



PROGRESOS de OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

www.elsevier.es/pog



ORIGINAL

Valor pronóstico de los receptores hormonales, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, ciclinas D1 y D2, *B-Cell Lymphoma2* y ciclooxigenasa-2 en pacientes jóvenes con cáncer de mama

M. Rosario Noguero Meseguer^{a,*}, Laura Yago Lisbona^b, Beatriz Segovia Blázquez^c,
M. Mar Muñoz Díez^a, Silvia Martín Gutiérrez^a, Ruth Carpintero Franco^a,
Blanca Sancho Pérez^d, Marta Gallego Álvarez^d, M. Consuelo Sanz Ferrández^d
y Jose Luis Mendizábal Urizar^e

^a Servicio de Ginecología, Hospital Universitario Infanta Cristina, Parla, Madrid, España

^b Servicio de Ginecología, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Madrid, España

^c Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Ávila, Ávila, España

^d Servicio de Ginecología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

^e Servicio de Ginecología, Hospital de Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Álava, España

Recibido el 30 de diciembre de 2010; aceptado el 1 de julio de 2012

Disponible en Internet el 26 de febrero de 2013

PALABRAS CLAVE

Cáncer de mama;
Menores 35 años;
Receptores hormonales;
Receptor 2 del factor de
crecimiento epidérmico;
Ciclinas;
B-cell Lymphoma 2;
Ciclooxigenasa-2

Resumen

Objetivo: Valor pronóstico de receptores hormonales (RRHH), expresión de HER-2, ciclinas D1 y D2, bcl-2 y ciclooxigenasa-2 (COX-2) en pacientes de 35 años o menores con cáncer de mama.
Sujetos y método: En una serie de 71 pacientes jóvenes, cuya evolución se conocía, analizamos por segunda vez las piezas tumorales mediante inmunohistoquímica y tissue arrays.

Evaluamos la influencia pronóstica de estos factores con el test de la chi al cuadrado y el método de Kaplan-Meier.

Resultados: El 67% de las pacientes mostraban RRHH positivos y el 48,6% sobreexpresaba el HER-2. Fueron ciclinas D1 y D2 positivos el 59,1% y 59,7%, respectivamente. El bcl-2 en el 62,5% de los casos, y la COX-2 en el 63,4% de los tumores. La positividad de RRHH y de COX-2 se relacionó significativamente con un mayor riesgo de recidiva local (OR = 4,6, p = 0,03 para RRHH y OR = 3,7, p = 0,02 para COX-2).

Conclusiones: La sobreexpresión de RRHH y COX-2 desempeña un papel pronóstico en la progresión del cáncer de mama en mujeres muy jóvenes. La expresión de ciclinas D1 y D2, y bcl-2 no influyó en su evolución.

© 2010 SEGO. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rnoguero.hdoc@salud.madrid.org (M.R. Noguero Meseguer).

KEYWORDS

Breast cancer;
Age less than 35;
Hormonal receptors;
Human Epidermal
Growth Factor
Receptor 2;
Cyclins;
B-cell Lymphoma 2;
Cyclooxygenase-2

Prognostic Value of Hormone Receptors, Human Epidermal Growth Factor Receptor, Cyclins D1 and D2, B-cell lymphoma 2 and Cyclooxygenase-2 in Young Patients with Breast Cancer**Abstract**

Objective: To investigate the value of hormone receptor (HR) status, HER-2, cyclins D1 and D2, bcl-2 and cyclooxygenase-2 (COX-2) in predicting the outcome of very young breast cancer patients (below 35 years).

Subjects and method: In this study HR, HER-2, cyclins D1 and D2, bcl-2 and COX-2 were determined for a second time by immunohistochemistry and tissue arrays in a cohort of 71 patients aged less than 35 years with known outcome. The prognostic influence of these factors was evaluated by the chi-square test and Kaplan Meier method.

