

~~T. 673~~

BIO. T 4119

**FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGIA
UNIVERSITAT DE VALENCIA**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

**VALOR DE LA MORFOLOGIA CUANTITATIVA
PARA LA DETECCION DE LAS ALTERACIONES
CELULARES EN LAS DISPLASIAS Y
CARCINOMAS.**

(ESTUDIO SOBRE LA GLANDULA MAMARIA HUMANA)

Memoria presentada por la Licenciada
DA AMPARO RUIZ SAURI para aspirar
al grado de Doctor en Medicina por la
Universitat de Valencia.

Valencia, Junio 1993



UMI Number: U607464

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607464

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO PATOLOGIA

Autor AMPARO RUIZ SAURI

Título completo de la tesis "Valor de la morfología cuantitativa para la detección de las alteraciones celulares en las displasias y carcinomas. Estudio sobre la glandula mamaria humana".

Calificación APTO CUM LAUDE

Fecha de lectura 23 Julio 1993

Tribunal (Nombre y apellidos de los componentes)

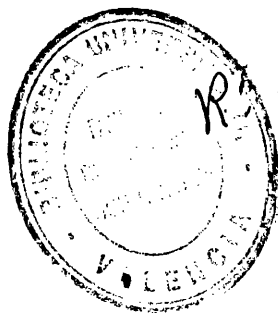
- Prof. Amando Peydro Olaya (Presidente)
- Prof. Guzman Ortuño Pacheco (Vocal)
- Prof. Emilio Alvarez Fernandez (Vocal)
- Prof. Ana Lluch Herrero (Vocal)
- Prof. Robert C. Callaghan (Secretario)

Director de la tesis

- Prof. Antonio Llombart Bosch

Dirección particular y teléf. del autor.

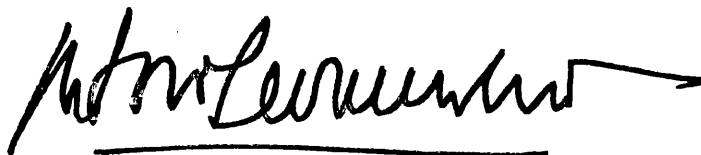
- José Ma Haro nº 59, pta. 30
- Tel. 372.72-12



D. ANTONIO LLOMBART BOSCH, Catedrático numerario de Histología, Embriología y Anatomía Patológica de la Facultat de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

CERTIFICA: Que D^a AMPARO RUIZ SAURI ha realizado personalmente, bajo mí dirección, el trabajo para optar al grado de Doctor en Medicina, titulado: «Valor de la morfología cuantitativa para la detección de las alteraciones celulares en las displasias y carcinomas. (Estudio sobre la glandula mamaria humana)».

**Y para que conste a efectos académicos, expido la presente en:
Valencia, Junio 1993.**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Lombart Bosch', with a horizontal line underneath it.

Fdo.: Prof. A. Lombart Bosch

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Antonio Llombart Bosch por su inestimable ayuda e inapreciable orientación tanto en el planteamiento y desarrollo de este trabajo como en el transcurso de los últimos 15 años.

Al Prof. D. Amando Peydró Olaya por haber inculcado en mí el amor a la morfología.

Al Prof. Antonio Pellin Perez, por su entusiasmo y comprensión.

Al Dr. Miguel Perez Bacete por su imprescindible ayuda en el terreno informático.

Al Dr. R. Callaghan por haberme introducido en el mundo de las técnicas cuantitativas.

A todos los miembros del Laboratorio Calderón por su colaboración y apoyo en el desarrollo de la técnica de citometría de flujo.

A todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica del I.V.O. por haberme proporcionado gran parte del material utilizado en este trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de Valencia por hacer agradables las horas de trabajo compartidas.

A la Srta. Gema Dobón por su buena disposición y estupenda realización de todos los cortes histológicos.

A D^a Pilar Torquemada y a la Srta. Elisa Alonso por su estímulo y ayuda en la parte técnica de este trabajo.

A D^a Elena Carcelén y D^a M^a Carmen Beitia por su constante apoyo y ayuda en el revelado y positivado de las fotos.

Al Dr. Sergio Almenar Medina, por TODO, sin su ayuda este trabajo no sería una realidad.

** El presente trabajo ha sido realizado con una ayuda de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (FCAECC)*

**Esta Tesis está dedicada a mi marido Sergio
y a mis hijos Sergio y Jorge, con todo mi cariño.**

Cuando te digo: «alta»
no pienso en proporciones, en medidas:
incomparablemente te lo digo.

Alta la luz, el aire, el ave;
alta, tú, de otro modo.

Pedro Salinas

INDICE

INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	6
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	9
Anatomía Patológica.....	9
Morfometría.....	28
Citofotometría Estática.....	37
Citometría de Flujo	51
MATERIAL Y METODOS.....	69
Estudio por medio de Morfometría	70
Estudio por medio de Citofotometría.....	72
Estudio por medio de Citometría de Flujo.....	76
RESULTADOS.....	88
Caracterización histopatológica	88
Análisis morfométrico.....	95
Citofotometría (Citometría estática).....	107
Citometría de flujo.....	109
Analogías y diferencias de la citometría estática con respecto a la citometría de flujo.....	112
ICONOGRAFIA.....	117
TABLAS.....	133
FIGURAS.....	144
GRAFICAS.....	154
DISCUSION	195
Morfometría.....	196
Citofotometría	202
Citometría de flujo.....	206
Analogías y diferencias de la citometría estática con respecto a la citometría de flujo.....	210
CONCLUSIONES.....	217
BIBLIOGRAFIA.....	220

INTRODUCCION

Del mismo modo que reconocemos a nuestros familiares, amigos y personas de trato cotidiano sin reparar en su estatura, índices craneométricos, tamaño de las extremidades, peso, etc., así los anatomopatólogos convencionales reconocen las lesiones tras haber llevado a cabo un entrenamiento pormenorizado en virtud del cual maestros expertos corrigen las apreciaciones de sus discípulos hasta considerarlos aptos para dicha facultad. Esta suele consistir en el reconocimiento de formas sin que intervenga un importante contingente de datos numéricos.

La histopatología convencional ha caracterizado las formas celulares y los patrones arquitecturales según dos esquemas básicos: o bien por medio de descripciones que establezcan una correspondencia entre tales estructuras y en la experiencia cotidiana (por ejemplo "células en anillo de sello", "núcleos en forma de cigarro puro", "patrón infiltrativo en fila india", "lobulillos con forma de saco de perdigones"), o bien por medio de términos referidos a entes geométricos sencillos (por ejemplo "células poligonales", "células redondas").

Sin embargo, aun en el caso de utilizar símiles geométricos, es infrecuente encontrar mediciones de los parámetros que caracterizan a dichas figuras. Así, cuando se habla de núcleos elípticos, difícilmente se mide la distancia interfocal, la excentricidad, el área, etc. En definitiva, no es frecuente la cuantificación de las formas geométricas que el patólogo utiliza para describir las lesiones.

Centrándonos en el ámbito de la patología mamaria, parece claro que todas las lesiones de dicha glándula están perfectamente caracterizadas por medio de descripciones morfológicas convencionales (AZZOPARDI, 1979). No obstante, en la última década se han definido con cierta precisión las hiperplasias ductales y lobulillares atípicas que parecen ser el punto de arranque de lesiones carcinomatosas (PAGE, 1978; PAGE, 1985; DUPONT, 1985). Sin embargo, existen datos que soportan la idea de una cierta dosis de subjetividad a la hora de interpretar estas lesiones borderline (ROSAI, 1991; SCHNITT, 1992).

En el caso concreto de la patología que nos ocupa se han utilizado diversos marcadores inmunohistoquímicos y combinaciones de los mismos para tratar de distinguir entre lesiones benignas y malignas y, de tal forma, lograr caracterizar correctamente a las hiperplasias atípicas (PAPOTTI, 1983; OHUCHI, 1987; JARASH, 1988; RAJU, 1989; RAJU, 1990).

Esta tesis se mueve predominantemente en el terreno de la morfometría y de la citofotometría y, básicamente, tiene como objetivo el analizar las diferencias existentes entre lesiones proliferativas sin atipias (Reclus II) y lesiones proliferativas con atipias (Reclus III), por una parte, y lesiones proliferativas con atipias y carcinomas in situ, por otra. También se intenta encontrar parámetros que permitan distinguir todas las lesiones anteriormente mencionadas de los carcinomas invasores.

Existen abundantes estudios morfométricos y por citometría estática y de flujo referentes a lesiones carcinomatosas (DZIURA, 1979; ZAJDELA, 1979; VAN BOGAERT, 1980; CORNELISSE, 1981; BAAK, 1982; MOSSLER, 1982; VAN DER LINDEN, 1986; ZAJICEK y cols., 1986; ZARBO, 1987; WEABER, 1990; WITZIG y cols., 1991). Sin embargo son escasos los estudios estrictamente centrados en el análisis de lesiones incluidas en el contexto de la mastopatía fibroquística. Habitualmente, en los estudios cuantitativos se ha empleado la mastopatía como patrón comparativo con respecto a las lesiones carcinomatosas (foco principal de atención de los mismos).

Son particularmente escasos los trabajos cuantitativos referentes a las hiperplasias ductales con o sin atipias (DZIURA, 1979; BOON, 1982, BAAK, 1985, PIENTA, 1991; OLINICI, 1987; DE POTER, 1987; GUSKI, 1988; NORRIS, 1988; KING, 1991) y no nos consta la existencia de publicaciones referentes a la hiperplasia lobulillar atípica.

Movidos por estas razones hemos analizado lesiones hiperplásicas convencionales, atípicas y lesiones carcinomatosas cuantificando parámetros morfométricos (área nuclear, perímetro nuclear, diámetro máximo y dos factores de forma) y cuantificando la cantidad de ADN por citofotometría estática y de flujo.

Resulta evidente que utilizamos una metodología híbrida por cuanto cuantificamos lesiones que han sido previamente clasificadas por métodos histopatológicos convencionales. No obstante, esta situación es inevitable por cuanto no existe otro tipo de clasificación disponible en la actualidad.

OBJETIVOS

Al igual que se ha demostrado que es importante tipificar histopatológicamente los carcinomas de mama, cuantificar la cantidad de ADN, la fracción proliferativa y el área nuclear para predecir el pronóstico y el comportamiento de estos tumores, también parece importante realizar éstas mismas determinaciones sobre lesiones benignas de la mama (ya sean con atipias o sin ellas), puesto que se ha demostrado, que algunas de éstas lesiones aumentan el riesgo de padecer cancer.

Con este motivo nos hemos planteado realizar un estudio comparativo de las lesiones benignas y borderline de la mama. Para ello hemos establecido tres grupos de trabajo:

1.- Grupo de lesiones ductales:

- 1.1. Hiperplasia ductal sin atipias.
- 1.2. Hiperplasia ductal con atipias.
- 1.3. Carcinoma in situ (ductal: comedo o no comedo).
- 1.4. Carcinoma in situ (papilar: micropapilar o cribiforme).

2.- Grupo de lesiones lobulillares:

- 2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias.
- 2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias.
- 2.3. Carcinoma lobulillar in situ.

3.- Grupo de lesiones de mastopatía fibroquística variadas. Incluye:

- 3.1. Adenosis.
- 3.2. Metaplasia apocrina.
- 3.3. Esclerosis radial.

A su vez, estas lesiones las hemos comparado con los carcinomas infiltrantes, de diferentes tipos (ductal, tubular, lobulillar, medular y apocrino).

Esta comparación la hemos hecho en base a una serie de análisis cuantitativos para contrarrestar en cierta medida el posible grado de

subjetividad de los diagnósticos anatomopatológicos convencionales. En concreto hemos realizado los siguientes estudios:

1.- Análisis morfométrico. En este apartado valoraremos los siguientes parámetros:

- 1.1. Area nuclear.
- 1.2. Perímetro nuclear.
- 1.3. Diámetro máximo del núcleo.
- 1.4. Factor de forma (del área y del perímetro).

Basados en el hecho de que cuanto mayor es el núcleo celular y mayor la irregularidad, más agresivo puede ser el comportamiento de esa lesión.

2. Análisis Citofotométrico. Que mide la cantidad de ADN presente en el núcleo celular. Esta cantidad puede ser normal (diploide) o bien puede estar alterada (aneuploide). Basados en estas premisas, intentaremos tipificar las diferentes lesiones para poder predecir cual va a ser el comportamiento de ellas. Utilizaremos dos técnicas:

- 2.1. Citometría estática.
- 2.2. Citometría de flujo.

Ambos métodos miden la cantidad de ADN, solo que cada uno de ellos tiene unas características particulares que hacen interesante hacer la medición por ambos métodos, a la vez que realizaremos una comparación entre los resultados de ambos para ver cual es la sensibilidad y la especificidad de cada uno de ellos.

Estas pruebas las realizamos sobre cada una de las lesiones descritas anteriormente, de manera que valoramos los resultados obtenidos en cada tipo de lesión y los contrastamos para ver si podemos tipificar las lesiones en base a técnicas cuantitativas (morfométricas y citofotométricas).

**REVISION
BIBLIOGRAFICA**

ANATOMIA PATOLOGICA

INTRODUCCION.

"Mastopatía" es un termino ambiguo que se aplica a un grupo de lesiones mamarias en las que se observa, en mayor o menor medida, fibrosis, formación de quistes, metaplasia e hiperplasia (ANDERSON, 1977). Por esta razón se han aplicado diversas denominaciones en función de las características histopatológicas dominantes, a saber : "mastopatía fibrosa" (MINKOWITZ, 1973), "Mastopatía fibroquística" (LLOMBART-BOSCH, 1989), "mastopatía fibroquística proliferativa" (GOMPEL, 1990), "enfermedad quística simple" (ANDERSON, 1980), "enfermedad quística crónica" (FRANTZ, 1951), "enfermedad quística hiperplásica" (ANDERSON, 1983), "displasia mamaria" (LLOMBART-BOSCH, 1989), "displasia fibroquística de la mama" (VAN BOGAERT, 1980), etc. El término más aceptado entre los patólogos norteamericanos es "enfermedad fibroquística" ("*fibrocystic disease*") (KERN y BROOKS, 1969; ROSAI, 1989) o "complejo enfermedad fibroquística" ("*fibrocystic disease complex* ") (PAGE, 1978) El *CONSENSUS MEETING* celebrado en Octubre de 1985 (HUTTER y cols., 1986) recomendó los términos "cambio fibroquístico" o "condición fibroquística" .

La mastopatía fibroquística es una condición común entre las mujeres jóvenes y su incidencia aumenta con la edad, alcanzando un pico en torno a los 40-45 años (GOMPEL, 1990).

Segun PAGE (1978) el complejo enfermedad fibroquística ("*fibrocystic disease complex*") incluye las siguientes lesiones : quistes, ectasia ductal, adenosis esclerosante, fibroadenoma, cambio apocrino, cambio papilar apocrino, hiperplasia ductal, hiperplasia epitelial papilar con cambios citológicos apocrinoides, hiperplasia ductal con atipia e hiperplasia lobulillar atípica.

La mastopatía funcional (GOMPEL,1990) es muy común y, probablemente, representa una alteración fisiológica debida a cambios cíclicos, estímulo hormonal alterado o hipersensibilidad del tejido mamario a la actividad hormonal normal . Este proceso ha sido denominado "enfermedad quística simple" (ANDERSON 1977) o "enfermedad no proliferativa" (PAGE, 1986) y está caracterizada histopatológicamente por quistes de varios tamaños, ectasia ductal, fibrosis estrómic, adenosis y cambio apocrino.

Cuando están presentes los cambios epiteliales hiperplásicos nos encontramos ante la "enfermedad quística hiperplásica" (ANDERSON, 1977) o "mastopatía fibroquística proliferativa" (GOMPEL, 1990). Dichos cambios hiperplásicos afectan al sistema ductal, ductular y a los acinos lobulillares.

No obstante, en las últimas décadas se ha revisado ampliamente la mastopatía proliferativa y se ha establecido la existencia de una variante atípica (KERN, 1969); ASHIKARI, 1974; PAGE, 1987) que, según diversos estudios anatomoclínicos pudiera estar relacionada con la aparición de cáncer mamario (STEINHOFF, 1970; HUTCHINSON, 1980; HUTTER, 1986; TAVASSOLI, 1990). La clasificación y las características histopatológicas de estas lesiones serán estudiadas a continuación.

DESCRIPCION DE LAS LESIONES ELEMENTALES PRESENTES EN LA MASTOPATIA.

Fibrosis estrómic.- La fibrosis estrómic es un hallazgo constante en la enfermedad fibroquística, observándose cantidades variables de tejido conectivo fibroso denso hipocelular con abundantes fibras de colágeno. Se considera que la proliferación epitelial estimula el crecimiento estrómic (GOMPEL, 1990). No obstante, podría ser un proceso reactivo secundario a la ruptura de quistes que proseguiría hasta la hialinización (ROSAI, 1989).

MINKOWITZ y cols. (1973) aplicaron el término "mastopatía fibrosa" ("*fibrous mastopathy*") para describir un conjunto de lesiones predominantemente constituidas por tejido conectivo fibroso denso que incluye ocasionales estructuras epiteliales mamarias distorsionadas y que, macroscópica- y mamográficamente, pueden encontrarse relativamente bien delimitadas.

Ectasia ductal.- Se dice que existe ectasia ductal mamaria cuando se observan espacios ductales distendidos no completamente redondeados (como ocurre con los quistes) (PAGE, 1978). Normalmente contienen material secretorio intraluminal, restos celulares involutivos e histiocitos espumosos, observándose fibrosis y elastosis del estroma periductal. No existe hiperplasia epitelial ni metaplasia apocrina (ROSAI, 1989). En ocasiones, el estroma circundante contiene abundantes histiocitos y plasmocitos.

La ectasia ductal mamaria probablemente se desarrolla sobre ductos segmentarios y subsegmentarios. Por consiguiente, no parece estar relacionada

con la enfermedad fibroquística ya que, según AZZOPARDI (1979), esta última se desarrollara a partir del sistema ducto terminal-unidad lobulillar.

Quistes.- Los quistes son estructuras que, en los cortes histológicos, presentan una morfología redondeada con un diámetro mínimo de 500 micrómetros (PAGE, 1978). HAAGENSEN (1987) denomina "enfermedad quística macroscópica" ("*gross cystic disease*") al proceso patológico en el cual existen quistes de un diámetro superior a 3 milímetros delimitados por un epitelio fino. El número y tamaño de los quistes es variable. AZZOPARDI (1979) considera que los quistes (independientemente de su tamaño) se originarían a partir de estructuras presentes en el sistema ducto terminal-unidad lobulillar.

Los quistes están revestidos por un epitelio columnar, cuboidal o aplanado pseudoendotelial en el caso de quistes residuales (LLOMBART-BOSCH, 1989). Las células descamadas en el fluido quístico presentan abundante citoplasma débilmente tingible y finamente vacuolado con pequeños núcleos homogéneos redondeados. Por otra parte pueden encontrarse cambios metaplásicos apocrinos en dicho revestimiento epitelial (VEASE METAPLASIA APOCRINA).

Metaplasia apocrina.- HAAGENSEN (1987) encontró epitelio apocrino en el 79 % de 1212 casos de enfermedad quística macroscópica. Dicho epitelio es morfológica- e inmunohistoquímicamente indistinguible del que tapiza las glándulas sudoríparas apocrinas (MAZOUJIAN, 1983). En la mama, el epitelio metaplásico apocrino suele tapizar los quistes mamarios y puede encontrarse en otro tipo de lesiones como los papilomas, la papilomatosis y el cambio papilar apocrino (PAGE, 1978). Dicho epitelio es prismático alto, ocasionalmente pseudo-estratificado, y está constituido por grandes células columnares de citoplasma oxífilo brillante con un fino punteado granular y un pequeño núcleo redondeado. En ocasiones, el polo apical del citoplasma sobresale formando "hocicos" que son extruidos según el procedimiento característico de la secreción apocrina.

El epitelio apocrino también puede estratificarse formando prolongaciones papilíferas carentes de tallos vasculoconectivos (HAAGENSEN, 1987; PAGE, 1987), a diferencia de lo que ocurre en la metaplasia apocrina del epitelio que reviste un papiloma intracanalicular (HAAGENSEN, 1987).

PAGE y cols. (1992) concluyen que la hiperplasia apocrina (aunque

adopte un patrón complejo) no constituye un indicador de riesgo, o bien es un indicador de debil magnitud, siempre y cuando no concurren hallazgos morfológicos de carcinoma ductal in situ.

Adenosis.- Segun PAGE (1987)] la adenosis es una condición en la cual se produce un incremento del número de elementos glandulares, existiendo un número normal de células por encima de la membrana basal (dos células). En base a la definición de PAGE (1987), la adenosis no es una hiperplasia epitelial (VEASE DEFINICION DE HIPERPLASIA EPITELIAL). Efectivamente, segun ANDERSON (1977), la adenosis consiste en la formación de nuevos lobulillos y/o agrandamiento de los lobulillos pre-existentes *sin proliferación intraluminal de las ceéulas que revisten los acini* ; de tal manera que los lobulillos retienen su aspecto histológico normal. No obstante, algunos autores como ROSAI (1988) consideran que la adenosis es una forma de hiperplasia. Recordemos la definición clásica segun la cual una determinada estructura anatómica presenta hiperplasia cuando ha aumentado su tamaño a expensas del aumento del número de células que la constituyen.

La forma mas común (PAGE, 1978; GOMPEL, 1990)) es la denominada "adenosis esclerosante" que está caracterizada por una proliferación ductular con intensa fibrosis intersticial y distorsión epitelial, provocando la aparición de estructuras glandulares deformadas que propician una falsa imágen de invasión. Los ductulos están constituidos por dos tipos celulares que pueden mostrar una morfología elongada según el eje de dicho ductulo. A bajo aumento las áreas afectas se presentan como zonas hiper celulares densas diseminadas en el parenquima. Segun FECHNER (1981) en los focos de adenosis esclerosante, los ductulos localizados periféricamente están dilatados, mientras que, en las porciones centrales, se encuentran prácticamente obliterados. Las células epiteliales tienen un tamaño normal y, a gran aumento, no presentan atipias. Las alteraciones morfológicas están provocadas por la compresión y la distorsión.

Se admite que, en la génesis de esta lesión, existe una fase de intensa proliferación epitelial y mioepitelial, como lo demuestra la tinción inmunohistoquímica frente a la actina (ROSAI, 1989), seguida de una fase esclerótica que modifica la configuración de las estructuras epiteliales.

La denominada "*blunt duct adenosis*" (adenosis canalicular en fondo de saco) FOOTE y STEWART, 1945) está histopatológicamente caracterizada por

una proliferación de conductillos distendidos que terminan en fondo de saco y que presentan mayor calibre que los ductulos lobulillares. Estos pueden disponerse irregularmente (forma no organoide) y pueden adoptar una distribución organoide (AZZOPARDI, 1979) reminiscente al patrón lobulillar (HAAGENSEN, 1986), razón por la cual dicha lesión se incluye bajo la categoría de la adenosis. Están tapizados por un epitelio prismático periféricamente delimitado por células mioepiteliales. Sin embargo, en la forma microquística (AZZOPARDI, 1979; GOMPEL, 1990) dicho epitelio tiende a aplanarse. HAAGENSEN (1987) considera que este proceso no es una verdadera forma de adenosis.

Se denomina "adenosis nodular" al proceso patológico que combina rasgos morfológicos presentes en la adenosis canalicular en fondo de saco y en la adenosis esclerosante (ROSAI, 1989). Los nódulos proliferantes son más celulares que en la adenosis canalicular en fondo de saco, pero mejor circunscritos que en la adenosis esclerosante, sin observarse la fibrosis y la distorsión de ésta última. Se considera que la adenosis nodular es la fase temprana no esclerótica de la adenosis esclerosante.

La adenosis tumoral (NIELSEN, 1987) presenta rasgos histopatológicos de cualquiera de las formas anteriormente mencionadas y, macroscópicamente, constituye un nódulo palpable.

Segun ROSEN (1983) y ROSENBLUM (1986) la "adenosis microglandular" está caracterizada por una proliferación de pequeños acinos de contorno redondeado que están distribuidos al azar sobre tejido adiposo, fibroadiposo o conectivo fibroso, no existiendo un estroma-reacción aparente. Las glándulas nunca están interconectadas y no existe formación de barras trabeculares (CLEMENT, 1983). El epitelio de revestimiento está constituido por una monocapa de pequeñas células cuboidales con un citoplasma que puede ser claro o eosinófilo. En algunos casos, el citoplasma contiene gránulos refractiles oxífilos que pueden oscilar desde pequeños hasta groseros agregados globulares. Por otra parte, muchas luces glandulares contienen material secretorio intraluminal. A diferencia de otras formas de adenosis, dichas glándulas pueden carecer de delimitación mioepitelial (CLEMENT, 1983). Sin embargo, existe una gruesa membrana basal que puede apreciarse ultraestructuralmente (TAVASSOLI, 1983).

Se considera que la adenosis microglandular es atípica cuando se

observan los anteriores rasgos y, además, la proliferación glandular presenta mayor complejidad y anormalidad citológica. Se aprecia una mezcla pleomórfica de pequeñas glándulas redondeadas y otras elongadas y tubulares. Existen acinos interconectados y nidos microcribiformes producidos por proliferación epitelial intraluminal con formación de puentes (ROSENBLUM, 1986) En general, existe estratificación del epitelio que reviste los acinos, infrecuente actividad mitótica, aumento del tamaño celular, espacios claros intercromatínicos y presencia de nucleolos.

JAMES y cols. (1993) estudian un grupo de 69 pacientes con adenosis microglandular y encuentran que 14 (23%) de ellas desarrollaron carcinoma de mama.

Cambio fibroadenomatoide . - Segun ROSAI (1989) es la anormalidad menos común de la enfermedad fibroquística. Tanto la proliferación estrófica como las características formaciones epiteliales propician una imagen reminiscente a la del fibroadenoma, pero sin la nítida delimitación de este último con respecto al tejido mamario vecino.

Cicatriz radial.- Histológicamente, la cicatriz radial presenta un área central de esclerosis que incluye estructuras tubuliformes irregularmente dispuestas. Como su nombre indica el área central esclerótica se expande con un contorno radiante que puede estar rodeado por tejido mamario afecto de adenosis o de hiperplasia epitelial. Dicha cicatriz contiene gruesos manojos de colágeno y fibras elásticas (RICKERT, 1981).

La irregular disposición de las estructuras ductuliformes atrapadas por la cicatriz configura una imagen de aspecto infiltrativo que plantea serios problemas de diagnóstico diferencial con el carcinoma tubular de mama. Sin embargo, puede efectuarse un diagnóstico correcto teniendo en cuenta la ausencia de atipia celular y mitosis y la persistencia de un epitelio biestratificado junto con la morfología característica de la lesión.

Hiperplasia epitelial.- Segun PAGE y col., (1987), el aspecto fundamental de la hiperplasia epitelial consiste en un incremento del número de células por encima de la membrana basal. En la mama el número normal es dos, de tal manera que la presencia de tres o más células por encima de la membrana basal implica, por definición, hiperplasia epitelial. Este término no incluye, sin embargo, aquellas situaciones en las cuales se produce un

incremento de elementos glandulares sin que exista aumento del número de células por encima de la basal. Esta última condición ha sido denominada apropiadamente "adenosis".

Hiperplasia epitelial ductal . - Para LLOMBART-BOSCH (1989), "la hiperplasia ductal presenta una proliferación mixta de células epiteliales y mioepiteliales causando una obliteración parcial o completa del conducto galactofórico, el cual tiende a distenderse". Se emplea el término "epiteliosis" para referirse a la situación caracterizada por una proliferación epitelial ductal sólida compacta con escaso componente estrómic y se denomina papilomatosis al "crecimiento epitelial y mioepitelial que adopta un patrón foliado fenestrado intraluminal" . No debemos confundir esta situación con la que aparece en los verdaderos papilomas y en la papilomatosis intraductal múltiple, donde existen auténticos tallos conectivos fibrovasculares que soportan la proliferación epitelial intraluminal.

Según PAGE (1987) es necesario observar, como mínimo, tres células por encima de la membrana basal para poder establecer el diagnóstico de hiperplasia epitelial ductal. Por esta razón se requiere un estudio cuidadoso evitando confusiones debidas a un corte tangencial.

En la hiperplasia ductal leve se encuentran de tres a cuatro células por encima de la membrana basal, mientras que en la hiperplasia moderada o florida existen cinco o más. No se recomienda separar las categorías moderada y florida ya que su relevancia para predecir el riesgo de cancer es la misma (PAGE, 1987)

Los aspectos citológicos e histológicos de la hiperplasia ductal son variables. Variabilidad que se observa dentro de una misma lesión y en lesiones distintas. Los núcleos suelen presentar rasgos cambiantes (de una célula a otra), mostrando una morfología elíptica o fusiforme. Según AZZOPARDI (1979) los núcleos raramente son redondeados excepto cuando han sido cortados transversalmente. Recordamos que la redondez y la monotonía morfológica nucleares son características de ciertas formas de carcinoma mamario in situ (AZZOPARDI ,1979; ROSAI, 1989; PAGE, 1985). En las células de la hiperplasia epitelial ductal suele observarse una delicada membrana nuclear, cromatina clara y, a menudo, pequeños nucleolos (PAGE, 1987). Según AZZOPARDI (1979), suele encontrarse un único nucleolo muy poco ostensible y la actividad mitótica suele ser escasa. Sin embargo, aunque ocasionalmente se aprecien

mitosis, éstas no tienen significado diagnóstico (PAGE, 1987). No obstante, conviene matizar esta afirmación con los resultados obtenidos por DE POTTER (1987). Estos autores han observado que existe una diferencia significativa entre el número medio de mitosis en la hiperplasia sin atipia (3'5 mitosis por 40 campos a gran aumento) y el valor medio encontrado en las lesiones hiperplásicas sin atipia presentes en pacientes con carcinoma ductal in situ o carcinoma ductal infiltrante (14'6 mitosis por 40 campos a gran aumento). Por consiguiente, las lesiones mamarias hiperplásicas que exhiben altas cuentas mitóticas pueden indicar la presencia de un carcinoma en vecindad y sugieren la existencia de una actividad proliferativa aumentada en el tejido mamario cercano al carcinoma.

El citoplasma suele ser eosinófilo claro, aunque puede oscilar entre fuertemente eosinófilo y translúcido. Ocasionalmente, el citoplasma es algo granular, adoptando un aspecto apocrinoide. Normalmente, los bordes citoplásmicos son indistinguibles, hasta el punto que los núcleos parecen encontrarse dispuestos en una masa pseudosincitial (AZZOPARDI, 1979).

La arquitectura de las lesiones hiperplásicas moderadas o floridas también es variable. Cuando el epitelio ductal hiperplásico ocupa las luces formando masas sólidas, las células tienden a disponerse de tal manera que el eje mayor de sus núcleos discurre paralelamente con respecto al eje mayor de los núcleos adyacentes, constituyendo remolinos o corrientes ("streaming") (AZZOPARDI, 1979) Por otra parte, los núcleos suelen encontrarse irregularmente espaciados con cierta superposición entre ellos.

Aun cuando los ductos pueden estar masivamente ocupados y distendidos por un epitelio hiperplásico sólido compacto, es frecuente observar brechas y espacios intercelulares de contorno irregular. Efectivamente, cuando tales espacios adoptan una morfología nítidamente redondeada nos encontramos ante uno de los signos histopatológicos de carcinoma intraductal in situ cribiforme (PAGE, 1985; PAGE, 1987). Cuando los espacios intraluminales son grandes, pueden estar atravesados por puentes constituidos por células ovaladas con su eje mayor dispuesto paralelamente con respecto al eje mayor del puente. No existe formación de trabéculas epiteliales intraluminales (AZZOPARDI, 1979).

Hiperplasia epitelial ductal atípica . - PAGE y col., (1987) consideran que debe diagnosticarse hiperplasia ductal atípica cuando se

observan criterios citológicos o arquitecturales de carcinoma ductal in situ, sin que estos lleguen a adquirir su plena expresión. También se diagnostica hiperplasia ductal atípica cuando se aprecian criterios de carcinoma ductal in situ sin que estos aparezcan uniformemente en, al menos, dos ductos. Por esta razón, describimos tales criterios (PAGE, 1985) :

1. Afectación de, al menos, dos ductos por la presencia de una población uniforme de células que están delimitadas por la membrana basal ductal. Las células neoplásicas son redondeadas, cuboidales o poligonales, presentan límites discernibles y, usualmente, están espaciadas de un modo regular.

2. Presencia de espacios intercelulares de contorno liso geométrico redondeado ("en sacabocados") configurando una morfología cribiforme; o bien presencia de frondas micropapilares dotadas de un extremo romo bulboso y una base de menor anchura. Nunca existe una disposición paralela arremolinada de las células (no streaming).

3. Los núcleos son redondeados, hiper cromáticos y monótonos.

EXCEPCION: Cuando, en determinadas áreas, se observa atipia nuclear similar a la del comedocarcinoma queda establecido el diagnóstico de carcinoma in situ sin el patrón clásico o la necrosis.

Segun PAGE (1987) cualquier caso en el que se observen uno de los dos primeros criterios (aunque el segundo sólo esté presente de un modo sugestivo) puede ser diagnóstico de hiperplasia ductal atípica. El tercer criterio puede considerarse como una ayuda, pero no es ni específico ni suficiente para el diagnóstico de hiperplasia ductal atípica.

Recientemente, PAGE (SCHNITT y cols.. 1992) utiliza los siguientes criterios para evaluar estas lesiones :

1. LA HIPERPLASIA FLORIDA SIN ATIPIA presenta torbellinos celulares (*has swirling of cells*), disposición y forma nuclear variables con espacios intercelulares irregulares que son más ostensibles centralmente.

2. EL CARCINOMA DUCTAL IN SITU (TIPO NO COMEDO) presenta una población de células uniformes regularmente espaciadas con características nucleares (así mismo) uniformes y que constituyen (sin género de dudas) la

totalidad de las células que ocupan dos espacios (ductales) circunscritos por membrana (basal).

3. En LA HIPERPLASIA DUCTAL ATÍPICA se observa, *en parte de un espacio ductal*, una población de células con las características anteriormente definidas para el carcinoma ductal in situ de tipo no comedo. Usualmente, la segunda población está constituida por células polarizadas como las que se observan normalmente en posición luminal inmediatamente por encima de la membrana basal.

4. Cuando se dude entre hiperplasia ductal atípica y carcinoma in situ, debe aplicarse la designación más benigna.

5. Para calificar una lesión como hiperplasia ductal atípica (en contraposición a la hiperplasia florida sin atipia), usualmente, pero no siempre, el conjunto de células objeto de problema muestra núcleos hiper cromáticos.

6. Para calificar una lesión como hiperplasia ductal atípica (en oposición a la hiperplasia florida sin atipia), las células objeto de problema deben constituir una barra (trabecular) entera atravesando un espacio o al menos constituir una población de seis o siete células, evitando la denominación de hiperplasia ductal atípica cuando el número de células sea menor. Esta es una indicación del nivel mínimo exigible en la definición de hiperplasia ductal atípica.

De POTTER y cols.. (1987) observaron que no existe una diferencia estadística significativa entre el número medio de mitosis en la hiperplasia sin atipia (3'5 mitosis por 40 campos a gran aumento) y en la hiperplasia con atipia (6'7 mitosis por 40 campos a gran aumento). Sin embargo, ambos resultados difieren significativamente del número medio de mitosis observado en el carcinoma ductal in situ (26'5/40 HPF) y en las lesiones carcinomatosas intraductales asociadas a carcinoma ductal infiltrante (51'3 / 40 HPF).

