta proporcionalmente con respecto al número de células neoplásicas en la medida que la enfermedad progresa. Este hecho pudiera explicarse debido a que de las células inflamatorias infiltrantes en el tumor liberan una serie de factores de crecimiento y proteasas que permiten el desarrollo del mismo al estimular la angiogénesis⁽²⁶⁻²⁸⁾.

Si se toma a la intensidad de este infiltrado y su proporción como una representación de las defensas inmunológicas del organismo, debe interpretarse entonces que en el cáncer de mama, aunque aumente localmente el número de células linfoides con respecto al número de células neoplásicas, estas defensas son inefectivas, esta interpretación se corresponde con estudios que señalan que en el cáncer, ocurre en algunas células una alteración del FasL (el cual es un mediador de apoptosis) o de su receptor FasR, señalando así que, este cambio a nivel celular es un potente inhibidor de la respuesta inmune ante el tumor, ya que, la expresión de FasL por las células tumorales evita que sean detectadas por las células inmunes⁽²⁹⁾. Otros estudios indican que la presencia de las células inmunes en el tumor no garantiza que la reacción inmune sea eficiente y que el grado de infiltración no

necesariamente se correlaciona con la intensidad de la respuesta inmune⁽³⁰⁾.

Este índice linfoide, a pesar de presentar una relación positiva, altamente significativa ($r=0,793$; $P<0,001$), con el número absoluto de células inflamatorias, depende de la proporción de los elementos que lo constituyen. Es así como, se presentaron muchos casos con un leve infiltrado inflamatorio, pero igualmente con escasas células neoplásicas por campo, obteniéndose un índice alto. De igual manera, en otros casos con un severo infiltrado inflamatorio, con abundantes células neoplásicas también, el índice linfoide fue bajo o intermedio.

El análisis de las variables tamaño del tumor, estado nodal axilar, estadio clínico y evolución revelan que en los casos estudiados, el cáncer de mama se detectó en etapas avanzadas. Sólo el 11,3 % de las pacientes se diagnosticaron con un tamaño tumoral menor de 2 cm, el 29,8 % sin metástasis axilares, 4,8 % en estadio clínico I y casi la mitad (49,2 %) presentó una evolución desfavorable en el tiempo que duró el estudio. Estos datos se corresponden con los encontrados por Schwartzmann G, quien señaló que el diagnóstico tardío del cáncer es el factor que más influye sobre la tasa de mortalidad ya que, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas II y III en países de Latinoamérica⁽³¹⁾. Estos hallazgos se pudieran explicar por el hecho de no existir en Venezuela, en general, campañas organizadas de información y pesquisa.

Los parámetros pronósticos clásicos se correlacionaron significativamente entre sí, con la excepción del estado nodal axilar, el cual, en este trabajo solo se relacionó con el tamaño del tumor y estadio clínico. Llama la atención que este parámetro es citado en la literatura mundial como el de mayor valor pronóstico independiente^(4,19, 24).

Los parámetros que presentaron una mayor relación con la evolución y serían útiles como factores pronósticos, según los resultados de

esta investigación fueron el tamaño del tumor, el grado histológico y estadio clínico; estos factores son mencionados como significativos en otros estudios junto con el estado nodal^(25,32-34). Por otro lado Arisio y col.⁽³⁵⁾, encontraron que junto con el tamaño del tumor, la presencia de carcinoma *in situ* y la invasión vascular, la edad es uno de los factores pronósticos más importantes de difusión metastásica en el cáncer de mama, este parámetro, en esta investigación, junto con el estado nodal, no presentaron relación significativa con la evolución.

Hoy en día, existen otros marcadores pronósticos que se realizan por técnicas moleculares de PCR e inmunohistoquímica, entre los que podemos señalar: el C-erbB-2, el p53, el receptor de estrógeno y el de progesterona, entre otros; estos marcadores

parecen ser prometedores para la evolución y tratamiento a seguir del paciente y van de la mano con las técnicas de valoración pronóstica ya aceptadas mundialmente^(34,36).

Según los resultados de la presente investigación, debe concluirse que el infiltrado inflamatorio no juega un papel pronóstico en el cáncer de mama, quizás debido a que se ha estudiado la infiltración en base al número de linfocitos presentes y no al tipo de célula infiltrante y su estado de activación, conociendo así, si dichas células son inmunocompetentes o no. Las células infiltrantes liberan una serie de factores quimiotácticos que favorecen la angiogénesis, permitiendo así, el crecimiento del tumor. Se debería estudiar entonces, las moléculas angiogénicas como marcadores pronósticos del cáncer de mama.