Results: Expression of HR was detected in 67% of the patients, HER-2 in 48.6%, cyclins D1 and D2 in 59.1% and 59.7%, respectively, bcl-2 in 62.5% and COX-2 in 63.4% of breast tumors. HR and COX-2 overexpression were significantly correlated with a major risk of local relapse (OR: 4.6, $P=.03$ for HR and OR: 3.7, $P=.02$ for COX-2).

Conclusions: Increased expression of HR and COX-2 may play a role in the progression of primary breast carcinoma in very young patients. Overexpression of cyclins D1 and D2 and bcl-2 had no prognostic value.

© 2010 SEGO. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Alrededor del 2% de las pacientes con cáncer de mama tienen menos de 35 años en el momento del diagnóstico. Su pronóstico tiende a ser peor que el de pacientes de mayor edad, ya que se presenta con características biológicas diferentes de las pacientes premenopáusicas más mayores^{1,2}.

En las mujeres jóvenes con cáncer de mama, así como en las de mayor edad, además de los factores pronósticos convencionales, como el tamaño tumoral, la invasión ganglionar axilar, el tipo y grado histológicos, la invasión vasculolinfática, y factores predictivos, como los receptores hormonales (RRHH) y el oncogén HER2, se continúa investigando en nuevos biomarcadores que demuestren utilidad para el pronóstico y el desarrollo de tratamientos que mejoren la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes.

Las ciclinas son proteínas implicadas en la inducción y control de las mitosis. Se comportan como oncogenes y estimulan el crecimiento celular.

Sin embargo, la expresión de las ciclinas D1 y D2 está relacionada con la presencia de predictores conocidos como de buen pronóstico y puede resultar de interés para valorar la respuesta al tratamiento hormonal^{3,4}.

El bcl-2 se encuentra en las mitocondrias, en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico. Actúa integrando estímulos pro y antiapoptóticos. Se asocia a la presencia de receptores estrogénicos y de progesterona, y se encuentra inversamente relacionado con el p53. Los tumores bcl-2 positivos tienen una evolución más favorable que aquellos bcl-2 negativos⁵⁻⁷.

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una enzima que cataliza la transformación de ácido araquidónico a prostaglandina H₂. En tejido normal, la COX-2 no se identifica, pero en células tumorales, particularmente en cáncer de mama, se incrementan los niveles de esta proteína.

La sobreexpresión de la COX-2 es un marcador de mal pronóstico en cáncer de mama. Se asocia a tumores grandes, de alto grado histológico, con RRHH negativos, amplificación

del HER-2, sobreexpresión del p53 y elevada tasa de proliferación del Ki-67⁸.

Sujetos y método

Realizamos un análisis retrospectivo de tipo descriptivo sobre 71 mujeres de 35 años o menores, diagnosticadas de cáncer de mama y tratadas en la Unidad de Patología Mamaria del Servicio de Obstetricia y Ginecología y de los servicios de Oncología Médica y Radioterápica del Hospital Doce de Octubre de Madrid, desde la apertura del centro, en 1980, hasta el año 2004.

El seguimiento mínimo fue de 5 años en todas las pacientes.

Nos planteamos el estudio de la influencia en la aparición de recidivas locoregionales y a distancia de los RRHH, HER-2, p53, ciclinas D1 y D2, bcl-2 y COX-2.

En una primera evaluación no pudimos obtener resultados concluyentes derivados de la presencia o no de RRHH y de la sobreexpresión de HER2, porque en el momento del análisis inicial, tras la cirugía, de las piezas histológicas de un número importante de casos no se disponía de la tecnología necesaria para aplicar las técnicas de inmunohistoquímica actuales.

Nos planteamos entonces completar el estudio mediante una segunda valoración de las piezas anatomopatológicas tumorales, algunas bastante antiguas, recuperándolas de nuevo y realizando un estudio inmunohistoquímico con las técnicas actuales, asociando al de los RRHH y HER2, el estudio mediante tissue arrays de otros biomarcadores, como ciclinas D1 y C2, bcl-2 y COX-2.

Técnica de inmunohistoquímica y tissue arrays

Las piezas anatomopatológicas, fijadas inicialmente en formol, se prepararon para realizar una segunda valoración: inmunohistoquímica (IHQ) y tissue arrays.