Normalmente, la hiperplasia ductal atípica se presenta en mujeres adultas. Sin embargo, ELIASÉN y cols. (1991) han descrito ocho casos en adolescentes y jóvenes (con edades comprendidas entre 18 y 24 años).

Por otra parte, KINTANAR y RAJU (1991) estudian 50 carcinomas ductales infiltrantes y 90 carcinomas ductales in situ y comprueban que la hiperplasia ductal atípica aparece, al menos localmente, en el 90% de los casos

de carcinoma ductal in situ y en el 77% de los carcinomas ductales infiltrantes. Por otra parte, la hiperplasia ductal atípica está asociada con mayor frecuencia con las formas no-comedocarcinoma de carcinoma ductal in situ (96%) y las formas más diferenciales de carcinoma ductal infiltrante.

A continuación describimos muy sucintamente las características morfológicas más sobresalientes de ciertos tipos de carcinoma ductal in situ para efectuar un correcto diagnóstico diferencial frente a la hiperplasia ductal atípica.

COMEDOCARCINOMA. - Las luces ductales afectas están ocupadas por neoformación que muestra áreas sólidas constituidas por grandes células dotadas de un citoplasma amplio que alberga un gran núcleo, usualmente pleomórfico, que, habitualmente, presenta groseros detalles cromatínicos y actividad mitótica. En la porción central del ducto suele observarse un magma necrótico que puede calcificarse secundariamente.

CARCINOMA DUCTAL IN SITU SOLIDO. - Está caracterizado por una proliferación sólida compacta, sin necrosis, que está constituida por células de mediano tamaño (mayores que las del carcinoma lobulillar in situ y menores que las del comedocarcinoma) (ROSAI, 1989; AZZOPARDI, 1979) puntualiza que estas células contienen citoplasma pálido y límites bien discernibles.

CARCINOMA DUCTAL IN SITU CRIBIFORME . - Proliferación epitelial intraductal carente de soporte estrófico que está constituida por células morfológicamente homogéneas y de límites discernibles que delimitan luces de contorno geométrico redondeado. Dichas luces son regulares en lo concerniente a su distribución, tamaño y forma. Normalmente, se observan barras trabeculares (vástagos epiteliales sólidos cuyas células se disponen con su eje mayor perpendicular al eje de dicho vástago) y arcos romanos (barras trabeculares curvilíneas que conectan dos puntos de una luz) (AZZOPARDI, 1979).

CARCINOMA PAPILAR IN SITU. - Neoformación que normalmente se desarrolla en una luz ductal de gran tamaño (quistificada) y que está constituida por complejas y delicadas ramificaciones vasculo-conectivas tapizadas por un epitelio prismático irregularmente estratificado de núcleos hipercromáticos marcadamente elongados. Según AZZOPARDI (1979) deben encontrarse barras trabeculares dispuestas perpendicularmente con respecto al eje mayor

de una papila. Normalmente, en los ductos circundantes suelen encontrarse lesiones compatibles con carcinoma in situ.

CARCINOMA MICROPAPILAR IN SITU . - Neoformación carcinomatosa intraductal que presenta frondas micropapilares desprovistas de estroma dotadas de un extremo apical como bulboso y de una base de implantación de menor anchura (PAGE, ANDERSON y ROGERS, 1987). Las células epiteliales que constituyen tales estructuras presentan una morfología homogénea.

CLINGING CARCINOMA . - Según AZZOPARDI (1979) corresponde a una neoformación carcinomatosa constituida por uno o dos estratos de células prismáticas atípicas que tapizan estructuras glanduliformes dotadas de una amplia luz vacía.

CARCINOMA HIPERSECRETORIO QUISTICO.- Neoformación de características similares a la anterior cuyas luces están quistificadas debido a la presencia de abundante material secretorio.

Hiperplasia epitelial lobulillar atípica .- Según PAGE (1985) se diagnostica hiperplasia lobulillar atípica cuando menos de la mitad de los acinos de una unidad lobulillar están ocupados, distorsionados y distendidos por una población uniforme de células con las características habitualmente observadas en el carcinoma lobulillar in situ. También se diagnostica hiperplasia lobulillar atípica cuando los acinos (independientemente de su número) están ocupados por una población celular con las características anteriormente mencionadas, existiendo luces intra-acinares, espacios intercelulares amplios o ausencia de distensión acinar significativa. En ocasiones, las células atípicas de este proceso se extienden por las luces ductales (PAGE, 1988).

Recordamos, brevemente, que el carcinoma lobulillar in situ (HAAGENSEN, 1987; BEGIN, 1985) se caracteriza por la afectación de un número variable de unidades lobulillares por una proliferación de células morfológicamente monótonas que obliteran las luces terminales con un grado variable de distensión. Se considera que la lesión no es invasora en base a la existencia de grupos insulares de células de contorno redondeado liso centrado en torno a un ductulo terminal. Existen dos tipos citológicos que pueden combinarse.

El primero está caracterizado por una población monótona de células

poligonales con un citoplasma pálido o anfófilo. Frecuentemente, se aprecian glóbulos intracitoplasmáticos o vacuolas. Los núcleos son redondos, de tamaño uniforme y, a menudo, presentan una cromatina finamente dispersa con nucleolos inconspicuos. Las mitosis son escasas o están ausentes.

El segundo subtipo está caracterizado por la presencia de una población de células más pleomórficas, menos cohesivas y con anisocitosis, pudiendo mostrar prominentes nucleolos. Estos dos tipos han sido designados como A y B respectivamente por HAAGENSEN y cols. (1978).

Conviene recordar el estudio retrospectivo de ROSEN y cols. (1978) intentando elucidar ciertas características biológicas del carcinoma lobulillar in situ poco conocidas entre muchos anatomopatólogos. Estos autores analizaron 99 pacientes con esta neoplasia que fueron tratados exclusivamente por medio de biopsia y seguidos durante un promedio de 24 años (siendo satisfactorio dicho seguimiento en 84 de ellas). En 28 (33 % de las pacientes) se desarrolló un carcinoma invasor (12 en la misma mama, 9 en la mama contralateral y 7 en ambas mamas). 20 fueron carcinomas ductales infiltrantes, 13 carcinomas lobulillares infiltrantes, uno mucinoso y uno tubular. La mayoría de tales carcinomas se hicieron ostensibles al cabo de 15 o más años después de la biopsia original y un 38 % no fueron detectados hasta transcurridos 20 años.

Aun cuando el 60 % de las piezas de mastectomía estudiadas subsiguientemente presentaron focos residuales de carcinoma lobulillar in situ, menos de la mitad de las pacientes tratadas exclusivamente con biopsia pueden presentar subsiguientemente carcinoma invasor ipsilateral.

Estos hallazgos sugieren que el carcinoma lobulillar in situ es un marcador tisular que indica incremento del riesgo de desarrollar subsiguiente carcinoma invasor de cualquier tipo histológico en la totalidad del parenquima mamario (ambas mamas) (ROSEN, 1980; TULUSAN, 1982). Dicho incremento del riesgo es 9 veces superior al de la población normal.

DIFICULTADES EN LA REPRODUCTIBILIDAD DE LOS CRITERIOS MORFOLOGICOS.

En muchos casos concretos los criterios anteriormente comentados no pueden aplicarse con rigor, dado el carácter extremadamente complejo de

numerosas lesiones que aparecen en la práctica cotidiana del laboratorio de Anatomía Patológica. Para corroborar lo anteriormente dicho recurrimos a la prueba que practicó ROSAI (1991) con cinco importantes mastopatólogos. Este autor sometió a la consideración de D. CARTER, R.E. FECHNER, R.L. KEMPSON, D.L. PAGE y P.P. ROSEN diez lesiones proliferativas ductales y siete lesiones proliferativas lobulillares. Solo debían ser consideradas las áreas delimitadas por un círculo, prescindiéndose de las alteraciones existentes fuera del mismo. Las alternativas diagnósticas eran "hiperplasia", "hiperplasia atípica", "carcinoma in situ" y "otros". Los cinco patólogos aceptan el concepto de hiperplasia atípica, aún cuando uno de ellos probablemente utilizaba tal denominación para las lesiones lobulillares con preferencia sobre las ductales. En ninguna de las diecisiete lesiones se emitió un mismo diagnóstico. Sólo en tres lesiones fueron concordantes los diagnósticos de cuatro de los cinco patólogos y en seis casos los diagnósticos recorrieron todo el espectro comprendido entre hiperplasia (sin atipia) y carcinoma in situ.

Sin embargo, recientemente (SCHNITT y cols.. 1992), siguiendo la línea del "experimento" anterior, ha sometido a la consideración de seis expertos mastopatólogos (SCHNITT, CONNOLLY, TAVASSOLI, FECHNER, KEMPSON y PAGE) 24 lesiones ductales proliferativas. Ahora bien, todos ellos deben emplear exclusivamente los seis criterios proporcionados por D.L. PAGE (anteriormente comentados en el apartado de hiperplasia ductal). En 14 de los 24 casos (58%) los seis observadores emitieron el mismo diagnóstico. En 17 casos (71%) cinco observadores llegaron a las mismas conclusiones diagnósticas y en 22 casos (92%) se apreció acuerdo entre cuatro observadores. En dos casos los diagnósticos recorrieron todo el espectro comprendido entre hiperplasia de tipo usual y carcinoma in situ.

Si bien el grado de concordancia obtenido en esta última experiencia es significativamente mayor al obtenido anteriormente en la prueba llevada a cabo por ROSAI (1991), puede constatarse que no existen criterios sistemáticamente reproducibles por parte de diversos morfólogos

Por esta razón parece lógico investigar las técnicas morfológicas cuantitativas para tratar de encontrar criterios más precisos ajenos a las interpretaciones subjetivas del patólogo convencional.

CLASIFICACION DE LA MASTOPATIA: En esta Tesis se emplea una clasificación de tres grados : Reclus I, II y III (LLOMBART-BOSCH 1989)

"El Reclus grado I (MASTOPATIA NO PROLIFERATIVA) incluye los procesos involutivos esclerosantes de la glándula con dominio del componente intersticial conjuntivo y mioepitelial, sobre el proliferativo ductal y ductular. Abarca, por tanto, los fenómenos de fibromatosis intersticial con atrofia ductal y lobulillar, adenosis esclerosante con hialinosos estrómic, formación de grandes y pequeños quistes revestidos por epitelio no papilar de tipo ductal o apocrino".

"El Reclus grado II (MASTOPATIA PROLIFERATIVA SIN ATIPIAS) muestra las dos clásicas variantes de proliferación ductal y lobulillar con las características previamente descritas de epiteliosis, papilomatosis, adenosis y esclerosis radial, así como también las posibles adenosis pseudotumoral (nodular) y adenosis microglandular".

"En el Reclus grado III (MASTOPATIA PROLIFERATIVA CON ATIPIAS) añadimos a lo previamente indicado como mastopatía proliferativa la presencia de atipias nucleares y celulares, así como alteraciones en el patrón arquitectónico de las mismas dentro de la propia glándula o ductulo distendido. Aceptamos que estas lesiones tipo Reclus grado III son difícilmente distinguibles de un carcinoma "in situ", ya sea lobulillar o ductal (soóido o papilar)".

SIGNIFICADO ANATOMOCLINICO ACTUAL DE LA MASTOPATIA

Para justificar en la medida de lo posible el concepto y clasificación de mastopatía que se emplea en esta tesis, consideramos conveniente desarrollar el actual significado clínico-patológico de este complejo y problemático conjunto de lesiones.

Uno de los problemas fundamentales de la patología mamaria actual consiste en poder establecer si el carcinoma de mama surge de novo o bien es el resultado de un proceso que se desarrolla en varias etapas, empezando por lesiones hiperplásicas que podrían transformarse en hiperplasias atípicas, las cuales, a su vez, resultarían ser las predecesoras inmediatas del carcinoma in situ. En este sentido, las lesiones proliferativas que aparecen en el contexto de la mastopatía podrían ser el punto de arranque de procesos neoplásicos malignos.

El primer punto de vista lleva implícita la idea de que las lesiones mamarias son o bien benignas o bien malignas y que las denominadas "hiperplasias atípicas" son lesiones mal conocidas provisionalmente englobadas bajo dicha denominación, de tal manera que el ulterior desarrollo de los conocimientos anatomopatológicos podrá determinar qué casos concretos son benignos y cuales malignos (AZZOPARDI, 1985).

El segundo punto de vista implica que las hiperplasias y, particularmente las hiperplasias atípicas, incrementan el riesgo de padecer carcinomas mamarios (PAGE 1978,85,86; DUPONT, 1985; NORRIS 1988; SIMPSON 1982; WELLINGS 1985; TAVASSOLI 1990; ASHIKARI 1974; BEGIN 1985; McDIVITT 1992; HAGENSEN 1987; KERN 1969; STEINHOFF 1970; HUTCHINSON 1980; LLOMBART-BOSCH 1989).

Los argumentos en favor de la relación existente entre mastopatía proliferativa y cancer incluyen :

1. Presencia de mastopatía en mamas extirpadas por carcinoma . - La frecuencia con que aparece ésta asociación oscila entre un 20 y un 40 por ciento (McDIVITT, 1978). Algunas veces pueden observarse todos los estadios de transición entre proliferación benigna y carcinoma, encontrándose lesiones con rasgos morfológicos borderline en las que la decisión de si corresponden o no a un carcinoma resulta ser una interpretación muy subjetiva (ROSAI, 1981, 1991).

LLOMBART-BOSCH (1989) en una revisión de 1.837 enfermas (biopsiadas entre los años 1985-1988) encontró 516 displasias mamarias frente a 1.169 carcinomas. La asociación displasia mamaria - carcinoma, fué relativamente baja: 111 de los carcinomas sufrían también displasia mamaria (9'5% de casos). Los otros 405 casos no estuvieron asociados a neoplasia. La distribución parcial de éstos últimos fué la siguiente: Mastopatía no proliferativa. Reclus I: 212 casos, Mastopatía proliferativa sin atipias. Reclus II: 163 casos, Mastopatía proliferativa con atipias. Reclus III: 30 casos. La distribución de los distintos tipos de mastopatía en los 111 casos en que se produjo la asociación con carcinomas, ofreció los siguientes valores: Mastopatías no proliferativas: Reclus I: 86 casos, Mastopatías proliferativas sin atipias. Reclus II: 17 casos, Mastopatías proliferativas con atipias. Reclus III: 8 casos.

2. Presencia de mastopatía en estudios biópsicos previos de pacientes con carcinoma de mama. - Cuando se revisan las preparaciones de tales casos, muy a menudo se encuentran cambios proliferativos floridos e incluso atípicos (ROSAI, 1981). Tales cambios aparecen con más frecuencia que el patrón usual de enfermedad fibroquística (KERN, 1969; STEINHOF, 1970).

3. Estudios de seguimiento con grandes series de pacientes afectas de enfermedad fibroquística. - Según HAAGENSEN (1987) la predisposición a desarrollar un carcinoma en pacientes con *enfermedad quística macroscópica* se demuestra calculando la fracción entre la cantidad observada de carcinomas en las pacientes que constituyen la serie y la cantidad prevista de carcinomas de acuerdo con los índices de incidencia específicos para ciertas edades y ciertas poblaciones. La relación entre carcinomas observados y previstos fué de 3 a 1 en la serie de 1784 pacientes privadas con enfermedad quística macroscópica y de 2 a 1 en 709 pacientes de la sala con idéntica enfermedad (HAAGENSEN, 1987).

Segun DUPONT y PAGE (1985) las pacientes que presentan hiperplasia epitelial sin atipia tienen un riesgo de desarrollar carcinoma invasor 1'9 veces superior al de las pacientes que presentan lesiones no proliferativas.

Por otra parte, PAGE y cols.. (1985) revisaron 10.542 biopsias mamarias que se obtuvieron entre 1950 y 1968 con un seguimiento satisfactorio (que se extendió durante un período de tiempo cuya media fué de 17'5 años tras la biopsia) en el 90 por ciento de los casos. En este estudio se diagnosticó hiperplasia ductal atípica en 150 de ellas e hiperplasia lobulillar atípica en 126. El riesgo relativo de desarrollar carcinoma invasor en las pacientes con hiperplasia ductal atípica fué 4'3 veces superior al de la población normal (3'2 veces en aquellos casos sin historia familiar de carcinoma de mama y 9'7 veces en aquellos casos en los que existía historia de cancer de mama en hermanas, madre o hijas). Por otra parte, según este mismo estudio, el riesgo relativo de desarrollar un carcinoma invasor en pacientes con hiperplasia lobulillar atípica fué 4'2 veces superior al de la población normal (3'5 veces superior en casos sin historia familiar y 8'4 veces cuando historia familiar).

Sin embargo, segun McDIVITT y cols.. (1992), las pacientes con enfermedad benigna sin hiperplasia tienen un riesgo 1'5 veces superior al de la población normal, las que muestran hiperplasia sin atipia tienen un riesgo 1'8

veces superior y las que presentan simultáneamente hiperplasia y atipia tienen un riesgo 2'6 veces superior.

Según el consenso establecido en Octubre de 1985 HUTTER y cols.. (1986) el riesgo relativo de desarrollar carcinoma invasor de mama según el tipo de lesión existente es como sigue:

Lesiones que no incrementan el riesgo : Adenosis (esclerosante o florida), metaplasia apocrina, quistes (macro- o microscópicos), ectasia ductal, fibroadenoma, fibrosis, hiperplasia epitelial leve (más de dos y menos de cuatro células epiteliales de espesor), mastitis, mastitis periductal y metaplasia escamosa.

Lesiones que incrementan débilmente el riesgo (de 1'5 a 2 veces) : Hiperplasia moderada o florida, sólida o papilar y papiloma con eje fibrovascular.

Lesiones que incrementan moderadamente el riesgo (5 veces) : Hiperplasia atípica (lesión borderline) ductal o lobulillar.

Análogamente, PAGE (1986) clasificó las lesiones mamarias según su potencial creciente de provocar la aparición de un carcinoma invasor de mama del siguiente modo:

Las que no incrementan el riesgo (enfermedad no proliferativa) : Adenosis esclerosante o florida, cambio apocrino, ectasia ductal e hiperplasia epitelial leve de tipo usual (ductal).

Con debil incremento del riesgo (1'5 - 2 veces) (enfermedad epitelial proliferativa sin atipia) : Hiperplasia de tipo usual (ductal) moderada o florida.

Con moderado incremento del riesgo (4 - 5 veces) (Hiperplasia atípica) : Hiperplasia ductal atípica e hiperplasia lobulillar atípica.

Con alto riesgo (8 - 10 veces) (carcinoma in situ): Carcinoma lobulillar in situ y carcinoma ductal in situ (no comedo).

Finalmente diremos que CONNOLLY y cols. (1992) estudiando 34 hiperplasias ductales atípicas y 26 hiperplasias lobulillares atípicas, concluyen

que ambos tipos de lesiones son predictores de riesgo de cancer bilateral de mama. Esta situación está en concordancia con similares estudios acerca del carcinoma lobulillar in situ, pero contrasta con hallazgos previos acerca del riesgo unilateral de cancer atribuido al carcinoma ductal no infiltrante tipo no comedo.

MORFOMETRIA

La Anatomía Patológica está basada en el reconocimiento cualitativo de aspectos morfológicos y su interpretación por patólogos cualificados (MARCHEUSKY, 1986). La tradicional aproximación al análisis morfológico es descriptiva. Los patólogos reconocen visualmente características estructurales que ellos consideran diferentes de las estructuras normales. Esta aproximación es exacta si la enfermedad mayoritariamente causa cambios cualitativos; por el contrario, es arbitraria y pobremente reproducible si la enfermedad predominantemente causa trastornos cuantitativos. En la práctica, definir, interpretar y diagnosticar una enfermedad no sólo conlleva cambios cualitativos, sino también cuantitativos, algunos de los cuales pasan inadvertidos en el trabajo rutinario diario (PESCE, 1987). La morfometría es especialmente necesaria para evaluar cambios cuantitativos que se escapan a la inspección visual del patólogo (HALL, 1985).

El valor de las medidas de morfometría nuclear en el diagnóstico patológico está resuelto, en gran parte, por la reproductibilidad de las medidas (AMBROS, 1991). A pesar de ello, aunque el uso adicional de datos cuantitativos objetivos sería deseable, las técnicas morfométricas, ámpliamente extendidas en otras áreas biológicas, han tenido sólo una aplicación limitada en el diagnóstico de la Anatomía Patológica.

APROXIMACION HISTORICA

En 1943 CHALKEY, aplicó la técnica del conteo de puntos para medir áreas tisulares, postulando que la fracción de la línea de puntos de perfil de un componente tisular es proporcional a su densidad volumétrica. Veinte años después WEIBEL y cols. (1966) generalizaron la teoría del conteo de puntos para valorar el porcentaje volumétrico, aplicándolo a muestras de pulmón humano y describiendo características cuantitativas tales como grosor, volumen, superficie, longitud y densidad numérica. Estos estudios despertaron en la década de los setenta el interés de muchos patólogos y empezaron a aceptar que la cuantificación de determinadas estructuras era útil para detectar pequeñas diferencias que escapan al ojo humano, con lo que se conseguía una mayor precisión y objetividad.

Etimológicamente, la palabra morfometría significa "medida de las

formas". La morfometría es la cuantificación de una estructura, por cualquier método, incluida la estereología (WEIBEL, 1979). La morfometría puede ser, en general, definida como la medida o estimación de longitudes, áreas o volúmenes (HALL, 1985).

La citometría, a menudo utilizada como sinónimo de morfometría, se refiere, en sentido estricto, a la medida de determinados parámetros o de ciertos elementos celulares, de manera que la citometría incluye la morfometría, la planimetría, la estereología y el conteo de elementos (BAAK, 1984).

La planimetría es usada para la valoración de formas cuantitativas de estructuras en dos dimensiones. En la práctica, el término planimetría se usa exclusivamente para mediciones de estructuras en un tablero gráfico. Las medidas de estructuras tales como células, núcleos, vasos sanguíneos, etc. son medidas planimétricas, aunque a menudo se denominan como morfométricas.

La estereología es una ciencia matemática aplicada que permite deducir la estructura tridimensional a partir de medidas realizadas en dos de las tres dimensiones del espacio (WEIBEL, 1979). La estereología generalmente estima el valor absoluto en una sección u órgano, mientras que la planimetría, valora la estadística descriptiva de un conjunto de elementos, individualmente considerados, en un órgano. Ambos métodos se complementan entre sí y de esta manera se han usado en múltiples estudios (STENKUIST, 1978; TEICH, 1979; BAAK y OORT, 1983).

BAAK y OORT (1983) han desarrollado normas de clasificación morfométrica para el diagnóstico en patología humana, observando que con la aplicación rutinaria de varios parámetros morfométricos se obtienen mejores resultados que con el análisis subjetivo del patólogo, sobre todo al aplicar clasificaciones multivariantes. Asimismo observaron que esta técnica posee una gran especificidad y sensibilidad al aplicarse al diagnóstico histopatológico (ROMPPANEN, 1982; MARIUZZI y cols., 1986).

INTERES DE LA MORFOMETRIA

El núcleo es una estructura de obvia importancia en las neoplasias, siendo el pleomorfismo nuclear junto con la actividad mitótica y las alteraciones en la estructura de la cromatina, un marcador de neoplasia.

La morfometría valora distintos parámetros celulares cuando se aplica al diagnóstico de la patología tumoral; estos principalmente son:

- el área nuclear, referida como tamaño.
- el perímetro nuclear, referido como tamaño y forma.
- los diámetros vertical y horizontal, referidos como tamaño y forma.

La morfometría es especialmente útil en el campo de lo que se denomina "lesiones continuas" (BAAK, 1984). En las clasificaciones por grados (de un espectro teóricamente continuo) el tumor es subdividido en dos, tres o más clases; pero la consistencia y reproductibilidad de éstos grados suele ser mala, tal como han puesto de manifiesto investigaciones ciegas y objetivas (BAAK, 1984). Esto es especialmente cierto en lo que se refiere a los criterios límites entre dos grados (llamados borderline), donde las consecuencias terapéuticas de tales discrepancias, pueden en ocasiones, ser considerables.

Por otra parte, partiendo de unos valores de referencia basales, la morfometría, mediante métodos cuantitativos perfectamente reproducibles, permite establecer los límites de actuación diagnóstica, testando los factores humanos que interfieren con el trabajo diagnóstico (COLLAN, 1984).

LA MORFOMETRIA APLICADA AL ESTUDIO DE LAS LESIONES MAMARIAS.

El estudio de las lesiones displásicas de la mama (Mastopatía fibroquística) por medio de técnicas específicas, como es la morfometría, está muy poco desarrollado, debido quizás a que la mayoría de los autores se han dedicado específicamente a estudiar las lesiones malignas (carcinoma infiltrante) tratando de encontrar nuevas luces que puedan ayudar al mejor diagnóstico de estas lesiones, claramente peligrosas para el enfermo.

De todos los parámetros utilizados en el estudio morfométrico de la mama, el área nuclear ha recibido una particular atención por parte de diversos autores. No obstante, también se han analizado otros, como son: el perímetro, diámetro máximo, diámetro mínimo, factor de forma, etc. En cuanto a éste último, merece mencionarse el estudio realizado por GSCHWIND y cols. (1986), quienes estudian cinco descriptores de elipticidad y dos de concavidad. Estos diferentes factores de forma fueron comparados usando 1800 contornos nucleares.

La determinación del área nuclear tiene abundantes precedentes en la literatura dedicada a la morfometría de la mama. Así, BAAK y cols. (1985), Van DER LINDEN y cols. (1986a), Van DER LINDEN y cols. (1986b), Van DER LINDEN y cols. (1987), estudian varias series de pacientes con cancer de mama y han señalado cómo el valor de la morfometría, en asociación con otros estudios (estado de ganglios linfáticos, tamaño tumoral e índice de actividad mitótica), ayuda significativamente a la predicción pronóstica de las enfermas. Encontraron que cuando la media del área nuclear excede aproximadamente las $53 \mu^2$, el pronóstico de estos pacientes es considerablemente peor que en pacientes en que el área nuclear es menor de $37 \mu^2$. Si la desviación standart del área nuclear excede $16 \mu^2$, el pronóstico también es peor y si es menor de $10 \mu^2$, muchos pacientes sobreviven. Estas cifras han sido corroboradas por PIENTA y COFFEY (1991), que en una serie de 100 pacientes, encontraron que la media del área nuclear aumentó progresivamente desde la mama normal ($25 \mu^2$) hasta $59 \mu^2$ que medían las células de los carcinomas con metástasis axilares en el momento de la mastectomía.

AALTOMAA y cols. (1992), FERNO y cols. (1992), ESKELINEN y cols. (1992), han corroborado que el perímetro nuclear junto con el diámetro del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, la fracción de células en fase S, el índice de ADN y la edad de las pacientes, son factores pronósticos de las pacientes con carcinoma de mama. AALTOMAA y cols. (1992) en un estudio de 234 mujeres con carcinoma de mama y ganglios axilares positivos, confirman que el área y perímetro nuclear, junto con el índice mitótico, proporcionan una información pronóstica.

VAN DIEST y cols. (1992) han visto que varios aspectos morfométricos y la expresión de la oncoproteína HER-2/neu, pueden ser factores importantes para identificar carcinomas que no responden a la quimioterapia.

TOSI y cols (1985) midieron también el área nuclear y el factor forma en 90 casos de carcinoma ductal de mama, pero ellos además estudiaron las metástasis en ganglios axilares, viendo que la media del área nuclear en las metástasis axilares era significativamente mayor que en el tumor primario. Atendido que el valor de la media del área nuclear era también significativamente mayor en los tumores primarios con metástasis axilares que en los tumores primarios sin metástasis axilares, les fué posible afirmar que tumores primarios con grandes áreas nucleares, son los más probablemente responsables de la invasión de ganglios linfáticos. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas con respecto al factor forma.

MAAEHLE y cols. (1982), estudiaron 112 casos de carcinomas de mama con metástasis axilares, y encontraron que 28 pacientes tenían núcleos menores de $44'8 \mu^2$, 56 pacientes estaban entre $44'8$ y $71'4 \mu^2$ y 28 pacientes tenían núcleos mayores de $71'4 \mu^2$. En este trabajo, también confirmaron que el tiempo de supervivencia media disminuyó conforme aumentaba la media del área nuclear.

CAVALLAR, y cols. (1990) por contra, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tumor primario y sus metástasis axilares en 24 parámetros estudiados, sobre un total de 65 casos.

UYTERLINDE y cols. (1987) han comparado la media del área nuclear en los tumores de mama diploides frente a los aneuploides, encontrando que en éstos últimos, las áreas fueron mayores que en los diploides. Estos resultados contrastan con los obtenidos por LOPEZ y cols. (1991), quienes no encontraron una clara correlación entre la media de las áreas nucleares y el estado de la ploidia en un estudio de 22 carcinomas de mama.

En una publicación posterior, UYTERLINDE y cols. (1987) realizaron un estudio retrospectivo, evaluando varios factores pronósticos en 63 pacientes con carcinoma ductal invasor de mama, mostrando especial atención al contenido en ADN celular, índice de actividad mitótica e índice pronóstico multivariable morfométrico. El análisis fue monitorizado al menos durante 50 meses y sólo se incluyeron pacientes que murieron con metástasis a distancia. El resultado mostró que el índice de actividad mitótica fué el mayor factor pronóstico de todos los parámetros considerados de modo aislado. Si bien las pacientes con un

tumor diploide o tetraploide mostraron un pronóstico mejor que los pacientes con carcinomas aneuploides, el índice de ADN, como un parámetro aislado, fué un pobre pronosticador en las curvas de supervivencia; en cambio, cuando se unió al índice pronóstico multivariable morfométrico, se encontró que el índice de ADN tenía un alto valor pronóstico.

En una serie de 78 carcinomas, BAAK y cols. (1982) aportaron que el análisis discriminante de los factores morfométricos, clasificaban correctamente al 82% de pacientes dentro de una supervivencia de 6 años., de acuerdo con LINDHOLM (1992) que clasifica correctamente el 86% de casos de carcinoma y 54 de 56 tumores benignos. En contraste, las metástasis axilares y el estadiaje del TNM, solo predecían correctamente el 54 y 56% respectivamente de los pacientes. Los dos mejores predictores de supervivencia fueron la actividad mitótica y el índice de celularidad, aunque todos los parámetros morfométricos, mostraron una significativa relación con la supervivencia.

Además de éstos estudios sobre el área nuclear en los carcinomas de mama y sus metástasis, también se han investigado los mismos frente a las lesiones benignas. Así, la distinción entre epiteliosis y carcinoma intraductal es de considerable importancia clínica y pueden usualmente realizarse fidedignamente aplicando los criterios antes señalados siguiendo a McDIVIT (1992), STEWART y BERG (1968), AZZOPARDI (1979), PAGE (1992), pero estos criterios son cualitativos y su aplicación es subjetiva, lo cual condiciona que puedan encontrarse con una situación en que el diagnóstico diferencial sea extremadamente difícil. Aún en los casos en que los aspectos cualitativos son típicamente de epiteliosis, los patólogos pueden sugerir la posibilidad de existir un carcinoma in situ, atendido que el grado de proliferación es muy alto; alternativamente, algunas formas de carcinoma intraductal, sobre todo la variante "clinging" puede ser subdiagnosticado, ya que el grado de proliferación celular es muy bajo (AZZOPARDI, 1979). Por ello, parece importante utilizar criterios cuantitativos que permitan distinguir con más objetividad éstas lesiones entre sí. Con este criterio, BATTACHARJEE y cols. (1985), utilizaron la morfometría nuclear para distinguir entre epiteliosis y carcinoma intraductal de mama, encontrando que la media del área nuclear fué mayor en los carcinomas intraductales que en las epiteliosis y ésta a su vez, fué mayor que la encontrada en los ductos normales de la mayoría de los casos, corroborando, en cierta medida, lo que hemos visto hasta el momento en los carcinomas, es decir que cuanto mayor es el área nuclear, mayor es la agresividad del proceso.

DZIURA (1979), habían estudiado 27 lesiones de mama por citologías, incluyendo casos de hiperplasia, carcinoma intraductal y carcinoma infiltrante y encontraron una marcada variación en el tamaño nuclear, presencia de macronúcleos, cromatina grosera, marcada superposición nuclear y desorden arquitectural celular, siendo éstos, los marcadores de malignidad., por contra, los carcinomas infiltrantes no pudieron ser distinguidos citológicamente de los carcinomas intraductales.

También VALL GREM (1976) y ZAJDELA (1979) encontraron una amplia variación en el área nuclear entre carcinomas y tumores benignos. En una larga serie de 173 lesiones de mama benignas y 103 malignas, CORNELISSE y cols. (1981), observaron que la media del área nuclear puede discriminar el 60% de carcinomas y el 95% de lesiones benignas. Los falsos negativos son aquellos que predominantemente presentaban núcleos pequeños. Estas lesiones, sin embargo, fueron asociadas a baja incidencia de metástasis axilares.

Si bien histopatológicamente se puede distinguir un tumor benigno (fibroadenoma) diploide, de un tumor maligno, también diploide; por medio de la morfometría se puede corroborar esta afirmación (BOON y cols., 1984; PESCE, 1986). Con este propósito, OLINICI y cols. (1987), plantean un trabajo para discriminar por métodos morfométricos entre carcinomas diploides y fibroadenomas, encontrando que la media de las áreas nucleares en los fibroadenomas era de $83.16 \mu^2$, mientras que en los carcinomas diploides fué de $99.7 \mu^2$, siendo éstos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

KING y cols. (1991) realizaron también un estudio morfométrico de lesiones epiteliales premalignas, evaluando 120 lesiones de mama clasificadas como 20 mastopatías fibroquísticas no proliferativas, 20 hiperplasias ductales, 20 hiperplasias ductales moderadas, 20 hiperplasias ductales atípicas, 20 carcinomas in situ y 20 carcinomas ductales infiltrantes procedentes de material biopsico o de mastectomía. Evaluaron en todos los casos el área, perímetro, diámetro máximo, diámetro mínimo, áreas de cromatina densas y claras, y encontraron que existía una progresión en la media de cada grupo con respecto a los 6 parámetros, de manera que la media total fué incrementando desde las lesiones no proliferativas hasta los carcinomas. Cuando compararon los seis grupos de lesiones con las medias de los 4 primeros aspectos nucleares, la

hiperplasia atípica fué significativamente distinta ($p < 0.05$) de los carcinomas y de las lesiones no proliferativas, pero no de las hiperplasias ductales, hiperplasias ductales moderadas o carcinomas in situ. Los carcinomas fueron indistinguibles de los carcinomas in situ y significativamente diferentes de las lesiones no proliferativas y de todas las lesiones proliferativas, incluyendo a las hiperplasias atípicas. Estos estudios confirman los previos de GUSKI y cols. (1988) así como de NORRIS y cols. (1988). También los datos aquí aportados hablan en favor de la existencia de una progresión entre la hiperplasia simple sin atipias, hiperplasia con atipias, carcinoma in situ y carcinoma invasor.

BECKER y cols. (1992) han comparado por estudios morfométricos la adenosis esclerosante con el carcinoma tubular, atendido que el diagnóstico diferencial, en algunas ocasiones, es dificultoso. Sólo dos variables morfométricas resultaron estadísticamente significativas, el coeficiente de variación de la forma de la luz del túbulo y la densidad de la superficie glandular, viendo que 31 lesiones fueron diagnosticadas correctamente (86%), ya que 3 adenosis esclerosantes y 2 carcinomas tubulares se clasificaron erróneamente.

