

**ARTICULO**

**Comparación de valoración subjetiva del infiltrado inflamatorio con índice linfoide en el cáncer de mama**

Aldo Reigosa<sup>1,2</sup>, Lesbia Castillo<sup>3</sup>, Víctor Barrios<sup>1</sup>, Carlos Callegari<sup>1</sup>, Karla Molina<sup>1</sup>, Luisa Morales<sup>1,4</sup>, Eddy Mora<sup>1,5</sup>, Marianela Zavala<sup>1,5</sup>, Luis Sucre<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC); <sup>2</sup>Departamento de Morfofisiopatología, Universidad de Carabobo (UC); <sup>3</sup>Departamento de Anatomía Patológica, UC; <sup>4</sup>Departamento de Farmacología, UC; <sup>5</sup>Departamento de Morfología, UC.; <sup>6</sup>Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", Valencia, Venezuela

**Correspondencia:** Universidad de Carabobo, frente a la Facultad de Ingeniería, Avenida Universidad, Bárbula, Valencia, Estado Carabobo, Venezuela.

**E-mail:** [areigosa@uc.edu.ve](mailto:areigosa@uc.edu.ve)

**Fax:** + 58-241-8666243

**Teléfono:** + 58-241-8666243

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

**Recibido:** mayo 2006

**Aprobado:** julio 2006

---

**RESUMEN**

En el cáncer de mama, la determinación del infiltrado inflamatorio peritumoral (IIT) se realiza en la mayoría de los casos sobre bases subjetivas. El objetivo del presente trabajo es aplicar un sistema cuantitativo semiautomático, el índice linfoide, para el cálculo del IIT y compararlo con el IIT subjetivo. Se seleccionaron 124 pacientes diagnosticados y tratados en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", de Valencia, Venezuela, entre los años de 1987 a 1996. Se analizó la correlación existente entre las valoraciones subjetivas del infiltrado inflamatorio en cáncer de mama, realizada por el patólogo que efectuó el diagnóstico en su momento, con las efectuadas en el momento de la captura de la imagen. Se compararon además estas mediciones subjetivas con la determinación semiautomática en computadora del índice linfoide. La confrontación de las intensidades del IIT entre los observadores, mostró desacuerdo en el 46 % de los casos ( $p < 0,01$ ). El índice linfoide, se relacionó con la apreciación de ambos observadores subjetivos. Este índice, es una manera más objetiva, precisa y reproducible de valorar la respuesta inflamatoria; por lo que su uso sería interesante ya que contribuiría a disminuir las discrepancias existentes entre los distintos observadores que evalúan el infiltrado de manera subjetiva.

**Palabras clave:** Infiltrado inflamatorio peritumoral, índice linfoide, sistemas de cuantificación.

## ABSTRACT

### **Comparing subjective evaluation of inflammatory infiltrate with lymphoid index in breast cancer.**

In breast cancer, determination of peri-tumoral inflammatory infiltrate (IIT) is made in most of the cases on subjective bases. The objective of the present work is to apply a semiautomatic quantitative system, the lymphoid index, to estimate IIT and to compare it with the subjective IIT. With this aim, 124 patients diagnosed and treated in the Oncology Institute "Dr Miguel Perez Carreño" in Valencia, Venezuela, between 1987 and 1996, were selected. The existing correlation between subjective evaluations of inflammatory infiltrate in breast cancer was analyzed, and the evaluations made by the pathologist at the time of diagnosis were compared with those at the moment of capturing the image. In addition, subjective measurements were compared with the semiautomatic computer determination of the lymphoid index. Confrontation of IIT intensities between observers showed discrepancy in 46 % of the cases ( $p < 0.01$ ). The lymphoid index was related to the appreciations of both subjective observers. This index is a more objective, accurate and reproducible way of estimating inflammatory response. The use of this index would contribute to diminish existing discrepancies between observers evaluating subjectively inflammatory infiltrate.

**Key words:** Peritumor inflammatory infiltrate, lymphoid index, quantification systems.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama ocupa el primer lugar en Venezuela como causa de mortalidad por cáncer en las mujeres y su incidencia ha aumentando en los últimos años, no solo en Venezuela sino a nivel mundial (1,2).