Tabla 1 Resultados tras un segundo análisis mediante inmunohistoquímica y tissue arrays

	Positivo % (n)	Negativo % (n)
RRHH	67,5 (48)	32,5 (23)
HER2	48,6 (34)	51,4 (37)
p 53	59,1 (42)	40,9 (29)
Ciclina D1	59,7 (42)	40,3 (29)
Ciclina D2	47,8 (34)	52,2 (37)
bcl-2	62,5 (44)	37,5 (27)
COX-2	63,4 (45)	36,6 (26)

Para ello, se realizaron secciones de 4 μ m de grosor el día previo a la IHQ. Se desparafinaban en xileno, deshidrataban en alcohol de elevada graduación y finalmente se colocaban en una solución «Tris-buffered» salina.

Las secciones eran sometidas a tratamientos enzimáticos, después calentadas y aclaradas en agua desionizada. A continuación, dichas secciones se incubaban en solución acuosa con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min, y aclaradas nuevamente con Tris buffered salino para disminuir la actividad peroxidada endógena.

Después se incubaban con los anticuerpos monoclonales adecuados. La detección primaria de anticuerpos se hizo usando el kit de detección Dako biotina-streptavidin peroxidada.

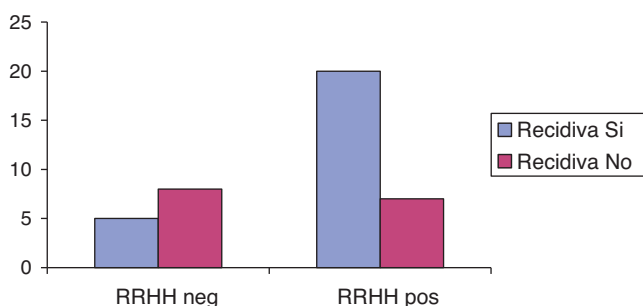
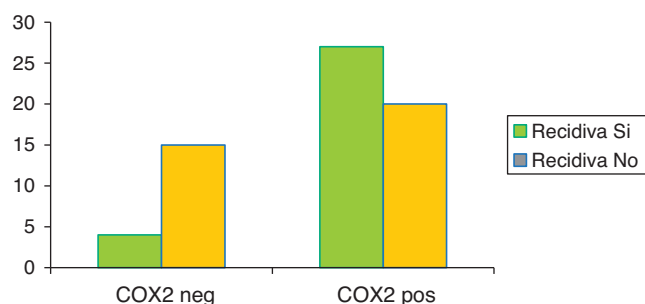
La intensidad de la tinción nuclear IHQ en células individuales se midió en una escala de 0 (no tinción) a +4 (intensidad fuerte), y se estimó el porcentaje de células con tinción nuclear de cada intensidad.

Un especialista en anatomía patológica evaluó todas las muestras con IHQ de forma ciega, sin conocer los datos clinicopatológicos.

La técnica utilizada se basó en las más utilizadas en la bibliografía consultada⁹.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS versión 15.0. Se aplicó el test de la χ^2 al cuadrado y calculamos la *odds ratio* de las variables analizadas para recidiva local y metástasis a distancia.

En el análisis de supervivencia se elaboró una curva de Kaplan Meier y se aplicaron las técnicas de Mantel-Cox y Breslow.

**Figura 1** Influencia de los receptores hormonales sobre la aparición de recidivas.**Figura 2** Influencia de la COX-2 sobre la aparición de recidivas.

Objetivos del estudio

1. Determinar la influencia sobre el riesgo de recidiva y metástasis en mujeres de 35 años o menores con cáncer de mama de:
 - El estado de los RRHH de estrógeno y progesterona; sobreexpresión de HER 2 y expresión del p53.
 - La expresión de los biomarcadores: ciclinas D1 y D2, bcl-2 y COX-2 sobre el riesgo de recidiva y metástasis en mujeres de 35 años o menores con cáncer de mama.
2. Realizar un estudio de supervivencia.