Pero, como hemos señalado previamente, también se han estudiado otros parámetros morfométricos, aunque con menos detalle. VAN BOGAERT y cols., 1980, analizaron la media del diámetro nuclear en 100 cánceres de mama y en secciones de tejido, (adoptando un factor de corrección de 1.55, ya que las secciones histológicas conllevan una significativa reducción y distorsión de sus estructuras, según han encontrado ellos mismos en un trabajo previo (VAN BOGAERT, 1979)), para evaluar su significación como un factor pronóstico temprano. Subdividieron éstos casos en 3 grupos: células con núcleos pequeños (25'5% de los casos), núcleos medianos (63'3%) y núcleos grandes (11'2%). Investigaron la recurrencia temprana y la tasa de mortalidad en cada una de las 3 categorías, demostrando que conforme aumenta el tamaño nuclear, se produce un incremento de la mortalidad, como consecuencia de metástasis.

ZAJDELA A y cols. (1985) compararon el diámetro nuclear entre el tumor primario y sus metástasis y observaron que hay una extremada similitud entre el diámetro nuclear del tumor primario y el de sus metástasis, apoyando con ello la idea de que la mayoría de los tumores tienen una naturaleza monoclonal.

En una serie de 78 carcinomas, BAAK y cols. (1982), observaron cómo el análisis discriminante de los aspectos morfométricos, es capaz de clasificar correctamente al 82% de pacientes dentro de una supervivencia de 6 años. En contraste, la presencia de metástasis axilares y el estadiaje del TNM, sólo se predicen correctamente en el 54 y 56% respectivamente de los pacientes. Los dos predictores mejores de supervivencia fueron la actividad mitótica y el índice de celularidad, aunque también todos los parámetros morfométricos, mostraron una significativa relación con la supervivencia.

MAYR y cols. (1991) han estudiado también al carcinoma intraductal por morfometría y lo comparan con la mama normal. Utilizando la media del diámetro nuclear, encuentran que el diámetro medio de las células en los ductos conteniendo un carcinoma intraductal, no invasor, fué de 349 μ , mientras que la de un ducto normal fué de 90 μ .

Finalmente merece señalarse cómo también han sido cuantificados otros parámetros nucleares además de los antes citados. BAAK (1984) utiliza la morfometría nucleolar como un elemento con relativo significado pronóstico para el seguimiento de los carcinomas ductales de mama, indicando que, en general, los no supervivientes tienen nucleolos más grandes y más pleomórficos que los supervivientes, en un seguimiento de 5 años. Las diferencias en diversas variables, incluyendo perímetro nuclear y celular, área nuclear y celular y relación del área nucleo/citoplasmica, han sido estudiados con análisis de imagen y evaluados por el test de Wilcoxon's en células de tumores de mama benignos y malignos. El mejor factor discriminante ha sido la relación del área nucleo/citoplasmica y el área nuclear media. Ambos parámetros pudieron ser usados para distinguir entre células benignas y malignas en punciones-aspiraciones de mama (BOON, 1982).

A través de esta revisión bibliográfica queda patente cómo el estudio de los parámetros cuantitativos tienen valor en la glándula mamaria, para ayudar a distinguir las lesiones morfológicamente problemáticas.

CITOFOTOMETRIA ESTATICA

METODO DE ANALISIS CITOFOTOMETRICO

La microespectrofotometría o citofotometría estática, introducida por CASPERSON en el año 1936, permite la cuantificación de la cantidad o de la concentración de una sustancia determinada en el interior de una célula sin modificar su estructura. El desarrollo histórico y fundamentos teóricos de ésta técnica han sido objeto de excelentes revisiones (SANDWRITTER, 1966; SWIFT, 1966; ATKIN, 1970; CASPERSSON y LOMAKKA, 1970; ZIMMER, 1973; JAMES, 1983).

Básicamente ésta técnica, que une las áreas de la microscopía y la espectrofotometría, permite la cuantificación de una sustancia por medio de la medición de la absorción producida en un haz de luz monocromático al atravesar la célula. La absorbancia o densidad óptica medida está relacionada con la concentración de la sustancia por medio de la Ley de Lambert-Beer (ZIMMER, 1973).

ERRORES INHERENTES A LA TECNICA.

El principal error que se origina con la utilización de ésta técnica es el denominado "error de distribución". Este error es debido a la heterogeneidad de la muestra estudiada, que provoca un error por defecto en la cuantificación de la sustancia estudiada, ya que la ley de Lambert-Beer solamente es aplicable a soluciones homogéneas.

Para subsanar este error se han aplicado diversos métodos de corrección (MENDELSON, 1966; MAYAL y MENDELSON 1970; GOLDSTEIN, 1981). Entre estos métodos se encuentra el de doble área y longitud de onda única (GARCIA y IORCO, 1966; GARCIA, 1973) el de doble longitud de onda (ORNSTEIN, 1952; PATAU, 1952; GARCIA, 1962), el del "plug" o de extinción media y el método de integración o barrido (ATKIN, 1970). Entre estos métodos el que reproduce valores más exactos es el método de integración o barrido (GOLDSTEIN, 1981), aunque en algunas aplicaciones el método de la doble longitud de onda produce resultados aceptables, precisando ésta metodología de una instrumentación menos sofisticada (CHIECO y BOOR, 1984).

Otros errores relacionados con la óptica del microscopio tales como tono, brillo y reflexión, pueden corregirse adecuadamente en gran medida en la citofotometría de barrido (MAYAL y MENDELSON, 1970; GOLDSTEIN, 1981) y sólo pueden ser relevantes en la medición de objetos muy pequeños (DUIJNDAM y cols., 1980a; DUIJNDAM y cols., 1980b).

CUANTIFICACION CITOFOTOMETRICA.

En los estudios citofotométricos realizados en el rango de la luz visible, si éstos no presentan una coloración propia, es necesaria la utilización previa de métodos citoquímicos que permitan su cuantificación. En el caso de componentes estructurales ésta tinción ha de ser específica de la sustancia problema, la reacción citoquímica ha de ser estequiométrica y el cromóforo resultante ha de ser monocromático, es decir, con un único espectro de absorción.

La longitud de onda utilizada para efectuar la medición suele coincidir con la longitud de onda de absorción del colorante.

ADN

A pesar de existir distintas técnicas citoquímicas que permiten la cuantificación citofotométrica del contenido en ácido desoxiribonucleico (DEICH, 1966), la tinción de Feulgen ha sido generalmente la preferente en los estudios citofotométricos (HALE, 1966; BAHR, 1970).

La reacción de Feulgen se basa en una hidrólisis previa del ADN, que elimina preferentemente las purinas, desenmascarando la función aldehídica de los azúcares desoxiribofuranosos a los que están unidos. Los aldehídos formados reaccionan con el reactivo de Schiff que toma su forma coloreada y que se une al ADN "in situ" sin difusión (DEITCH, 1966).

La hidrólisis convencional de Feulgen es con HCl 1N a 60°C. Sin embargo, para estudios citofotométricos es más conveniente la utilización de otros protocolos. Los más utilizados son la hidrólisis con HCl 5N a temperatura ambiente o con HCl 3'5 N a 37°C. Estos protocolos permiten una mayor reproducibilidad de las características de la tinción (FAND, 1970)

APLICACION DE LA CITOFOTOMETRIA ESTATICA AL ESTUDIO DE LAS LESIONES MAMARIAS.

Las técnicas diagnósticas que cuantifican la cantidad de ADN por citometría estática se apoyan en el criterio internacionalmente aceptado de que aneuploidía es un marcador de células transformadas neoplásicamente. Esta aneuploidía, traduce la existencia de aberraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales de las células. Por ello, la demostración de aneuploidía en células de una displasia o lesión borderline nos va a permitir el diagnóstico de neoplasia (BOCKING y cols., 1990). La demostración de la aneuploidía por tanto puede utilizarse como ayuda diagnóstica en los casos en los que el diagnóstico morfológico no es suficiente para determinar el carácter neoplásico de una lesión. No obstante, la no evidencia de aneuploidía en el diagnóstico, no descarta la existencia de una neoplasia.

La observación de aneuploidía mediante análisis cromosómicos en cultivos celulares, por supuesto muy precisa, es hoy día muy laboriosa y de alto coste económico. Además, la mayoría de las veces resulta imposible cultivar las células relevantes, por ejemplo de la zona de displasia. Por esto, la medición del contenido de ADN nuclear por citometría estática o de flujo ha de ser un método a incorporar en la rutina diagnóstica habitual. Por otra parte, muchos tumores muestran una gran dispersión en el número de cromosomas, mientras que las correspondientes variaciones en el llamado índice de ADN que correspondería a 1 para $2n$ cromosomas es, proporcionalmente, menor (VERA ROMAN, 1987).

Como hemos señalado previamente, las pacientes con enfermedad fibroquística de la mama presentan un incremento en la incidencia del cáncer de mama (COPELAND y cols., 1960; FUJIMORI y cols., 1960; HAAGENSEN, 1956; HODGE y cols., 1959; HUMPHREY y cols., 1962; KARPAS y cols., 196; KERN y cols., 1969). Sobre todo, cuando se trata de hiperplasia atípica, que es, o bien un marcador de incremento del riesgo de cáncer o bien es, por sí misma, una lesión premaligna (BLACK y cols., 1969; PAGE y cols., 1985; WELLINGS y cols., 1975).

Sin embargo, la interpretación de ésta hiperplasia atípica es en cierto grado subjetiva y variable de un observador a otro y, por consiguiente, de limitada utilidad clínica. Resulta difícil encontrar una interpretación consistente y

reproducibles de estos cambios histológicos. PAGE y cols. (1985), encuentran que hay desacuerdo aproximadamente en el 25% de casos de hiperplasia atípica.

Así mismo, la mayoría de casos encontrados en mujeres premenopausicas, sugiere que el carcinoma lobulillar in situ tiende a aparecer aproximadamente 8 a 10 años antes que el carcinoma invasor (LUDWIG, 1972). Sin embargo, todos los esfuerzos dedicados a relacionar ésta lesión con el carcinoma invasor se han basado en estudios estadísticos (HUTTER y cols., 1969); McDIVITT y cols., 1967; NEWMAN, 1963). Por ello, basándose en la hipótesis de que el contenido en ADN nuclear y/o número de cromosomas en muchas neoplasias epiteliales malignas y en sus lesiones precursoras es anormal, se han realizado diversos estudios que sugieren que la aneuploidía, en ausencia de irradiación previa, puede ser indicativa de la presencia de una neoplasia epitelial preinvasiva o bien invasiva (LUDWIG y cols., 1972).

En base a ello, IZUO y cols.. (1971 b) determinaron la cantidad de ADN (por citofotometría estática) en 15 casos con lesiones hiperplásicas mamarias. Ocho de las quince pacientes desarrollaron posteriormente carcinoma y siete no. El estudio de cinco lesiones hiperplásicas procedentes de tres pacientes del primer grupo reveló una distribución aneuploide del ADN (2 hiperdiploides, 2 hipodiploides y 1 cuasidiploide). Sin embargo, todos los casos del segundo grupo mostraron una distribución diploide o diploide-tetraploide. Así mismo, en otra publicación de éste grupo de autores (IZUO y cols., 1971 a) se cuantificó la cantidad de ADN en lesiones metaplásicas apocrinas procedentes de nueve casos de enfermedad fibroquística (utilizando como control glándulas apocrinas vulvares, que tienen una restringida distribución diploide). En todas las lesiones existía (junto a la población diploide) una población tetraploide que, proporcionalmente, aumentaba conforme se incrementaba el grado histológico de la metaplasia (grado 1 : las células apocrinas constituyen un único estrato en la pared quística; grado 2 : las células se apilan sobre la luz; grado 3 : existe proliferación papilar). En un caso de metaplasia grado 3 se observó una distribución hiperdiploide-aneuploide. Posteriormente, la paciente desarrolló un carcinoma invasor.

RAJU y cols. (1991) desarrollaron también un estudio sobre la cantidad de ADN en las metaplasias apocrinas, en éste caso asociadas, tanto a lesiones

benignas como malignas y encontraron que la mayoría de las lesiones benignas (metaplasia apocrina 3/4, adenosis con cambios apocrinos 3/3, hiperplasia ductal atípica con cambios apocrinos) y los carcinomas de bajo grado (carcinoma intraductal 9/10, carcinoma lobulillar in situ 2/2, carcinoma infiltrante con cámbios apocrinos 1/1 y carcinoma lobulillar infiltrante 14/14), se encontraban en el rango diploide (94%). Por el contrario, 24/25 (96%) de las lesiones malignas de alto grado, fueron aneuploides (carcinoma intraductal 10/10 y carcinoma ductal infiltrante 14/15, todos con cambios apocrinos). Concluyen que las lesiones apocrinas benignas y malignas de la mama, abarcan un espectro proliferativo y neoplásico similar al de las lesiones de mama no apocrinas.

También, CARPENTER, JOYCE y COOKE (1987) estudiaron 13 casos con lesiones proliferativas atípicas, 12 casos de carcinoma ductal in situ y 26 lesiones carcinomatosas intraductales en el contexto de carcinomas invasores. Se encontraron células aneuploides en aproximadamente el 30 % de las atipias proliferativas (4 de 13) y carcinomas ductales in situ (4 de 12). Sin embargo, se encontró aneuploidía en el 88 % (23 de 26) de las lesiones carcinomatosas intraductales asociadas a carcinoma invasor. Además, en 16 lesiones pertenecientes a éste tercer grupo se comparó la ploidía del carcinoma invasor y del carcinoma ductal in situ asociado. En 11 casos ámbas lesiones fueron aneuploides, en un caso ámbas diploides y en 4 casos el carcinoma ductal in situ fué aneuploide mientras que el carcinoma invasor asociado fué diploide. Por consiguiente, según estos autores, la aneuploidía puede ser un dato valioso para predecir el comportamiento biológico más agresivo de las lesiones preinvasivas.

Por otro lado, De POTTER y cols.. (1987) estudiaron, por medio de citometría estática, cinco lesiones no proliferativas, once casos con lesiones proliferativas sin atipia, siete con atipias, catorce carcinomas intraductales in situ y once lesiones carcinomatosas ductales in situ asociadas a carcinoma invasor. Las cinco lesiones no proliferativas mostraron un contenido en ADN diploide. Las lesiones hiperplásicas sin atipia presentaron una distribución del ADN de caracter diploide con muy pocas células tetraploides. Seis de los siete casos de hiperplasia ductal con atipia presentaron una distribución del ADN diploide con pocas células tetraploides; sin embargo, en una de las pacientes se observó un pico puramente tetraploide. Todos los casos de carcinoma in situ presentaron curvas de ADN con una proporción variable de células en el pico diploide y

tetraploide. En éstas lesiones no se encontraron aneuploidías, aunque sí hubo un caso que mostró una distribución diploide e hipotetraploide. Por contra, las lesiones de carcinoma ductal in situ asociadas a carcinoma ductal infiltrante mostraron una distribución aneuploide en el 64 % de las pacientes. Las restantes presentaron una cantidad variable de células diploides, hiperdiploides e hipertetraploides.

KING y cols. (1991), encontraron que la cantidad de ADN aumentaba desde las lesiones no proliferativas hasta los carcinomas, excepto en las hiperplasias atípicas. Los carcinomas infiltrantes y carcinomas in situ, ambos, tenían un incremento total de la cantidad de ADN comparado con las lesiones no proliferativas y proliferativas, sin embargo, el carcinoma in situ muestra un mayor incremento y tiene una mayor variabilidad entre los casos.

También TEPLITZ y cols.. (1990) cuantificaron por medio de análisis de imagen la cantidad de ADN presente en lesiones correspondientes a doce casos en los que coexistían hiperplasia ductal atípica (utilizando los criterios de PAGE) y carcinoma ductal infiltrante. Encontraron que, en seis casos, tanto las lesiones carcinomatosas infiltrantes como las lesiones ductales atípicas acompañantes eran euploides y, en los otros seis, ámbos tipos de lesiones eran aneuploides/hiperdiploides. Estos autores sugieren que tal congruencia sugiere una herencia estable de las mutaciones somáticas involucradas en el proceso de la carcinogénesis.

Resultados similares han descrito ERIKSSON y cols. (1992) que estudiaron 36 lesiones benignas, 34 hiperplasias epiteliales, 40 carcinomas in situ y 204 carcinomas invasores. Encontraron que 15 de las 34 hiperplasias epiteliales, 33 de los 40 carcinomas intraductales y 180 de los 204 carcinomas invasores, fueron de contenido en ADN aneuploide. LONGIN y cols. (1992), en 14 lesiones benignas y 72 carcinomas, han visto que todas las lesiones benignas menos una (13/14) fueron diploides, mientras que la mayoría de los carcinomas invasores fueron aneuploides (58/72).

Un problema similar se plantea cuando se analiza el carcinoma lobulillar in situ. LUDWIG y cols.. (1973) estudiaron la cantidad de ADN en ocho casos de carcinoma lobulillar in situ y en cinco de carcinoma lobulillar infiltrante por medio de microespectrofotometría estática. Siete de los ocho carcinomas lobulillares in situ presentaron una cantidad de ADN dentro del rango diploide-tetraploide, mientras que el octavo fué aneuploide. Tres de los cinco carcinomas infiltrantes

fueron diploides-tetraploides y dos aneuploides. Por otra parte, estudiando tres lesiones carcinomatosas lobulillares in situ adyacentes a carcinomas lobulillares invasores, observaron que las lesiones in situ se encontraban en el rango diploide-tetraploide. Además, el componente invasor fué diploide-tetraploide en dos casos y aneuploide en otro.

Estos datos , un tanto discrepantes, indicarían que la aneuploidía no es, en realidad, un marcador seguro para tipificar ni las lesiones hiperplásicas atípicas ni las carcinomatosas.

Pero no basta con detectar las lesiones preinvasoras, sino que también es preciso, una vez detectado el cáncer, establecer cuál es el grado de agresividad de este tumor. Es generalmente aceptado que el grado de malignidad del cáncer de mama por criterios puramente histológicos es difícil y de limitado valor en la predicción del pronóstico. Por ello se han realizado numerosos intentos de usar análisis citoquímicos y bioquímicos de células transformadas para dar una información más precisa acerca del potencial maligno del tumor en casos individuales.

Recientes estudios procedentes de diversos laboratorios han demostrado que la determinación del patrón de distribución del ADN nuclear es un método útil en la gradación de la malignidad de los tumores de mama (ATKIN, 1972; AUER y cols., 1980; FOSSA, 1983; DOWLE, 1987), y por tanto, utilizable como factor pronóstico. En este sentido, se han recogido muy numerosos trabajos en la bibliografía interesados en el tema, no obteniéndose siempre resultados concordantes. Recogemos algunos más significativos:

ERHART y cols. (1986) estudiaron una serie de 49 pacientes con carcinoma de mama, 26 de las cuales sobrevivieron más de 10 años y las otras 23 murieron 2 años después de la intervención, encontraron que en estas últimas todos los tumores (excepto uno) presentaban altos valores de ADN (cantidad de ADN $> 5c$), mientras que la mayoría de las pacientes que sobrevivieron 10 años, mostraron un patrón de distribución de ADN diploide, habiendo encontrado sólo 2 casos en que los tumores presentaban alta fracción de células con valores de ADN excediendo el nivel $5c$. Por consiguiente, éstos autores defendieron que éstos resultados podrían ser útiles para obtener consejo pronóstico en pacientes individuales. Esto también ha sido corroborado por otros autores (ATKIN, 1972; AUER y cols., 1980; AUER y cols., 1984; ERHARDT y cols., 1986b; AUER y

ASKENSTEN, 1989).

Por el contrario, BOCKING y cols. (1989), apoyan que la validez pronóstica de éste método no es buena para la paciente individual, aunque sí está de acuerdo con otros muchos autores (ATKIN, 1972; AUER, 1980; AUER 1984; BOHM, 1975; CORNELISSE, 1987; LINTENBERG ,1985; KRUG, 1984; PATEK, 1980 Y THORUD, 1986), que el contenido en ADN nuclear posee información pronóstica para grandes grupos de pacientes con cancer de mama. El y sus colaboradores se basan en el estudio del llamado "Grado de malignidad de ADN" (basado en la varianza del valor de ADN alrededor del pico diploide normal). Además esta medición, atendido que puede haber una significativa variación del grado de malignidad dentro de un tumor, la realizan en diferentes zonas tumorales, encontrando que no hay variaciones significativas de una zona a otra. BOCKING y cols. (1989) por ello han defendido que el "grado de malignidad de ADN" , junto con el grading histomorfológico, aportan información pronóstica independiente al estadiaje del TNM.

De la misma opinión son OPFERMANN y cols. (1987), aunque utilizando parámetros distintos: balance de ploidía (diferencia entre el porcentaje de células euploides y aneuploides) e índice de proliferación (proliferación de células entre los picos). Estos autores defienden que, para un número significativo de pacientes, la clasificación multivariable de perfiles de ADN de los tumores de mama, es de pequeña importancia para el patólogo, que tiene que dar un pronóstico para un paciente determinado.

Siguiendo esta misma línea, TRONCOSO y cols., 1989 también evaluaron el contenido en ADN nuclear en un grupo histológicamente homogéneo de carcinomas ductales invasores procedentes de pacientes con cortas y largas supervivencias, encontrando que los pacientes que presentaron períodos cortos de supervivencia, por lo general, presentaban rangos predominantemente aneuploides (con una gran proporción de células mostrando un contenido en ADN cerca del 5c), mientras que los pacientes con largos períodos de supervivencia, presentaban contenido en ADN más cerca del rango diploide; a pesar de que estos tumores mostraban similar estadiaje patológico e idéntica imagen histológica. Un estudio similar con los mismos resultados realizaron AUER y cols. (1984).

FALLENIOUS y cols. (1988), también encontraron correlación entre el contenido de ADN de las células neoplásicas y el pronóstico, de manera que los tumores que presentaban valores de ADN dentro de los límites de los tejidos normales (euploides) presentan un pronóstico favorable. Por el contrario, los tumores con valores de ADN aumentados o dispersos (aneuploides) tuvieron peor pronóstico. Estos autores consideran que esto ocurre independientemente de si el porcentaje de células está por encima de 2.5c o 5c, en el Índice de ADN o de los histogramas de Auer.

Intentando clasificar de alguna manera los diferentes patrones de distribución del ADN dentro de unas pautas, AUER y cols., 1980 elaboraron unos histogramas tipo que englobarían a todas las formas de distribución del ADN. Estos histogramas han sido bastante utilizados en la bibliografía y tomados como modelo para el estudio del ADN. Abarcan los siguientes tipos:

Los histogramas del tipo I están caracterizados por presentar un único y distintivo valor modal de ADN en la región diploide y cuasi-diploide de las células normales. Tan solo un pequeño número de células están alejadas de dicho valor modal.

Los histogramas del tipo II o bien presentan un distinto valor modal en la región tetraploide o cuasi-tetraploide o bien muestran dos picos bien definidos en torno a las regiones 2c y 4c respectivamente. Muy pocas células o ninguna presentan cantidades de ADN correspondientes a la fase de síntesis de las células normales. Sólo unas pocas células caen fuera del rango de valores de ADN propios de la población normal; tales células generalmente tienen cantidades de ADN en torno a 8c.

Los histogramas del tipo III presentan usualmente dos picos, pero se diferencian del tipo II por el hecho de que existe un importante número de células con cantidades de ADN similares a las de las células de control en fase de síntesis de ADN. Como regla general, la posición de los dos picos se desvía algo de los valores 2c y 4c de las poblaciones celulares normales.

En los histogramas de tipo IV se observa una pronunciada e irregular aneuploidía, de tal manera que las células presentan cantidades de ADN que oscilan entre cerca de 2c y más de 6c o incluso 8c.

AUER y cols. (1980), en éste mismo trabajo y en un estudio retrospectivo de 112 pacientes, demostraron que la mayoría de las pacientes estudiadas (80%) con carcinoma de mama de larga supervivencia (carcinomas mamarios de bajo grado de malignidad) presentaron histogramas de ADN de los tipos I y II. Sin embargo, la mayoría de las pacientes (81%) con un corto período de supervivencia (pacientes con carcinomas de alto grado de malignidad), tenían histogramas de los tipos III y IV.

Además del valor del contenido en ADN en el pronóstico de los pacientes, se han estudiado otros parámetros: VON ROSEN y cols. (1986) analizaron el contenido en ADN sobre muestras citológicas, pero en pacientes menores de 35 años portadoras de Carcinoma invasor de mama. Encontraron que, a pesar de que aproximadamente el 90% de los tumores eran aneuploides (mostrando perfiles de ADN tipo III y VI de Auer), estos tumores no poseían alto potencial maligno.

FALLENIOUS y cols. (1984), estudiaron una serie de carcinomas invasores de mama clínicamente no palpables, pero sí detectables mamográficamente, para ver si mostraban cantidades de ADN distintas de los carcinomas clínicamente palpables y vieron que el 90% de ellos tenían cantidades de ADN nuclear dentro de la región diploide y tetraploide del epitelio normal de la mama, lo cual indujo a pensar que los carcinomas no palpables, tienen predominantemente una alta diferenciación biológica y son poco proliferativos, mostrando un pronóstico mejor.

La mayoría de los estudios sobre el significado pronóstico del contenido en ADN nuclear en cancer de mama, ha sido obtenido sobre carcinomas ductales, teniendo menor información sobre los otros diferentes subtipos histológicos. ERHARDT y cols., 1986, estudiaron el contenido en ADN en 80 carcinomas de mama, comprendiendo 16 carcinomas ductales, 9 papilares, 14 comedocarcinomas, 13 coloides, 15 lobulillares y 13 medulares.

De acuerdo con otros autores (AUER y cols, 1980; AUER y cols., 1984) encuentran que los carcinomas ductales muestran diferentes tipos de distribución del patrón de ADN nuclear, es decir, tumores con valores de ADN en la región normal diploide o tetraploide (tumores euploides), o bien con valores excediendo la región normal tetraploide (tumores aneuploides). La mayoría de los tumores papilares y coloides fueron euploides, mientras que en

general, los comedocarcinomas, muestran perfiles aneuploides. Estos hallazgos están de acuerdo con la supervivencia esperada dentro de este grupo de pacientes.

En el carcinoma lobulillar de mama la correlación entre el patrón de distribución de ADN y la supervivencia esperada de la paciente fue baja. Por el contrario, el carcinoma medular mostró perfiles de ADN aneuploides, pero la correlación con el tiempo de supervivencia esperado fué bajo. Por consiguiente, el carcinoma lobulillar, en general, tiene un peor pronóstico que el esperado a partir de los análisis de ADN nuclear, mientras que los carcinomas medulares, en general, tienen un mejor pronóstico que el indicado a partir de las medidas de ADN (BOKING, 1989).

FOSSA y cols. (1982), SPRINGER y cols. (1979) plantean otro problema distinto: ¿son los carcinomas diploides indistinguibles de los tumores benignos, también diploides?. Sin embargo, encontraron que la mayoría de los carcinomas diploides de mama tienen histogramas de ADN que difieren de los de las lesiones benignas, debido al número de células que se encuentran por fuera del pico diploide. Estos autores, junto con ATKIN y col., 1979 y KALLENBERGER y cols., 1967, observaron una buena correlación entre el grado de aneuploidía y el pronóstico.

Como se deduce de todos los trabajos revisados vemos que el patrón de distribución del ADN nuclear en los carcinomas de mama es constante; es decir, hay una serie de tumores cuyas células malignas exhiben un valor de ADN localizado en la región diploide o tetraploide, como lo hacen las células epiteliales normales de la mama; mientras que hay otro grupo de tumores cuyas células están muy dispersas y excediendo la región diploide o tetraploide. El significado biológico y clínico de estos hallazgos no es conocido, pero lo que sí que está claro es que aquellos carcinomas de mama con un patrón de ADN diploide o tetraploide homogéneo tienen un mejor pronóstico que aquellos tumores que exhiben un patrón de distribución del ADN heterogéneo, excediendo las regiones diploide o tetraploide.

Atendido que la presencia clínica de metástasis axilares está correlacionada con un pronóstico más incierto, también se han realizado numerosos estudios confrontando la cantidad de ADN en el tumor primario y en las metástasis.

A este respecto, AUER y cols. (1979), estudiaron 22 tumores de mama y sus metástasis y encontraron que, si bien el patrón de distribución de cada uno de los tumores difiere ampliamente, los tumores primarios y sus metástasis siempre muestran un patrón de distribución similar, independientemente del tiempo de recurrencia de las metástasis. Estos resultados fueron interpretados como indicativos de que los carcinomas mamarios, en general, muestran un alto grado de estabilidad en el contenido nuclear de ADN durante la historia de la enfermedad y sugiere que la progresión del tumor es más probable que sea debida a un incremento y/o diseminación de células tumorales mostrando similares propiedades genéticas y potencial maligno, más que una desdiferenciación progresiva e incremento de la malignidad de las células tumorales.

Estos hallazgos fueron corroborados posteriormente por AUER y cols. (1984) en un estudio de carcinomas de mama sobre material de autopsias. En cambio, RONDEZ y cols. (1991) estudiando 120 casos de carcinomas primarios de mama, 15 casos de metástasis y 15 casos de lesiones benignas, encontraron cómo una media del 76.7% de los carcinomas examinados fueron aneuploides con muchos índices de ADN entre 1.6 y 2, observando un alto porcentaje de aneuploidías en las metástasis, siendo este porcentaje mayor que en los tumores primarios. Este fenómeno fue explicado como una consecuencia de la heterogeneidad tumoral así como de la inestabilidad genética que propician el desarrollo de una nueva línea celular. Esto fué corroborado por otros autores (CHRISTOV y col., 1989; RUBE y cols., 1988). Así pues, los ganglios axilares serían predictores significativos de recurrencia, pero no del patrón de distribución de ADN (KLINTENBERG y cols., 1985).

Todas las revisiones que hemos visto hasta el momento, han sido realizadas por microespectrofotometría, utilizando como colorante el Feulgen y el material procedía, bien de bloques incluidos en parafina o bien de muestras citológicas. Como quiera que este método consume tiempo y limita el número de células a examinar, fué introducida la citometria de flujo como un método alternativo que aumenta drásticamente el número de células a estudiar. Por contra la mayor desventaja de este método es la imposibilidad de tener una identificación morfológica exacta de las células tumorales. No obstante, muchos de los estudios recientes de ADN han sido realizados usando Citometria de flujo (TRONCOSO y cols., 1989).

Han sido publicados pocos estudios comparativos entre los diferentes métodos. FALLENIUS y cols., 1987, estudiaron 50 carcinomas de mama utilizando ambos métodos (citometría estática y citometría de flujo). En una primera observación, los resultados confirmaron que existe una buena correlación entre el valor modal determinado por citometría estática y el Índice de ADN, cuantificado por citometría de flujo. Sin embargo, cuando los tumores fueron clasificados cómo de bajo o alto grado de malignidad mediante el Índice de ADN y fase S (citometría de flujo) y mediante los tipos de histogramas (citometría estática), la concordancia fué menor. Por ello, estos autores sugieren que la simple determinación del valor modal por Citometría estática o el Índice de ADN por Citometría de flujo no es suficiente para dar un grado adecuado de malignidad y piensan que la combinación de la ploidia y del porcentaje de células dispersas por fuera del pico modal, sería más sensible para establecer el grado de malignidad de los carcinomas de mama.

Medidas paralelas en 67 casos de carcinomas de mama utilizando citometria estática y citometria de flujo, mostraron una buena correlación entre el Índice de ADN; sin embargo, con Citometria de flujo se encontró menor anormalidad en la ploidia (CORNELISSE y cols., 1984; CORNELISSE y cols., 1985; AUER y cols., 1987), también encuentran debil correlación entre ambos métodos, ya que algunos tumores clasificados como euploides por un método, fueron clasificados como aneuploides por el otro. Piensan que la principal razón de ésta débil correlación radica en la preparación de las muestras y en la representación de células tumores dentro de la muestra.

La Citometría de flujo y la Citometría estática proporcionan medidas de contenido en ADN comparables, aunque también aparecen discrepancias ocasionales (DAWSON y cols., 1990).

BALDETORP y cols. (1992) en un estudio comparativo de 222 carcinomas de mama utilizando citometría estática y citometría de flujo, encontraron analogías en el 76% de los casos (168/222), resultados similares a los encontrados por GHALI y cols. (1992), que tuvieron analogía en el 90'4% de los casos (104/115).

YUAN y cols. (1992) realizaron un estudio comparativo en 101 pacientes con carcinoma de mama y encontraron que 46 tumores fueron diploides y 55

aneuploides cuando utilizaron la citometría de flujo, mientras que cuando el estudio lo realizaron con análisis de imagen, 30 tumores fueron diploides y 71 aneuploides, pero piensan que aunque el análisis de imagen parece ser más sensible que la citometría de flujo, para detectar aneuploidía, el análisis de imagen carece de la especificidad de la citometría de flujo en la correlación con el seguimiento clínico.

LEE y cols. (1992) así mismo, realizaron un estudio comparativo en 100 carcinomas invasores de mama y encontraron una buena correlación entre los dos métodos, con unos resultados similares en la detección de aneuploidías en el 81% de los tumores. La citometría estática permite visualizar y seleccionar las células tumorales y fue más sensible en detectar tetraploidias y poblaciones celulares altamente aneuploides. Por el contrario, la citometría de flujo proporcionó mejor resolución y fue más efectiva en la detección de tumores multiploides y tumores "near" diploides y aneuploides.

ALVAREZ y cols. (1993) muy recientemente, han estudiado 37 casos que contenían áreas de carcinoma intraductal y de carcinoma ductal infiltrante, utilizando ambas técnicas y solo encontraron analogías en 22 de 37 casos (59´4%).

CITOMETRIA DE FLUJO (CMF)

APROXIMACION HISTORICA

La CMF es el método más ampliamente aplicado para la obtención de medidas automáticas de parámetros celulares. Aunque el primer paso en el diagnóstico de los procesos patológicos lo constituye la evaluación histopatológica y citológica, la CMF, al igual que la citometría estática, proporciona una importante información adicional objetiva y reproducible, complementando a la histopatología clásica (LOVETT, 1984).

Los orígenes de la CMF se remontan al año 1934 cuando MOLDAVAN, utilizó un sistema con el cual realizaba contajes celulares, haciendo desfilas a las células por un tubo capilar y donde éstas eran captadas por un receptor fotoeléctrico. Este método presentaba un gran problema y era la focalización y la obstrucción de los capilares cuando por ellos pasaban células de un determinado grosor. Esto no fue resuelto hasta que en 1953 ROSLAND-TAYLOR, siguiendo las observaciones de REYNOLDS, tuvo la idea de inyectar lentamente las células en suspensión al centro de una corriente líquida más rápida para que las arrastre, las centre, las alinee y disminuya los problemas de obstrucción.

A partir de 1949, COULTER comenzó la puesta a punto de aparatos de CMF que permiten contar las células y medir su tamaño por el cambio de conductancia por interrupción del medio en que ellas se encuentran. En 1956, una afortunada observación, supuso un avance importante en la citometría de flujo, cuando experimentó que al pasar células sanguíneas en una solución salina por un orificio muy pequeño se detectarían por los cambios producidos en la impedancia eléctrica sobre el orificio.

MAHEBTSKY (1965) aportó mejoras muy importantes: los aparatos utilizados permiten ahora medir dos parámetros simultáneamente sobre la misma célula, a una velocidad de 500 células/segundo. Estos dos parámetros son el tamaño, correlacionado con la intensidad de luz difundida a un pequeño ángulo, y la cantidad de ADN y de ARN obtenida en medidas de absorción de luz UV por los ácidos nucleicos. Estos aparatos fueron posteriormente sustituidos por el Orthocytógrafo y el Cytofluorógrafo.

En 1969, VAN DILA adopta el laser como una fuente luminosa de excitación. Esto permitió, entre otras cosas, una mejor focalización del haz, una gran potencia de excitación y una estabilidad del cromatismo. El utilizó las propiedades de la luz difundida bajo un pequeño ángulo para evaluar el tamaño de las células y muestra la relación entre la ploidía de las células y la fluorescencia que ellas emiten, cuando éstas son incubadas en presencia de un fluorocromo específico del ADN.

