

P. Soriano,
S. Navarro,
C. Vázquez,
A. Llombart-Bosch

Valor pronóstico del estudio de la ploidía y proliferación celular en el carcinoma ductal invasivo. Estudio retrospectivo de 184 casos

Pronostic significance of ploidy and cellular proliferation studies in invasive ductal carcinoma. Retrospective study of 184 cases

SUMMARY

We present a retrospective study of tumoral ploidy and cell proliferative index performed on 184 cases diagnosed of invasive ductal breast carcinoma and treated with radical mastectomy during the period 1979-1985 and a follow-up over 10 years. The methodology included static cytometry and flow cytometry. As parameters of cell proliferation we evaluated expression of PCNA and S-fraction of cell cycle.

A statistically significant correlation between static cytometry and flow cytometry was obtained (p -value < 0.01). Moreover, we observed a correlation between time of survival and the results obtained with flow cytometry (p -value < 0.05); low survival (< 3 years) was correlated with diploidy, intermediate survival (3-10 years) with aneuploidy and high survival ratio (> 10 years) correlated with diploidy. The median survival in diploid cases was higher (7.18 years) than in aneuploid cases (6.48 years).

PCNA expression was statistically correlated with the data obtained with flow cytometry (p -value < 0.05) but not with other parameters (time of survival, mitotic index, S-fraction or G2S fraction).

We conclude that although histopathology is the main prognostic indicator in breast cancer, the study of ploidy and the expression of PCNA could differentiate between groups of patients with different evolution of disease.

Departamento de Patología.
Hospital Clínico Universitario.
Valencia. Servicio de Cirugía.
Instituto Valenciano
de Oncología (IVO). Valencia.

Correspondencia:
Dra. P. Soriano Sarrió.
Departamento de Patología.
Hospital Clínico Universitario.
Avda. Vicente Blasco Ibáñez, 17.
46010 Valencia.

Palabras clave:

Carcinoma mamario. CFM. CMF. PCNA.

Key words:

Breast cancer. Cytometry. CFM. CMF. PCNA.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de mama es el tumor maligno más frecuente en la mujer y que causa más muertes dentro de este colectivo. En España es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, ya que los tumores de mama suponen el 29,02 % del total, estimándose la incidencia en 30-40/100.000 mujeres¹.

Aunque la histopatología continúa siendo la principal fuente de datos pronósticos para clasificar las lesiones mamarias, numerosos autores han intentado estudiar otros factores con significado pronóstico añadido al anterior^{2,3}, como es el estudio de la ploidía⁴, los parámetros de proliferación celular como la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular⁵⁻⁷), la fracción celular en síntesis y la fracción en G2 y en síntesis.

La expresión de PCNA como marcador de proliferación y su correlación con el marcate con timidina tritada ha sido bien demostrada⁸. Asimismo, en otros estudios, la expresión de PCNA ha sido correlacionada con el tamaño, grado e índice mitótico tumoral^{13,14,19}, así como con la aneuploidía^{10,16}. Por otra parte, el contenido de DNA medido por citometría estática no parece tener relación con los niveles receptores hormonales⁹.

En este contexto, Camplejohn et al (1995)¹¹ en un estudio de 881 carcinomas mamarios demostraron que la fracción S (SPF) era un marcador significativo importante en cuanto a la supervivencia total, supervivencia libre de recaída y supervivencia después de la recaída. Otros autores han correlacionado una alta fracción de síntesis con la positividad ganglionar^{15,16}, la aneuploidía y el grado tumoral alto¹⁸.

Nuestro objetivo en el presente trabajo es confirmar, si es posible, el valor pronóstico en la determinación de la ploidía nuclear y el índice proliferativo en un grupo de 184 casos de cáncer mamario.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se analizaron todos los carcinomas ductales con material e historia disponibles, procedentes de los archivos del Instituto Valenciano de Oncología, comprendidos entre 1979 y 1985, con la finalidad de poder disponer de un correcto seguimiento.

En total analizamos 184 casos de mujeres, todas ellas tratadas con mastectomía radical y disección axilar pero sin quimioterapia previa.

Los datos clínicos obtenidos de cada paciente fueron: la edad en el momento del diagnóstico, estado pre o posmenopáusico, localización, tamaño macroscópico de la tumoración, la fecha de cirugía, tipo de intervención realizada, el número de ganglios extirpados, el número de ganglios afectos, tipo de tratamiento neo o coadyuvante recibido, marcadores hormonales positivos o negativos (por estudios bioquímicos), fecha de la primera recidiva, fecha de la primera metástasis, fecha de la última visita, así como la fecha de la muerte y su causa (en aquellos casos que los enfermos fallecieron).