Resultados

Influencia sobre la aparición de recidivas locorregionales y metástasis a distancia de los factores estudiados

En la [tabla 1](#) presentamos los hallazgos obtenidos tras el segundo análisis de las piezas tumorales mediante IHQ y tissue arrays.

En la [tabla 2](#) aparece reflejada la influencia sobre la aparición de recidiva y metástasis tumorales de las variables analizadas.

Desarrollaremos, a continuación, aquellos resultados estadísticamente significativos.

Influencia del estado de los receptores hormonales

1. Sobre la aparición de recidiva. La positividad en los RRHH determinó un mayor riesgo de recidiva local respecto de los tumores que no los expresaban, como se desprende de la [figura 1](#). La diferencia fue estadísticamente significativa (OR = 4,6, IC del 95%, 1,12-18,7) ($p = 0,03$).
2. En el desarrollo de metástasis. El estado de los RRHH no influyó significativamente en la aparición de metástasis a distancia (OR = 1,5; IC del 95%, 0,4-6,3) ([tabla 2](#)).

Influencia de la expresión de ciclooxigenasa-2

1. Sobre la presencia de recidivas locorregionales. Los tumores COX-2 positivos tuvieron un mayor riesgo de recidiva local que los COX-2 negativos (OR = 3,7; IC del 95%, 1,03-13,30) ([fig. 2](#)).

Tabla 2 Influencia sobre la aparición de recidivas locorregionales y metástasis a distancia de los factores estudiados

	Recidiva (OR)	Significación	Metástasis (OR)	
RRHH	4,6	p = 0,03	1,5	ns
Pos/negativo	IC del 95%, 1,12-18,7		IC del 95%, 0,4-6,3	
Cerb2	0,84	ns	2,3	ns
Pos/negativo	IC del 95%, 0,13-5,2		IC del 95%, 0,2-27,6	
P53	3,7	ns	No valorable	ns
Pos/negativo	IC del 95%, 0,6-23,9			
Ciclina D1	0,84	ns	1,05	ns
Pos/negativo	IC del 95%, 0,31-0,23		IC del 95%, 0,36-3,02	
Ciclina D2	1,34	ns	1	ns
Pos/negativo	IC del 95%, 0,52-3,48			
bcl-2	0,94	ns	0,84	ns
Pos/negativo	IC del 95%, 0,50-1,73		IC del 95%, 0,21-3,24	
COX-2	3,7	p = 0,02	2,26	ns
Pos/negativo	IC del 95%, 1,03-13,30		IC del 95%, 0,56-9,06	

2. Metástasis a distancia. La aparición de metástasis fue más frecuente en tumores COX-2 positivos, si bien no estadísticamente significativa (OR = 2,26; IC del 95%, 0,56-9,06) (tabla 2).

Como comentarios adicionales a los resultados no significativos, presentados en la tabla 2, debemos señalar que:

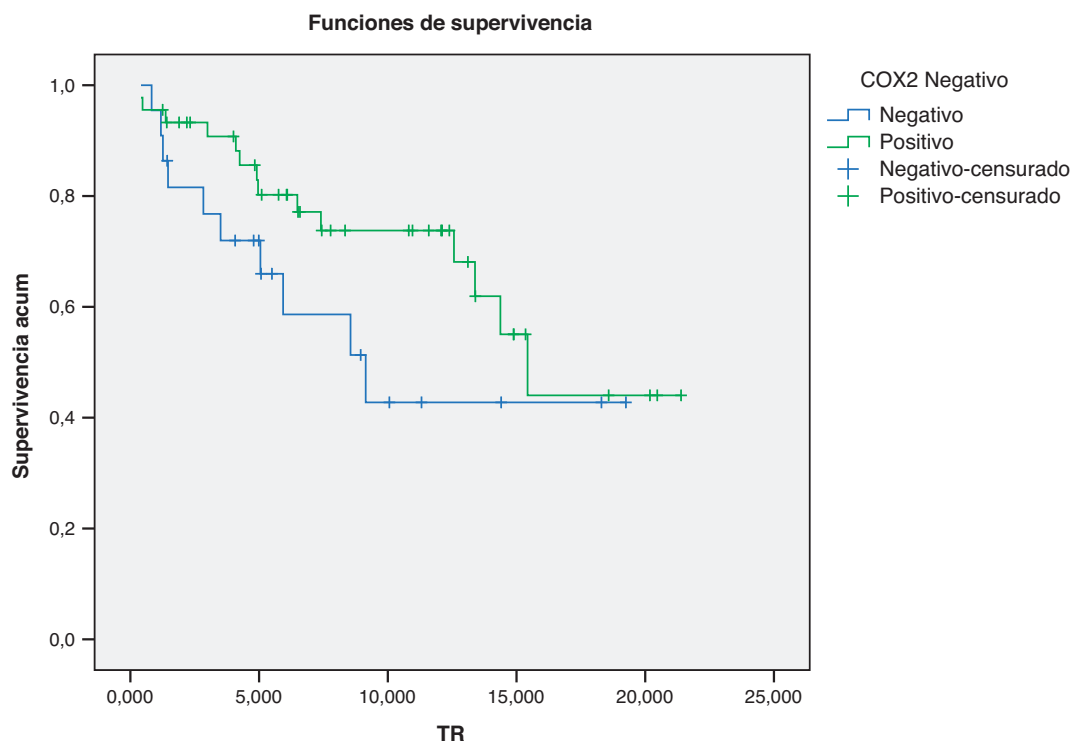
- La positividad de p53 y HER2 no mostró influencia significativa sobre la evolución de las pacientes.
- La expresión de ciclina D1 y D2 y bcl-2 no tuvo repercusión en el desarrollo posterior de recidivas locorregionales y metástasis a distancia.

Análisis de supervivencia

Únicamente la expresión de la COX-2 tuvo repercusión en la supervivencia a 5 años en nuestra casuística de pacientes con cáncer de mama con edad de 35 años o menor.

Los 45 casos COX-2 positivos tuvieron una supervivencia acumulada menor que los casos de COX-2 negativos, según se desprende de la observación de la curva de Kaplan-Meier (fig. 3).

Las pruebas de Mantel-Cox (log rank) y Breslow no mostraron resultados estadísticamente significativos.

**Figura 3** Análisis de supervivencia para COX-2.

La mediana de supervivencia en los tumores COX-2 positivos fue de 9,1 años (rango: 4,1-14,1), inferior que en los COX-2 negativos: 15,4 años (rango:13-17).

La media de seguimiento para los tiempos completos fue de 5,53 años (rango: 0,4-15,4) y para los censurados de 9,5 años (rango: 1,25-21,4).

Discusión

El cáncer de mama es una enfermedad con evolución clínica y pronóstico variables.

En pacientes jóvenes, la edad, independientemente del tipo de tratamiento y las características tumorales, es, por sí sola, un factor de riesgo para recidiva local y metástasis a distancia, si bien algunos estudios retrospectivos contradicen estas afirmaciones¹⁰.

Como en las mujeres de mayor edad, en pacientes de 35 años o menores con cáncer de mama se utilizan distintos biomarcadores como complemento a la estadificación clinicopatológica, para identificar a pacientes con alto riesgo de recaída. En este estudio, se analiza la influencia de la expresión de los RRHH, HER2, p53, ciclinas D1 y D2, la proteína bcl-2 y la COX-2 sobre el pronóstico y la aparición de recidivas y metástasis a distancia, para terminar con un estudio de supervivencia de las pacientes.

La presencia de RRHH en un 67,5% de nuestras pacientes se relacionó con un peor pronóstico, con mayor riesgo de recidiva local en los artículos revisados, encontramos datos similares¹¹.

En la literatura se encuentran frecuencias elevadas de *cerb2* en tumores de mujeres jóvenes. Su importancia pronóstica es controvertida. Un número importante de trabajos han publicado resultados en la línea del peor pronóstico de tumores *cerb2* positivos, mientras que otros aportan datos contrarios¹².