Paralelamente a la ampliación de las posibilidades de análisis, se desarrolló a partir de 1965, una técnica preparativa: una gotita de líquido conteniendo la célula que se ha marcado, puede ser desviada hacia un tubo colector, donde será separada. De este modo, se pueden reagrupar subpoblaciones homogéneas en cuanto a parámetros (tamaño, fluorescencia), que el aparato por sí mismo estudiará. La deflección se podía realizar por diferentes medios, pero el más (acertado) es el que utilizó HULETT, 1972 quien utilizó la deflección de gotitas cargadas eléctricamente y desviadas por un campo eléctrico para obtener subpoblaciones puras, identificadas como portadoras de un antígeno de superficie. Estos son los primeros trabajos publicados realizados por la "Fluorescence Activated Cell Sorter" (FACS). (Numerosos aparatos utilizados hoy en día, utilizan este mismo principio).

FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO

El término citometría se utiliza para referirse a un método de medida de las características físicas o químicas de las células o, por extensión a las de otras partículas biológicas. La citometría de flujo es un proceso en el cual éstas medidas se realizan mientras las células pasan una a una, formando una corriente, a través de los aparatos de medida.

Una de las mejores definiciones de la citometría de flujo es la de HOWARD SHAPIRO, 1988: "La citometría de flujo es un proceso en el cual células aisladas u otras partículas biológicas, pasan de una en una en el interior de una corriente líquida a través de un sensor, el cual mide sus características físicas o químicas".

Cada parámetro que puede ser determinado por citometría de flujo, puede ser también medido, como es obvio, por otros métodos citométricos alternativos, incluso estos métodos pueden ser aplicados en circunstancias donde no se puede utilizar la citometría de flujo (STEEINKAMP, 1984).

El análisis por citometría de flujo permite mediante la medida de un determinado parámetro en cada célula de forma individual, obtener un histograma de distribución de la población celular para dicho parámetro.

La medición del parámetro seleccionado se realiza marcando previamente la partícula con un fluorocromo específico. Posteriormente se mide la fluorescencia emitida al excitar el fluorocromo por la luz del laser que utiliza el citómetro de flujo, siendo proporcional la fluorescencia emitida al contenido celular de dicho parámetro.

La citometría de flujo permite el análisis cuantitativo de los parámetros celulares, tales como el contenido de ADN, ARN o actividad enzimática, que pueden ser determinados de forma rápida y precisa. Estos datos, se añaden a los obtenidos por el estudio morfológico, pudiendo tener en determinadas ocasiones un valor diagnóstico o pronóstico independiente (CORNELISSE y cols., 1987; EMDIN, 1987; FRIEDLANDER y cols., 1984; KOKAL, 1986; KUNICKA, 1987; SCOTT, 1987; COON y cols., 1989; DRESLER, 1989).

En resumen, la citometría de flujo permite un rápido estudio de gran número de células mucho más allá de los métodos citopatológicos tradicionales. Por esta técnica es posible detectar pequeñas cantidades de células neoplásicas dentro de un gran número de células normales.

A pesar de sus ventajas, la citometria de flujo no puede suplantar al microscopio, dado que éste permite el diagnóstico con escaso número de células, lo que no es posible con la citometría de flujo y, además es sabido que el contenido "normal" de ADN no indica "no neoplasia".

Los parámetros dependientes de las emisiones de fluorescencia son muy versátiles y las posibilidades de estudio de los mismos están supeditadas a la capacidad de diseñar procesos de tinción que relacionen la variación del parámetro deseado con una determinada emisión de fluorescencia (SHAPIRO, 1986).

APLICACION DE LA CITOMETRIA DE FLUJO AL ESTUDIO DE LAS LESIONES MAMARIAS.

Así como existe abundante información bibliográfica correspondiente a carcinomas de mama analizados con las técnicas de citometría de flujo, dicha información es escasa en lo referente a la aplicación de esta técnica a la mastopatía fibroquística convencional y atípica.

Esta situación puede justificarse, en parte, teniendo en cuenta dos problemas:

En primer lugar, siempre ha tenido gran importancia el poder determinar qué factores están implicados (dentro del heterogéneo grupo de los carcinomas mamarios) en el potencial metastático y recurrente de estas lesiones malignas, quedando en segundo plano las lesiones consideradas como "benignas".

En segundo lugar, sólo recientemente se está intentando sistematizar el grupo catalogado globalmente como "hiperplasias atípicas", razón por la cual difícilmente se han estudiado con técnicas complementarias, como la que nos ocupa en este momento.

A continuación, destacamos aquellos aspectos de la situación actual en la investigación de las lesiones malignas con citometria de flujo, intentando resaltar los pormenores que pueden ser relevantes para investigar posteriormente con esta técnica la mastopatía.

El comportamiento biológico de los carcinomas de mama depende, no sólo del estadiaje clínico y del patron histológico, sino de otros factores, como son la diferenciación celular, el contenido en ADN, el estado de los receptores estrogénicos y la actividad proliferativa de las células tumorales (RABER, 1982; ATKIN, 1979; AUER, 1984; HEDLEY, 1984; COULSON, 1984; MORAN, 1984; SILVESTRINI, 1985; CORNELISSE, 1987; KALLIONIEMI, 1987; LELLE, 1987; DRESSLER, 1988; DRESLER, 1992). De entre ellos, últimamente se ha utilizado mucho para predecir el factor pronóstico, la cantidad de ADN y la actividad proliferativa de las células tumorales.

Los parámetros fundamentalmente estudiados por la citometría de flujo son :

1. CANTIDAD DE ADN (PLOIDIA).
2. CORRELACION ENTRE CANTIDAD DE ADN Y TIPO DE LESION.
3. CORRELACION ENTRE CANTIDAD DE ADN Y GRADO DE DIFERENCIACION.
4. CORRELACION ENTRE CANTIDAD DE ADN Y AGRESIVIDAD BIOLOGICA.
5. CORRELACION ENTRE CANTIDAD DE ADN Y OTROS INDICADORES PRONOSTICOS.
6. FRACCION DE CELULAS EN FASE S.
7. CORRELACION ENTRE LA FRACCION DE CELULAS EN FASE S Y OTROS PARAMETROS CLINICOPATOLOGICOS.
8. CORRELACION ENTRE TODOS ESTOS PARAMETROS EN LOS TUMORES PRIMARIOS Y SUS METASTASIS.

1. Cantidad de ADN . -

Comenzaremos revisando los resultados obtenidos con la citofotometría de flujo en las lesiones benignas.

OLSZEWSKI y cols.. (1981) encontraron una cantidad de ADN diploide en 10 lesiones benignas (cinco mastopatías fibroquísticas y cinco fibroadenomas). MORAN y cols.. (1984) estudiaron 21 lesiones mamarias benignas (4 casos de enfermedad fibroquística, 9 de adenosis esclerosante, 4 fibroadenomas y 4 papilomatosis) y observaron que todas ellas eran diploides (índice de ADN igual a 1). El índice de ADN es la fracción existente entre el número del canal donde se encuentra la población celular a estudiar y el número del canal donde se encuentra una población normal del paciente problema (standard interno).

SPYRATOS y cols.. (1987) analizaron la ploidía en 72 lesiones mamarias benignas (24 fibroadenomas, 27 "hiperplasias atípicas o mastopatías proliferativas", 15 hiperplasias moderadas y 6 lesiones miscelaneas) y encuentran que todas ellas fueron diploides excepto un fibroadenoma presente

en el contexto de una hiperplasia atípica (mostrando un 20% de las células con un índice de ADN de 1'28). No obstante, en algunos casos se encontró un pequeño pico en la región tetraploide. Resultados análogos encontraron PALMER y cols. (1988).

Por otra parte, CHRISTOV (1989) estudió 30 lesiones mamarias benignas (10 casos de mastopatía fibroquística, 10 fibroadenomas, 4 lipogranulomas, 2 adenosis esclerosantes, 2 casos de ginecomastia, 1 cystosarcoma phyllodes y 1 leiomioma) que, sistemáticamente, mostraron un contenido de ADN diploide.

Por lo demás, estos resultados fueron independientes del método de disgregación celular utilizado. Así, CHASSEVENT y cols. (1984) analizaron 11 lesiones mamarias benignas que fueron disociadas según tres métodos distintos (mecánicamente, enzimáticamente y con Ficoll) y no observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos según los tres métodos, resultando todas las lesiones diploides.

En general, puede decirse que las lesiones benignas de la mama tienen un índice de ADN igual a uno.

Sin embargo, AASMUNDSTAD y HAUGEN (1990) más recientemente observaron que el 62 % (46 de 74) de los carcinomas ductales no infiltrantes eran diploides, siendo aneuploides el 38 % restante (28 de 74). Datos similares a los encontrados por KILLEEN y HIDEO (1991), los cuales encuentran, en un estudio realizado sobre 56 casos de carcinomas ductales in situ, que 23 casos, es decir (41%) fueron aneuploides. Además han encontrado que la atipia nuclear está significativamente correlacionada con la aneuploidía y que el grado de necrosis está correlacionado con el grado nuclear, pero no con la ploidía.

En lo que respecta a las lesiones invasoras de la mama, OLSZEWSKI y cols.. (1981) encontraron que el 92 por ciento de 92 carcinomas de mama mostró aneuploidía, oscilando entre 2'1c y 5'4 c con un valor medio igual a 3'30 c \pm 0'93 c. Se observó una distribución bimodal con un pico cerca del diploide y un segundo pico ampliamente distribuido entre el pico cuasidiploide y el pico triploide-tetraploide. Similarmente, el 89 por ciento de 76 carcinomas analizados por MORAN y cols.. (1984) fueron aneuploides (61 de los 69 tumores primarios y 7 de las 7 metastasis) y se encontraron dos picos aneuploides en el 10'5 por ciento de las lesiones (7 tumores primarios y una metástasis).

Sin embargo, SPYRATOS y cols.. (1987) observaron que el 33 %

(35/106) de los carcinomas infiltrantes eran diploides, el 13 % (14/106) tetraploides y el 54 % (57/106) aneuploides. En éstos casos, la distribución del ADN fué bimodal; es decir, que había un estrecho pico en la región diploide y un pico más grande en la región aneuploide. Así mismo, ABANDOWITZ (1987) encontró aneuploidía en el 68 % de 163 carcinomas mamarios, KALLIONIEMI y cols. (1988) en el 63.6 % de 308, FEICHTER y cols.. (1988) en el 62'4 % de 300, HATSCHEK (1989) en el 63'3 % de 272 , CHRISTOV y cols.. (1989) en el 69 % de 180 y RIJKEN (1991) en el 7% de 102.

BOSARI y cols. (1992) en 158 pacientes con ganglios negativos, encontraron que el 48% (70) fueron aneuploides y el 19% (28) tetraploides. LI (1992) en el 61'7% DE 47 tumores, DRESLER y cols.(1992) en el 64% DE 565 casos, TETU y cols. (1993) en el 58'7% de 751 casos y MARCOTE VALDIVIESO y cols. (1993) en el 65'9% de 220 pacientes.

COULSON (1984), tras analizar 74 carcinomas de mama, encontró que el 21% de los tumores fueron diploides e indistinguibles de la población diploide procedente del tejido mamario normal, el 8% fueron hipodiploides, el 11% hipertetraploides, el 8% multiploides y el 52% restante fué hiperdiploide.

CHASSEVENT y cols.. (1984) estudiaron 66 carcinomas de mama utilizando los tres métodos de disociación anteriormente comentados y encontraron que el 67 % de ellos fueron aneuploides, sin existir diferencias estadísticamente significativas dependientes del tipo de disociación empleado. Sin embargo, en las muestras disociadas enzimáticamente se observó un menor porcentaje de células aneuploides con concomitante disminución de la fracción de células en fase G2-M (13'2 % en la disociación enzimática frente a 17'6 % con Fi-coll). No obstante, la disociación enzimática proporcionó poblaciones celulares con mayor viabilidad que los otros métodos.

Sin embargo, LEWIS (1990) ha descrito una menor incidencia (41 %) de aneuploidía al analizar 155 carcinomas mamarios, lo cual es similar a la encontrada por HAFFTY y cols. (1992), 37% de aneuploidía en un estudio de 38 pacientes en tumores recurrentes.

No obstante, resulta muy ilustrativa la experiencia desarrollada por FUHR y cols.. (1991). Estos autores analizãñ el contenido en ADN (por citometría de flujo) procedente de distintos pñntos de 141 lesiones carcinomatosas y observaron que en el 52 % de los casos existía, al menos, una población

aneuploide. En cambio, en el 18 % de los tumores con poblaciones aneuploides no se detectó aneuploidía en una o más muestras identificadas como carcinomatosas. Por todo ello, estos autores aconsejan que las tomas para citometría de flujo deben realizarse simultáneamente en diferentes puntos del tumor.

En general, puede decirse que aproximadamente un sesenta por ciento de los tumores malignos de mama muestran una o varias poblaciones con un índice de ADN anormal.

2. Correlación entre cantidad de ADN y tipo de lesión. En las lesiones benignas no existe correlación alguna entre la cantidad de ADN y las características histológicas de la lesión ya que todas las lesiones benignas son sistemáticamente diploides cuando se emplea la citofotometría de flujo (MORAN 1984, CHRISTOV 1989) .

Sin embargo, en las lesiones malignas se detecta cierta correlación entre ploidía y tipo histológico.

Así, AASMUNDSTAD y HAUGEN (1990) comprobaron que el 73% (33 de 45) de los carcinomas ductales no infiltrantes de tipo no comedo fueron diploides, mientras que el 55 % (16 de 29) de los carcinomas ductales no infiltrantes de tipo comedón fueron aneuploides. Estos autores sugieren que el estudio concomitante de la ploidía y el tipo histopatológico puede resultar un apropiado predictor del curso clínico.

Por otra parte, dentro de las neoplasias invasoras, OLSZEWSKI y cols. (1981) apreciaron que la ploidía más alta se da en los carcinomas medulares (media de $3'96 \pm 0'68$ C). Sin embargo, los carcinomas ductales bien diferenciados, los coloides y tubulares mostraron una ploidía menor (media de $2'5 \pm 0'52$ C).

Así mismo, MORAN y cols.. (1984) detectaron una correlación similar. El índice de ADN más bajo se observó en los carcinomas lobulillar (media de 1'05 en 4 lesiones) y tubular (media de 1'07 en 3 lesiones). Por el contrario, dicho índice adquirió valores más altos en el carcinoma ductal (media de 1'60 en 58 lesiones) en el carcinoma medular (media de 1'65 en 4 lesiones) y en los implantes metastáticos (media de 1'94 en 7 lesiones).

FEICHTER y cols.. (1988) estudiaron 300 carcinomas mamarios (257

ductales invasores, 24 lobulillares infiltrantes, 7 tubulares, 9 medulares, 1 papilar, 1 carcinoma adenoide quístico y 1 carcinoma mucinoso) y observaron que la mayor proporción de lesiones diploides (17 de 24 carcinomas; 70'8 %) apareció en el grupo de los carcinomas lobulillares invasores. Por otra parte, el 66'2 % (170 de 257 carcinomas) correspondió a los ductales invasores y el mayor porcentaje de aneuploidía se encontró en el grupo de los carcinomas medulares (7 de los 9 casos estudiados fueron aneuploides).

Por otra parte, HATSCHEK y cols.. (1989) vieron que más del sesenta por ciento de los carcinomas ductales y medulares eran aneuploides, mientras que los tipos lobulillar, mucinoso y tubular fueron predominantemente diploides o cuasidiploides.

Los anteriores resultados están en contradicción con los obtenidos por CHRISTOV y cols.. (1989), ya que estos autores encuentran que no son significativas las diferencias en el índice de ADN entre carcinomas ductales, lobulillares y tubulares (en 109 carcinomas ductales la media fue de 1'54, en 4 lobulillares de 1'52, en 3 tubulares de 1'51 y en un medular de 1'74).

3. Correlación entre cantidad de ADN y grado de diferenciación.

La aneuploidía aparece más frecuentemente en tumores pobremente diferenciados histológicamente (JAKOBSEN, 1984; KALLIONIEMI, 1987; HEDLEY, 1987; OWAINATI, 1987; McDIVITT, 1986; THORUD, 1986; BICHEL, 1982; OLSZEWSKI, 1984; MASTERS, 1987; FEICHTER y cols., 1988; GNANT, 1992).

A este respecto CHRISTOV y cols.. (1989) agruparon los carcinomas en tres grados de diferenciación considerando ocho parámetros histológicos: heterogeneidad estructural, penetración en los tejidos vecinos, invasión vascular, presencia de áreas necróticas o calcificaciones, pleomorfismo nuclear, patrón cromatínico, relación núcleo/citoplasmática y actividad mitótica. Observaron que 22 de 30 carcinomas de grado I (73'3 %) , 24 de 62 carcinomas de grado II (38'7 %) y 22 de 88 carcinomas de grado III (25'0 %) fueron euploides y que 8 de 30 carcinomas de grado I (26'7 %), 38 de 62 carcinomas de grado II (61'3 %) y 66 de 88 carcinomas de grado III (75 %) fueron aneuploides. Por consiguiente, los carcinomas bien diferenciados (grado I) fueron predominantemente diploides y, por el contrario, los carcinomas

pobrementemente diferenciados (grado III) fueron predominantemente aneuploides.

Por otra parte, MORAN y cols.. (1984) publicaron que en el carcinoma ductal existe una buena correlación entre el grado de diferenciación y la ploidía. En los carcinomas ductales bien diferenciados la media del índice de ADN fué de 1'25 (en 6 lesiones), en los de intermedio grado de diferenciación fué de 1'51 (20 lesiones) y en los pobrementemente diferenciados de 1'71 (32 lesiones).

CHASSEVENT y cols.. (1984) observaron que la frecuencia con que aparece aneuploidía aumentaba significativamente con el grado histológico (grado I : 62 %, grado II : 68'8 % y grado III : 100 %), de tal manera que todos los tumores de grado III son aneuploides. Resultados similares encontraron FRIERSON (1993), de forma que en una serie de 118 carcinomas ductales infiltrantes, el 40% de grado I, 71% de grado II y 83% de grado III, fueron aneuploides.

Asi mismo, FEICHTER y cols.. (1988) vieron una buena correlación entre la ploidía y el grado de diferenciación (según los criterios de BLOOM y RICHARDSON, 1957), ya que el 85'9 % de los carcinomas de grado I, el 34'9 % de los carcinomas de grado II y el 13'4 % de los de grado III fueron diploides. TETU y cols. (1993), en un estudio de 751 carcinomas de mama con ganglios positivos, han señalado que la aneuploidía estuvo correlacionada con mayor edad de las pacientes, pobre grado nuclear, ausencia de receptores progesterónicos y expresión de la oncoproteína Her-2/neu . Mientras que una alta fracción S estuvo asociada con edad joven de la paciente, gran tamaño tumoral y pobre grado nuclear. Enfatizan la importancia de la aneuploidía y alta fracción S como indicadores de peor pronóstico en pacientes con carcinoma de mama y ganglios linfáticos positivos.

4. Correlación entre la cantidad de ADN y agresividad biológica.

Los estudios realizados con citometría estática, ya revisados anteriormente, han sugerido que todas aquellas cantidades de ADN que se apartan del valor diploide, van asociadas a un peor pronóstico de las pacientes (ATKIN, 1979; AUER, 1984), mientras que aquellos tumores con contenido en ADN diploide, tienen un pronóstico más favorable, semejando, en cierta medida, el comportamiento de los tumores benignos diploides y de las lesiones benignas de la mama.

De este modo, utilizando técnicas de citometría de flujo, también se ha sugerido que el intervalo libre de enfermedad en las pacientes con tumores de mama con contenido en ADN aneuploide es menor que en pacientes portadoras de tumores con contenido en ADN diploide (McGUINE, 1985; EWERS, 1989; COULSON, 1984; HEDLEY, 1984); sin embargo, no existe una clara información sobre si hay una diferencia significativa en lo referente a largos períodos de supervivencia.

KALLIONIEMI y cols. (1987), LI (1992), observaron que las pacientes con tumores diploides ofrecían un intervalo libre de enfermedad más amplio y mayor supervivencia que las pacientes con tumores aneuploides. Además, para optimizar el valor predictivo de la citometría de flujo del ADN, definieron 3 tipos de histogramas combinando dos parámetros poderosos: La ploidía y la fase S. El contenido diploide y fase S baja (histograma tipo I) define un subgrupo de pacientes con cerca del 90% de supervivencia acumulada a los 8 años. El contenido diploide y una fase S alta o contenido aneuploide con baja fase S (histogramas tipo II) y está asociado a un riesgo de muerte intermedio, y por último, el contenido aneuploide asociado a una fase S alta (mayor del 12%) (histogramas tipo III) con una supervivencia del 50% a los 8 años. MARCOTE VALDIVIESO y cols., (1993), encontraron una distribución de la supervivencia similar, sobre todo en el primer grupo.

Estos mismos autores (KALLIONIEMI y cols.. 1988) vieron que los tumores aneuploides presentaban un riesgo de muerte tres veces superior cuando se comparaban con los tumores diploides y que el mayor riesgo de muerte estaba asociado con índices de ADN hipertetraploides ($ID > 2.20$); mientras que índices de ADN tetraploides ($ID = 1.80-2.20$) están asociados con un relativo bajo riesgo.

VAN DAM y cols.. (1989) realizaron un estudio en 30 pacientes con cancer de mama para detectar la presencia de poblaciones celulares aneuploides en tejido mamario "sano" localizado a distancia del tumor. En las trece pacientes que presentaron un tumor primario diploide no se encontraron células aneuploides en ninguna de las 39 muestras tomadas a distancia del tumor. Sin embargo, en 4 de las 17 pacientes (23 %) que mostraron un tumor primario aneuploide se observaron células aneuploides en tejido distante. Además, en todos estos casos el índice de ADN de las células aneuploides distantes fué idéntico al del tumor primario. En base a éstos datos y al control histológico paralelo, los autores concluyen que las muestras procedentes de tejido

mamario "sano" distante con aneuploidía nuclear corresponden probablemente a poblaciones metastáticas.

DODD y cols. (1993) estudiaron la heterogeneidad intratumoral con respecto a la cantidad de ADN en 20 carcinomas de mama y encontraron que 8 casos fueron homogéneamente diploides, pero de los 12 restantes que fueron aneuploides, 4 de ellos mostraron ADN aneuploidía en la región central y diploidía en la región periférica.

5. Correlación entre cantidad de ADN y otros indicadores pronósticos.

ABANDOWITZ, 1987 encuentra una débil relación entre la ploidía y el estado de receptores estrogénicos y estado menopausico de la paciente. DOWLE (1987) correlacionó significativamente la ploidía tumoral con el tamaño del tumor, grado histológico y estado menopausico, mientras que no encontró ninguna relación con el estado de los receptores estrogénicos y afectación de los ganglios linfáticos, de acuerdo con HEDLEY (1984) y BOSARI y cols. (1992).

PALMER y cols. (1992) en una serie de 419 pacientes, mediante un análisis univariable de Wilcoxon-Gehan, encontraron que la ploidía, la fracción S, tamaño tumoral, afectación de ganglios linfáticos, estado de los receptores estrogénicos, edad y tipo histológico, fueron estadísticamente significativos predictores de supervivencia. Al contrario que REDKAR y cols. (1992). Así mismo ARNELOV y cols. (1992) piensan que la fase S, estadiaje del tumor y ganglios linfáticos son importantes factores pronósticos para el paciente, pero no lo es la ploidía del tumor ni el volumen tumoral por mamografía.

SPYRATOS y cols.. (1987) observan que los tumores de mayor tamaño son predominantemente aneuploides, aunque ésta correlación no fué estadísticamente significativa. Análogamente, no pudo correlacionarse la ploidía con la presencia de metástasis ganglionares axilares, la edad de la paciente o el status menopausico, lo mismo que CHASSEVENT y cols.. (1984) que no encontraron una correlación estadísticamente significativa entre la ploidía, el tamaño del tumor, las metástasis ganglionares y status menopausico. POWELL y cols. (1992) en un estudio de 100 casos, encontraron que únicamente cuando el tamaño tumoral es de 4 cm. de diámetro, el tumor es aneuploide y la fase S alta mayor de 10%, el paciente presenta una pobre supervivencia.

Por otra parte, FEICHTER y cols.. (1988) observaron una correlación entre

contenido tisular de receptores estrogénicos y ploidía, ya que fueron aneuploides el 78'5 % de los carcinomas con receptores estrogénicos negativos (0 - 10 fmol/U) frente al 55'0 % de aneuploides entre los carcinomas con receptores estrogénicos positivos (> 20 fmol/U). Análogamente, fueron aneuploides el 75'9 % de los carcinomas con receptores progesterónicos negativos (0 - 10 fmol/U) frente al 54'6 % de aneuploides entre los carcinomas con receptores progesterónicos positivos (> 20 fmol/U).

6. Fracción de células en fase S.

OLSZEWSKI y cols.. (1981) estudiaron diez lesiones benignas, viendo que, aproximadamente el 96 % de las células procedentes de las mismas, se encuentran en fase Go/G1 y sólo el 4 % se encontraba en fase S y G2-M. Así mismo, CHRISTOV et al. (1989) hallaron que en 10 enfermedades fibroquísticas el valor medio de la fracción de células en fase S fué del 3'64 % y en 8 fibroadenomas del 3'88 %.

Por otra parte, MORAN y cols.. (1984) obtuvieron valores mayores que los anteriores entre las lesiones benignas, el valor medio más alto de la fracción de células en fase S se encontró en la papilomatosis (11'3 %) y el más bajo en la enfermedad fibroquística (6'7 %). Sin embargo, no se encontró una diferencia estadística significativa en el valor medio de todas las lesiones benignas (media de 10'1 %). Ahora bien, en las 21 lesiones benignas estudiadas por estos autores la fracción de células en fase S osciló entre 0'7 % y 27'9 %.

OLSZEWSKI y cols.. (1981) analizaron 90 carcinomas mamarios y obtienen un valor medio del 83 % de células en fase Go/G1 y del 17 % de células en fase S y G2-M. Según estos autores la fracción de células en fase S es cuatro veces mayor en los carcinomas que en las lesiones benignas. Estos mismos autores observan que los carcinomas papilares, tubulares, coloides y ductales bien diferenciados presentaban los mayores porcentajes de células en fase Go/G1. Sin embargo, el carcinoma medular de mama ofreció el mayor porcentaje (30 %) de células en fase S y G2/M.

Por otra parte, MORAN y cols.. (1984) encontraron cómo en 76 lesiones malignas la fracción de células en fase S osciló entre 0'7 y 37'4 %. Ahora bien, entre dichas lesiones malignas, el valor medio más alto se halló en el carcinoma medular (20'2 %) y el más bajo en el carcinoma tubular (5'8 %), siendo la media para el carcinoma ductal de 15'7 %. FEICHTER y cols.. (1988) también

comprobaron que el valor medio más alto de la fracción de células en fase S aparece en los carcinomas medulares (7'84 %), siendo menor dicho valor en los carcinomas ductales invasores (4'76 %), lobulillares invasores (4'46 %) y tubulares (4'27 %).

En lo concerniente al grado de diferenciación, MORAN y cols.. (1984) indicaron que, en los carcinomas ductales, el porcentaje de células en fase S aumentaba conforme aumenta el grado de anaplasia. En los carcinomas bien diferenciados la media de la fracción de células en fase S es de 9'2 %, en los carcinomas de intermedio grado de diferenciación de 11'2 % y en los carcinomas pobremente diferenciados de 19'4 %.

REDKAR y cols. (1992) en un estudio de 171 pacientes, observaron que el 89% de los tumores diploides mostraban una fracción proliferativa menor del 10% y el 73% de los aneuploides mostraron una fase S mayor del 20%.

A su vez, FEICHTER y cols.. (1988) apreciaron que la media de la fracción de células en fase S fué de $6'15 \pm 3'78$ % en los carcinomas aneuploides y de $2'66 \pm 2'04$ % en los diploides. Además, constataron cierta correlación entre el grado de diferenciación y la fracción de células en fase S, ya que en 57 carcinomas de grado 1 el valor medio de la fracción de células en fase S fué de 2'26 %, en 146 carcinomas de grado 2 el valor medio de dicha fracción fué de 4'22 % y en 97 carcinomas de grado 3 de 7'22 %. También CHRISTOV y cols.. (1989) encontraron una diferencia significativa, en lo que respecta a la fracción de células en fase S, entre las lesiones carcinomatosas diploides y aneuploides. Efectivamente, en 32 carcinomas diploides la media de la fracción de células en fase S fué de 6'31 % y en 41 carcinomas aneuploides dicha media fué del 20'94 %. Dicha diferencia sigue observándose en las lesiones metastáticas. Así, en 17 implantes metastáticos diploides la media de la fracción de células en fase S fué de 10'92% y en 12 implantes aneuploides de 23'14 %. No obstante, KUTE y cols.. (1990) estudian 197 carcinomas de mama y hallaron que, en los 102 casos que fueron aneuploides

7. Correlación entre la fracción de células en fase S y otros parámetros clinicopatológicos.

OLSZEWSKI y cols.. (1981) no pudieron establecer una una relación significativa entre la distribución de células en el ciclo celular y tamaño tumoral. Así mismo, FEICHTER y cols. (1988) tampoco apreciarón una correlación entre

el tamaño tumoral y la fracción de células en fase S. Sin embargo, OLSZEWSKI y cols.. (1981) observaron relación entre el status proliferativo de la neoplasia y el período premenopausico o postmenopausico de las pacientes. Los tumores procedentes de mujeres premenopausicas tendrían un mayor porcentaje de células en fase S y G2/M que los tumores procedentes de mujeres postmenopausicas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. A este respecto ABANDOWITZ (1987) y SIGURDSSON (1990), observaron una proporción discretamente mayor de células en fase S en mujeres premenopausicas. Análogamente, FEICHTER y cols.. (1988) apreciaron una discreta diferencia en la fracción de células en fase S entre mujeres premenopausicas y postmenopausicas (5'21 % versus 4'69 % respectivamente).

Por otro lado, KALLIONIEMI (1987), HEDLEY, MORAN, McDIVITT, COULSON (1984), han visto como los tumores con alto porcentaje de células en Fase S es más probable que correspondan a tumores pobremente diferenciados. Además Hedley, 1987, sostienen que un gran porcentaje de células en Fase S cuando está asociado a aneuploidía es altamente significativo para un mal pronóstico en pacientes con carcinoma de mama y ganglios axilares positivos, siendo bajo éste porcentaje de células en los tumores diploides e hipertetraploides. CLARK y cols., 1992 en un trabajo en el que se estudiaron 298 carcinomas de mama, encontraron que la fracción de células en fase S proporciona información pronóstica adicional para predecir el período libre de enfermedad en pacientes con ganglios axilares negativos, tumores menores de 3 cm. y receptores estrogénicos positivos.

Así mismo, CHRISTOV y cols.. (1989) encontraron una correlación entre el grado de diferenciación, ploidia y fracción de células en fase S. En 8 carcinomas diploides de grado I el valor medio de la fracción de células en fase S fué del 2'4 % y en 4 carcinomas aneuploides de grado I dicha media fué de 10'7 %. En 13 carcinomas diploides de grado II la media de la fracción de células en fase S fué de 5'4 % y en 14 carcinomas aneuploides de grado II dicho valor fué de 16'7 %. Finalmente, en 12 carcinomas diploides de grado III la media fué de 10'5 % y en 22 carcinomas aneuploides de grado III de 25'0 %. Como se ve, para un mismo grado de diferenciación, el valor medio de la fracción de células en fase S fué mayor en los tumores aneuploides. Por otra parte, los tumores diploides y aneuploides menos diferenciados tienen valores medios de la fracción de células en fase S mayores que los más diferenciados.

Resultados similares encontraron GNANT y cols. (1992).

También OLSZEWSKI y cols.. (1981) encontraron que la presencia de metástasis axilares es más frecuente en las lesiones que tienen mayores fracciones de células en fase S y G2/M. A éste respecto (KALLIONIEMI y cols., 1987) estudiaron una serie de pacientes con cancer primario de mama en las que analizaron el impacto pronóstico del contenido en ADN y la fracción de células en fase S. Vieron que el contenido en ADN aneuploide junto a una fracción alta de células en fase S (14.12 ± 5.80 %) estuvo claramente asociada con una pobre diferenciación tumoral, mayor estadiaje histológico, mayor tamaño tumoral, metástasis axilares y ausencia de receptores esteroideos, por lo que postularon que el análisis del ADN sería un método prometedor para la estimación del pronóstico de pacientes con cancer de mama. Estos mismos resultados fueron corroborados en un trabajo posterior por éstos mismos autores (KALLIONIEMI, 1988) y también por DRESSLER (1988) y FISHER (1991). Sin embargo FEICHTER y cols.. (1988) no encontraron una diferencia estadísticamente significativa, en lo que respecta a la fracción de células en fase S, entre los carcinomas sin metástasis axilares y con metástasis axilares (4'59 % versus 4'96 % respectivamente).

KALLIONIEMI y cols.. (1988) han podido establecer que el porcentaje de células en fase S, fué de valor pronóstico adicional en ambos tipos de tumores (diploides y aneuploides). Por combinación del índice de ADN y la fase-S, éstos autores describieron 3 tipos de histogramas de ADN, que fueron asociados con un pronóstico favorable, intermedio o desfavorable de las pacientes. Los tumores diploides junto con una baja fase S (< 7%) (histogramas de ADN tipo I), fué asociado con un pronóstico muy favorable, mientras que los tumores aneuploides con un alto índice de ADN (> 2.20) y alta fase S (> 12%) (histogramas de ADN tipo III) fueron relacionados con mal pronóstico, con un riesgo de muerte 8 veces mayor aproximadamente que las pacientes con histogramas tipo I, considerando a éstos histogramas de ADN como un poderoso indicador pronóstico independiente en el cancer de mama.

HAFPTY y cols. (1992) en un grupo de 50 pacientes que mostraron recurrencia tumoral, encontraron que la ploidía y la fracción de células en fase S fueron indicadores pronósticos estadísticamente significativos para la supervivencia a los 5 años e intervalo libre de enfermedad. Los pacientes que sobrevivieron a los 5 años y presentaban tumores con ADN diploide, fueron el 64% comparados con el 15% en la población aneuploide. Del mismo modo,

pacientes con baja fracción S (< 12%) experimentaron un 83% de supervivencia a los 5 años comparados con el 24% en pacientes con alta fracción S (> 12%). Cuando combinaron la ploidía y la fase S, definieron 2 categorías de favorable (tumor diploide y baja fracción S) y desfavorable (aneuploide y alta fracción S). Los pacientes que estaban en el grupo de favorables, experimentaron un 89% de supervivencia a los 5 años y un 100% de período libre de enfermedad, mientras que las pacientes en la categoría de desfavorables, mostraron un 24% de supervivencia a los 5 años y un 32% de período libre de enfermedad.

8. Correlación entre todos estos parámetros en los tumores primarios y sus metástasis.

FOSSA, 1984; JAKOBSEN, 1984; KALLIONIEMI, 1987; DRESSLER, 1988; HEDLEY, 1987 y CORNELISSE, 1987, piensan que la aneuploidía en los carcinomas de mama es más frecuente en tumores que cursan con diseminación axilar; mientras que otro grupo (EWERS, 1984; UYTERLINDE, 1987) no ven una relación significativa.

Como ya hemos señalado en los estudios de citometría estática, también la citometría de flujo confirma que la aneuploidía en el carcinoma de mama es más frecuente entre los carcinomas con diseminación axilar (FOSSA, 1984; JAKOBSEN, 1984; KALLIONIEMI, 1987; DRESSLER, 1988; HEDLEY, 1987 y CORNELISSE, 1987). Sin embargo los resultados no son unánimes afirmativos, habiendo también alguna observación en que ésta relación no fué significativa (EWERS, 1984; UYTERLINDE, 1987).