Todos los tumores habían sido fijados en formol tamponado e incluidos en parafina valorando en ellos los parámetros histopatológicos, morfométricos, ploidía tumoral, así como la fracción proliferativa de dichos tumores.

El análisis histopatológico se realizó a partir de cortes de 3 μ , teñidos con hematoxilina-eosina. Los datos obtenidos fueron: el tipo histopatológico tumoral según

la OMS, el Índice de Scarff-Bloom, el porcentaje de necrosis tumoral, la intensidad de infiltrado inflamatorio crónico acompañante y las lesiones mamarias asociadas (grado de mastopatía). También se consideró el número de ganglios axilares infiltrados por el tumor, cuando había invasión linfática.

Con la citometría estática (CFM) se cuantificó el DNA tumoral a partir de cortes desparafinados y teñidos con la tinción de Feulgen modificada. Para ello se cuantificaron 200 células de cada caso utilizando un microespectrofotómetro de barrido modelo 01 de Carl Zeiss con objetivos y condensador panacromáticos de apertura variable entre 0,1 y 0,9. Los parámetros de cuantificación utilizados para la valoración de cada uno de los casos se realizó en base a los siguientes criterios:

- *Diploide*: cuando la cantidad de DNA estaba comprendida entre 0,9 y 1,1.
- *Hiperdiploide*: cantidad de DNA entre 1,10 y 1,39.
- *Tridiploide*: cantidad de DNA entre 1,40 y 1,60.
- *Hipertriploide*: cantidad de DNA entre 1,61 y 1,69.
- *Tetraploide*: cantidad de DNA entre 1,90 y 2,10.
- *Hipertetraploide*: cantidad de DNA mayor de 2,10.

Con el fin de unificar resultados y comparar estos parámetros se utilizó el término aneuploide en todos aquellos casos que no fueron diploides.

Para la citometría de flujo (CMF) y partiendo de material en parafina fue necesario un procesamiento de la muestra para obtener una suspensión celular¹⁸. Para ello utilizamos el método descrito por Kedley et al (1983). posteriormente para el análisis del DNA se utilizó un citómetro de flujo Coulter EPICS profile (Coulter Electronic Inc., Hialeah, Fc.) equipado con un láser de argón de 15 mW y 400 nm^{19,21}.

Para emitir unos resultados a partir de toda la información almacenada, se utilizó el programa m-cycle.

En este trabajo sólo estudiamos los casos con un coeficiente de variación de 10 o menos, siguiendo los criterios de la mayoría de los autores que han trabajado con material parafinado (Kaplan, 1986; Guo, 1989). Con esta técnica, además de valorar el índice DNA, se puede obtener el coeficiente de variación de cada pico, la relación entre fase G0-G1 y G2-M y el porcentaje de células correspondientes a cada una de las fases.

Para el análisis inmunohistoquímico de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) se utilizó la técnica de ABC peroxidasa con un anticuerpo monoclonal clon PC10(DAKO), a una dilución de 1:20 (fig. 1). En cada caso se valoró el número de núcleos inmunoteñidos con un recuento total de 1.000 núcleos.

RESULTADOS

Entre las 184 mujeres estudiadas con carcinoma tipo ductal invasivo, la supervivencia media obtenida fue de 6,74 años (DE 3,91). Puesto que en la muestra existen pacientes vivas en la fecha del último control al finalizar el estudio, habría que matizar el concepto de "supervivencia mínima" o "supervivencia a fecha del último control". El 49,2% de las pacientes tuvieron una supervivencia superior a 7 años. Existían 80 pacientes fallecidas en la fecha del último control al cierre del estudio. Para estas últimas el promedio de supervivencia fue de 3,73 años (DE 2,46).

Para poder unificar resultados se ha establecido tres grupos de riesgo, definidos según el índice de Scarff-Bloom, el tamaño tumoral y el número de ganglios metastásicos. Los criterios establecidos fueron: grupo A de alto riesgo, Grupo B de riesgo medio y grupo C con bajo riesgo (tabla 1).

Al establecerse esta división de los pacientes en tres niveles de riesgo se pretende analizar en qué parámetros se observan diferencias significativas según el nivel de malignidad, es decir, determinar qué valores de los marcadores estudiados se asocian de una manera más relevante con un riesgo alto, moderado o bajo. Del mismo modo, se desea conocer de qué modo la pertenencia a un grupo de riesgo u otro determina la evolución a largo plazo (elevación de la supervivencia), la existencia de recurrencia o la aparición de metástasis.