REFERENCIAS

1. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(1):10-30.
2. Capote LO. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. Dirección de Oncología, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. 1996.
3. Chia SK, Speers CH, Bryce CJ, Hayes MM, Olivotto IA. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1630-1637.
4. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181-187.
5. Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Save-Soderbergh J, Davis BW, Reed R, et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1992;10(5):696-705.
6. Arriagada R, Le MG, Contesso G, Guinebretiere JM, Rochard F, Spielmann M. Predictive factors for local recurrence in 2006 patients with surgically resected small breast cancer. *Ann Oncol.* 2002;13(9):1404-1413.
7. Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol no. 4). VI. Discriminants for five-year treatment failure. *Cancer.* 1980;46(4 Suppl):908-918.
8. Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2 282 patients with breast carcinoma. *World J Surg.* 2001;25(6):767-772.
9. Leong C, Boyages J, Jayasinghe UW, Bilous M, Ung O, Chua B, et al. Effect of margins on ipsilateral breast tumor recurrence after breast conservation therapy for lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100(9):1823-1832.
10. Ioachim HL. The stromal reaction of tumors: An expression of immune surveillance. *J Natl Cancer Inst.* 1976;57(3):465-475.
11. Hiratsuka H, Imamura M, Ishii Y, Kohama G, Kikuchi K. Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer.*

- 1984;53:2456-2466.
12. Ioachim HL, Hajdu C, Giancotti FR, Dorsett B. Lymphoid proliferations and lymphomas associated with gastric metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *Hum Pathol.* 1999;30(7):833-842.
 13. Vose BM, Moore M. Human tumour-infiltrating lymphocytes: A marker of host response. *Semin Hematol.* 1985;22(1):27-40.
 14. Lee TK, Horner RD, Silverman JF, Chen YH, Jenny C, Scarantino CW. Morphometric and morphologic evaluations in stage III non-small cell lung cancers. Prognostic significance of quantitative assessment of infiltrating lymphoid cells. *Cancer.* 1989;63(2):309-316.
 15. Ito H, Masuda H, Shimamoto F, Inokuchi C, Tahara E. Gastric carcinoma with lymphoid stroma: Pathological and immunohistochemical analysis. *Hiroshima J Med Sci.* 1990;39(2):29-37.
 16. Fisher ER, Kotwal N, Hermann C, Fisher B. Types of tumor lymphoid response and sinus histiocytosis. Relationship to five-year, disease-free survival in patients with breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 1983;107(5):222-227.
 17. Wernicke M, Podesta A. Host defense factors, tumor aggressiveness, and prognosis associated with carcinomas of the breast. *Hum Pathol.* 1984;15(5):423-429.
 18. Simpson JF, Page DL. Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am J Clin Pathol.* 1994;102(Suppl 1):3-8.
 19. Black MM, Opler SR, Speer FD. Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surg Gynecol Obstet.* 1955;100:543-551.
 20. Giorno R. Mononuclear cells in malignant and benign human breast tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 1983;107(8):415-417.
 21. Whiteside TL, Miescher S, Hurlimann J, Moretta L, von Flidner V. Clonal analysis and in situ characterization of lymphocytes infiltrating human breast carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* 1986;23(3):169-178.
 22. Baak JP, Van Dop H, Kurver PH, Hermans J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer.* 1985;56(2):374-382.
 23. van der Linden HC, Baak JP, Lindeman J, Hermans J, Meyer CJ. Morphometry and breast cancer. II. Characterisation of breast cancer cells with high malignant potential in patients with spread to lymph nodes: Preliminary results. *J Clin Pathol.* 1986;39(6):603-609.
 24. Vinh-Hung V, Verschraegen C, Promish DI, Cserni G, Van de Steene J, Tai P, et al. Ratios of involved nodes in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6(6):R680-688.
 25. Elston CW, Ellis IO. 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.* 1991;19(5):403-410.
 26. Arihiro K. Pathological approach to evolving prognostic and predictive factors of breast cancer. *Breast Cancer.* 2004;11(4):343-349.
 27. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines: The regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 2004;25(4):201-209.
 28. Yu JL, Rak JW. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res* 2003;5:83-88.
 29. Chappell DB, Restifo NP. T cell-tumor cell: A fatal interaction? *Cancer Immunol Immunother.* 1998;47(2):65-71.
 30. Ladanyi A. Function and prognostic significance of immune cells infiltrating human tumors. *Magy Onkol.* 2004;48(1):49-56.
 31. Schwartzmann G. Breast cancer in South America: Challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. *J Clin Oncol.* 2001;19(18 Suppl):118-124.
 32. Dodd GD. Screening for breast cancer. *Cancer.* 1993;72(3 Suppl):1038-1042.
 33. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;51(3):195-208.
 34. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Staging system for breast cancer: Revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *Surg Clin North Am.* 2003;83(4):803-819.
 35. Arisio R, Sapino A, Cassoni P, Accinelli G, Cuccorese MC, Mano MP, et al. What modifies the relation between tumour size and lymph node metastases in T1 breast carcinomas? *J Clin Pathol.* 2000;53(11):846-850.
 36. Heimann R, Ferguson D, Gray S, Hellman S. Assessment of intratumoral vascularization (angiogenesis) in breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1-3):147-158.