SYMANS y cols. (1992) han estudiado una serie de 11 carcinomas ductales invasores de mama con metástasis axilares, los cuales presentan en cuanto a cantidad de ADN, una distribución bimodal y encuentran que el clon diploide o tetraploide visto en el tumor primario es el que tiene mayor capacidad para metastatizar y no el clon aneuploide.

**MATERIAL
Y
METODOS**

MATERIAL

El presente estudio se ha realizado sobre secciones de parafina de muestras tisulares procedentes de material biopsico. Hemos utilizado 165 casos de lesiones mamarias repartidas entre lesiones benignas, carcinomas in situ y carcinomas infiltrantes. En concreto, estas lesiones corresponden a:

- 102 casos de Mastopatía fibroquística

30	Hiperplasia Lobulillar	Reclus II.
15	Hiperplasia Lobulillar	Reclus III
15	Hiperplasia Ductal	Reclus II
10	Hiperplasia Ductal	Reclus III
10	Adenosis	
10	Metaplasia Apocrina	
12	Esclerosis Radial	

- 29 Casos de Carcinoma In Situ:

13	Carcinoma Intraductal
8	Carcinoma Papilar Intraductal
8	Carcinoma Lobulillar In situ

- 34 Casos de Carcinoma Infiltrante:

21	Carcinoma ductal
5	Carcinoma tubular
1	Carcinoma apocrino
1	Carcinoma coloide
1	Carcinoma papilar
2	Carcinoma medular
2	Carcinoma lobulillar

Todos los casos fueron obtenidos de muestras biopsicas o de mastectomías procedentes del Instituto Valenciano de Oncología y del Hospital Clínico Universitario . Ninguna de las pacientes había recibido tratamiento previo alguno. Todos los casos fueron seleccionados, tras el diagnóstico, para estudio morfométrico, citofotométrico y de citometría de flujo. Los criterios seguidos para el diagnóstico histológico fueron los citados en la revisión bibliográfica.

METODOS

Todo el material utilizado en el presente estudio, fué fijado por inmersión de los fragmentos tisulares en formol tamponado al 10%, procesado de la forma habitual, realizándose su inclusión en parafina. Se realizaron secciones de 6 μ que fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina. Sobre éste material se realizaba el diagnóstico y a partir de aquí se seleccionaban los casos a estudiar

En cada uno de los 165 casos, se siguió el mismo procedimiento:

- 1 corte de 6 μ teñido con Hematoxilina-Eosina.
- 2 cortes de 6 μ teñidos con Feulgen
- 3 cortes de 50 μ que fueron almacenados para posteriormente ser procesados para citometría de flujo.
- 1 corte de 6 μ teñido con Hematoxilina-Eosina, que sirvió de control.

ESTUDIO POR MEDIO DE MORFOMETRIA

A partir de cortes de tejido incluidos en parafina y teñidos con Hematoxilina-Eosina, seleccionamos las áreas más representativas de las lesiones mamarias a medir. Una vez seleccionada la lesión, procedimos a coger la misma sección, pero esta vez teñida con Feulgen (con la finalidad de utilizar la misma zona para medir la morfometría y la citofotometría) y procedimos a su fotografiado. Las fotografías se realizaron en blanco y negro con un fotomicroscopio Zeiss Axiophot con un objetivo de 63X. Para positivar los negativos se utilizó una ampliadora Leitz-Wetzlar modelo Focomat-II C, realizándose las fotografías a 2.000 aumentos.

Sistema utilizado

Para el estudio morfométrico, se utilizó un sistema de análisis de imagen, ZEISS-Kontron, modelo MOP VIDEOPLAN 2000, que incluye como conjunto básico:

- Unidad central de procesado de 64 KB de RAM, 16 KB de video.
- Interfases de comunicación 2X serial, 2X paralela

- Unidades de memoria: diskettes 540 KB y disco duro 10 MB (tipo Winchester).
- Teclado
- Monitor de televisión, 9", 0'5 mm de resolución.
- Tablero digital, 280x280 mm, 0'1 mm de resolución.
- Printer-Plotter, Alfamérica-Gráfica
- Software Universal, que incluye programas operativos con una serie de parámetros analíticos (morfométricos, morfológicos, de libre programabilidad, etc.).
- Cursor, con el que se delimitan las estructuras (núcleos) sobre los positivos fotográficos fijados al tablero digital.

Este sistema está diseñado para la adquisición de datos y conocimiento de características geométricas a partir de imágenes de estructuras que son perfiladas en una tabla digital.

Los datos se obtienen a partir de los perfiles de los núcleos trazados con el cursor; datos que son rápida y continuamente calculados hacia parámetros geométricos seleccionados por medio del ordenador.

Los programas de medida, permiten obtener numerosos parámetros geométricos. Todos los valores individuales son almacenados en la memoria del programa. El sumatorio, la media, la desviación standard y el porcentaje de los valores se calculan instantáneamente y este hecho permite una gran flexibilidad en posteriores evaluaciones. Todos los valores calculados, incluyendo los histogramas de distribución, pueden ser visionados en la pantalla y posteriormente impresos en papel, por medio de la impresora ya mencionada.

En nuestro trabajo, en concreto, se han evaluado, sobre los núcleos de cada una de las lesiones, los siguientes parámetros: área, perímetro, diámetro máximo, y dos factores de forma (del área y del perímetro). De cada caso se midieron 200 núcleos, los cuales fueron seleccionados de las áreas más representativas y solo se midieron aquellos núcleos cuyos perfiles estaban bien definidos.

ESTUDIO POR MEDIO DE CITOFOTOMETRÍA

La citofotometría permite calcular la cantidad o la concentración de una sustancia determinada en el interior de una célula sin modificar su estructura.

Su fundamento estriba en la apreciación de la pérdida de intensidad que experimenta un haz luminoso al atravesar la célula, o viceversa, en la estimación de la intensidad transmitida a través de la célula a partir de un haz de luz monocromática de intensidad conocida.

La proporción de luz que las células permitan pasar a través de ellas, será el cociente o relación entre la intensidad lumínica I_i y la parte de luz que se recoja al otro lado de la célula I_f .

A esta relación se le denomina transmitancia de la célula al haz monocromático y se expresa abreviadamente por la letra T, pues

$$T = I_f / I_i$$

Se realizan dos medidas de la intensidad del haz. La primera en un lugar del medio donde no hay células, que se denominará "punto de referencia" o simplemente "blanco", a la que se le asigna el valor T_i . La segunda medida se realiza a través de la célula, sin variar las condiciones en que se midió el blanco, y es el valor I_f .

A partir de la transmitancia, puede calcularse la concentración en una célula de un cromóforo que absorba selectivamente la luz monocromática del haz incidente.

Para este cálculo conviene introducir un nuevo concepto, el de absorbancia o extinción, que corresponde al logaritmo de la transmitancia cambiado de signo, es decir:

$$E = -\log. T \text{ (E = extinción).}$$

El valor E representa la densidad óptica de las células y por medio de ella, aplicando la ley de Beer, obtendremos la concentración del cromóforo.

$$C = E / K \cdot h$$

Siendo C la concentración, E la extinción, h la altura de la célula en centímetros y K el coeficiente molecular de absorción de la sustancia.

La ley de Beer solamente se cumple en los casos en que el cromóforo esté uniformemente distribuido. Como éste no es el caso de la mayoría de las tinciones citológicas e histológicas, ha de utilizarse algún método de corrección para evitar este error que se denomina "error de distribución".

Nosotros hemos utilizado el método de integración o de barrido, en el cual se mide la extensión de minúsculos subcampos del área medida, en los cuales puede considerarse homogénea la distribución del cromóforo, procediendo posteriormente a la integración de dichos valores.

1. Método de Feulgen

El método de tinción empleado para la demostración del ADN es una modificación del método de Feulgen-Rossenbeck. El fundamento de éste método implica una hidrólisis suave, que libera grupos aldehído en los azúcares desoxiribosa del ADN y su posterior detección mediante el reactivo de Schiff.

Método de Feulgen (Modificado):

- 1.- Desparafinar con xiloles y alcoholes.
- 2.- Hidrólisis en HCl: Sumergir en HCl 3.5 N a 37°C durante 40 minutos.
- 3.- Lavar con HCl 1N a temperatura ambiente durante un minuto.
- 4.- Lavar con agua destilada.
- 5.- Incubar con reactivo de Schiff durante 60 minutos en oscuridad.
- 6.- Lavar con agua hasta que la preparación deje de soltar colorante.
- 7.- Deshidratar en alcoholes y montar en Entellan.

2. Microespectrofotómetro

Se utilizó un microespectrofotómetro de barrido (scanning) modelo 01 de Carl-Zeiss con objetivos panacromáticos y condensador panacromático de apertura variable entre 0'1 y 0'9. La platina se mueve a pasos de 0'5 μ . La longitud de onda deseada se seleccionó con un monocromador de filtro.

3. Ordenador

Un microordenador PDP-11 modelo DEC-LAB/03 con convertidor de canales analógico-digital está conectado por medio de un sencillo interface a la salida del amplificador del fotomultiplicador y a la unidad de control de la platina de Scanning. Este sistema permite el muestreo de las señales del fotomultiplicador y el movimiento de la platina bajo programa.

4. Programas

POSAL: Es el programa de medición propiamente dicho y trabaja registrando directamente las coordenadas.

Se introduce un valor umbral de absorbancia que nos permitirá posteriormente eliminar aquellos valores de absorbancia menores a los del objeto coloreado que interesa cuantificar, con la finalidad de suprimir el "ruido" de fondo. Antes de medir la primera célula y utilizando el objetivo de 100 aumentos, se localiza un área no ocupada por la célula, donde se registrará el valor del blanco, sobre la media de un total de 100 mediciones.

Después de esto, se localizan sucesivamente los objetos que deseamos medir, delimitándose la célula o porción del área celular por medio de puntos utilizando los pulsadores del interface.

Tras finalizar el registro de puntos, el ordenador "traza" un polígono juntando dichos puntos y procede a realizar el "barrido" de ésta área poligonal a saltos de $0'5 \mu$ realizando diez medidas en cada punto y registrando la media.

Finalizado el barrido, el ordenador integra los valores obtenidos en cada punto y obtiene un valor de extinción total del área medida que guarda en el archivo abierto en el disquette magnético.

Así mismo, también archiva el número de campos medidos dentro del área y que corresponde al área aproximada del polígono en unidades de $0'25 \mu^2$.

Simultáneamente escribe estos valores por la impresora junto con el valor de la cantidad relativa al área y el número de la célula cuantificada.

RESULT. Es el programa de escritura de resultados.

Comienza leyendo los valores del archivo existente en el disquette magnético y, tras imprimir un encabezamiento para anotar las características del

caso, lista, junto con el número de la célula medida, los valores del contenido total, área y contenido relativo de cada célula. Al final de la lista, imprime el valor medio sobre el total de células medidas de cada una de éstas variables.

A continuación permite introducir el valor de la anchura intervalo de clase deseada para cada variable e imprime su distribución de frecuencias relativa y acumulada y, a continuación, el histograma de éstos valores.

5. Medición Citofotométrica.

Para cada caso estudiado, se ha realizado la cuantificación del ADN sobre un total de 100 células, escogidas de aquellas zonas mejor conservadas, utilizando los programas descritos anteriormente. Además en cada caso, se han medido 25 linfocitos que han servido de patrón de referencia interno. La longitud de onda empleada fué de 560 nm.

El estudio se ha realizado, como ya se ha señalado, sobre cortes de tejido incluido en parafina y teñidos con la técnica de Feulgen para evidenciar el ADN. Al igual que BOOKING (1987) hemos aplicado a los linfocitos un factor de corrección de 1.18, para evitar que todas las gráficas estuvieran desplazadas a la derecha.

La valoración de cada uno de los casos, se realizó en base a los siguientes criterios:

- DIPLOIDE: Cuando la cantidad de ADN estaba comprendida entre 0'90 y 1'10.
- HIPERDIPLOIDE: Cantidad de ADN comprendida entre 1'11 y 1'39
- TRIPLOIDE: Cantidad de ADN comprendida entre 1'40 y 1'60
- HIPERTRIPLOIDE: Cantidad de ADN comprendida entre 1'61 y 1'89
- TETRAPLOIDE: Cantidad de ADN comprendida entre 1'90 y 2'10
- HIPERTETRAPLOIDE: Cantidad de ADN mayor de 2'10

Intentando clarificar los resultados y para mejor expresar los datos en porcentajes, en algunas ocasiones, hemos utilizado el término ANEUPLOIDE, en aquellos casos que no eran ni Diploides ni Tetraploides.

ESTUDIO POR MEDIO DE CITOMETRIA DE FLUJO

Como ya hemos señalado, la citometría de flujo mide las características físicas o químicas de las células o de otras partículas biológicas, al pasar éstas de forma individual a través de un sistema detector y para ello es imprescindible que éstas células o partículas estén suspendidas en una solución acuosa (SHAPIRO, 1988).

Para realizar esta técnica en muestras de tejido incluidas en parafina, es necesario transformar el tejido en una suspensión celular. Hemos seguido la técnica descrita por Hedley para tejidos fijados y parafinados (HEDLEY col., 1983), con alguna pequeña modificación, como veremos más adelante.

1. Preparación del tejido.

Si bien existen en la bibliografía varios métodos para preparar el material incluido en parafina apto para ser procesado por el citómetro de flujo (VINDELOW y col., 1990), nosotros hemos utilizado el método seguido por HEDLEY y cols., 1983)

Los pasos seguidos para la realización de la técnica en las muestras parafinadas de que disponíamos como material son:

- 1.- Desparafinado.
- 2.- Rehidratación.
- 3.- Disgregación celular.
- 4.- Filtrado.
- 5.- Centrifugado.
- 6.- Tinción específica.
- 7.- Incubación con RNasa.

De cada bloque, mediante microtomo, se realizaron 7 cortes, los dos primeros de 6 μ , a continuación tres cortes de 50 μ y finalmente otros dos de 6 μ .

Los cortes de 6 micras se tiñeron con hematoxilina-eosina y Feulgen para

el estudio anatomopatológico y estudio por citometría estática, en ellos se confirmó la existencia de la lesión a estudiar en los cortes de 50 μ .

Cada corte de 50 μ se colocó en un tubo de vidrio seco de 15 ml. numerado.

1.- Desparafinado.

Los cortes se desparafinaron añadiendo 10 ml. de xilol, realizando 2 cambios de 20 minutos cada uno a temperatura ambiente.

2.- Rehidratación.

Una vez desparafinado, se rehidrató el tejido, utilizando etanol a concentraciones decrecientes de la siguiente forma:

100%.....	10 minutos
90%.....	10 minutos
75%.....	10 minutos
60%.....	10 minutos
50%.....	10 minutos

Realizados estos pases, el tejido se mantuvo en agua destilada durante 8 horas.

3.- Disgregación celular.

3.1. Retirando previamente el exceso de agua, los cortes eran depositados cuidadosamente en una placa de petri.

3.2. Una vez el tejido en la placa de petri, se añadía una gota de pepsina al 0'5% en 0'9% de solución de cloruro sódico ajustada a pH 1.5 con ácido clorhídrico 2N (P-7012, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.), procediendo a la disgregación mecánica mediante bisturí, dislacerando el corte hasta convertirlo en una masa uniforme.

3.3. Finalizada la disgregación mecánica, procedíamos a la digestión enzimática, para lo cual se mantenía el tejido en incubación con 2 μ l de pepsina a 37 grados C durante 60 minutos y con agitación continua. La digestión con pepsina tiene un doble fin en este método, por una parte, producir una

suspensión de núcleos aislados a partir de una sección de tejido y por otra parte, romper los puentes que la fijación con formol provoca entre el ADN y las nucleoproteínas, lo que da lugar a una tinción más uniforme del ADN (HEDLEY, 1983).

4. Filtrado.

A continuación se procede al filtrado de la solución a través de un filtro de nylon de 60 μ .

5. Centrifugado.

Centrifugado de la solución durante 10 minutos a 1000 rpm., desechando el sobrenadante, por lo menos dos veces.

6. Tinción específica

Al sedimento, le añadimos 250 μ l. del colorante, en nuestro caso, Yoduro de Propidio (Sigma Chemical Co.), a una concentración de 50 μ g/ml PBS manteniéndolo un mínimo de 15 minutos como período de tinción de la muestra. Una vez teñida se conservaba a 4 grados fuera de la luz.

7.- Incubación con RNasa.

Como el yoduro de propidio marca tanto el ADN como el ARN, con el fin de eliminar el ARN, era necesario añadir 50 μ l de RNasa (Cooper Biomedical, Malvern, PA) en cada tubo. A continuación se deja en incubación en baño de 37 $^{\circ}$ con agitación continua, posteriormente 30 minutos en nevera y ya está listo para su análisis.

2. **Análisis del ADN**

El material obtenido fue analizado en un citómetro de flujo Coulter EPICS Profile (Coulter Electronics Inc. Hialeah, FL) equipado con un láser de argón que opera a 15 mW a 488 nanómetros.

El citómetro de flujo se compone de 3 partes (CARRETERO, 1985):

1.- Cámara de análisis.

2.- Sistema óptico de recogida, separación y medición de los distintos tipos de fluorescencia y dispersión de luz de láser.

3.- Sistema de digitalización y construcción de los histogramas de distribución celular.

En la cámara de análisis tiene lugar la irradiación de las células, previamente teñidas o marcadas con un fluorocromo, por el haz de láser focalizado en el punto medio de flujo del líquido de transporte. El paso de las células de forma individual y centradas con respecto a la luz del láser se consigue utilizando un flujo laminar, al hacer que la corriente de líquido en el cual se desplazan las células esté formada por dos flujos concéntricos, uno interno, donde se encuentran las células y otro externo compuesto de una solución salina fisiológica o agua.

Al disminuir la presión del flujo interno con respecto al externo, se produce un centrado del flujo interno en medio del cilindro de líquido, de forma que las células se ven forzadas a circular por un cilindro interno de flujo laminar. Con esto se consigue el paso de células una a una y centradas, de forma que todas pasan por el punto medio del haz del láser. La interacción de las células con el láser provoca la dispersión de parte de la luz del haz y la emisión de fluorescencia.

Cada uno de éstos tipos de emisión es recogido por un detector de luz dispersada frontalmente (medida de la dispersión frontal) y por un bloque óptico situado ortogonalmente respecto al flujo de células y a la dirección de iluminación del haz del láser (medida de la dispersión ortogonal y de las diferentes fluorescencias).

El bloque óptico contiene tres o cuatro fotomultiplicadores (dependiendo de la capacidad de medición del citómetro), los cuales pueden medir y ampliar la fluorescencia recibida en diferentes partes del espectro óptico, determinadas por los filtros de color y espejos dicróicos. La posibilidad de medir simultáneamente varias fluorescencias permite realizar análisis multiparamétricos, lo que constituye una característica muy importante de los sistemas de citometría de flujo.

La fluorescencia emitida hay que cuantificarla, y para ello, la intensidad de luz recogida por las lentes se transforma, mediante fotomultiplicadores, en una señal de voltaje que es amplificada a pulsos de salida individuales para cada célula de forma proporcional al valor del parámetro biológico que se está determinando.

Finalmente, una vez cuantificada la fluorescencia emitida por cada partícula, hay que ordenar los datos obtenidos, de forma que consigamos un histograma de distribución de la población celular que nos permita la interpretación de los resultados. Las señales producidas por los fotomultiplicadores son señales eléctricas, que varían de 0 a 10 voltios, y no pueden ser asimiladas por un ordenador, éste necesita que los datos le sean dados de forma binaria. Es necesario realizar lo que se conoce como digitalización de la señal. Para ello un convertidor analógico-digital transforma la señal analógica en una señal digitalizada. Así, si consideramos un convertidor de "8 bits", esto significa que la señal máxima (10 voltios) será digitalizada en 2^8 , es decir, 256 valores discontinuos, que serían 0 mV., 40 mV., 120 mV., 9.60 V. Toda señal será transformada en un valor digitalizado igual a uno de estos 256 valores, el más próximo por defecto, que son los 256 canales que tiene el histograma que realiza el citómetro de flujo. Para este tipo de convertidor de 8 bits, la precisión será del 0.4%.

En resumen, mediante el proceso de tinción conseguimos que la variación del parámetro biológico se traduzca en una variación de la emisión de fluorescencia, la cual será medida por el aparato, obteniendo así un rango de valores de fluorescencia desde 0 hasta un máximo que cubrirá en condiciones óptimas, el rango de variaciones del parámetro a determinar.

Los primeros datos que nos dá el citómetro de flujo aparecen en forma de histograma biparamétrico, donde los parámetros medidos son correlacionados dos a dos, de forma que cada célula está representada por dos puntos. Los parámetros son, cantidad de fluorescencia (abscisas) y luz dispersada (ordenadas).

El análisis de estos datos nos permite realizar un tratamiento gráfico de los mismos con la construcción de un histograma monoparamétrico en el que en las abscisas se expresa la cantidad de fluorescencia y en las ordenadas el número de células que tienen la misma cantidad de fluorescencia, y por tanto la misma cantidad del parámetro problema.

El sistema informático del citómetro de flujo realiza, además, un tratamiento numérico que consiste en calcular una serie de parámetros tales como la media, pico modal, coeficiente de variación, mediana. ..

La amplificación de la señal se puede hacer de forma directa (cuando una célula tiene la mitad de contenido que otra, da lugar a un pulso con la mitad de

amplitud), de forma integral, en el que el resultado es proporcional al total de fluorescencia emitida por la célula durante el análisis, o de forma logarítmica que es la que consigue una mayor definición de las poblaciones.

El análisis de los ácidos nucleicos se efectuará tras la coloración por fluorocromos específicos que deben cumplir una serie de requisitos, tales como: tener un espectro de excitación compatible con la fuente luminosa, tener un rendimiento cuantitativo suficiente y estabilidad en el marcaje.

Nosotros hemos utilizado los fluorocromos intercalantes que son los más extendidos en razón de su bajo costo, de su buen rendimiento cuantitativo y de la buena absorción de fuentes luminosas de 488 nm. Tanto el bromuro de etidio como el yoduro de propidio son derivados del fenantreno y se intercalan entre los ácidos nucleicos de doble cadena, ADN y ARN. La coloración del ADN requiere la previa permeabilización de la célula y la eliminación del ARN antes del análisis del ADN.

Para el análisis de los resultados es necesario la utilización de un estándar, que permita una calibración del aparato, estándar que se utiliza normalmente antes del análisis de la muestra. Nosotros hemos utilizado tanto esferas de plástico (Immuno-chek, Coulter Electronics, Inc.) como linfocitos humanos para calibrar el aparato.

Nosotros, para determinar el pico diploide G0-G1 y el Índice de ADN, como trabajamos sobre piezas fijadas en formol e incluidas en parafina, no utilizamos el control standard habitual de eritrocitos de trucha, debido a la variación en la intensidad de la fluorescencia que se produce en las diferentes piezas y que depende del tiempo de fijación en formol y de la antigüedad del bloque de parafina (BERLINGER, 1987), y hemos tomado como control interno, las células inflamatorias que contienen todas las piezas estudiadas y que forman picos G0-G1. Las muestras con un solo pico G0-G1, se consideraron diploides, mientras que las muestras con más de un pico G0-G1, fueron consideradas como aneuploides, considerando siempre el primer pico como el diploide, lo cual dada la escasez de hipodiploidias, da lugar a un porcentaje de error inferior al 5% (GRABEL-PIETRUSKY, 1982; GUILLEN, 1988)

3. Análisis de los Histogramas.

Todos los datos adquiridos, necesitan una interpretación, por lo que es necesario realizar modelos matemáticos que permitan sacar conclusiones de la información almacenada.

El rigor de los resultados de la citometría de flujo se basan en cinco principios: 1). La selección de los controles: los más exactos son las propias células parenquimatosas normales del tejido a estudio. 2) Tinciones específicas y estequiométricas: como el yoduro de propidio, bromuro de etidio, DAPI, etc; estos son colorantes intercalares que tiñen simultáneamente el ARN y el ADN, por lo que es imprescindible el tratamiento con RNA-asa. 3). La evaluación de la ploidía, que dependen del control empleado, del tipo de tejido y de los errores inherentes al sistema. 4). Selección de los histogramas: Los autores estrictos consideran útiles para el análisis tan sólo aquellos histogramas con fases S inferiores al 10 por ciento; sin embargo, en las muestras de parafina es frecuente la aparición de fragmentos tisulares adheridos que producen fases S anormalmente elevadas. y 5) Análisis del ciclo celular: ya que la evaluación pronóstica tumoral por citometría de flujo en material extraído de bloques de parafina es un campo reciente y poco explorado, es aconsejable una técnica lo más rigurosa y uniforme posible con el fin de que los resultados puedan ser comparables.

Para la interpretación del ciclo celular, no existe un modelo matemático absoluto aplicable a todos los casos, sino que existen aproximaciones más o menos precisas.

La ecuación fundamental del ciclo celular, necesita dos hipótesis (METEZEAU, 1988):

1.- Una parte de las células tienen un contenido "x" de ADN (fase G₀-G₁), otra parte de las células tienen un contenido "2x" de ADN (fase G₂-M), el resto de las células tienen un contenido en ADN comprendido entre "x" y "2x" (fase S). Esto da lugar al histograma de citometría de flujo conocido.

2.- Existe una relación lineal entre la cantidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo marcador del ADN y la cantidad de ADN.

Estas dos hipótesis permiten establecer un histograma en el cual se sitúan las células dentro del ciclo celular en función de la cantidad de fluorescencia

emitida.

Normalmente, la mayor parte de las células, más del 95%, se encuentran en fase de reposo, o estadio G0-G1 del ciclo celular, teniendo un contenido de ADN diploide (2 N), primer "pico" del histograma. Las células que se encuentran sintetizando ADN, fase S o de síntesis, tienen mayor contenido en ADN, entre 2N y 4N, zona plana del histograma situada entre los dos "picos", mientras que las células que están en la fase de mitosis, fase G2-M, tienen el máximo contenido en ADN, 4N, segundo "pico" del histograma. El número de células en cada fase del ciclo puede ser determinado por la citometría de flujo, dándonos la media de fluorescencia de las células en fase G0-G1, la medida del contenido del ADN celular.

El denominado índice de ADN constituye la forma más habitual de expresar el contenido en ADN o ploidía de la población celular. El índice de ADN se calcula dividiendo el contenido en ADN (número de canal del histograma de la población G0-G1) de una población problema, por el contenido en ADN que tiene una población ya conocida, que puede ser un estándar determinado, como una población de linfocitos ya preparados para este fin, o, en el caso de la mama, la medida de ADN que tienen las células inflamatorias del estroma, que siempre hay en la muestra, y que son diploides..

Índice de ADN:

$$\frac{\text{Contenido en ADN de la población problema}}{\text{Contenido de ADN de la población conocida}}$$

Por definición, el índice de ADN de una población diploide, "normal", es 1.0 (la media del canal de los "picos" G0-G1 de ambas poblaciones, conocida y problema, se superponen al tener las dos el mismo contenido en ADN, contenido normal). Aquellas células que tienen más ADN que la población diploide serían hiperdiploides y las que tienen menos, hipodiploides, dando lugar a índices de ADN mayores y menores de 1, respectivamente. Estas poblaciones aneuploides darían lugar a picos extras en el histograma realizado por el citómetro de flujo.

Una vez recogidos los datos de la fluorescencia emitida por cada célula y realizado el histograma, lo que interesa es realizar el cálculo del número o porcentaje de células que se encuentran en fase G0-G1, en fase G2-M ó en fase S; para ello se utilizan una serie de modelos que nos permiten interpretar

el histograma, pero sin que exista un modelo ideal para el estudio del ciclo celular. Estos modelos se basan en métodos estadísticos, gráficos o paramétricos.

Nosotros hemos utilizado los métodos paramétricos a través de un programa de ordenador.

Los datos obtenidos de cada muestra, se grabaron en discos de ordenador compatible y fueron analizados utilizando el programa m-cycle. Se analizaron un mínimo de 10.000 núcleos por cada muestra.

El análisis de cada histograma comporta la realización de los siguientes pasos:

- 1.- Introducción del histograma en la memoria del ordenador.
- 2.- Entrada en el programa de análisis de ADN donde se nos representa en pantalla los gráficos a analizar.
- 3.- Acotar la zona de interés de la gráfica en la que se hallan los picos sujetos a examen.
- 4.- Eliminar la zona de "ruido" inespecífica en aquellos histogramas que contienen un elevado nivel de tinción no nuclear.
- 5.- Acotar mediante los cursores, el pico correspondiente a la fase G0-G1. La existencia de un solo pico G0-G1 indica que se trata de un tumor diploide o casi diploide (HEDLEY, 1983).
- 6.- Acotar mediante los cursores la fase G2-M
- 7.- Acotar los picos aneuploides, si existen.
- 8.- Una vez realizada esta operación, el ordenador inicia un proceso de cálculo, dándonos:

- El coeficiente de variación para cada pico.
- La relación entre las fases G0-G1 y G2-M.
- La posición media de cada uno de los picos
- El porcentaje de células correspondiente a cada una de las distintas fases.
- El índice de ADN en los casos aneuploides.

Nosotros sólo utilizamos aquellos histogramas cuyo coeficiente de variación fué de 10 o menor de 10, cifra aceptada por la mayor parte de los autores cuando se trabaja con material fijado y parafinado (GUO, 1989; KAPLAN, 1986).

En las muestras diploides, el índice de ADN siempre es 1 y en los aneuploides, siempre diferente de 1. En nuestro material, como no hemos utilizado control externo, hemos considerado siempre la segunda población G0-G1 como la aneuploide (GRABEL-PIETRUSKY, 1982; GUILLEN, 1988)

La interpretación de los histogramas en cuanto a cantidad de ADN, es la misma que hemos utilizado en la citofotometría (ya señalada anteriormente), teniendo en cuenta que en aquellos histogramas que sólo aparecía un sólo pico G0-G1, los consideramos como Diploides.

ESTUDIO ESTADISTICO:

El estudio estadístico se realizó mediante el Programa SPSS/PC implementado en un 486 Sx..Se realizaron las siguientes técnicas:

- Para la comparación de variables cuantitativas (en escala de intervalo) en diferentes grupos de lesiones, se utilizó el análisis multivariante de comparación de medias (MANOVA), donde se contrasta mediante una F de Snedecor y se estima el modelo:

$$Y_1 = \mu_1 + \alpha_i \pm E_1$$

$$Y_2 = \mu_2 + \beta_j + E_2$$

$$Y_3 = \mu_3 + \gamma_l + E_3$$

$$Y_4 = \mu_4 + \epsilon_k + E_4$$

Donde Y_1, Y_2, Y_3 son las variables dependientes (área, perímetro, diámetro máximo, factores de forma),

μ_1, μ_2, μ_3 , son los valores medios,

$\alpha_i, \beta_j, \gamma_l, \epsilon_k$ son los efectos diferenciales en el grupo de lesiones y

E_1, E_2, E_3, E_4 son variables ruido blanco

Los test univariantes son t de Student clásicos, al nivel de confianza habitual $\beta = 0.05$.

- Para las variables categóricas (citometría estática y citometría de flujo) , la

homogeneidad o en su caso las diferencias entre diagnósticos se contrastaron mediante el estadístico clásico χ^2 de Pearson. Hay que señalar que la validez de la p es asintótica (válida con muchos datos), por lo cual en este trabajo, debe ser interpretada con cautela.

RESULTADOS

RESULTADOS

Seleccionamos un total de 165 casos de patología mamaria, de los cuales 102 casos correspondieron a mastopatías fibroquísticas (displasias mamarias), 29 fueron de carcinoma in situ y 34 fueron carcinomas infiltrantes (ver tabla 1). Realizamos un estudio comparativo de casos de mastopatía fibroquística proliferativa sin atipias (Reclus II), con atipias (Reclus III), carcinoma in situ y carcinoma infiltrante, con respecto a diferentes variables morfométricas: área, perímetro, diámetro máximo, dos factores de forma y al contenido de ADN. Esto último fue estudiado por dos métodos distintos: Citometría estática y citometría de flujo, en un intento de comparar la sensibilidad y especificidad de ambos métodos.

Hemos establecido 3 grupos de lesiones supuestamente comparables:

- 1.- Hiperplasia ductal sin atipias versus hiperplasia ductal con atipias - carcinoma intraductal o carcinoma papilar intraductal - carcinoma ductal infiltrante.
- 2.- Hiperplasia lobulillar sin atipias versus hiperplasia lobulillar con atipias - carcinoma lobulillar in situ - carcinoma lobulillar infiltrante.
- 3.- Patología variada asociada a la mastopatía fibroquística: adenosis, esclerosis radial y metaplasia apocrina versus hiperplasia ductal con atipias y carcinoma intraductal.

1.- CARACTERIZACION HISTOPATOLOGICA:

A continuación describimos los criterios histopatológicos que hemos empleado para tipificar las lesiones que hemos analizado posteriormente morfométrica y cuantitativamente.

MASTOPATIA FIBROQUISTICA (DISPLASIA MAMARIA):

HIPERPLASIA DUCTAL. Corresponde a una proliferación mixta de células epiteliales y mioepiteliales que causan una obliteración parcial o completa de los ductos, los cuales tienden a distenderse. Distinguimos dos variantes fundamentales:

Epiteliosis: Proliferación epitelial intraluminal de morfología predominantemente sólida o escasamente fenestrada que viene acompañada de un pobre componente estrómic. Los límites celulares son difícilmente discernibles, dando la impresión de crecimiento pseudosincitial. Los núcleos son generalmente ovalados y, con frecuencia, se disponen de tal modo que sus ejes mayores discurren paralelamente formando "remolinos" o "corrientes" (streaming). Los espacios intercelulares son de contorno anfractuoso y predominan en las porciones periféricas de los ductos. Nunca presentan una morfología redondeada "en sacabocados". Es característico observar distintos tipos celulares y, cuanto menos, dos poblaciones celulares: una de hábito epitelial y otra de hábito fusiforme. No debe observarse monotonía citológica, y ambas poblaciones se entremezclan en los mismos campos histológicos. No hay dominio absoluto de uno de ellos.

Papilomatosis: Se diagnostica papilomatosis cuando se observa una proliferación epitelial y mioepitelial que forma excrescencias intraluminales de tres o más células de espesor acompañadas por discreto componente estrómic. Dichas estructuras muestran una morfología foliada y, en ocasiones, contienen células metaplásicas apocrinas, entremezcladas con las células ductales y las mioepiteliales.

HIPERPLASIA DUCTAL ATÍPICA: Proceso proliferativo celular complejo situado dentro de los conductos galactóforos extra lobulares e interlobulares. Hay en general dilatación de la luz del conducto (uno o varios vecinos) con ocasional tendencia quística. El epitelio proliferante puede llenar por completo el ducto o de modo arborescente (parcial) recordando formas de epiteliosis sólida o de papilomatosis. Hay formas mixtas de epiteliosis y papilomatosis conjuntamente en un mismo ducto.

Existe distorsión del patrón proliferativo celular. Este se produce sobre un área de hiperplasia ductal sin atipias (dentro del mismo ducto o en ductos vecinos). En efecto hay pérdida de la pluriclinalidad celular (células mioepiteliales, ductales) dominando las células de uno u otro tipo. Hay pérdida parcial de la polaridad nuclear. Existen irregularidades nucleares y hay grandes nucleolos. Puede haber alguna mitosis. Falta la necrosis masiva y solo aparece algún núcleo en picnosis. Hay células espumosas entremezcladas de tipo macrofágico. Aparecen células claras (seudomioepiteliales). Los núcleos poseen ocasionales vacuolas.

una hiperplasia lobulillar previa. Las luces de los lobulillos pueden contener un conducto algo distendido (aunque esto no siempre ocurre). Hay aumento del número de estructuras celulares en el lobulillo. Las células tienden a perder su polaridad. Hay irregularidades de tamaño y forma nuclear. Los nucleolos son más prominentes. Pueden existir mitosis. Hay ocasionales necrosis (picnosis nuclear). Hay persistencia de límites celulares y de luces intralobulillares que suelen tener localización central. Persisten células mioepiteliales asociadas con los lobulillos. Pueden adoptar un aspecto celular claro.