Tras el estudio estadístico detallado de todos los datos disponibles se han obtenido una serie de correlaciones que esbozamos detalladamente a continuación.

El nivel de riesgo del paciente se correlacionó significativamente (p -valor < 0,01) con la presencia de recurrencia. Así, en mujeres de riesgo C (bajo) se observó una tasa de recurrencia del 33%, en el nivel B (medio) se incrementó a un 49%, y alcanzó el 62,2% en el grupo A (alto riesgo).

Puede afirmarse, pues, que conforme aumenta el nivel de riesgo se presenta mayor probabilidad de recurrencia.

El grupo de riesgo también se asoció significativamente (p -valor < 0,01) con la presencia/ausencia de metástasis. Así, en riesgo C (bajo) hasta un 73,5% de las pacientes no tuvieron metástasis; en riesgo B (medio) esta proporción decreció al 50,8%; finalmente en riesgo A (alto), sólo el 41,3% de las historias estaban libres de metástasis. Con respecto a la primera localización de la metástasis se vio que un 22% de las mujeres presentaron metástasis óseas, 13,3% pleuropulmonares (vía hematogena), 5,2% ganglionares (ganglios no axi-

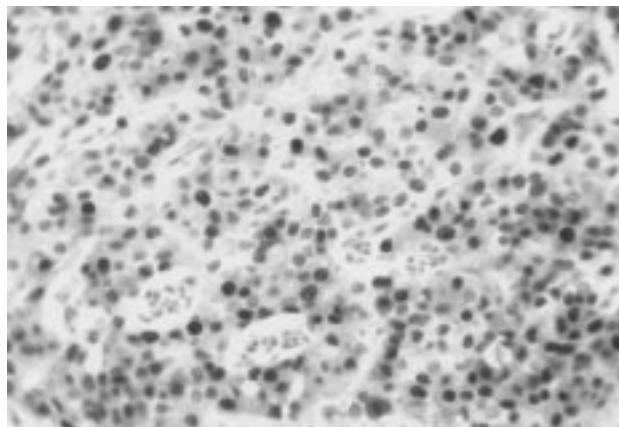


Fig. 1. Estudio inmunohistoquímico frente al antígeno de proliferación celular, mostrando intensa positividad nuclear (ABC peroxidasa, $\times 40$).

TABLA 1
CRITERIOS ESTABLECIDOS

Índice de Scarff-Bloom	Tamaño tumoral	N.º ganglios
Grupo A	8-9	> 40 mm
Grupo B	6-7	20-40 mm
Grupo C	3-4-5	< 20 mm

lares), 3,5% hepáticas, 1,7% en SNC, 1,2% cutáneas, 1,2% en parótida y 0,6% metástasis en suprarrenales.

Por tanto, niveles de riesgo creciente se asociaron con una mayor probabilidad de sufrir metástasis. La localización de las metástasis fue independiente del grupo de riesgo al que pertenecía la mujer. En nuestro estudio, la mayor parte de los casos pertenecientes al grupo de bajo riesgo no presentaron metástasis, pero si aparecieron fueron metástasis óseas o pleuropulmonares (vía hematogena). Sin embargo, los pertenecientes al grupo de medio y alto riesgo sí que presentaron metástasis, siendo las más frecuentes las óseas. Asimismo, se observó que, si ya habían metástasis en el momento del diagnóstico inicial, éstas ocurrían en el grupo de alto riesgo.

En cuanto al factor supervivencia y los grupos de riesgo, no se obtuvo relación estadísticamente significativa aunque sí pudimos apreciar una tendencia general. Así, el porcentaje de mujeres que vivieron menos de 3 años fue aumentando conforme aumentó el grupo de riesgo, siendo de 4, 13 y 22% para los grupos de bajo, medio y alto riesgo, respectivamente. Eso es, conforme aumentó el grupo de riesgo, las mujeres murieron más pronto. La

misma relación se obtuvo en el grupo de mujeres que vivieron entre 3-6,99 años, cuyas proporciones fueron 27, 27,8 y 31,7%. Por contra en el período de 7-9,99 años, el porcentaje de mujeres sufrió un descenso conforme aumentó el nivel de riesgo, siendo de 36,1, 31,7 y 22%, es decir, que la supervivencia fue más alta en las mujeres de bajo riesgo. La misma tendencia se observó en el grupo de ≥ 10 años, siendo la proporción de 25, 20,8 y 31,7% para los grupos de bajo, medio y alto riesgo.