Se puede afirmar que el carcinoma de mama es una enfermedad heterogénea en cuanto a su evolución. Como ejemplo de ello cabe citar, que de las pacientes sin metástasis en los ganglios linfáticos axilares, un 20 a 30 % de ellas presentarán recidivas o morirán en los 10 años subsiguientes a la terapia local inicial.

Para evitar el sobre tratamiento, morbilidad y el alto costo del tratamiento en el 70 a 80 % restante de las pacientes, deberían existir parámetros que permitieran identificar cuáles son las pacientes con riesgo de recaída y/o muerte (3). Este 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 (4-6). 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, como expresión de las defensas inmunológicas, 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 (11,13-15).

Así mismo, la mayoría de los carcinomas invasores mamarios presentan un IIT de intensidad variable. En la literatura, la significación del IIT en mama es controversial en cuanto a su papel pronóstico. Moore y Foote lo interpretaron como una respuesta favorable contra la neoplasia, basados en su presencia e intensidad en el carcinoma medular, el cual posee un relativo mejor pronóstico (16). Reportes posteriores al de An, Carter, Wernicke y Whiteside apoyan esta hipótesis (4,17-19). Sin embargo, otros informes como los de Champion y Fisher afirman todo lo contrario, es decir que los tumores con menor IIT presentan menos metástasis ganglionares y una supervivencia mayor (20,21). El IIT favorecería la angiogénesis y por consiguiente la proliferación neoplásica (22).

Por otro lado, el IIT se calcula habitualmente de una forma subjetiva, señalando el patólogo su intensidad (leve, moderada o severa), de acuerdo a su apreciación (22,23). Hay estudios que han propuesto diferentes formas de reportar el infiltrado inflamatorio, de acuerdo al patrón de infiltración (24,25), al conteo absoluto de células por campo (26,27) o estableciendo escalas cuantitativas o semicuantitativas (28,29). Lee y col, utilizaron el índice linfoide (relación entre células linfoides inflamatorias/células neoplásicas) en el cáncer de pulmón, con resultados que tuvieron significación pronóstica (14). La discrepancia reportada sobre el valor del infiltrado inflamatorio, pudiera estar relacionada con el hecho de no existir un método estándar y objetivo para su cálculo y reporte.

El objetivo del presente trabajo es comparar la valoración del IIT subjetivo clásico con el índice linfoide, para evaluar las posibles discrepancias entre observadores del informe subjetivo y la utilidad de un sistema semiautomático objetivo.

## METODOS

En el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" (IOMPC) de Valencia, entre los años de 1987 a 1996, se diagnosticaron y trataron 356 pacientes con cáncer de mama. De ellos, a los propósitos del presente estudio, fueron seleccionados 124 pacientes que cumplían 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 y pacientes sin quimioterapia neoadyuvante. Estos criterios se fundamentaron en la premisa de tratar de disminuir en lo posible la influencia de otras variables que pudieran afectar la valoración del IIT. Por ello se escogieron casos de un solo tipo histológico, la variedad más frecuente y sin quimioterapia previa (inusual en el IOMPC antes de 1996).

Se registró la intensidad del IIT que se encuentra en el informe de la biopsia, realizada subjetivamente por el patólogo que efectuó el diagnóstico en su momento, registrándose un total de 8 patólogos que realizaron estas valoraciones.

Se seleccionó una preparación histológica de cada caso, de la periferia del tumor, efectuándose una segunda determinación de la intensidad del IIT en el momento de la captura de la imagen. Esta la realizó el mismo observador en todos los casos (AR).

El índice linfoide se calculó según método descrito por Lee y col. (14), con la diferencia de

realizar la cuantificación de células linfoides y neoplásicas con imágenes digitalizadas, de forma semiautomática.