La lesión se asocia a una hiperplasia ductal sin atipias de forma que existe transición entre hiperplasia ductal sin atipias e hiperplasia ductal atípica.

En ocasiones la hiperplasia atípica del lobulillo semeja un carcinoma lobulillar in situ, pero ésto es sólo aceptable cuando el número de acinos tipo carcinoma lobulillar in situ, están aislados (uno o dos) y en ningun caso alcanzan a afectar a un lóbulo glandular completo. Si ésto llegara a ocurrir entonces se debe considerar la lesión como un carcinoma in situ lobulillar asociado a una hiperplasia lobulillar con atipias.

METAPLASIA APOCRINA: El epitelio metaplásico apocrino suele tapizar , en ocasiones, los quistes mamarios y también ciertas lesiones papilíferas. Dicho epitelio es prismático alto, ocasionalmente pseudoestratificado y está constituido por grandes células columnares de citoplasma oxífilo brillante con un fino punteado granular y un pequeño núcleo redondeado. El núcleo puede ser grande y nucleolado.

ESCLEROSIS RADIAL : Proceso caracterizado por la presencia de una trama de tejido conectivo fibroso denso hialino con elastosis que configura unos rayos convergentes hacia un punto central. Dicho magma contiene estructuras tubuliformes de pequeño tamaño distorsionadas y parcialmente obliteradas por la reacción cicatricial. En vecindad suelen existir cambios patológicos compatibles con mastopatía. La arquitectura general de la lesión y los cambios circundantes permiten efectuar un correcto diagnóstico diferencial (en muchos casos) con respecto al carcinoma tubular.

Manteniendo un criterio práctico, hemos agrupado las lesiones anteriormente descritas en dos grupos BARTOW (1987), LLOMBART-BOSCH (1989):

- **MASTOPATIA PROLIFERATIVA SIN ATIPIAS (RECLUS II):** Muestra las dos clásicas variantes de proliferación ductal y lobulillar con las características previamente descritas de epiteliosis, papilomatosis y adenosis (incluyendo la forma microglandular).

- **MASTOPATIA PROLIFERATIVA CON ATIPIAS (RECLUS III):** Cuando, además de las lesiones proliferativas anteriormente descritas, se observan signos de hiperplasia ductal atípica o de hiperplasia lobulillar atípica.

CARCINOMAS NO INFILTRANTES (IN SITU):

CARCINOMA LOBULILLAR IN SITU: La imagen más clásica corresponde a una alteración multicéntrica de las unidades lobulillares de varios lóbulos condicionando su dilatación en globos, aislados por basales y con total relleno por células de clonalidad única que semejan un saco de perdigones. Hay desaparición total de la luz del lobulillo. Puede haber puntos de necrosis que condicionanseudoluces.

Dentro del lobulillo solo existe una población celular neoplásica. No hay polaridad nuclear. No existen diferencias entre células basales y células centro acinosas. Los núcleos son de cromatina densa grosera irregular. Hay nucleolos grandes. Existen mitosis. Hemos encontrado tipos monomorfos de núcleos homogéneos pero también se ha descrito la variante celular polimorfa con fuertes atipias y con secreción celular tipo mucina que produce vacuolas citoplásmicas. Hay distensión y refuerzo de membranas basales con endoreduplicación de las mismas. En el estroma hay infiltración linfocitaria y reacción de angiogénesis vascular.

CARCINOMA DUCTAL IN SITU DE TIPO COMEDOCARCINOMA. Neoformación que crece en el interior de los ductos y que está constituida por grandes células con amplio citoplasma y prominente núcleo con groseros detalles cromatínicos y actividad mitótica. En la porción central suele existir necrosis tumoral. Hay distensión irregular del conducto. Existe duplicación de membranas basales.

CARCINOMA DUCTAL IN SITU CRIBIFORME: Neoformación constituida por células morfológicamente homogéneas y de límites bien definidos que crece en el interior de los ductos sin ningún tipo de soporte estrómic, observándose luces regularmente distribuidas de contorno redondeado (en sacabocados). Existen barras trabeculares que son

formaciones epiteliales sólidas (sin estroma) cuyas células se disponen con su eje mayor perpendicular al eje de dicha barra. Hay focal necrosis con picnosis nuclear.

CARCINOMA DUCTAL IN SITU MICROPAPILAR: Se trata de una neoplasia intraductal que presenta barras trabeculares de extremo apical bulboso y base de implantación más estrecha que están perpendicularmente dispuestas con respecto a la pared del ducto.

CARCINOMA PAPILAR IN SITU: Proceso neoplásico que se desarrolla en el interior de espacios distendidos, probablemente ductales, que muestra complejos tallos vasculo-conectivos que sostienen barras trabeculares sólidas (carentes de estroma) que se disponen perpendicularmente con respecto a dichos tallos. Además se observan frondas revestidas por un epitelio prismático alto de núcleos hipercromáticos marcadamente elongados. En los espacios ductales vecinos suele apreciarse carcinoma ductal in situ.

CARCINOMAS INFILTRANTES

CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE: Se trata de una neoformación constituida por trabéculas, nidos sólidos, estructuras glanduliformes y regueros irregulares que infiltran el estroma mamario y provocan una reacción desmoplásicas de intensidad variable. Las células neoplásicas presentan un contorno poligonal y están dotadas de un citoplasma finamente vacuolado con un núcleo vesicular hipercromático.

En muchos casos el proceso anteriormente descrito suele coexistir con lesiones carcinomatosas ductales in situ. Puede observarse disección neoplásica de los espacios perineurales y embolización linfática.

CARCINOMA TUBULAR. Carcinoma infiltrante extremadamente diferenciado formado por tubulos no rodeados de basales que adoptan patrones microquísticos o en rosario, con frecuentes fusiones del epitelio. Este está formado por una única población celular, con tendencia a confluir entre sí. Los núcleos muestran cromatina abigarrada, muy densa.

CARCINOMA LOBULILLAR INFILTRANTE: Proceso neoplásico infiltrativo constituido por regueros o "filas indias" de células predominantemente redondeadas de mediano tamaño con un núcleo discretamente hipercromático que asienta sobre un citoplasma que puede

Resultados

incluir vacuolas mucosecretoras. En muchos casos una vacuola de moco de gran tamaño desplaza excéntricamente el núcleo y la célula adopta una morfología "en anillo de sello". Suele observarse una disposición celular radialmente concéntrica en torno a los ductos (dianas periductales). En muchos casos existen restos dispersos de carcinoma lobulillar in situ.

2.- ANALISIS MORFOMETRICO:

1.- GRUPO DE LESIONES DUCTALES.

Como ya hemos mencionado anteriormente, hemos realizado un estudio comparativo entre las siguientes lesiones:

- 1.1. Hiperplasia ductal sin atipias (Reclus-II).
- 1.2. Hiperplasia ductal con atipias (Reclus-III).
- 1.3. Carcinoma in situ (intraductal) sólido-comedón.
- 1.4. Carcinoma in situ de tipo papilar (micropapilar, criboso).
- 1.5. Carcinoma ductal infiltrante.
- 1.6. Carcinomas infiltrantes (otros tipos).

En base a una serie de medidas nucleares: área, perímetro, diámetro máximo y dos factores de forma (factor de forma del área y factor de forma del perímetro). Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

A. AREA NUCLEAR: El área nuclear hace referencia al área comprendida por el trazado que delimita la estructura nuclear. Encontramos los siguientes resultados en el grupo de lesiones ductales:

A.1.1. Hiperplasia ductal sin atipias (R-II). Hemos analizado un total de 15 lesiones de éste tipo, entre las cuales había 5 que correspondían a papilomatosis (ya descrita anteriormente) y las otras 10, correspondían a epiteliosis (ya descrita anteriormente). En ámbos casos sin atipias. Estas dos lesiones forman parte del contexto de hiperplasia ductal, y por ello se han analizado juntas, siendo además los resultados de las medidas nucleares similares en ambos tipos de lesiones. El área nuclear de cada una de las 15 lesiones, viene especificada en la tabla nº 1. El **área nuclear media** de las 15 lesiones fué de $30.80 \mu^2$ (tabla nº 12), con un rango que osciló entre $19.92 \mu^2$ que correspondió a un caso de papilomatosis con núcleos muy pequeños, y $43.36 \mu^2$ que se encontró en un caso de epiteliosis.

A.1.2. Hiperplasia ductal con atipias (R-III). Analizamos un total de 10 lesiones de éste tipo, entre las cuales había 5 casos de papilomatosis, 2 de

epiteliosis y 3 de hiperplasia ductal propiamente dicha. Todos los casos mostraban atipias, en mayor o menor proporción, pero en ningún caso llegaban a ser carcinoma in situ. Al igual que en el caso anterior, la papilomatosis y la epiteliosis forma parte del contexto general de hiperplasia ductal, por ello se han considerado globalmente, mostrando además resultados similares en todas las mediciones nucleares, dentro del grupo de con atipias. El **área nuclear media** fué de $41.35 \mu^2$ (tabla nº 12) con un rango comprendido entre $28.25 \mu^2$ y $90.18 \mu^2$. El área nuclear obtenida en cada una de las lesiones viene especificada en la tabla nº 2.

A.1.3. Carcinoma in situ (intraductal). Analizamos un total de 13 lesiones, entre las cuales había carcinomas intraductales de tipo comedón y cribiforme. **La media del área nuclear** fué de $47.93 \mu^2$ (tabla nº 12) y el rango se situó entre $30.84 \mu^2$ del carcinoma con núcleos más pequeños y $92.25 \mu^2$ para el carcinoma con núcleos más grandes. Los resultados individuales de cada lesión vienen especificados en la tabla nº 3.

A.1.4. Carcinoma in situ de tipo papilar Estudiamos 8 lesiones de este tipo y **el área nuclear media** fué de $44.18 \mu^2$ (tabla nº 12) con un rango que osciló entre $31.91 \mu^2$ y $51.46 \mu^2$. El área nuclear de cada una de las lesiones se refleja en la tabla nº 4.

A.1.5. Carcinoma ductal infiltrante. De este tipo de lesión estudiamos 22 casos, de los cuales 21 fueron de tipo ductal y solo 1 caso fue de tipo papilar. El área nuclear obtenida en cada lesión se muestra en la tabla nº 5. El **área nuclear media** fué de $52.10 \mu^2$ (tabla nº 12) y el rango osciló entre $27.86 \mu^2$ y $75.00 \mu^2$.

A.1.6. Carcinomas infiltrantes Cuando en lugar de analizar sólo los carcinomas ductales infiltrantes, analizamos todos los carcinomas infiltrantes recogidos, sin distinguir tipos (incluye: carcinomas ductales: 21, carcinomas tubulares: 5, carcinomas lobulillares: 2, carcinoma papilar: 1, carcinomas medulares: 2, carcinoma apocrino: 1, carcinoma coloide: 1), **la media del área nuclear** es de $52.29 \mu^2$ (tabla nº 12), con un rango comprendido entre $18.84 \mu^2$ y $97.74 \mu^2$. Ver resultados en la tabla nº 5.

Así pues, como resumen de este apartado podemos concluir que en el grupo de lesiones ductales y en cuanto al área nuclear se refiere, encontramos que el área de los núcleos fué más pequeña en las hiperplasias sin atipias y fué aumentando progresivamente hasta el carcinoma infiltrante. Estadísticamente

significativo ($p < 0.0003$). (Ver Fig. 16). En cambio, cuando enfrentamos las lesiones una a una, las diferencias no fueron tan claras. De manera que sólo hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre las hiperplasias ductales sin atipias y los carcinomas in situ y con los carcinomas infiltrantes y entre las hiperplasias ductales con atipias y los carcinomas infiltrantes. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la hiperplasia ductal sin atipias y la hiperplasia ductal con atipias o entre ésta última y los carcinomas in situ ó entre estos últimos y los carcinomas infiltrantes. (Ver tabla nº 12).

B. PERIMETRO NUCLEAR. Corresponde a la longitud del trazado efectuado para delimitar la estructura nuclear. En el grupo de lesiones ductales encontramos los siguientes resultados:

B.1.1. Hiperplasia ductal sin atipias (Reclus-II) El perímetro nuclear de cada una de las 15 lesiones, ya mencionadas anteriormente, viene especificado en la tabla nº 1. **La media del perímetro nuclear** fué de 21.7μ (tabla nº 12) y el rango osciló entre 16.85μ que correspondió a un caso de papilomatosis y 29.29μ que fué medido en un caso de epiteliosis.

B.1.2. Hiperplasia ductal con atipias (Reclus-III). El perímetro nuclear encontrado en cada una de las 10 lesiones de este tipo, viene especificado en la tabla nº 2. **La media del perímetro nuclear** fué de 24.29μ (tabla nº 12), el perímetro más pequeño correspondió a un caso de epiteliosis (19.71μ) y el perímetro más grande lo presentó un caso de hiperplasia ductal propiamente dicha (34.81μ).

B.1.3. Carcinoma in situ (intraductal). De las 13 lesiones que recogimos de este tipo, **el perímetro nuclear medio** fué de 25.58μ (tabla nº 12) con un rango entre 20.35μ y 35.71μ . Los resultados pormenorizados de cada caso vienen especificados en la tabla nº 3.

B.1.4. Carcinoma in situ de tipo papilar. Estudiamos un total de 8 casos y **la media del perímetro nuclear** fué de 24.46μ (tabla nº 12) con unos límites por arriba y por abajo de 26.55μ y 20.83μ respectivamente. Los resultados individuales de cada lesión están reflejados en la tabla nº 4.

B.1.5. Carcinoma ductal infiltrante. De un total de 22 casos, hallamos la **media del perímetro nuclear** y encontramos que fué de 26.97 μ (tabla nº 12) con un rango entre 19.68 μ y 32.18 μ . Los resultados pormenorizados de cada caso quedan reflejados en la tabla nº 5.

B.1.6. Carcinomas infiltrantes. De un total de 34 casos, la media del perímetro nuclear fué de 26.83 μ (tabla nº 12), con un rango que osciló entre 16.11 μ que corresponde a un caso de carcinoma tubular y que a su vez coincide con el área más pequeña, y 36.43 μ que corresponde a un caso también de carcinoma tubular y coincide, igualmente con el área mayor. Ver resultados en la tabla nº 5.

Podemos concluir, lo mismo que sucedía con el área, que la media del perímetro en cada grupo de lesiones, muestra una progresión creciente desde las lesiones sin atipias hasta el carcinoma infiltrante, estadísticamente significativo ($p < 0.0002$). (Ver fig. 16). En cambio cuando enfrentamos las lesiones una a una, las diferencias estadísticamente no fueron tan claras. Así sólo hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las hiperplasias ductales sin atipias y las hiperplasias ductales con atipias, con los carcinomas in situ y con los carcinomas infiltrantes y entre las hiperplasias ductales con atipias y los carcinomas infiltrantes. Ver tabla nº 13.

C DIAMETRO MAXIMO. Corresponde al eje mayor de la estructura nuclear. En el grupo de lesiones ductales, encontramos los siguientes resultados:

C.1.1. Hiperplasia ductal sin atipias (Reclus-II). En los 15 casos estudiados de este tipo de lesión, la **media del diámetro máximo** fué de 6.76 μ (tabla nº 12) con un rango que osciló entre 5.51 μ y 7.93 μ . Los datos correspondientes a cada una de las lesiones quedan reflejados en la tabla nº 1.

C.1.2. Hiperplasia ductal con atipias (Reclus-III) .La **media del diámetro máximo** de los 10 casos estudiados, fué de 7.78 μ (tabla nº 12), con un rango entre 5.51 μ para un caso de papilomatosis y 7.70 μ para un caso de epiteliosis. Los resultados pormenorizados de cada lesión están especificados en la tabla nº 2.

C.1.3. Carcinoma in situ (intraductal). Estudiamos un total de 13 casos. **La media del diámetro máximo** fué de 7.43μ (tabla nº 12) con un rango entre 6.57μ y 11.67μ . Los resultados obtenidos en cada lesión, están reflejados en la tabla nº 3.

C.1.4. Carcinoma in situ de tipo papilar. De este tipo de lesión estudiamos 8 casos. **La media del diámetro máximo** fué de 7.87μ (tabla nº 12) y el rango osciló entre 6.60μ y 8.62μ . Los resultados obtenidos en cada lesión, quedan reflejados en la tabla nº 4.

C.1.5. Carcinoma ductal infiltrante. Estudiamos un total de 22 casos, como ya se ha mencionado anteriormente, y **la media del diámetro máximo** fué de 7.84μ (tabla nº 12), con un rango que osciló entre 6.64μ y 10.39μ . Los resultados hallados en cada una de las lesiones, están reflejados en la tabla nº 5.

Podemos observar cómo la media del diámetro máximo, va aumentando progresivamente desde las hiperplasias ductales sin atipias hasta el carcinoma infiltrante, si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0.3$). (Ver Fig. 17)

D. FACTORES DE FORMA. Hemos estudiado dos factores de forma: Forma del área y forma del perímetro.

Forma del área: Determina la aproximación de la forma del núcleo a las estructuras circulares o elipsoidales, siendo el valor máximo igual a 1 para círculos ó elipses y menor de 1 para otro tipo de estructuras.

Forma del perímetro: Determina la aproximación de la forma del núcleo a la circularidad, siendo el valor máximo para el círculo igual a 1 y menor a 1 para otras estructuras tales como la elipse o estructuras irregulares.

En el grupo de lesiones ductales encontramos los siguientes resultados:

D.1.1. Hiperplasia ductal sin atipias (Reclus-II) **La media de ambos factores de forma** (factor de forma del área y factor de forma del perímetro) fué respectivamente de 0'98 y 0'89 (tabla nº 12), siendo este valor muy uniforme en cada una de las lesiones. Ver tabla nº 1.

D.1.2. Hiperplasia ductal con atipias (Reclus-III): Al igual que en el caso anterior, **la media de ámbos factores de forma** fué de 0'98 y 0'86 (tabla nº 12), siendo prácticamente igual en cada una de las lesiones que configuran este apartado. Ver tabla nº 2.

D.1.3. Carcinoma in situ (intraductal): Igualmente, **la media de los factores de forma** fué de 0'98 y 0'90 (tabla nº 12). Ver tabla nº 3 donde quedan reflejados los resultados pormenorizados de cada uno de los casos.

D.1.4. Carcinoma in situ de tipo papilar: De la misma forma, **la media de ámbos factores de forma** fué de 0'98 y 0'91 respectivamente (Factor forma del área y factor de forma del perímetro) (tabla nº 12). Ver tabla nº 4.

D.1.5. Carcinoma ductal infiltrante: **La media de los dos factores de forma**, al igual que en los casos anteriores, fué de 0'98 y 0'88 (tabla nº 12). Ver tabla nº 5.

Vemos pues, como ámbos factores de forma no son discriminantes en el grupo de lesiones estudiado y no nos permite distinguir ningún tipo de lesión. (Ver Fig. 18).

2. GRUPO DE LESIONES LOBULILLARES.

El estudio comparativo , lo realizamos entre las siguientes lesiones:

- 2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias (Reclus-II)
- 2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias (Reclus-III)
- 2.3. Carcinoma lobulillar in situ.
- 2.4. Carcinoma lobulillar infiltrante.

Al igual que en el grupo anterior, comparamos estos cuatro tipos de lesiones con los siguientes parámetros morfométricos: área, perímetro, diámetro máximo y dos factores de forma. (forma del área y forma del perímetro).

A. AREA NUCLEAR: Hemos encontrado los siguientes resultados:

A.2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias (Reclus-II): Sobre un total de 30 lesiones de este tipo, sin atipias, encontramos que la **media del área nuclear** fue de $31.26 \mu^2$ (tabla nº 12) y el rango estuvo comprendido entre $16.16 \mu^2$ para el caso de hiperplasia lobulillar sin atipias con núcleos más pequeños y $41.70 \mu^2$ para la hiperplasia lobulillar sin atipias con núcleos más grandes. Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 6

A.2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias (Reclus-III): Analizamos un total de 15 casos de hiperplasia lobulillar en donde todos los casos, en mayor o menor proporción, mostraban atipias. El **área media** de los 15 casos fué de $33.22 \mu^2$ (tabla nº 12) con un rango que estaba comprendido entre $18.30 \mu^2$ y $42.04 \mu^2$. Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 7

A.2.3. Carcinoma lobulillar in situ: Sobre un total de 8 casos de carcinoma lobulillar in situ, efectuamos la **media del área nuclear** y encontramos que fué de $33.26 \mu^2$ (tabla nº 12), mostrando un rango comprendido entre $21.38 \mu^2$ y $46.02 \mu^2$. Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 8.

A.2.4. Carcinoma lobulillar infiltrante: Solo hemos estudiado dos casos de carcinoma lobulillar infiltrante que, lógicamente, no son estadísticamente significativos. No obstante, la media de ámbos casos fué de $38.53 \mu^2$ (tabla nº 12), algo mayor que la encontrada en el carcinoma lobulillar in situ. Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 5.

A.2.5. Carcinomas infiltrantes.: Si consideramos todos los casos de carcinomas infiltrantes, igual que hemos hecho antes, ésta diferencia ya es mayor. (Ver apartado A.1.6.) Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 5

Estudiando el área nuclear en el grupo de las hiperplasias lobulillares, no encontramos una diferencia numéricamente tan ostensible entre los distintos tipos de lesiones (no fué significativo estadísticamente $p=0.3$) (Ver Fig. 19), de manera que sólo había una pequeña diferencia entre las medias de la hiperplasia lobulillar sin atipias y la hiperplasia lobulillar con atipias

(estadísticamente no significativo a nivel 0.05) pero no encontramos diferencias de ésta última con respecto al carcinoma in situ y carcinoma infiltrante de tipo lobulillar.

B. PERIMETRO NUCLEAR Hemos encontrado los siguientes resultados:

B. 2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias (Reclus-II): Sobre un total de 30 casos estudiados, como hemos visto anteriormente, efectuamos la **media del perímetro nuclear** y encontramos que fué de 21.34 μ (tabla nº 12), con un rango que osciló entre 15.36 μ y 32.42 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 6.

B.2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias (Reclus-III): Estudiamos un total de 15 casos, como hemos visto anteriormente, y encontramos que la **media del perímetro nuclear** fué de 21.19 μ (tabla nº 12), con un rango que estuvo comprendido entre 15.98 μ y 24.45 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 7.

B.2.3. Carcinoma lobulillar in situ: Hemos estudiado un total de 8 casos de carcinoma lobulillar in situ y hemos encontrado que la media del perímetro nuclear fué de 21.67 μ , siendo el perímetro medido más pequeño de 17.34 μ y el más grande, dentro de este tipo de lesión, de 26.37 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 8.

B.2.4. Carcinoma lobulillar infiltrante: Como hemos indicado anteriormente, solo estudiamos dos casos de carcinoma lobulillar infiltrante, cuya **media del perímetro** fué de 23.52 μ (tabla nº 12), aunque lógicamente no es significativo.

B.2.5. Carcinomas infiltrantes. Ver apartado B.1.6

Relacionando el perímetro en los diferentes tipos de lesiones lobulillares, podemos observar cómo, al igual que sucedía con el área, el perímetro tampoco distingue a la hiperplasia lobulillar sin atipias, de la hiperplasia lobulillar con atipias y del carcinoma lobulillar in situ (Ver Fig. 19), no obstante, sí que observamos una pequeña diferencia (estadísticamente no significativa a nivel 0.05)) si la comparación se establece entre el grupo de lesiones benignas

en general y carcinomas in situ con respecto a los carcinomas lobulillares infiltrantes. Al haber estudiado sólo dos casos de carcinoma lobulillar infiltrante, ésta comparación no es significativa.

C. DIAMETRO MAXIMO: Encontramos los siguientes resultados:

C.2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias (Reclus-II): Hemos analizado un total de 30 casos de hiperplasia lobulillar sin atipias y hemos encontrado que **la media del diámetro máximo** fué de 6,90 μ (tabla nº 12), con un rango que osciló entre 4.90 μ y 8.78 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 6.

C.2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias (Reclus-III): Como ya hemos visto anteriormente, hemos estudiado 15 casos de hiperplasia lobulillar con atipias y hemos encontrado que **la media del diámetro máximo fué de 6.95 μ** (tabla nº 12), siendo el diámetro máximo más pequeño encontrado de 5.10 μ y el más grande de 7.92 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 7.

C. 2.3 Carcinoma lobulillar in situ: Hemos analizado 8 casos de éste tipo de lesión, y hemos encontrado que **la media del diámetro máximo fué de 7.13 μ** (tabla nº 12), con un rango comprendido entre 5.96 μ y 9.04 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 8.

C.2.4. Carcinoma lobulillar infiltrante: Sólo estudiamos dos casos de este tipo de lesión y **la media del diámetro máximo fué de 7.01 y 7.93 μ** (tabla nº 12) .

C.2.5. Carcinomas infiltrantes: Ver apartado C1.6.

El diámetro máximo no distinguió a los diferentes tipos de lesiones ($p=0.6$)
(Ver Fig. 20)

D. FACTORES DE FORMA. Hemos estudiado dos factores de forma (ver apartados previos) y hemos encontrado los siguientes resultados, en este grupo de lesiones lobulillares:

D.2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias (Reclus-II) La media de ambos factores de forma (factor de forma del área y factor de forma del perímetro) fué respectivamente de 0'98 y 0'88 (tabla nº 12), siendo éste valor muy uniforme en cada una de las lesiones. Ver tabla nº 6..

D.2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias (Reclus-III): Al igual que en el caso anterior, la media de ambos factores de forma fué de 0'98 y 0'89 (tabla nº 12), siendo prácticamente igual en cada una de las lesiones que configuran este apartado. Ver tabla nº 7

D.2.3. Carcinoma lobulillar in situ: Igualmente, la media de los factores de forma fué de 0'98 y 0'90 (tabla nº 12). En la tabla nº 8 quedan reflejados los resultados pormenorizados de cada uno de los casos.

D.1.5. Carcinoma lobulillar infiltrante: La media de los dos factores de forma, de los dos unicos casos estudiados fue de al igual que en los casos anteriores, fue de 0'98 y 0.89 (tabla nº 12). Ver tabla nº 5.

Vemos pues, cómo ambos factores de forma no son discriminantes en este grupo de lesiones . Ver Fig. 21).

3. GRUPO DE LESIONES VARIAS: ADENOSIS, METAPLASIA APOCRINA, ESCLEROSIS RADIAL.

Por último, vamos a establecer un estudio comparativo entre éstas tres lesiones individuales: adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial con respecto a las lesiones hiperplásicas con atipias, tanto ductales como lobulillares, con los carcinomas in situ y con el grupo de carcinomas infiltrantes, en base a los cinco parámetros morfométricos ya señalados.

A. AREA NUCLEAR: Hemos encontrado los siguientes resultados:

A.3.1. Adenosis: Estudiamos 10 casos de adenosis, entre las cuales 3 fueron adenosis simple, 3 adenosis quística, 1 adenosis esclerosante, 1 adenosis microglandular y 2 adenosis tumoral. Los resultados no variaron en cada tipo de lesión, por lo que se estudiaron homogéneamente. La media del área nuclear fué de 31.80 μ^2 (tabla nº 12), con un rango que osciló entre

21.16 μ^2 para un caso de adenosis simple y 42.90 μ^2 observado en un caso de adenosis tumoral. Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 9.

A.3.2. Metaplasia apocrina: Estudiamos 11 casos de metaplasia apocrina, que mostraron un **área nuclear media** de 28.72 μ^2 (tabla nº 12), con un rango que osciló entre 20.55 μ^2 y 40.78 μ^2 . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 10.

A.3.3. Esclerosis radial: Estudiamos 12 casos de esclerosis radial y encontramos que el **área nuclear media** fué de 32.91 μ^2 (tabla nº 12), con un rango que osciló entre 18.57 μ^2 y 41.06 μ^2 . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 11.

Si comparamos éstas tres lesiones sin atipias (adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial) con la hiperplasia ductal con atipias y carcinomas in situ (intraductal y papilar), vemos como sí que existe una diferencia estadísticamente significativa al nivel 0.05. (Ver Fig. 22); en cambio cuando ésta misma comparación la establecimos con respecto a la hiperplasia lobulillar con atipias y al carcinoma lobulillar in situ, encontramos que no hubo diferencias estadísticamente significativas. Ver tabla nº 14.

B. PERIMETRO NUCLEAR. Encontramos los siguientes resultados:

B.3.1. Adenosis: Hemos analizado un total de 10 lesiones de adenosis y la **media del perímetro** fué de 20.94 μ (tabla nº 12), con un rango que se encontraba entre 17.59 μ y 24.21 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 9.

B.3.2. Metaplasia apocrina: Estudiamos un total de 10 casos y la **media del perímetro** fué de 19.62 μ (tabla nº 12), con un rango que osciló entre 16.60 μ y 23.06 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 10.

B.3.3. Esclerosis radial: Como hemos visto anteriormente, analizamos un total de 12 casos, con una **media del perímetro** de 21.28 μ (tabla nº 11) y un rango comprendido entre 18.57 μ y 23.75 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 11.

Si comparamos estas tres lesiones sin atipias (adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial) con la hiperplasia ductal con atipias y carcinomas

in situ (intraductal y papilar), vemos como sí que existe una diferencia estadísticamente significativa al nivel 0.05. (Ver Fig. 22); en cambio cuando ésta misma comparación la establecimos con respecto a la hiperplasia lobulillar con atipias y al carcinoma lobulillar in situ, encontramos que no hubo diferencias estadísticamente significativas. (Ver tabla nº 14)

C. DIAMETRO MAXIMO: Observamos los siguientes resultados:

C.3.1. Adenosis: La media del diámetro máximo fué de 6.89 (tabla nº 12), con un rango comprendido entre 6.07 μ y 7.56 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 9.

C.3.2. Metaplasia apocrina: La media en este caso fué de 6.78 μ (tabla nº 12) con unos límites establecidos entre 5.43 μ y 9.72 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 10.

C.3.3. Esclerosis radial: De los 12 casos revisados, encontramos que la media del diámetro máximo fué de 6.95 μ (tabla nº 12) con un rango que osciló entre 6.40 μ y 7.98 μ . Los resultados detallados de cada una de las lesiones se muestran en la tabla nº 23.

Si comparamos éstas tres lesiones sin atipias (adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial) con la hiperplasia ductal con atipias y carcinomas in situ (intraductal y papilar), vemos cómo en cuanto a la media del diámetro máximo, no se pudo encontrar una diferencia estadísticamente significativa. (Ver Fig. 11);

D. FACTORES DE FORMA. Hemos estudiado dos factores de forma (ver apartados previos) y hemos encontrado los siguientes resultados, en este grupo de lesiones benignas.

D.3.1. Adenosis : La media de ámbos factores de forma (factor de forma del área y factor de forma del perímetro) fué respectivamente de 0'98 y 0'89 (tabla nº 12), siendo éste valor muy uniforme en cada una de las lesiones. Ver tabla nº 9.

D.3.2. Metaplasia apocrina: Al igual que en el caso anterior, la media de ámbos factores de forma fue de 0.98 y 0.91 (tabla nº 12), siendo

prácticamente igual en cada una de las lesiones que configuran este apartado. Ver tabla nº 10

D.3.3. Esclerosis radial: Igualmente, la media de los factores de forma fué de 0.98 y 0.89 (tabla nº 12) . Ver tabla nº 11 donde quedan reflejados los resultados pormenorizados de cada uno de los casos.

Como ya hemos señalado, a este nivel no existen diferencias estadísticamente significativas. (Ver Fig. 24).

3.- CITOFOTOMETRIA (CITOMETRIA ESTATICA):

Todos los casos estudiados mostraron una distribución del ADN unimodal, de forma que todos los histogramas tenían un solo pico, con un rango que osciló desde 0'8 hasta 3, excepto 2 casos que mostraron 2 picos bien definidos, el primero de ellos diploide y el segundo aneuploide. La cantidad de ADN en cada uno de los grupos señalados previamente, fué la siguiente:

1. GRUPO DE LESIONES DUCTALES.

1.1. Hiperplasia ductal sin atipias. (Reclus-II): 66.6% (10/15) fueron diploides con un I.D. = 1; 33'3% (5/15) fueron aneuploides I.D. distinto de 1

1.2. Hiperplasia ductal con atipias. (Reclus-III): 60% fueron diploides (6/10) y el 40% (4/10) fueron aneuploides.

1.3. Carcinoma in situ (intraductal): 76.92% fueron diploides (10/13), 23'2% aneuploides (3/13) .

1.4. Carcinoma papilar in situ: 37'5% fueron diploides (3/8) y el 62'5% fueron aneuploides (5/8).

1.5. Carcinomas infiltrantes: 36'3% (12/33) fueron diploides, 51'5% (17/33) aneuploides y 12'12% (4/33) fueron tetraploides. De ellos, los dos carcinomas medulares que estudiamos fueron diploides y los 2 lobulillares aneuploides.

2. GRUPO DE LESIONES LOBULILLARES:

2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias. (Reclus-II): 60% (18/30) fueron diploides, 33'3% (10/30) fueron aneuploides y el 6'6% (2/33) fueron tetraploides.

2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias. (Reclus III): 53'3% (8/15) fueron diploides y 46'6% (7/15) aneuploides.

2.3. Carcinoma lobulillar in situ: 50% (4/8) fueron diploides, 37'5% (3/8) aneuploides y 12'5% (1/8), tetraploide.

2.4. Carcinoma lobulillar infiltrante: Los dos casos estudiados fueron aneuploides.

3. GRUPO DE LESIONES VARIAS: ADENOSIS, METAPLASIA APOCRINA, ESCLEROSIS RADIAL.

3.1. Adenosis: 50% de los casos (5/10) fueron diploides y el 50% (5/10) aneuploides.

3.2. Esclerosis radial: 83'33% (10/12) fueron diploides y 16'66% (2/12) aneuploides.

3.3. Metaplasia apocrina: 80% (8/10) fueron diploides y 20 (2/10) aneuploides.

Valorados los resultados, vemos cómo en el grupo de lesiones ductales, en cuanto al contenido de ADN se refiere, no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la hiperplasia ductal sin atipias, con atipias y el carcinoma intraductal, que muestran una cantidad de ADN diploide en el 60% de los casos, aproximadamente. Este porcentaje disminuye un poco en el carcinoma papilar in situ (37'5%), lo mismo que en los carcinomas infiltrantes (36'3%) de casos diploides. De manera que la única diferencia estadísticamente significativa a nivel 0.05, se establece entre los carcinomas ductales infiltrantes con respecto a la hiperplasia ductal sin atipias, con atipias y carcinoma intraductal. (Ver tabla nº 15))

En el grupo de lesiones lobulillares, encontramos resultados algo distintos, de forma que el número de casos diploides va disminuyendo progresivamente

según aumenta la agresividad de la lesión. Así en la hiperplasia lobulillar sin atipias, el número de casos diploides fue del 60%, en la hiperplasia lobulillar con atipias del 53'3% y en el carcinoma lobulillar in situ, del 50%. Ninguno de los dos carcinomas lobulillares infiltrantes que estudiamos fue diploide (ambos fueron aneuploides). Sin embargo, esta progresión no es estadísticamente significativa.