También se realizó un estudio estadístico para tratar de correlacionar la supervivencia tanto con los resultados obtenidos por citometría estática y de flujo, junto a los obtenidos mediante la expresión inmunohistoquímica del PCNA.

Los resultados obtenidos tanto por CMF como por CFM aparecen relacionados significativamente (p -valor < 0,01). Ambos marcadores proporcionaron en la mayor parte de los casos el mismo resultado (bien diploide, bien aneuploide) (fig. 2A-D).

Así, por CMF se obtuvieron 97 casos diploides y 62 aneuploides, mientras que por CFM fueron 72 casos diploides y 87 aneuploides. El tiempo de supervivencia se relacionó con el valor de la CMF (p -valor < 0,05). Así, en las supervivencias < 3 años, el 24 % de los casos fueron diploides (todos éstos con alta fracción de síntesis con la CMF) y el 18,1 % aneuploides (obtenidos por CFM). Para supervivencias entre 3 y 6,99 años fueron el 21,3 % diploides y el 36,2 % aneuploides. Para supervivencias entre 7 y 9,99 años los porcentajes fueron 26,7 % diploides y 31,9 % aneuploides. En cuanto a supervivencias superiores o iguales a 10 años, las cifras obtenidas fueron 28 y 13 % para los casos diploides y aneuploides, respectivamente.

Por CMF se observó una mayor proporción de casos aneuploides en el período de supervivencia de < 3 años a 6,99 años, y una mayor proporción de casos diploides en períodos de supervivencia mayores de 7 años. Por tanto, la tendencia común observada es que los casos aneuploides vivieron menos tiempo que los casos diploides.

El estudio del contenido de DNA determinado tanto por CFM como por CMF demostró que tanto la supervivencia media como la supervivencia máxima disminuyen en los casos aneuploides (tabla 2).

Se ha llevado a cabo también un análisis bivariante del PCNA frente a otros parámetros (mitosis, fracción de síntesis y fracción G2S), y aunque se observó una discreta tendencia a la proporcionalidad directa entre ellos, no se pudo alcanzar ninguna correlación estadísticamente significativa (tablas 3-5). Tampoco se obtuvo una

correlación estadísticamente significativa entre el PCNA y el tiempo de supervivencia de las enfermas.

Si agrupábamos los valores obtenidos con el PCNA en dos grandes grupos (< 25 y ≥ 25 de positividad), se obtuvo una correlación estadísticamente significativa frente a la CMF (p -valor < 0,05). En concreto, con valores de PCNA > 25 existía una proporción similar de resultados diploides y aneuploides. Para valores de PCNA < 25 %, el porcentaje de diploides subía al 69,5 % y el de aneuploides descendió al 30,5 %. Esto podría significar a nuestro juicio que la expresión baja de PCNA se correlaciona mejor con la diploidía.

DISCUSIÓN

En el estudio pronóstico del cáncer de mama la evaluación del contenido de DNA ha sido relevante usando tanto citometría estática^{18,22} como citometría de flujo²³, encontrándose una correlación significativa entre la ploidía tumoral y el grado histológico. Así, los tumores diploides son generalmente mejor diferenciados, mientras que los aneuploides son usualmente pobremente diferenciados.

Evidencias crecientes sugieren que la estimación del contenido de DNA por citometría está estrechamente relacionada con el comportamiento clínico del carcinoma mamario^{11,24-26}.

Numerosos estudios han sugerido una correlación entre el contenido del DNA y el curso clínico de pacientes con carcinoma de mama^{22,25,27,28}. Todos ellos coinciden en que los tumores diploides con un pequeño número de células proliferantes, están asociados a mayores intervalos libres de enfermedad y de supervivencia, a diferencia de las neoplasias aneuploides con fracción elevada de células proliferativas. Johnson et al¹² estudiaron a 100 mujeres con carcinoma mamario y ganglios negativos tratando de relacionar la influencia del tamaño tumoral, el grado nuclear y el contenido en DNA por citometría de flujo, con la supervivencia total.

Pacientes con carcinomas diploides vivieron significativamente más que aquellas con DNA aneuploide. Mientras que pacientes con fracción de síntesis menor del 10 % vivieron significativamente más que aquellas cuya fracción de síntesis fue del 10 % o mayor. Sin embargo, fue el tamaño tumoral el que más impacto tuvo en la supervivencia, demostrándose mediante un análisis multivariante de la varianza, que éste era el que mayor efecto tenía sobre el pronóstico. Sin embargo, en el mismo estudio el grado tumoral no tuvo influencia significativa en la supervivencia.