Se procedió a la captura y digitalización de al menos dos imágenes de cada caso a 400x de magnificación. Para ello se utilizó un microscopio Zeiss Axiostar, cámara de video Sony modelo ExwaveHAD adaptada al microscopio y conectada con computadora Pentium IV Intel 3.0 GHz, de 1 GByte de memoria RAM y disco duro de 80 GByte, con monitor super VGA de 17 pulgadas y tarjeta de video D-Link, modelo DUB-T210. Las imágenes se capturan en formato bit map (BMP), de un tamaño de 640 x 480 píxeles, en color verdadero (RGB), ya que es el formato de captura automático de la tarjeta. Luego, mediante el programa Photo Shop versión 6.0 se abren y guardan en formato JPEG, el cual ocupa menos espacio en disco duro, para su posterior análisis. La resolución utilizada de la pantalla del monitor fue de 1152 por 864 píxeles. Es de hacer notar, sin embargo, que este tipo de cálculo puede realizarse con resoluciones menores. La determinación semiautomática en computadora del índice linfoides de cada caso, se realizó valiéndose del programa (software) llamado "Bronce", creado para tal fin 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 (linfo-plasmocitarias) y neoplásicas, quedando en cada célula un punto del color previamente seleccionado, a fin de no contar la misma célula varias veces. Automáticamente aparece en la ventana correspondiente su número absoluto y porcentaje. El índice linfoides se obtiene posteriormente de la división del número total de células inflamatorias del caso entre el de células neoplásicas (Figura 1).

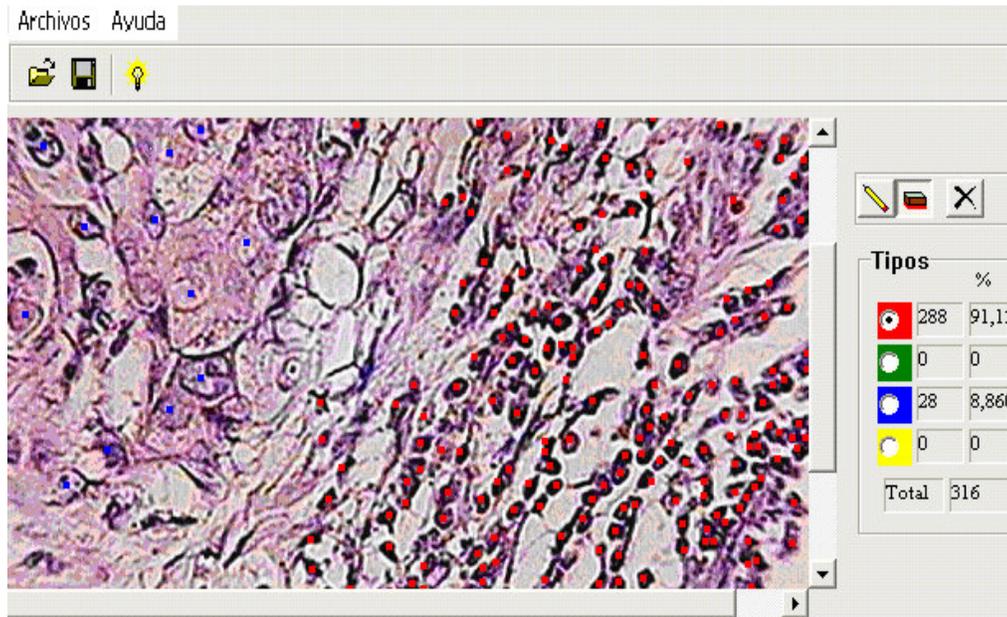


Figura 1. Programa Bronce. Imagen de la periferia de un carcinoma ductal infiltrante. Con el punto rojo se encuentran marcadas las células linfoides (288 células) y con el azul las neoplásicas (28 células). El índice linfoides de este caso sería de 10,29 (288/28).

El índice linfoides se dividió en tres grupos, ( $\leq 1,5$ ; entre 1,6 a 3;  $> 3$ ), con el fin de poder correlacionar con las tres categorías habituales del cálculo subjetivo. Para el análisis e interpretación de los resultados, los cuales fueron procesados a través del programa

estadístico SSPS – 10, por técnicas estadísticas univariadas: de frecuencia y porcentaje, así como también utilizando el coeficiente de concordancia Kappa y la matriz de correlación de Spearman según el caso.

### RESULTADOS

Los 124 casos del estudio representaron 34,8 % del total de casos (356 pacientes) con cáncer de mama diagnosticados en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” de Valencia, entre los años de 1987 a 1996, constituyendo 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. 45,97 % (n = 57) de las pacientes eran menores de 50 años y 54,03 % (n = 67) iguales o mayores de 50 años.