En estudios preclínicos, las proteínas bcl-2 inhiben la apoptosis *in vitro* y se asocian a quimiorresistencia. *In vivo*, la expresión de las proteínas bcl-2, al inhibir la apoptosis, tendría una influencia adversa en el pronóstico de los pacientes. Sorprendentemente, los análisis estadísticos revelaron que los pacientes bcl-2 positivos tenían una evolución más favorable y mayor supervivencia, comparado con tumores bcl-2 negativos.

Callagy et al.¹³ y Nelli et al.¹⁴ analizaron la expresión bcl-2 en tejido de cáncer de mama utilizando inmunohistoquímica y estudiaron su relación con otros marcadores pronósticos bien conocidos y validados, así como su papel en la supervivencia de las pacientes.

También investigaron la asociación entre la expresión de bcl-2 y la supervivencia de las pacientes.

La hipótesis inicial fue que la expresión débil o no expresión de bcl-2 podría indicar una mayor agresividad tumoral y, consecuentemente, un peor pronóstico.

Los autores analizaron a 57 mujeres con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante, entre 1999 y 2003. Se observó que los tumores bcl-2 negativos mostraban una tendencia a tener una menor supervivencia total, pero no estadísticamente significativa. Con respecto a la supervivencia libre de enfermedad, no hubo asociación. En cualquier caso, debido al pequeño número de pacientes incluidos en el

análisis estadístico, estos hallazgos deben ser interpretados con cautela.

Otros estudios han encontrado hallazgos contrarios, es decir, los tumores bcl-2 negativos mostraban un mejor pronóstico¹⁵⁻¹⁷.

En uno de los mayores estudios que evaluaban la significación pronóstica del bcl-2, Rolland et al., en un estudio de 819 pacientes, mostraban que el bcl-2 solo no tenían una significación pronóstica independiente. Sin embargo, tumores con p53 (+) y bcl-2 (–) se asociaban a un peor pronóstico¹⁸.

En nuestro trabajo, la proteína bcl-2 no mostró repercusión sobre la aparición de recidivas locorregionales y metástasis a distancia; si bien los tumores bcl-2 positivos mostraron un comportamiento más favorable (tabla 2).

En relación con el valor pronóstico de la ciclina D1, Renault-Llorca et al.¹⁹ estudian a 710 pacientes con cáncer operable, estadio II-III, tratadas con neoadyuvancia, entre 1982 y 2004. Valoran la influencia de este biomarcador sobre la respuesta al tratamiento sistémico. Tras el análisis, no encontraron una correlación significativa entre la expresión de la ciclina D1 y la respuesta a la quimioterapia, ni sobre la supervivencia de las pacientes. No ejercía pues, un factor pronóstico relevante.

Otros autores hablan de resultados similares²⁰⁻²².

Por el contrario, encontramos bibliografía que adjudica un papel predictivo de buen pronóstico a la sobreexpresión^{23,24}.

En la literatura revisada, la sobreexpresión de la COX-2 se correlaciona significativamente con corta supervivencia total y libre de enfermedad²⁵⁻²⁷.

La sobreexpresión de COX-2 en nuestro estudio, del mismo modo que en los trabajos revisados, se relaciona con un peor pronóstico. Así, las pacientes con sobreexpresión de la COX-2 tuvieron más riesgo de recidiva que las COX-2 negativas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Orlando L, Ghisini R, et al. Role of endocrine responsiveness and adjuvant therapy in very young women (below 35 años) with operable breast cancer and node negative disease. *Ann Oncol*. 2006;17: 1497–503.
2. Curigliano G, Rigo R, Colleoni M, Braud FD, Nole F, Formica V, et al. Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: response according to biologic and endocrine features. *Clin Breast Cancer*. 2004;5:125–30.
3. Bhatavdekar JM, Patel KK, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Chikhlikar PR, et al. Prognostic significance of immunohistochemically localized biomarkers in stage II and stage III breast cancer: a multivariate analysis. *Ann Surg Oncol*. 2000;7:305–11.
4. Malara NM, Leotta A, Sidoti A, Lio S, D'Angelo R, Caparello B, et al. Ageing hormonal behaviour and cyclin D1 in ductal breast carcinomas. *Breast J*. 2006;15:81–9.
5. Arýkók AT, Onal BU, Han U. Expressions of cyclin D1, p53, bcl-2, and bax in infiltrative ductal carcinoma of the breast: correlations with clinicopathologic characteristics. *Breast J*. 2006;12: 391–2.

6. Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C, Palma PD, Mauri FA, Boracchi P, et al. Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatment in operable node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1995;2:189–98.
7. Cecka F, Hornychova H, Melichar B, Ryska A, Jaudik P, Mergarcova M, et al. Expresión de BCL-2 in breast cancer: correlation with clinicopathological characteristics and survival. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2008;51:107–12.
8. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62:632–5.
9. Malora NM, Leotta A, Sidoti A, Lio S, D'Angelo R, Caparello B, et al. Ageing hormonal behaviour and cyclin D-1 in ductal breast carcinomas. *Breast*. 2006;15:81–9.
10. González-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, et al. Women age $\leq$ years with primary breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103:2466–72.
11. Wonshik H. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer*. 2004;4:82.
12. Maru D. HER-2/neu and p53 overexpression as biomarkers of breast carcinoma in women age 30 years and younger. *Cancer*. 2005;103:900–5.
13. Callagy GM, Phararoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2468–75.
14. Neri A, Marrelli K, Roviello F, De Marco G, Mariani F, DeStefano A, et al. Bcl-2 expression correlatos with lymphovascular invasión and long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;99:77–83.
15. Linjawi A, Kontogiannea M, Halwani F, Edwardes M, Meterissian S. Prognostic significance of p53, bcl-2 and Bax epression in early breast cancer. *J Am Coll Surg*. 2004;198:83–90.
16. Beenken SE, Grizzle WE, Crowe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg*. 2001;233:630–8.
17. Pernick NL, Biernat L, Du W, Visscher DW. Clinicopathologic analysis of Fas, Fas ligand, and other biomarkers in locally advanced breast carcinoma. *Breast J*. 2000;6:233–41.
18. Rolland P, Spendlove I, Madrid Z, Rakha EA, Patel P, Ellis IO, et al. The p53 positive Bcl-2 negative phenotype is an independent marker of prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007;120:1311–7.
19. Penault-Llorca F, Arrial C, Raoelfils I, Chollet P, Cayre A, Mouret-Reynier MA, et al. Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index, ki-67, cyclin D1, an cyclo-oxygenase-2 in 710 operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist*. 2008;13:1235–45.
20. Michalides R, Hageman P, Tinteren H, Houben L, Wientjens E, Klomp maker R, et al. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer*. 1996;73:728–34.
21. Barbareschi M, Pelosio P, Caffo O, Buttita F, Pellegrini S, Barbazza R, et al. Cyclin-D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: relation with clinicopathologic characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21WAF1 immunohistochemical expression. *Int J Cancer*. 1997;74:171–4.
22. Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. Overexpression of cyclin D1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2002;98:415–8.
23. Abramson VG, Troxel AB, Feldman M, Mies C, Wang Y, Sherman L, et al. Cyclin D1b in human breast carcinoma and coexpression with cyclin D1a is associated with poor outcome. *Anticancer Res*. 2010;30:1279–85.
24. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1996;69:92–9.
25. Denkert C, Winzer KJ, Müller BM, Weichert W, Pest S, Köbel M, et al. Elevated expresión of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2003;97:2978–87.
26. Sivula A, Taivensaari-Mattila A, Lundin J, Joensuu H, Haglund C, Ristimäki A, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;89:215–20.
27. Miglietta A, Toselli M, Ravarino N, Vencia W, Chiecchio A, Bozzo F, et al. COX-2 expression in human breast carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Br J Cancer*. 2010;103:68–75.