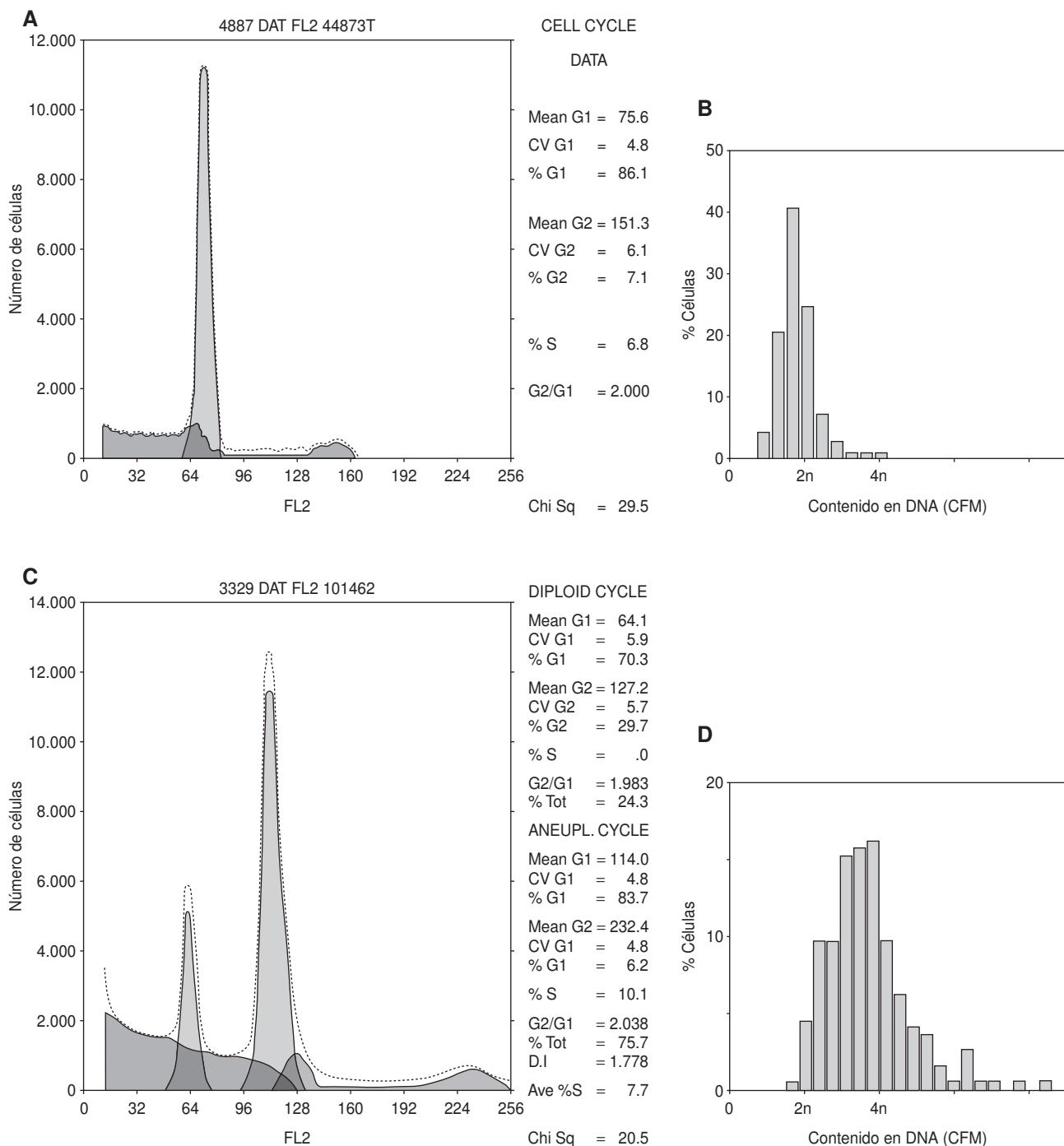


Fig. 2. Análisis de la ploidía en el carcinoma mamario. A) y B) carcinoma ductal infiltrante con claro pico diploide demostrado por CMF y CFM; C) y D) carcinoma ductal infiltrante con contenido de DNA aneuploide por CMF y CFM.

Nosotros también realizamos un estudio de supervivencia tanto para los casos obtenidos por CMF como por CFM, siendo éste estadísticamente significativo (p -valor < 0,05). La tendencia observada es que los casos aneuploides vi-

ven menos tiempo que los casos diploides. El contenido de DNA determinado tanto por CMF como CFM demostró que tanto la supervivencia media como la supervivencia máxima disminuyen en los casos aneuploides.