La Tabla 1 presenta la distribución de los casos objeto de estudio de acuerdo a la intensidad del infiltrado inflamatorio. Esta determinación es la que se encuentra en el informe de la biopsia, realizada subjetivamente por el patólogo que efectuó el diagnóstico en su momento. Como se observa, las categorías de leve y moderada tuvieron una frecuencia igual, representando cada una 41,1 % de los casos.

**Tabla 1. Infiltrado inflamatorio tumoral determinado por el observador que diagnosticó el cáncer de mama**

	n	%
55		
Leve	51	41,1
Moderada	51	41,1
Severa	22	17,8
Total	124	100

Una segunda determinación de la intensidad del infiltrado inflamatorio tumoral se realizó en el momento de la captura de la imagen, por el mismo observador para todos los casos. Los resultados de esta medición, de carácter subjetivo, se muestran en la tabla 2. Se observa predominio de los casos con infiltrado inflamatorio leve, con una frecuencia de 72 casos, que representaron 58,1 %.

**Tabla 2. Infiltrado inflamatorio tumoral determinado por el observador que realizó la captura digital de los casos de cáncer de mama**

Intensidad	n	%
Leve	72	58,1
Moderada	38	30,6
Severa	14	11,3
Total	124	100

La comparación de las intensidades del infiltrado inflamatorio tumoral de las determinaciones del observador que efectuó el informe original del caso y las del patólogo en el momento de la captura de imágenes para su digitalización y análisis, se muestran en la tabla 3. Hubo acuerdo entre los dos observadores en 67 casos, representando 54 % y por lo tanto, en 46 % de los casos, casi la mitad de ellos, hubo desacuerdo, significando un alto porcentaje de variación interobservador. La mayor variación se apreció en los casos que el observador 1 catalogó como moderado y el observador 2 como leve, siendo éstos 27 casos (37,5 %) de los casos leves del observador 2. El coeficiente de concordancia Kappa rechaza la hipótesis nula, acepta que existe una concordancia débil entre ambos observadores (Kappa = 0,213) pero la misma es estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ), es decir no se debe al azar.

**Tabla 3. Comparación de la intensidad de los infiltrados inflamatorios tumorales determinados por el observador que diagnosticó el cáncer de mama y el del observador que realizó la captura digital**

		Observador 2			Total
		leve	moderado	severo	
Observador 1	leve	38	12	1	51
	moderado	28	18	5	51
	severo	5	9	8	22
Total		71	39	14	124

Nota: Los números de las columnas y filas representan la coincidencia entre los observadores. Kappa = 0,213;  $p < 0,01$ ; Error típico asintótico = 0,070; T aproximada = 3,255

La tabla 4 presenta la matriz de correlación de Spearman entre el índice linfocitario y sus elementos constitutivos, es decir el conteo absoluto y objetivo de células inflamatorias y el conteo absoluto de células neoplásicas, con los IIT subjetivos. El número de células 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. Asimismo, el índice linfocitario se asoció de forma positiva y significativa con el número absoluto de células inflamatorias, lo que era de esperar, ya que este último representa el numerador en su cálculo. Este índice no se correlacionó con el número de células tumorales. Se evidenció una relación significativa entre el índice linfocitario y la apreciación de ambos observadores subjetivos, mayor con la apreciación subjetiva 2, la del patólogo que realizó la captura.

**Tabla 4. Matriz de correlación de Spearman entre el índice linfoide - número de células tumorales - número de células inflamatorias e infiltrado subjetivo.**

		Indice linfoide	Nº células tumorales	Nº células linfoides	Histología subj 1	Histología Subj 2
<b>R Spearman</b>	<b>Indice linfoide</b>	1,000	-0,147	0,887**	0,595**	0,701**
		.	0,103	0,000	0,000	0,000
<b>Valor p</b>	<b>Nº células tumorales</b>	-0,147	1,000	0,291**	0,011	0,054
		0,103	.	0,001	0,905	0,551
	<b>Nº células linfoides</b>	0,887**	0,291**	1,000	0,554**	0,697**
		0,000	0,001	.	0,000	0,000
	<b>Histología subj 1</b>	0,595**	0,011	0,554**	1,000	0,398**
		0,000	0,905	0,000	.	0,000
	<b>Histología subj 2</b>	0,701**	0,054	0,697**	0,398**	1,000
		0,000	0,551	0,000	0,000	.