En el grupo de patología varia: adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial, sí que hubo una clara diferencia entre la esclerosis radial y la metaplasia apocrina por un lado y la hiperplasia ductal y lobulillar con atipias y carcinoma in situ, por otro, en donde el número de casos diploides pasó del 80% aproximadamente al 60% aproximadamente (estadísticamente significativo, $p < 0.05$). Esto no sucedió así con la adenosis. (Ver tabla 16)

4.- CITOMETRIA DE FLUJO

Todos los histogramas de ADN pudieron ser utilizados, ya que 8 casos que en un principio mostraron celularidad insuficiente, fueron repetidos con éxito en la segunda ocasión (esto fue posible porque el material procedía de bloques incluidos en parafina). La cantidad de núcleos medidos en todos los casos fue superior a 30.000. El coeficiente de variación mostró un rango entre 3 para los más bajos y 12 para los más altos, correspondiendo estos últimos a los casos aneuploides y los primeros a los diploides. Todos los casos diploides mostraron un solo pico y los casos aneuploides dos. No encontramos ningún caso multiploide.

La distribución de la cantidad de ADN fue la siguiente:

1. GRUPO DE LESIONES DUCTALES:

1.1. Hiperplasia ductal sin atipias. (Reclus II): 93'3% de los casos (14/15) fueron diploides y solo 1 caso (6'6%) fue aneuploide.

1.2 Hiperplasia ductal con atipias. (Reclus-III): 80% (8/10) fueron diploides, 20% (2/10) aneuploide y 10% (1/10) tetraploide.

1.3. Carcinoma intraductal: 84'6% diploides (1/13) y 15'38% aneuploides (2/13).

1.4. Carcinoma papilar intraductal: 62'5% diploide y 37'5% aneuploides.

1.5. Cacinoma infiltrante: 35% diploides (7/20), 45% aneuploides (9/20) y 20% (4/20) tetraploides.

2. GRUPO DE LESIONES LOBULILLARES:

2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias. (Reclus II): 83'3% (25/30) fueron diploides, 10% (3/30) aneuploides y 6'6% (2/30) tetraploides.

2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias. (Reclus-III): 80% (12/15) fueron diploides y 20% (3/15) aneuploides.

2.3. Carcinoma lobulillar in situ: 62'5% (5/8) fueron diploides y 37'5% (3/8) aneuploides.

2.4. Carcinoma lobulillar infiltrante: solo estudiamos 2 casos y fueron 1 diploide y otro aneuploide.

3. GRUPO DE PATOLOGIA VARIA: ADENOSIS, METAPLASIA APOCRINA, ESCLEROSIS RADIAL.

3.1. Adenosis: 90% fueron diploides (9/10) y 10% aneuploides (1/10).

3.2. Metaplasia apocrina: El 100% de los casos fueron diploides (10/10).

3.3. Esclerosis radial: 91'6% fueron diploides (11/12) y 8'3% aneuploides (1/12).

Con citometría de flujo, al igual que con citometría estática, no encontramos diferencias ostensibles, referida a la cantidad de ADN, en el grupo de lesiones ductales. Así, tanto la hiperplasia ductal sin atipias como la hiperplasia ductal con atipias y el carcinoma in situ, mostraron un porcentaje de casos diploides muy similar (93%, 80% y 84% respectivamente). En cambio, el porcentaje de casos diploides disminuyó claramente en el carcinoma in situ de tipo papilar y

Resultados

en los carcinomas ductales infiltrantes (62.5% y 57.5% respectivamente). De manera que la única diferencia estadísticamente significativa a nivel 0.05, se establece entre los carcinomas ductales infiltrantes con respecto a la hiperplasia ductal sin atipias, con atipias y carcinoma intraductal. (Ver tabla 17)

En el grupo de lesiones lobulillares estudiadas, no encontramos diferencias entre la hiperplasia lobulillar sin atipias y la hiperplasia lobulillar con atipias, cuyo porcentaje de casos diploides fué respectivamente de 83% y 80%, en cambio sí que encontramos una pequeña diferencia (Estadísticamente no significativo $p= 0.2$) entre estos dos tipos de lesiones con respecto al carcinoma lobulillar in situ, cuyo número de casos diploides fué del 62.5%. No se puede establecer comparación entre el carcinoma lobulillar in situ y el carcinoma lobulillar infiltrante ya que de este ultimo solo recogimos dos casos, que además fueron diploides.

En el grupo de patología varia: adenosis, esclerosis radial y metaplasia apocrina, prácticamente fueron diploides el 100% de los casos, claramente distinguibles (estadísticamente significativo, $p<0.05$) de los casos de hiperplasia ductal y lobulillar con atipias y carcinoma in situ (100% de los casos aproximadamente diploides, frente al 80% y 60% respectivamente). (Ver tabla nº 18)

5.- ANALOGIAS Y DIFERENCIAS DE LA CITOMETRIA ESTATICA CON RESPECTO A LA CITOMETRIA DE FLUJO.

Los resultados obtenidos por uno y otro método frente a análogas lesiones y con semejantes muestras, solo fueron superponibles en el 55% de los casos, a pesar de que en ambos casos medimos cantidad de ADN. A continuación analizamos pormenorizadamente cuales son las analogias y diferencias encontradas en cada uno de los grupos:

1. GRUPO DE LESIONES DUCTALES.

1.1. Hiperplasia ductal sin atipias. (Reclus II): 10 casos fueron diploides tanto en citometria estática como en citometria de flujo, 1 caso fue aneuploide en los dos casos y 4 casos no coincidieron, puesto que fueron aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo. (73% de analogias y 27% de diferencias) (Gráfica 1).

1.2. Hiperplasia ductal con atipias.(Reclus III): De los 10 casos estudiados, 6 fueron diploides por citometria estática y por citometria de flujo, 2 casos fueron aneuploides por ambos métodos y y 3 casos fueron distintos, siendo aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo (70% de analogias y 30% de diferencias) (Gráfica 2)

1.3. Carcinoma in situ (intraductal): Estudiamos 13 casos de carcinoma in situ de tipo intraductal y encontramos que 10 casos fueron diploides por ambos métodos, 1 caso fue aneuploides en ambos casos y 2 fueron diferentes, siendo aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo (Encontramos un 84'6% de analogias y un 15'4% de diferencias) (Gráfica 3)

1.4 .Carcinoma papilar intraductal: Hemos encontrado que solo 3 casos han sido diploides tanto por citometria estática como por citometria de flujo, 2 casos han sido aneuploides por ambos métodos y 3 casos fueron distintos, siendo aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo.(75% de analogias y 25% de diferencias) (Gráfica 4).

1.5. Carcinoma ductal infiltrante: Hemos estudiado 22 casos de carcinoma ductal infiltrante, siendo uno de ellos de tipo papilar, y hemos encontrado que solo 3 casos fueron diploides por ambos métodos, otros 3 fueron aneuploides por ambos métodos, 2 fueron tetraploides por ambos

métodos y 14 casos fueron diferentes, de los cuales 4 fueron diploides por citometría estática y aneuploides por citometría de flujo, 5 fueron aneuploides por citometría estática y diploides por citometría de flujo, 2 casos fueron tetraploides por citometría estática y diploides por citometría de flujo, 1 caso fue tetraploide por citometría estática y aneuploide por citometría de flujo, 2 casos fueron aneuploides por citometría estática y tetraploides por citometría de flujo (38% de analogías y 62% de diferencias) Gráfica 5).

1.6. Carcinomas Infiltrantes: De un total de 33 casos de carcinomas infiltrantes (señalados previamente), hemos encontrado que 6 casos fueron diploides tanto por citometría estática como por citometría de flujo, 5 casos fueron aneuploides por los dos métodos y 2 fueron tetraploides en ambos casos, los restantes 21 casos fueron diferentes, de los cuales 5 fueron diploides por citometría estática y aneuploides por citometría de flujo, 9 fueron aneuploides por citometría estática y diploides por citometría de flujo, 3 casos fueron tetraploides por citometría estática y diploides por citometría de flujo, 1 caso fue tetraploide por citometría estática y aneuploide por citometría de flujo, 2 casos fueron aneuploides por citometría estática y tetraploides por citometría de flujo (38% de analogías y 62% de diferencias).

2. GRUPO DE LESIONES LOBULILLARES.

2.1. Hiperplasia lobulillar sin atipias. Reclus II: De entre 30 casos de hiperplasia lobulillar sin atipias, encontramos que 15 casos fueron diploides tanto por citometría estática como por citometría de flujo y 1 caso fue aneuploide con ambas técnicas. Es decir, que encontramos un 53% de analogías. De los 14 casos restantes, 2 casos fueron diploides por citometría estática y aneuploides por citometría de flujo, otro caso fue diploide por citometría estática y tetraploide por citometría de flujo, 9 fueron aneuploides por citometría estática y diploides por citometría de flujo, 1 fue tetraploide por citometría estática y diploide por citometría de flujo y por último, 1 caso fue tetraploide por citometría estática y aneuploide por citometría de flujo, es decir que encontramos un 47% de diferencias entre ambas técnicas (Gráfica 6)

2.2. Hiperplasia lobulillar con atipias. Reclus III: Estudiamos 15 casos de hiperplasia lobulillar con atipias y encontramos que solo 6 casos fueron diploides por ambos métodos, es decir, que encontramos un 40% de analogías. De los otros casos, 2 fueron diploides por citometría estática y

aneuploides por citometria de flujo y los otros 7 restantes, fueron aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo. Es decir, que en este grupo encontramos un 60% de diferencias entre ambas técnicas (Gráfica 7).

2.3. Carcinoma lobulillar in situ: Hemos estudiado 8 casos y encontramos que solo 1 caso fue diploide y 3 aneuploides en ambos métodos, mientras que 2 casos fueron aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo y 2 casos fueron tetraploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo. Es decir, que encontramos un 50% de analogías y diferencias. (Gráfica 8)

2.4. Carcinoma lobulillar infiltrante: Solo estudiamos dos casos de carcinoma lobulillar infiltrante, que fueron aneuploides por citometria estática pero por citometria de flujo solo uno fue aneuploide. El otro fue diploide.

3. GRUPO DE LESIONES VARIAS: ADENOSIS, METAPLASIA APOCRINA Y ESCLEROSIS RADIAL.

3.1. Adenosis. De 10 casos de adenosis, solo 4 fueron diploides por ambos métodos, el resto de casos, es decir el 60% fueron diferentes, ya que 1 caso fue diploide por citometria estática y aneuploide por citometria de flujo y los 5 restantes fueron aneuploides por citometria estática pero diploides por citometria de flujo. (Gráfica 9).

3.2. Metaplasia apocrina. Los 10 casos de metaplasia apocrina, mostraban analogías en el 80% de los casos, es decir que 8 casos fueron diploides por ambos métodos, mientras que los 2 restantes, fueron aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo (Gráfica 10).

3.3. Esclerosis radial. De los 12 casos estudiados, 9 fueron diploides por ambos métodos (75% de analogías), mientras que los otros 3 fueron, 2 aneuploides por citometria estática y diploides por citometria de flujo y por ultimo, un caso fue diploide por citometria estática y aneuploide por citometria de flujo (Gráfica 11).

En el grupo de lesiones ductales, el porcentaje de casos que mostraron la misma cantidad de DNA fue bastante alta (70% aproximadamente), si excluimos al grupo de los carcinomas, en donde encontramos grandes diferencias de una técnica a otra. El estudio estadístico nos puso en evidencia que los resultados

Resultados

obtenidos por ambos grupos son homogéneos y solo encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el grupo de carcinomas ductales infiltrantes.

En el grupo de lesiones lobulillares, esta analogía fue menor (50% aproximadamente) En este grupo, el estudio estadístico si que encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los resultados obtenidos por citometría estática y los obtenidos por citometría de flujo.

En el grupo de patología varia, si excluimos al grupo de las adenosis, vemos como los resultados fueron semejantes. El estudio estadístico demostró que los resultados obtenidos por las dos técnicas fueron bastante homogéneos, puesto que no encontramos diferencias estadísticamente significativas, excluyendo a la adenosis, que si que demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

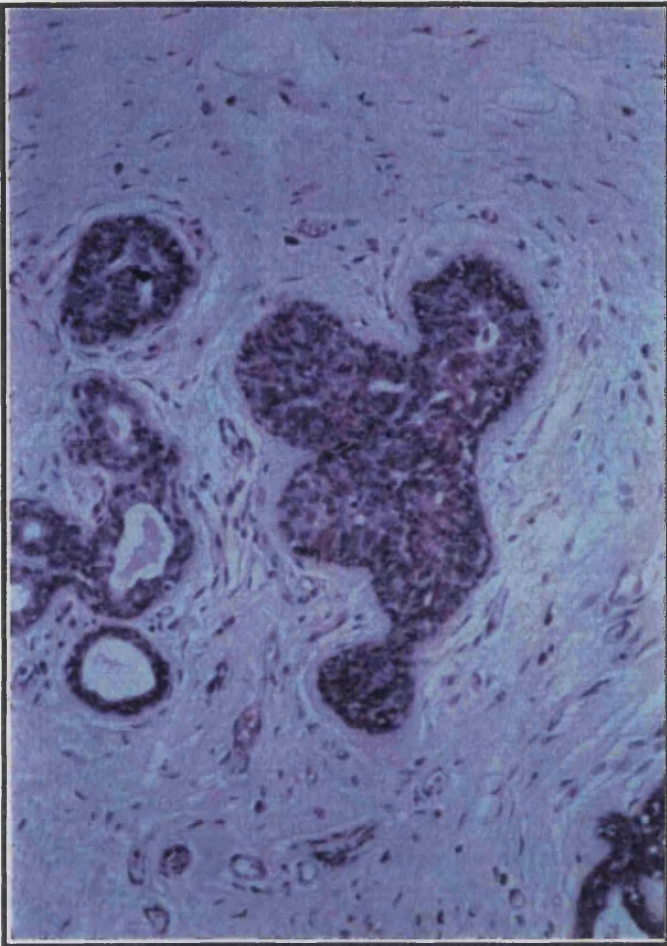
ICONOGRAFIA

Figura nº 1: Epiteliosis. Reclus II

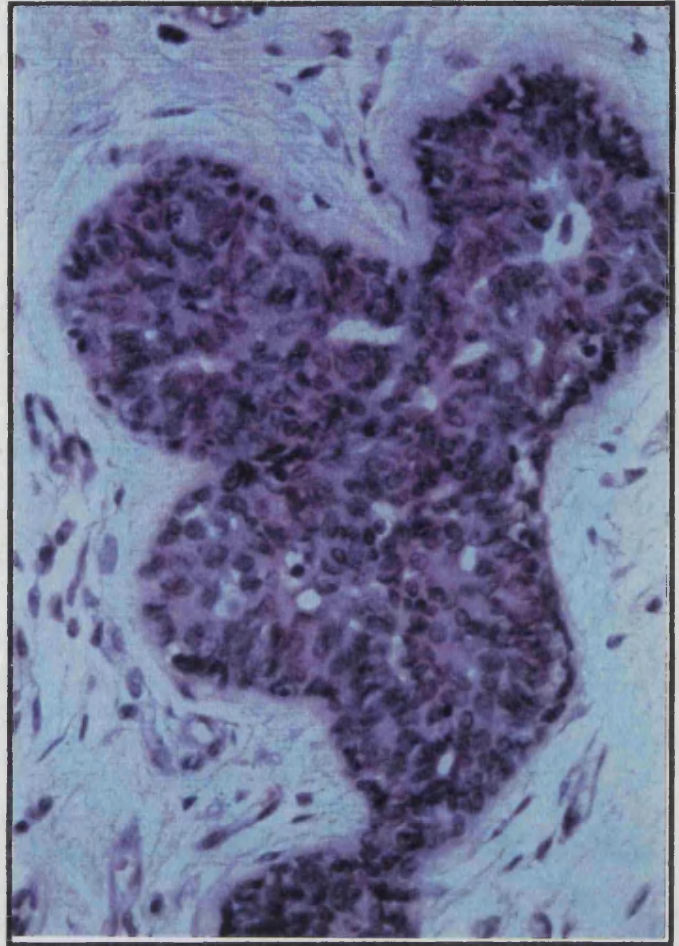
A. Ducto mamario ocupado por proliferación celular relativamente compacta que presenta pequeñas brechas intercelulares de contorno anfractuoso. H.E., 10 x

B. El ducto está ocupado por población celular heterogénea, observándose superposición celular, núcleos ovalados y núcleos fusiformes. Evidentemente las brechas intercelulares nunca son de contorno redondeado. H.E., 20 x

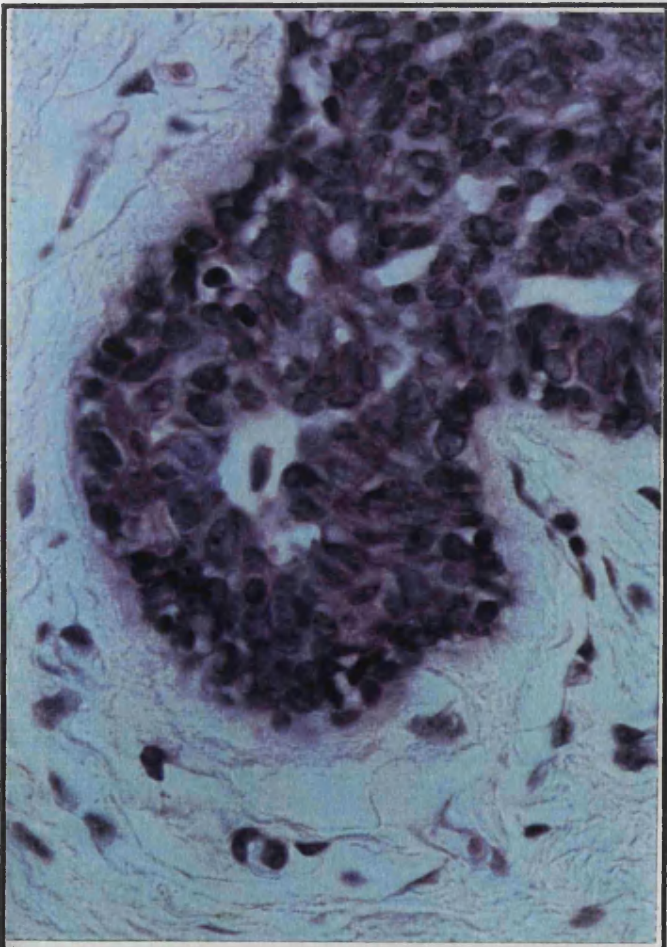
C y D. Los límites celulares son difícilmente discernibles, existiendo ostensible superposición celular y crecimiento pseudosincitial. Prácticamente ningún núcleo es redondeado y no existe hiper cromatismo nuclear. H.E., 40 x



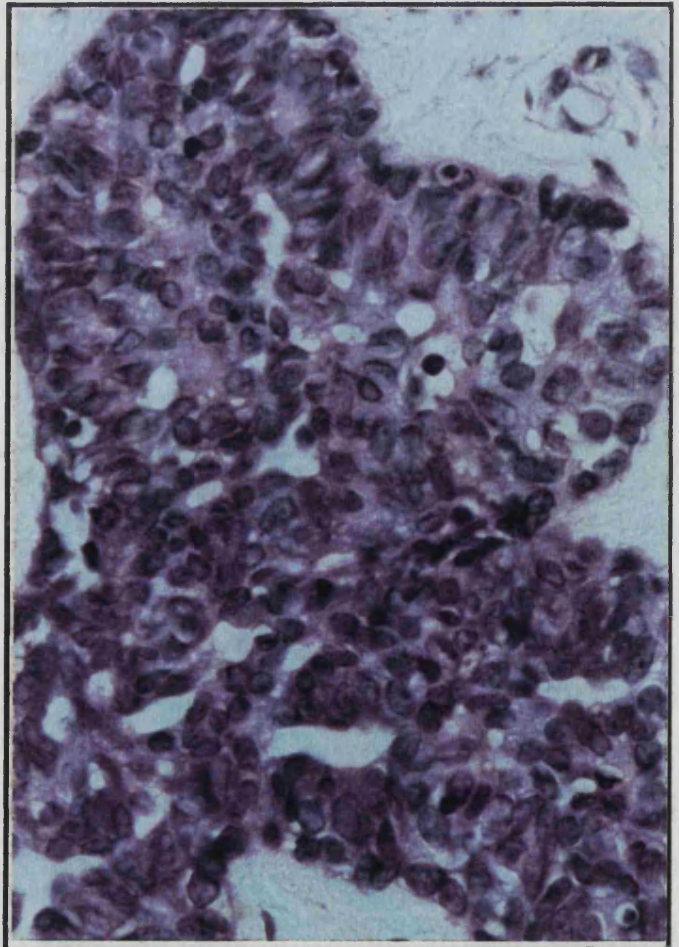
A



B



C



D

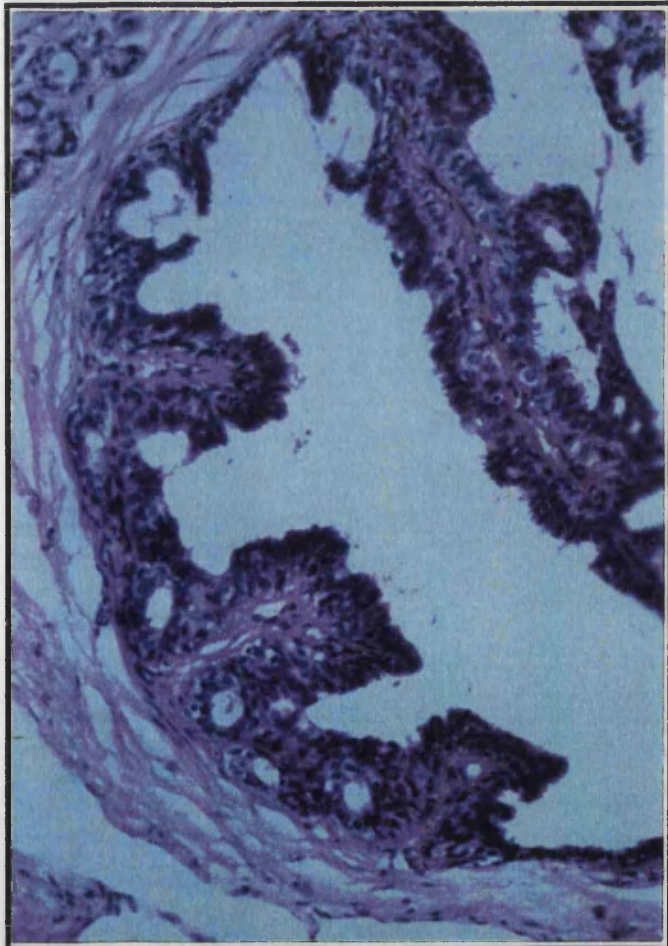
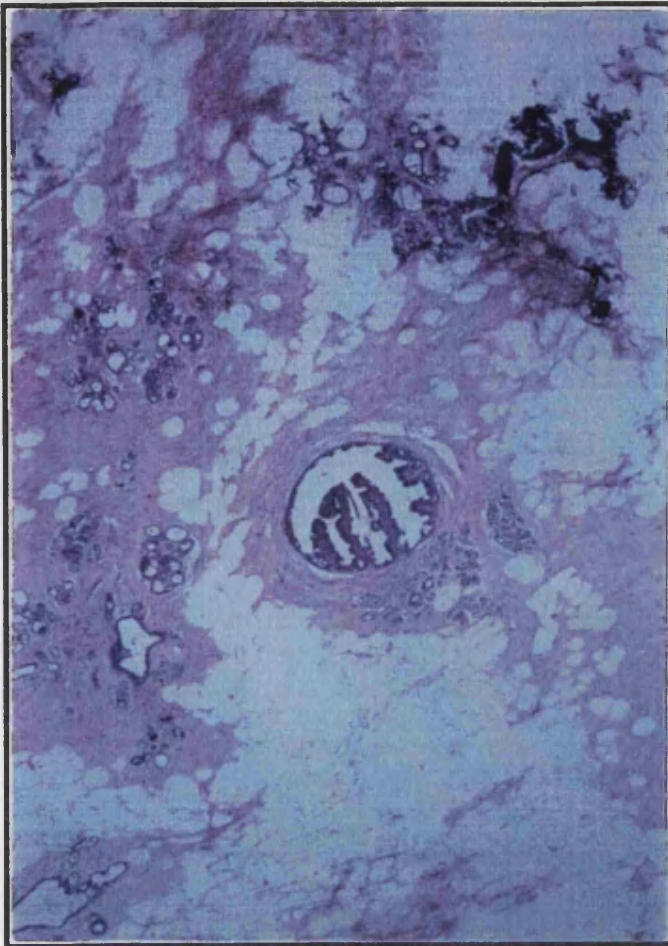
Figura nº 2: Papilomatosis. Reclus II

A. Luz ductal distendida que alberga proyecciones papilíferas. H.E., 2,5 x

B. Proyecciones revestidas por un epitelio prismático, existiendo así mismo, luces glanduliformes en la base del tallo vasculo-conectivo de las mismas. H.E., 10 x

C. Pronunciada pseudoestratificación epitelial y clara delimitación mioepitelial, tanto en las proyecciones papilíferas como en las estructuras glanduliformes. H.E., 20 x

D. Epitelio hiperplásico en el extremo apical que muestra varias células de espesor, observándose brechas intercelulares de contorno anfractuoso y superposición celular con límites intercelulares imprecisos. H.E., 63 x



A

B

C

D

Figura nº 3: Hiperplasia lobulillar sin atipias, con atipias, Ca. lobulillar in situ

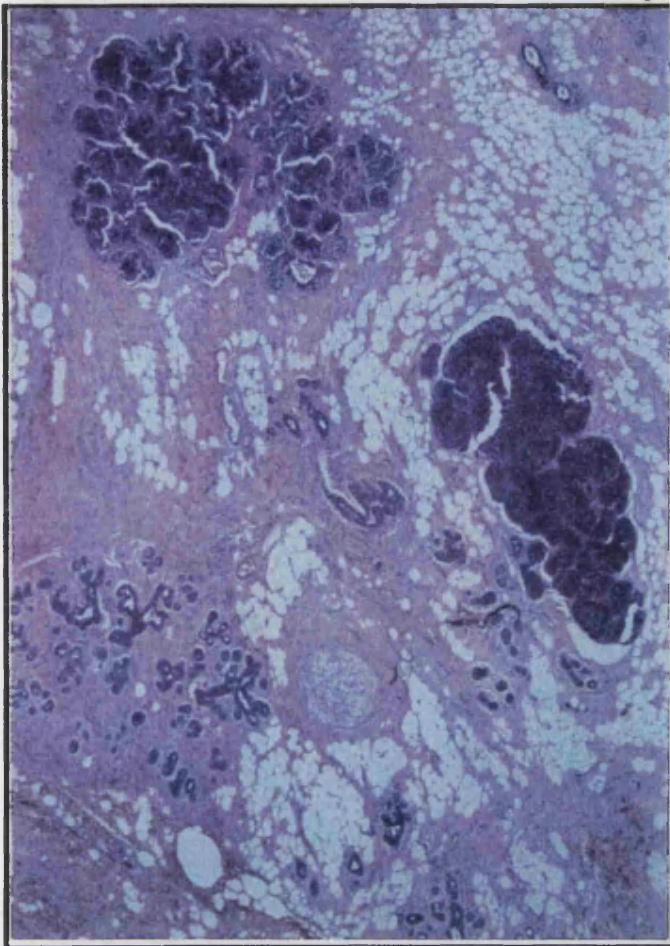
A. En el ángulo inferior izquierdo existe unidad lobulillar aumentada de tamaño con incremento del número de acinos lobulillares. En el ángulo superior izquierdo se aprecia lobulillo dotado de acinos de contorno irregular parcialmente distendidos por la presencia de agregados celulares basófilos. Finalmente, a la derecha de la imagen, existe lobulillo con acinos de contorno romo que están marcadamente distendidos y prácticamente obliterados por población de células pequeñas. H.E., 2,5 x

B. Detalle del ángulo inferior izquierdo, observándose aumento del número de acinos en el estroma lobulillar especializado. H.E., 10 x

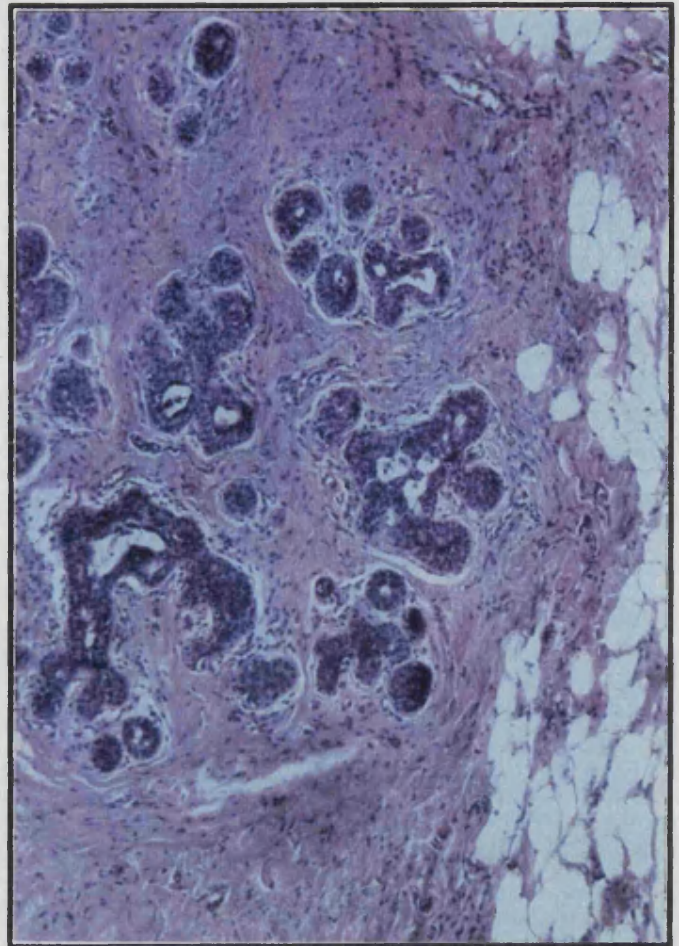
C. Proliferación ordenada de células cuboidales con óptima delimitación mioepitelial. H.E., 40 x

D. Los núcleos muestran una fina trama cromatínica con pequeños cromocentros. H.E., 63 x

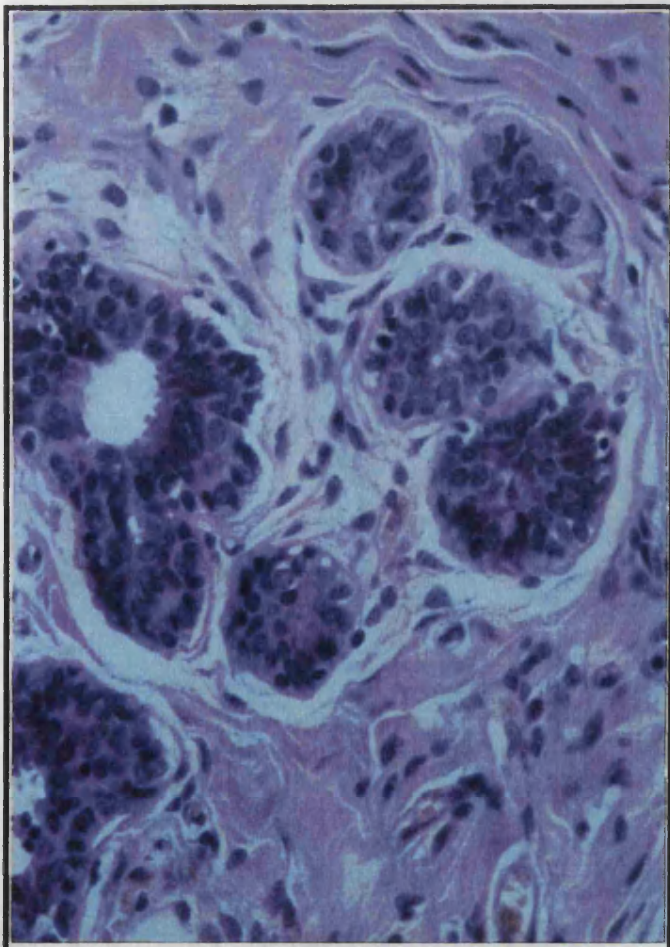
Figura nº 3



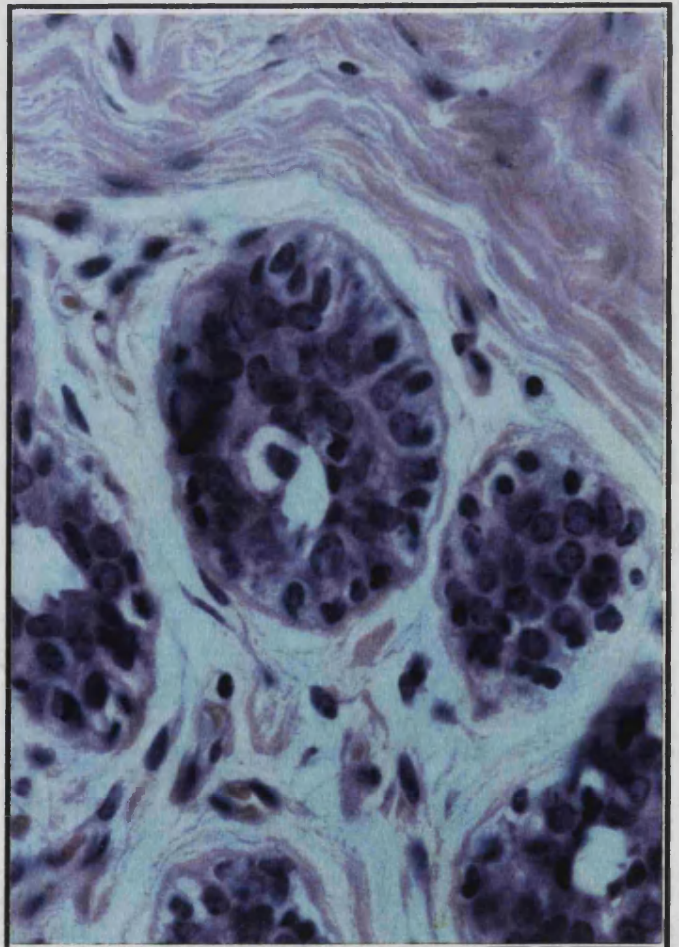
A



B



C



D

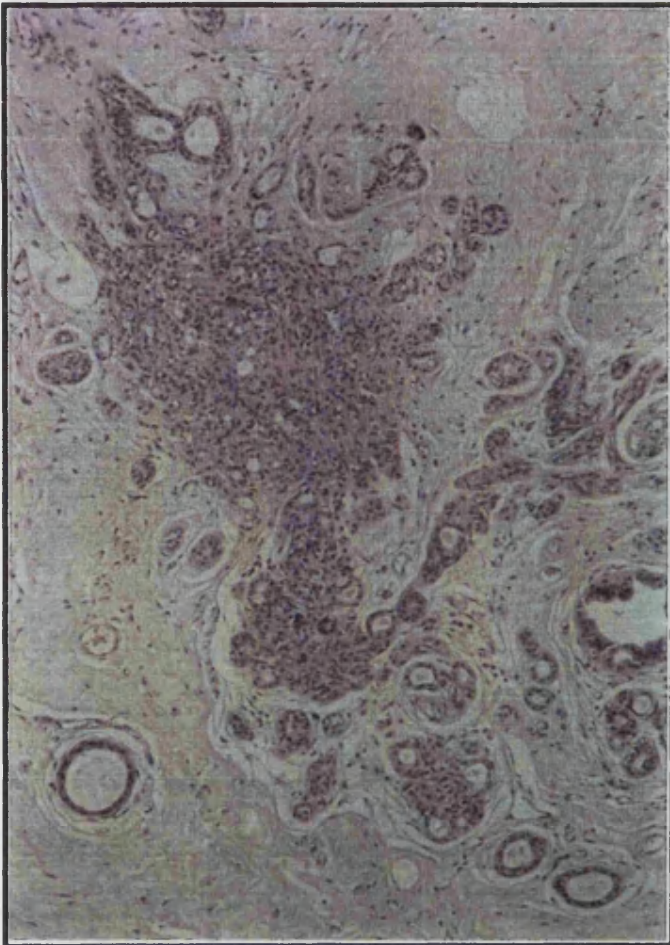
Figura nº 4 Esclerosis radial y Metaplasia apocrina.