TABLA 2
SUPERVIVENCIA SEGÚN CITOMETRÍA CMF Y CFM

	Total	CMF		CFM	
		Diploide	Aneuploide	Diploide	Aneuploide
Total	165 100,0%	101 100,0%	64 100,0%	75 100,0%	94 100,0%
Supervivencia (en años)					
< 3	34 20,6 %	17 16,8 %	17 26,6 %	18 24,0 %	17 18,1 %
3-6,99	49 29,7 %	27 26,7 %	22 34,4 %	16 21,3 %	34 36,2 %
7-9,99	48 29,1 %	32 31,7 %	16 25,0 %	20 26,7 %	30 31,9 %
≥ 10	34 20,6 %	25 24,8 %	9 14,1 %	21 28,0 %	13 13,8 %
Supervivencia					
Media	6,78	7,38	5,83	7,18	6,48
DE	3,86	3,88	3,65	4,27	3,50
Mínimo	0,25	0,48	0,25	0,25	0,59
Máximo	15,59	15,59	14,65	15,59	14,04

Respecto al PCNA, Battersby⁸ encontró una alta correlación positiva entre el índice de marcaje con timidina tritiada (TLI) y la inmunorreactividad frente al anticuerpo monoclonal para PCNA. Este estudio demostró

que el DNA provee un índice útil de síntesis del DNA y de proliferación celular.

Frierson¹³ no encontró correlación estadística entre la positividad del PCNA (PC10) y la edad del paciente, el *status* ganglionar, los niveles de receptores hormonales, ploidía, formación tubular o pleomorfismo nuclear. Sin embargo, sí encontró correlación significativa entre la positividad frente a PCNA y el tamaño tumoral, el grado histológico y el porcentaje mitótico. El rango de positividad frente al PCNA osciló del 3 al 85% (36%).

En nuestros casos la media para el PCNA en tejido fijado en formol fue de 27,2%.

Según Schimmelpenning et al (1993)¹⁰ existe una asociación directa entre la expresión del PCNA, el grado histológico alto y la aneuploidía. Las pacientes que presentaban tumores con histogramas cerca del DNA diploide y más del 20% de células neoplásicas inmunorreactivas frente a PCNA, tuvieron un curso clínico significativamente peor que aquellos con un histograma similar y menos del 20% de células inmunorreactivas al PCNA. En cambio, la inmunorreactividad frente al PCNA no aportó información pronóstica adicional para pacientes con diploidía distinta o variantes de tumores aneuploides. En un análisis multivariante, tanto el *status* ganglionar como el tamaño tumoral y la ploidía del DNA, tuvieron un valor pronóstico significativo. Estos hallazgos indicaron que aquellos carcinomas caracterizados

TABLA 3
MITOSIS SEGÚN PCNA

	Total	PCNA 100					
		< 10		10-19,99		20-39,99	≥ 40
Total	159 100,0 %	41 100,0 %	33 100,0 %	53 100,0 %	32 100,0 %		
Mitosis							
< 10 p.c.	101 63,5 %	31 75,6 %	19 57,6 %	31 58,5 %	20 62,5 %		
10-20 p.c.	55 34,6 %	9 22,0 %	14 42,4 %	21 39,6 %	11 34,4 %		
> 20 p.c.	3 1,9 %	1 2,4 %	0 0,0 %	1 1,9 %	1 3,1 %		

TABLA 4
FRACCIÓN DE SÍNTESIS SEGÚN PCNA

	Total	PCNA 100					
		< 10		10-19,99		20-39,99	≥ 40
Total	140 100,0 %	33 100,0 %	28 100,0 %	51 100,0 %	28 100,0 %		
Fracción síntesis							
≤ 10	60 42,9 %	15 45,5 %	11 39,3 %	21 41,2 %	13 46,4 %		
> 10	80 57,1 %	18 54,5 %	17 60,7 %	30 58,8 %	15 53,6 %		

TABLA 5
FRACCIÓN G2S SEGÚN PCNA

	Total	PCNA 100								
		< 10		10-19,99		20-39,99		≥ 40		
Total	139	100,0%	33	100,0%	28	100,0%	50	100,0%	28	100,0%
Fracción G2S										
≤ 20	61	43,9%	15	45,5%	11	39,3%	21	42,0%	14	50,0%
> 20	78	56,1%	18	54,5%	17	60,7%	29	58,0%	14	50,0%

por actividad proliferativa alta y patrón de distribución cerca del DNA diploide, pueden mostrar progresión tumoral rápida. La positividad frente al PCNA osciló entre el 5 y el 60% (valor medio, 13,63% ± 10,89%).