\*\* Correlación significativa  $p < 0,01$

## DISCUSIÓN

El interés principal del presente estudio fue analizar el grado de confiabilidad del IIT calculado subjetivamente en el cáncer de mama, al comparar dos distintas mediciones subjetivas con la determinación semiautomática en computadora del índice linfoide valiéndose de sistema diseñado para tal fin. En este estudio se evidenció una diferencia significativa entre ambas mediciones subjetivas, indicando ello que el cálculo del índice linfoide, a pesar de ser más laborioso, es recomendable, ya que es una manera más objetiva de evaluar la infiltración linfocitaria. La medición subjetiva 2 presentó una mayor correlación con el índice linfoide. Esto se explica por su determinación por un solo observador, en lugar de los 8 que intervinieron en la primera medición, disminuyendo así la variación interobservador.

Este índice linfoide, a pesar de presentar una relación positiva, altamente significativa ( $p < 0,01$ ) con el número absoluto de células linfoides, depende de la proporción de los elementos que lo constituyen. Es así como se presentaron casos con un leve infiltrado inflamatorio, pero igualmente con escasas células neoplásicas por campo, obteniéndose un índice elevado. De igual manera, en otros casos con un severo infiltrado inflamatorio, con abundantes células neoplásicas también, el índice linfoide fue intermedio o bajo.

El índice linfoide representa una medida objetiva que relaciona el número absoluto de células inflamatorias con el número absoluto de células neoplásicas. La relación existente entre la infiltración linfoide y el pronóstico del paciente se ha realizado en varios estudios de carcinoma de mama, por diversos tipos de valoraciones subjetivas, lo que pudiera influir en los resultados controversiales del valor pronóstico de dicha infiltración (16-21). Estos resultados podrían ser

evaluados utilizando el índice linfoide, con la finalidad de disminuir los posibles errores de la apreciación subjetiva realizada por el observador.

El desacuerdo en el 46% de los casos confirma lo anteriormente reportado en la literatura, en cuanto a la variabilidad y falta de reproducibilidad de la apreciación del IIT, quizás debido a las distintas técnicas empleadas para su cálculo (14,21,30).

El IIT mostró mayor correlación con el observador que valoró la infiltración en el momento de la captura de la imagen (0,701), que con las efectuadas en el momento del informe original (0,595); se podría inferir entonces que esta diferencia reportada entre los observadores, con respecto al IIT, pudiera ser debido al número de patólogos involucrados.

En los últimos años se han estudiado nuevos marcadores de valor pronóstico, discutiendo su posible utilidad clínica en distintas neoplasias a partir de trabajos experimentales y estudios clínicos. Aunque se han descrito varios factores pronósticos, son pocos los que pueden considerarse suficientemente caracterizados o aceptados. En general, para establecer la utilidad de un marcador de valor pronóstico, debe validarse tanto en aspectos técnicos como clínicos (31,32). La técnica de estudio debe ser suficientemente sensible, específica y reproducible, y los resultados deben ser fácilmente interpretables y significativos. Por otro lado, se debe evaluar además, cuales son los factores mas adecuados para un determinado caso o para una terapia en particular (33).

El estudio realizado por Lee y col, señala que el índice linfoide es un indicador pronóstico de la evolución clínica de pacientes con cáncer de pulmón (14). Por otro lado, Stewart y Heppner señalan que la evaluación del papel que juega la respuesta inmune en el control del carcinoma de mama, no está muy clara y que dicha respuesta no es un mecanismo de defensa, sino que por el contrario, quizás sirva como facilitadora del desarrollo del cáncer, observando en su estudio una correlación entre un infiltrado linfoide elevado y pacientes con evolución desfavorable (34); sería importante reevaluar entonces si utilizando este índice en lugar del IIT subjetivo, se contribuye con la valoración pronóstica del paciente con cáncer de mama.