Aunque no hubo correlación estadísticamente significativa entre el PCNA, el índice mitótico, la fracción de síntesis o la fracción G2S, sí pudimos apreciar una determinada tendencia. De forma que el grupo con < 10 mitosis h.p.f. se asociaba más frecuentemente al grupo en el cual el índice de PCNA era < 10, el grupo que presentaba de 10 a 20 mitosis se asociaba más frecuentemente al grupo con índice de PCNA entre 10 y 19,9, y el grupo con más de 20 mitosis se asociaba más frecuentemente al grupo con un índice de PCNA de ≥ 40 (tabla 3).

Camplejohn et al en 1995¹¹ realizaron un estudio de 881 pacientes con carcinoma mamario tratado en el mismo centro, demostrando que la fracción en fase S (SPF) era un marcador significativo importante en cuanto a la supervivencia total (OS), supervivencia libre de recaída (RFS) y supervivencia después de la recaída (SAR). Para OS y RFS, el SPF fue el segundo indicador más fuerte del curso clínico de la enfermedad después del estado ganglionar, y para el SAR éste fue el marcador pronóstico más fuerte. El SPF se correlacionó positivamente con el grado histológico pero fue el indicador más fuerte de la supervivencia.

La distribución de valores fue claramente distinta para las dos clases de ploidía del tumor, ya que tumores DNA aneuploides tienen una media de SPF significativamente más alta. Por contra tumores con varias poblaciones aneuploides (tumores multiploides) muestran un pronóstico peor que otros tumores aneuploides, si bien esta tendencia no alcanza significado estadístico. Steck et al¹⁸ también demuestran que una alta fracción en S o G2S se correlaciona con DNA aneuploide, grado alto del tumor y marcadores hormonales negativos.

Nosotros, al igual que Camplejohn et al¹¹, encontramos que la distribución de los valores, tanto para SPF (fracción proliferativa de síntesis), como para la fracción

G2S, es significativamente diferente para ploidías tumorales distintas, siendo las medias más altas para tumores aneuploides. La media obtenida de SPF para tumores diploides fue de 10,18, siendo de 13,32 en tumores aneuploides. La media obtenida para fracción G2S fue de 18,51 para tumores diploides y de 25,25 para tumores aneuploides.

En base al presente estudio, resaltamos el valor pronóstico complementario de la determinación de los parámetros morfométricos, citométricos y de proliferación en el carcinoma ductal infiltrante de mama.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio retrospectivo de la ploidía tumoral y del índice de proliferación celular de 184 mujeres diagnosticadas de carcinoma ductal invasivo de mama y tratadas con mastectomía radical durante el período 1979-1985, con el propósito de disponer de un período de seguimiento superior a 10 años.

Las técnicas empleadas fueron citometría estática (CFM) y citometría de flujo (CMF). También se valoraron los parámetros de proliferación celular (PCNA, fracción de síntesis y fracción G2S).

Se encontró correlación estadísticamente significativa entre la citometría estática y la flujo (*p*-valor < 0,01), observándose que ambas técnicas proporcionaron en la mayor parte de los casos el mismo resultado.

También se comprobó que el tiempo de supervivencia se correlacionaba con los valores obtenidos por CFM (*p*-valor < 0,05). En concreto para supervivencias bajas (< 3 años) se obtuvo un discreto predominio de casos diploides. Las supervivencias medias (3-10 años) se presentaron asociadas a tipología aneuploide y las largas (> 10 años) se asociaron claramente a CFM diploide. Asimismo se observó, aún sin significado estadístico, que la media de supervivencia era mayor en los casos diploides que en los aneuploides, siendo en el primero de

7,18 años y en el segundo de 6,48 años. La expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) mostró correlación estadísticamente significativa con los valores obtenidos por CMF (p -valor < 0,05), aunque no con otros parámetros estudiados (tiempo de supervivencia, índice mitótico, fracción de síntesis o fracción G2S).

Se concluye, por tanto, que aunque la histopatología continúa siendo la principal fuente de información pronóstico-evolutiva en el cáncer mamario, la citometría junto con el estudio de expresión de PCNA pueden contribuir significativamente a discernir grupos evolutivos diferentes.

REFERENCIAS

1. Wolman SR, Schinella RA, Gimotty P, Ownby H, Maloney T, Dawson PJ. A retrospective analysis of breast cancer based on outcome differences. *Hum Pathol* 1991; 22: 475-80.
2. Cowan WK, Henry J, Corbett IP, Reid WA, Horne CHW. Immunohistochemical and other features of breast carcinomas presenting clinically compared with those detected by cancer screening. *Br J Cancer* 1991; 64: 780-4.
3. Scmitt FC, Ponsa CV. Factores predictivos en la terapia del carcinoma de mama. *Rev Senol Patol Mam* 2000; 13: 31-8.
4. Luzzi P, Mangiavacchi P, Cevenini G, Marini D, Tosi P. Ploidy pattern and cell cycle in breast cancer as detected by image analysis and flow cytometry. *Cytometry* 1994; 18: 79-87.
5. Schimmelpenning H, Eriksson ET, Pallis L, Skoog L, Cedermark B, Auer GU. Immunohistochemical c-erbB-2 protooncogen expression and nuclear DNA content in human mammary carcinoma *in situ*. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 548-52.
6. Senra A, Quintela D. Los marcadores diagnósticos y pronósticos del cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mam* 1999; 12: 121-32.
7. Van Dierendonck JH, Keijzer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ. Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-72.
8. Battersby SAA. Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/cyclin. *Hum Pathol* 1990; 21: 781.
9. Rondez R, Pirozinski W. Determination of nuclear DNA content and hormone receptors in breast cancer by CAS100 cell analysis system as related to morphologic grade and biochemical results. *Anal Quant Cytol Histol* 1991; 13: 233-45.
10. Schimmelpenning H, Eriksson ET, Franzen Bo, Zetterberg A, Auer G. Pronostic value of the combined assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and nuclear DNA content in invasive human mammary carcinomas. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993; 423: 273-79.
11. Camplejohn RS, Gillet C et al. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. *Br J Cancer* 1995; 71: 140-5.
12. Johnson HJ, Belluco C, Abou-Azama AM, Dee S, Kahn L, Wise L. Prognostic factors in node-negative breast cancer. *Arch Surg* 1992; 127: 1386-91.
13. Frierson HF. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas; comparison with clinical and pathologic variables. *Mod Pathol* 1993; 6: 290-4.
14. Agarwal S, Jain R, Rusia U, Gupta RL. Proliferating cell nuclear antigen immunostaining in breast carcinoma and its relationship to clinical and pathological variables. *Indian J Pathol Microbiol* 1997; 40: 11-6.
15. Sneider J, Ruibal A, Sánchez J, Lucas R, Núñez ML, Tejerina A. Utilización de factores pronósticos tumorales para predecir la invasión ganglionar de la axila en cáncer de mama precoz. *Rev Senol Patol Mam* 1999; 12: 7-11.
16. Uzarevic B, Petrovecki M et al. Prognostic significance of cell cycle parameters in infiltrative ductal breast carcinoma. *J Clin Lab An* 1998; 12: 131-6.
17. Pinder SE, Sibbering DM et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer* 1995; 71: 146-9.
18. Steck K, Hunt K, Tucker S, Singletary S, El-Naggar AK. Flow cytometric analysis of ki-67 in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with tumor and patient characteristics. *Oncol Rep* 1999; 6: 835-8.
19. Torres FX, Brown RD, Linden MD, Zarbo RJ. Comparison of two methods of mechanical disaggregation of scirrhouss breast adenocarcinomas for DNA flow cytometric analysis of whole cells. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 8-13.
20. Kallioniemi OP, Holli K, Isola JJ, Rabinovitch PS. Automated peak detection and cell cycle analysis of flow cytometry DNA histograms. *Cytometry* 1994; 16: 250-5.
21. Lockett B. Automatic detection of clustered, fluorescent-stained nuclei by digital image-based cytometry. *Cytometry* 1994; 17: 1-12.
22. Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren A. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. *Can Res* 1984; 44: 394-6.
23. Olszewski W, Darzynkiewics Z, Rosen PP, Schwartz M, Melanen M. Flow cytometry of breast carcinoma. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptors. *Cancer* 1981; 48: 980-4.
24. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989; 320: 627-33.
25. Fallenius AG, Franzen SA, Auter GU. Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. *Cancer* 1988; 62: 521.
26. McGuire WL. Pronostic factors for recurrence and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1987; 10: 5-9.
27. Dressler L, Seamer L, Owens M, Clark G, McGuire W. DNA flow cytometry and pronostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988; 61: 420-7.
28. Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer—a study with long-term follow-up. *Br J Cancer* 1989; 60: 693.