El índice linfoide calculado por un sistema semiautomático, pudiera ser por lo tanto una manera más objetiva, precisa y reproducible de valorar el infiltrado inflamatorio en la mama y tumores de otros sitios, por lo que su uso seria interesante ya que evitaría las discrepancias existentes entre los distintos observadores que evalúan el infiltrado de manera subjetiva. Sin embargo, al requerir más tiempo y disponer de mayor tecnología, es necesario evaluar su utilidad y justificación en la práctica de rutina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55:10-30.
2. Anuario de mortalidad 2004. Ministerio de Salud, Venezuela. 2005. Disponible en [http://www.msds.gov.ve/msds/direcciones\\_msds/Epidemiologia/Estadistica/Index.htm](http://www.msds.gov.ve/msds/direcciones_msds/Epidemiologia/Estadistica/Index.htm).
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; 22:1630-7.

4. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989; 63:181-7.
5. Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Save-Soderbergh J, Davis BW, Reed R, Torhorst J, Golouh R, Peterson HF, Price KN, et al. International Breast Cancer Study Group, Bern, Switzerland. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1992; 10:696-705.
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;13:1404-13.
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 (Suppl):908-18.
8. Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2282 patients with breast carcinoma. *World J Surg*. 2001; 25:767-72.
9. Leong C, Boyages J, Jayasinghe UW, Bilous M, Ung O, Chua B, Salisbury E, Wong AY. Effect of margins on ipsilateral breast tumor recurrence after breast conservation therapy for lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer*. 2004; 100:1823-32.
10. Ioachim HL. The stromal reaction of tumors: an expression of immune surveillance. *J Natl Cancer Inst*. 1976; 57:465-75.
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; 53:2456-66.
12. Ioachim HL, Hajdu C, Giancotti FR, Dorsett B. Lymphoid proliferations and lymphomas associated with gastric metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *Hum Pathol*. 1999; 30:833-42.
13. Vose BM, Moore M. Human tumor-infiltrating lymphocytes: a marker of host response. *Semin Hematol*. 1985; 22:27-40.
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; 63:309-16.
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; 39:29-37.
16. Moore OS, Foote FW.: The relative favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 1949; 2:635-42.
17. An T, Sood U, Pietruk T, Cummings G, Hashimoto K, Crissman JD. In situ quantitation of inflammatory mononuclear cells in ductal infiltrating breast carcinoma. Relation to prognostic parameters. *Am J Pathol*. 1987 Jul; 128:52-60.
18. Wernicke M, Podesta A. Host defense factors, tumor aggressiveness, and prognosis associated with carcinomas of the breast. *Hum Pathol*. 1984; 15:423-9.
19. Whiteside TL, Miescher S, Hurlimann J, Moretta L, von Fliedner V. Clonal analysis and in situ characterization of lymphocytes infiltrating human breast carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 1986; 23:169-78.
20. Champion HR, Wallace IW, Prescott RJ. Histology in breast cancer prognosis. *Br J Cancer* 1972; 26:129-38.

21. 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; 107:222-7.
22. Lee AH, Happerfield LC, Bobrow LG, Millis RR. Angiogenesis and inflammation in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol.* 1997; 181:200-6.
23. Fisher ER, Anderson S, Tan-Chiu E, Fisher B, Eaton L, Wolmark N. Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer.* 2001; 91(Suppl):1679-87.
24. Lee AH, Happerfield LC, Millis RR, Bobrow LG. Inflammatory infiltrate in invasive lobular and ductal carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 1996; 74:796-801.
25. Lee AH, Happerfield LC, Bobrow LG, Millis RR. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *Clin Pathol.* 1997; 50:669-73.
26. Bilik R, Mor C, Hazaz B, Moroz C. Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1989; 28:143-7.
- 27.- Ben-Hur H, Cohen O, Schneider D, Gurevich P, Halperin R, Bala U, Mozes M, Zusman I. The role of lymphocytes and macrophages in human breast tumorigenesis: an immunohistochemical and morphometric study. *Anticancer Res.* 2002; 22:1231-8.
28. Lauder I, Aherne W, Stewart J, Sainsbury R. Macrophage infiltration of breast tumours: a prospective study. *J Clin Pathol.* 1977; 30:563-8.
29. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56:4625-9.
30. Simpson JF, Page DL. Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am J Clin Pathol* 1994; 102 (Suppl 1): S3-8.
31. Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85:1206-19.
32. Klijn JG, Berns EM, Foekens JA. Prognostic factors and response to therapy in breast cancer. *Cancer Surv.* 1993; 18:165-98.
33. Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2005; 6:147-59.
34. Stewart TH, Heppner GH. Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology.* 1997;115 Suppl:S141-53