A. Pequeña zona de adenosis esclerosante rodeada por abundante cantidad de tejido conectivo fibroso denso hialino. H.E., 2,5 x

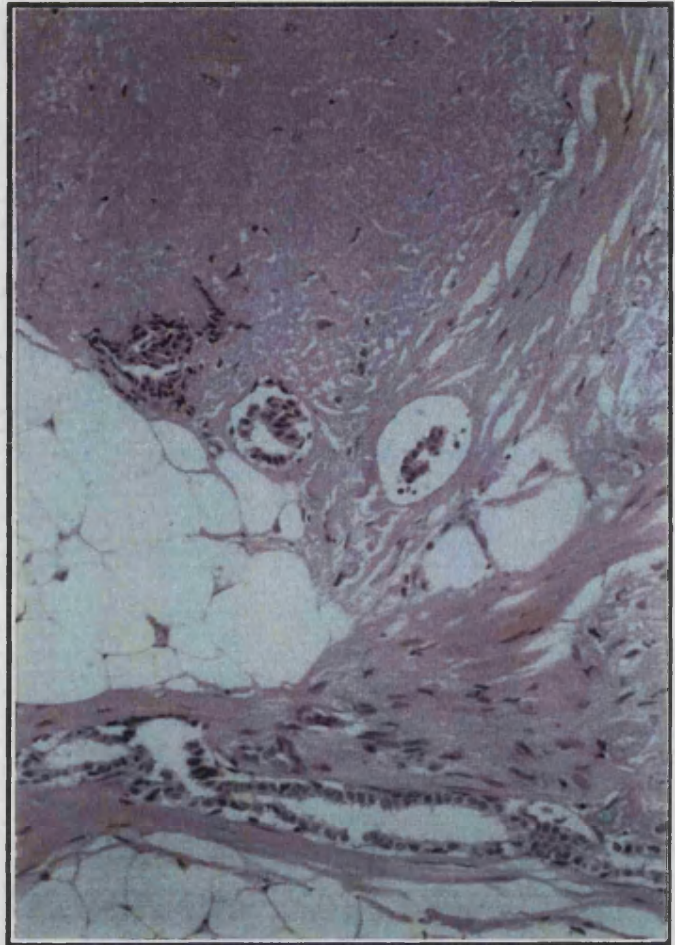
B. Corresponde a la zona cicatricial, observándose tejido conectivo fibroso denso hialino con elastosis, existiendo estructuras tubuliformes distorsionadas que se asemejan, en cierta medida, a las del carcinoma tubular. No obstante, en el conducto elongado del margen inferior existe delimitación mioepitelial. H.E., 10

C. Ducto parcialmente distendido que presenta células cuboidales y prismáticas de citoplasma oxífilo y núcleo redondeado. Existe cambio papilar apocrino (excrecencias intraluminales papilíferas carentes de estroma vasculo-conectivo). H.E., 20 x

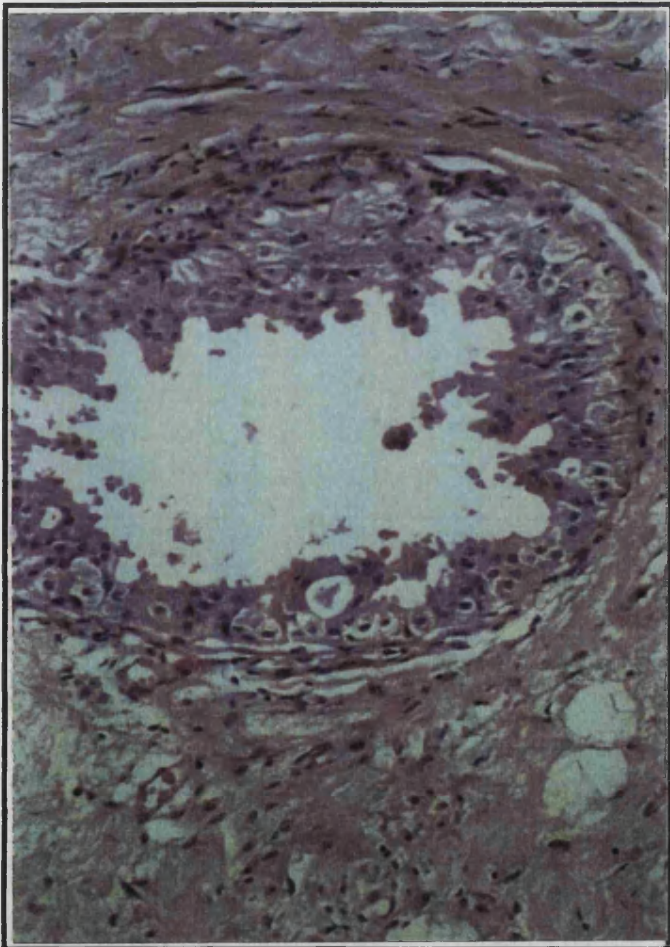
D. Excrecencia papilífera que contiene células prismáticas y poligonales que presentan el característico citoplasma oxífilo con un fino punteado granular y un núcleo redondo. H.E., 63 x



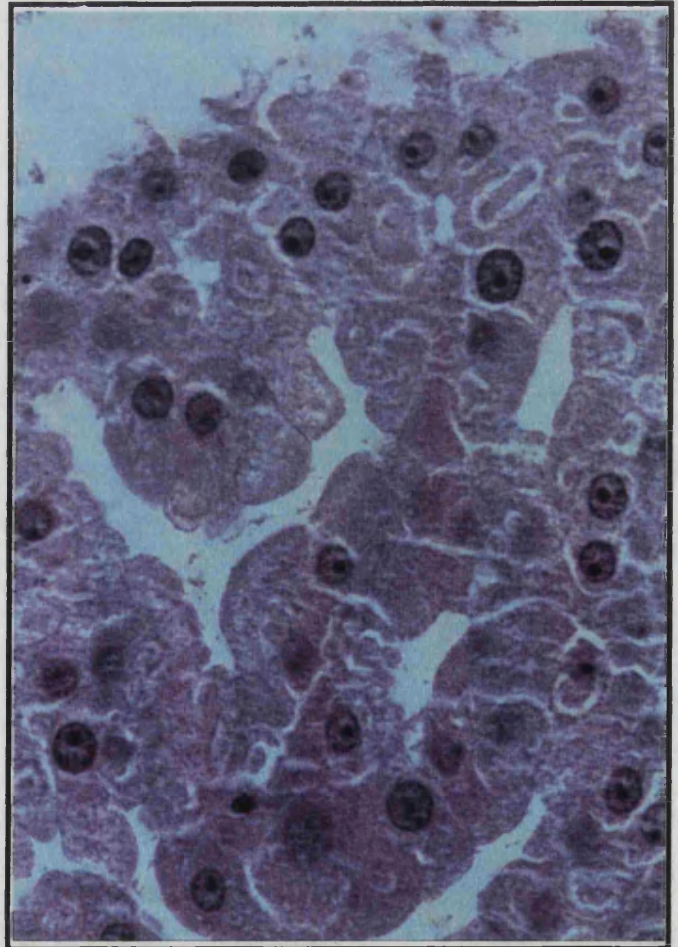
A



B



C



D

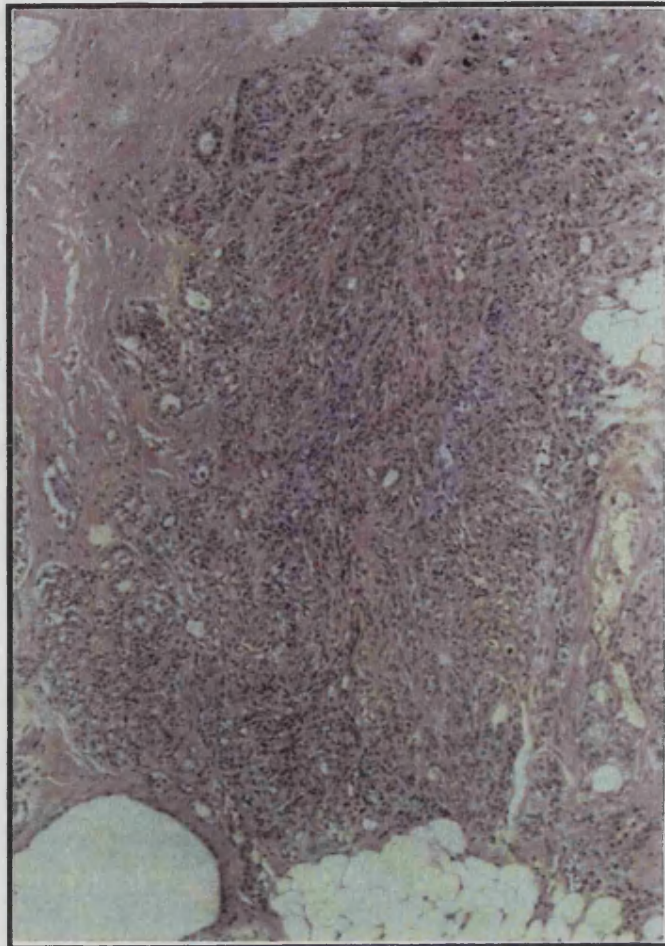
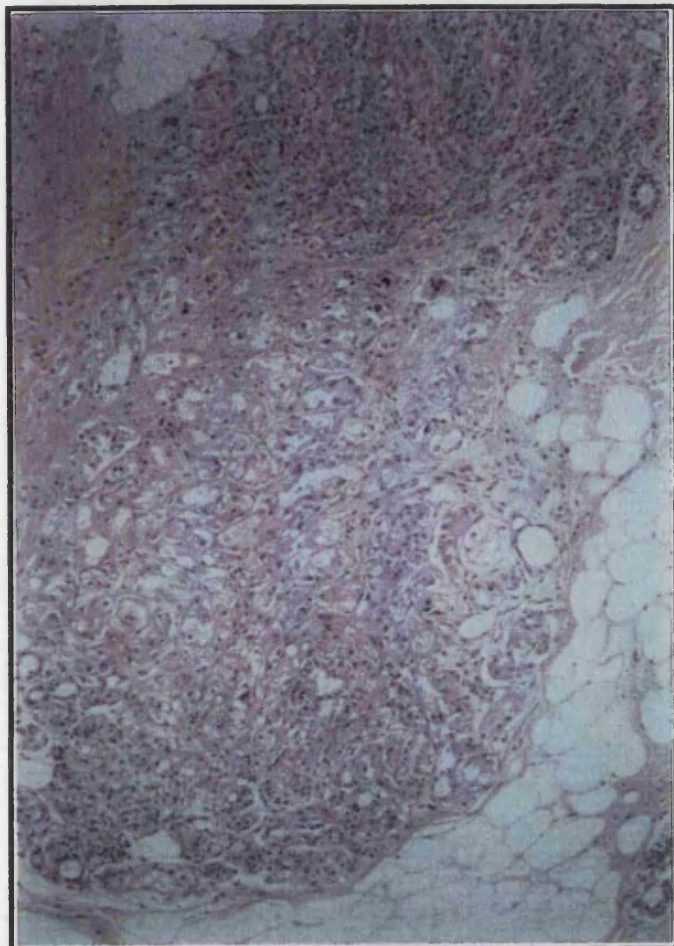
Figura nº 5: Adenosis esclerosante.

A. Zona hipercelular abigarrada que presenta pequeñas luces en las porciones más periféricas de la lesión (situación característica en este tipo de lesión). HE 10 x

B. En el tercio inferior existe zona de hipercelularidad con escasa trama glandular. Las luces glandulares son más abundantes en los dos tercios superiores. H.E., 10 x

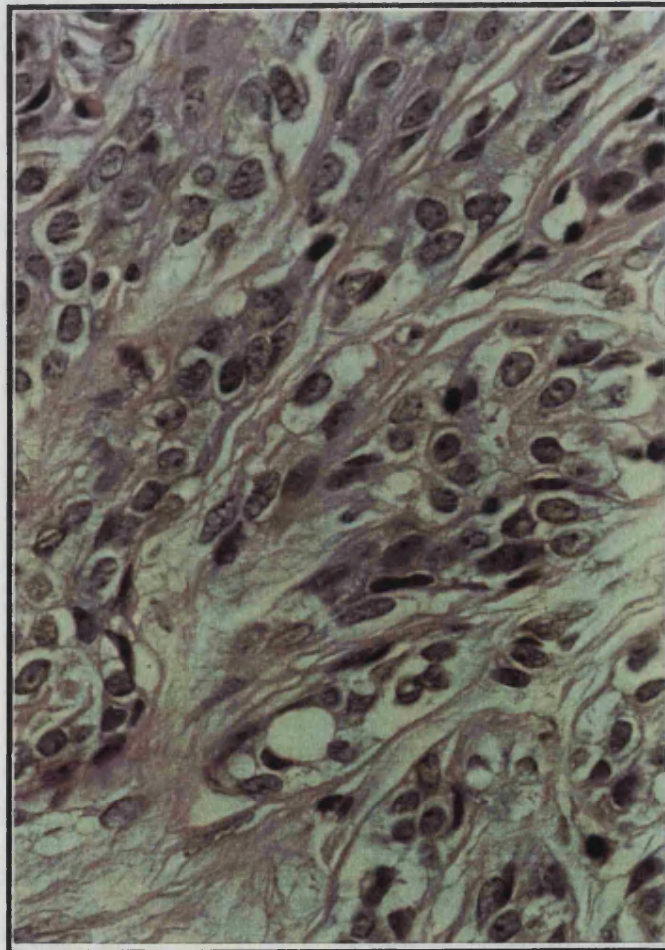
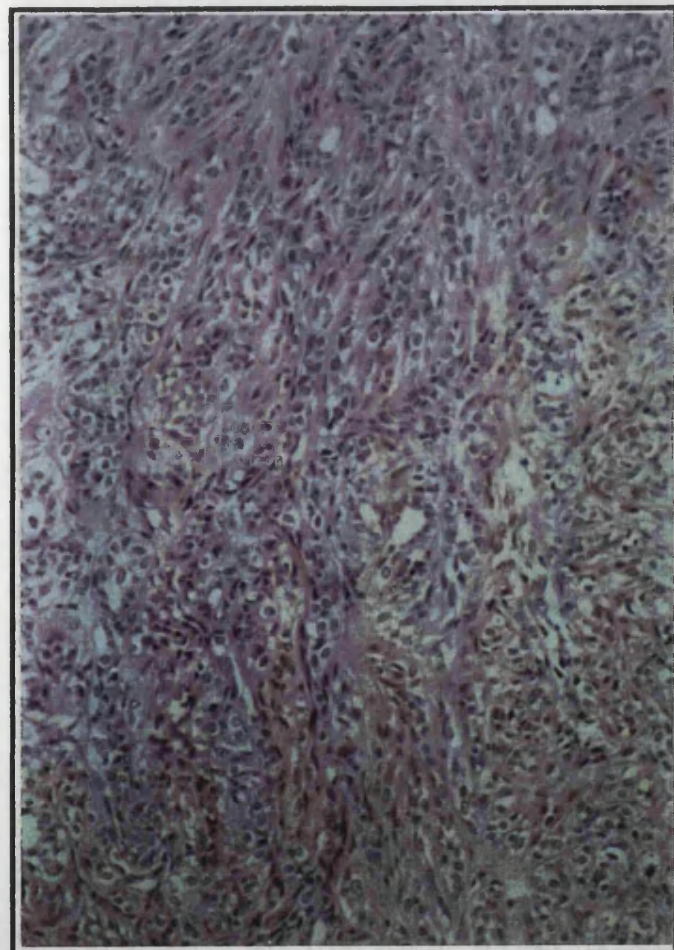
C. Se aprecia la alternancia de células fusiformes, cordones compactos de células epiteliales claras y luces glandulares delimitadas por células cuboidales acinares. No existe hipercromatismo nuclear ni atipia. H.E. 20 x

D. Los canalículos presentan una delimitación mioepitelial irregular. Entre las células epiteliales existen abundantes elementos estromales (¿mioepiteliales?) fusiformes cuya proliferación distorsiona al componente epitelial. H.E., 40 x



A

B



C

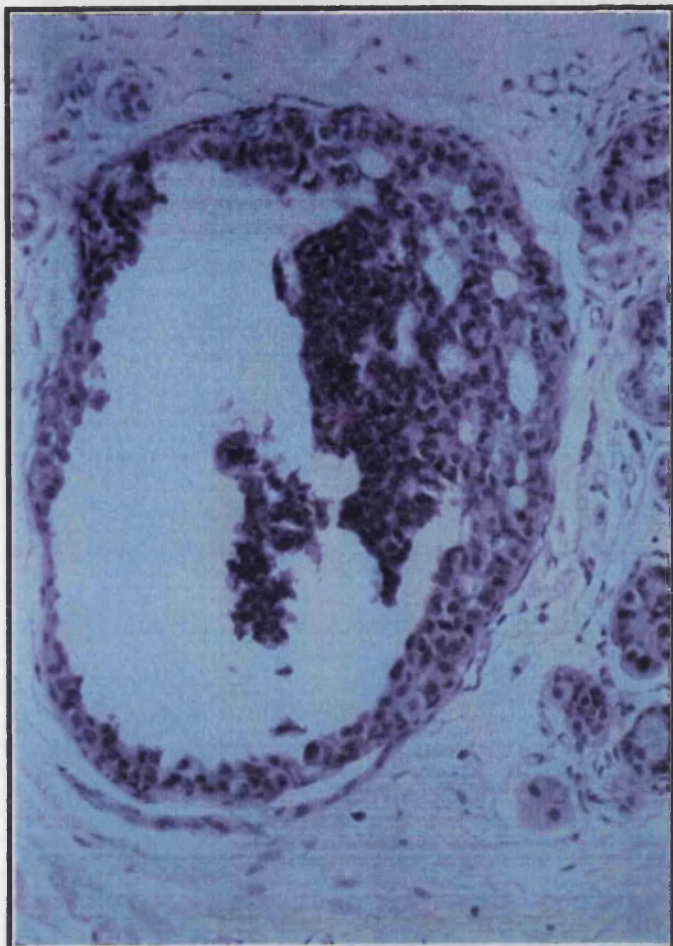
D

Figura nº 6: Hiperplasia ductal con atipias. Reclus III.

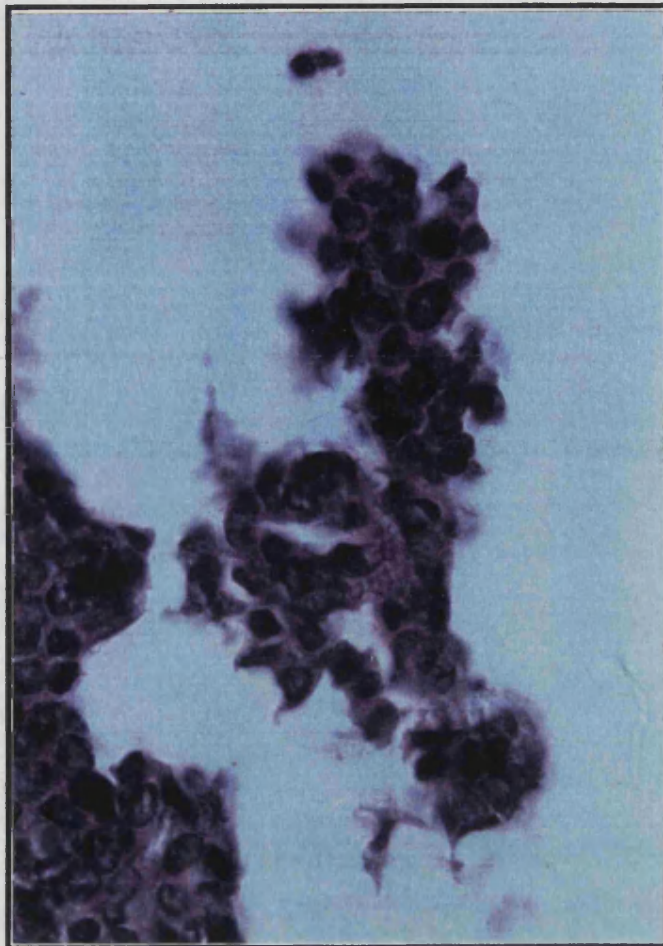
A. En una única luz ductal se aprecia una franja celular de espesor variable que presenta orificios predominantemente redondeados y una excrecencia hipercelular con hiper Cromatismo nuclear. H.E., 10 x

B. Detalle de la porción central. Obsérvese el pronunciado hiper Cromatismo nuclear. H.E. 20 x

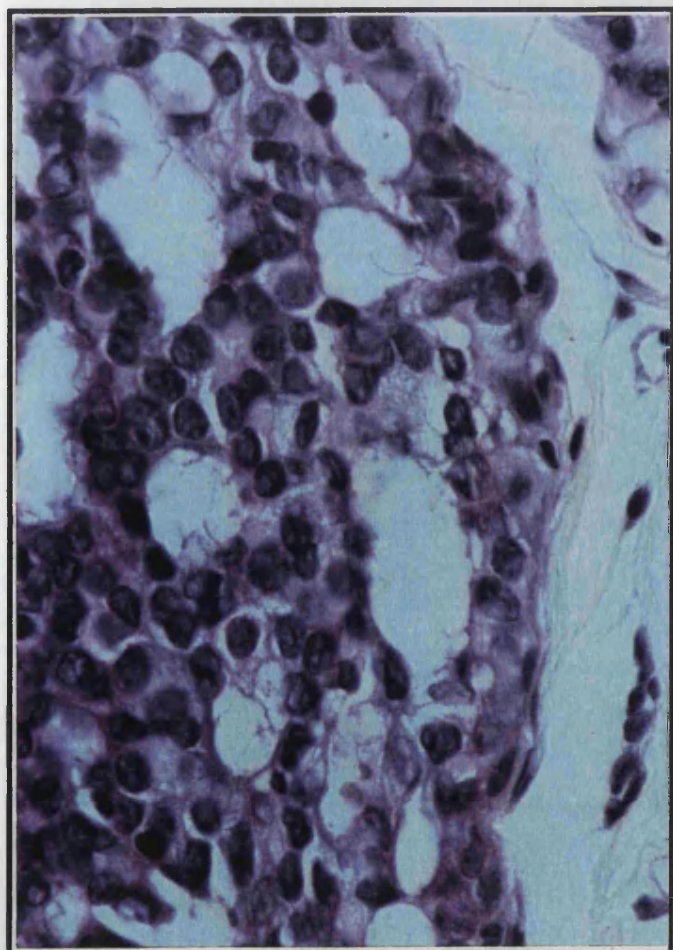
C y D. Se aprecia una tendencia a la organización cribiforme con luces delimitadas por células cuboidales relativamente homogéneas, de límites precisos y núcleos hiper Cromáticos redondeados. No existen células fusiformes. Las estructuras epiteliales carecen de soporte estrómic. H.E. 40 x



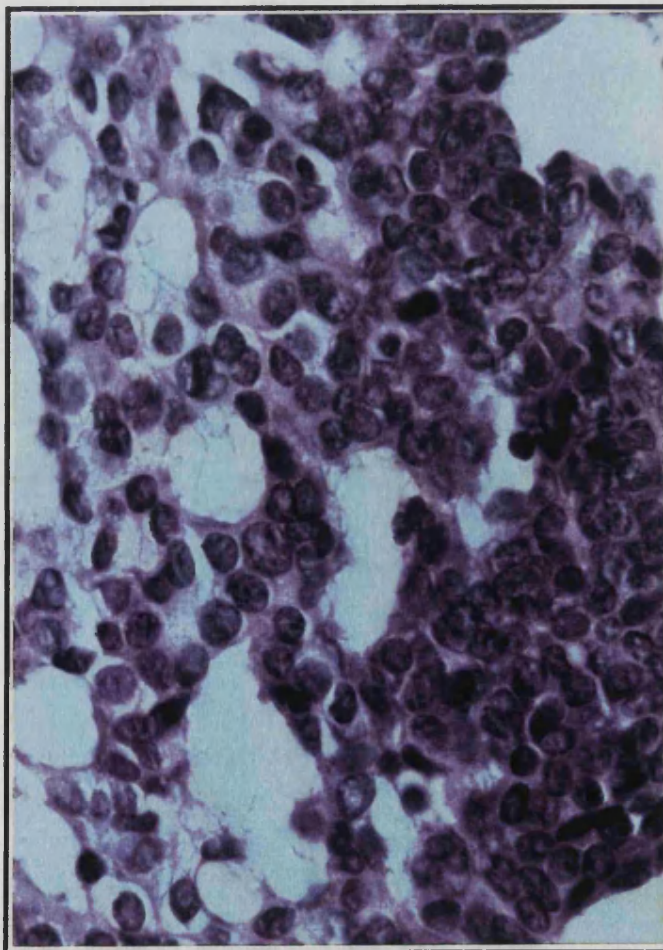
A



B



C



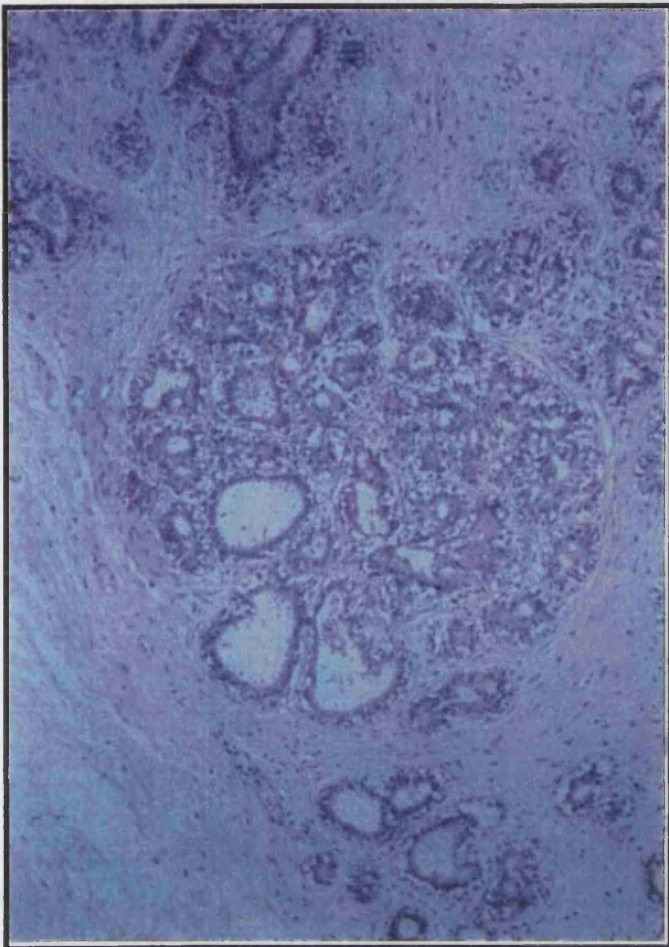
D

Figura nº 7: Hiperplasia lobulillar atípica de células claras.

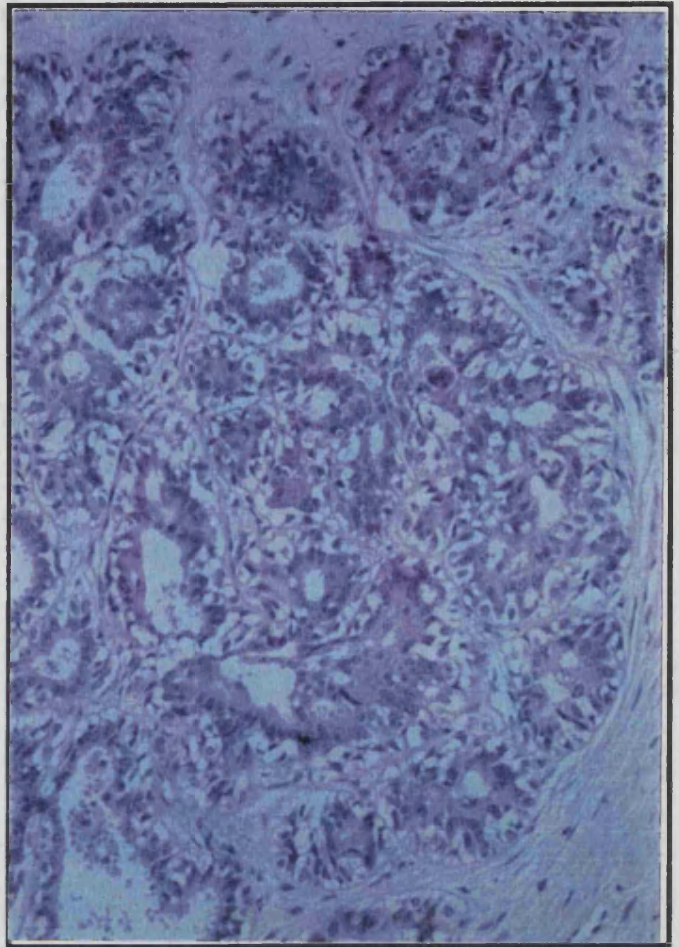
A. Lobulillo agrandado con acinos parcialmente obliterados. H.E., 10 x

B. Los acinos están parcialmente distendidos y muestran pequeñas luces.
H.E. , 20 x

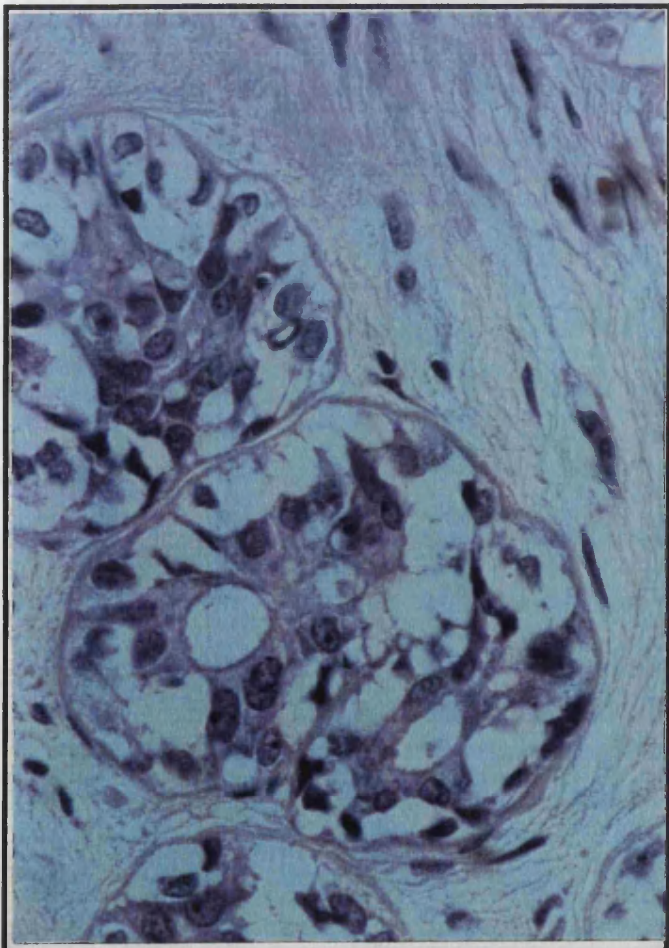
C y D. Dichos acinos contienen células poligonales de amplio citoplasma claro y núcleo predominantemente redondeado de cromatina homogénea con pequeños cromocentros. H.E., 40 x



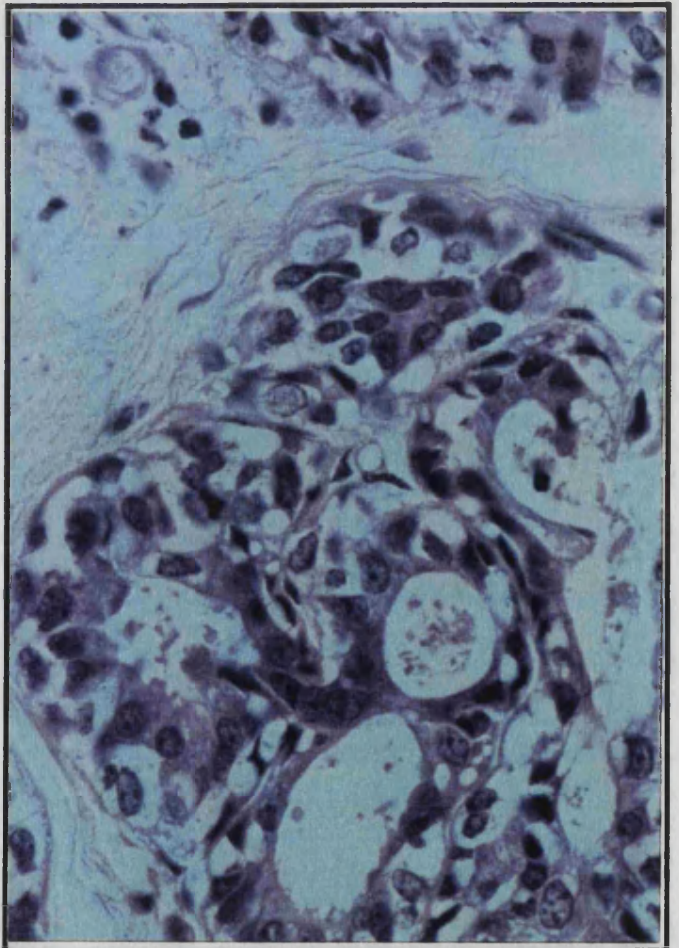
A



B



C



D

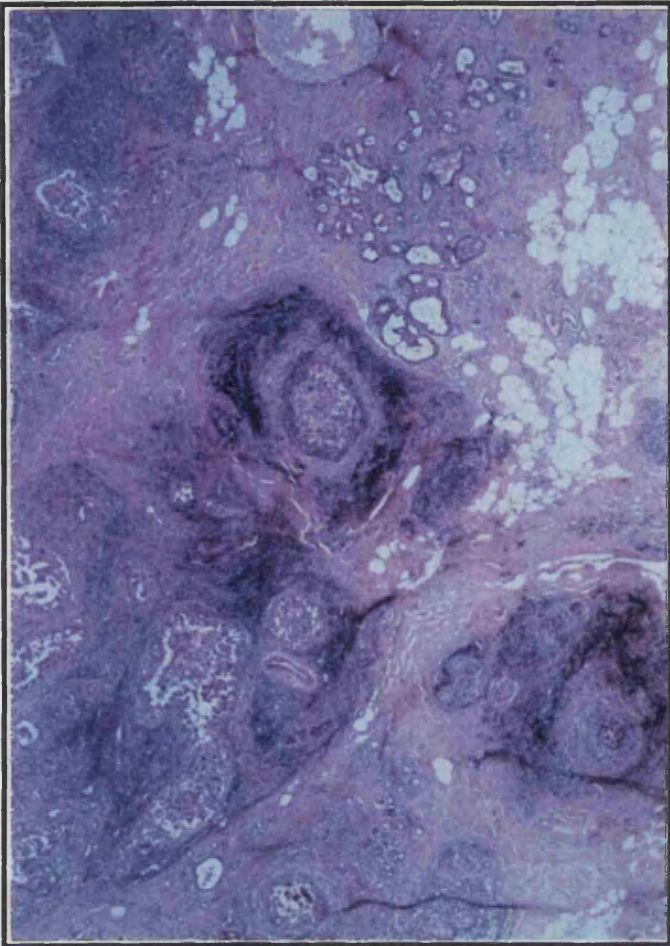
Figura nº 8: Carcinoma intraductal de tipo comedo.

A. Ductos ocupados por proliferación epitelial irregular y material necrótico central. H.E., 2,5 x

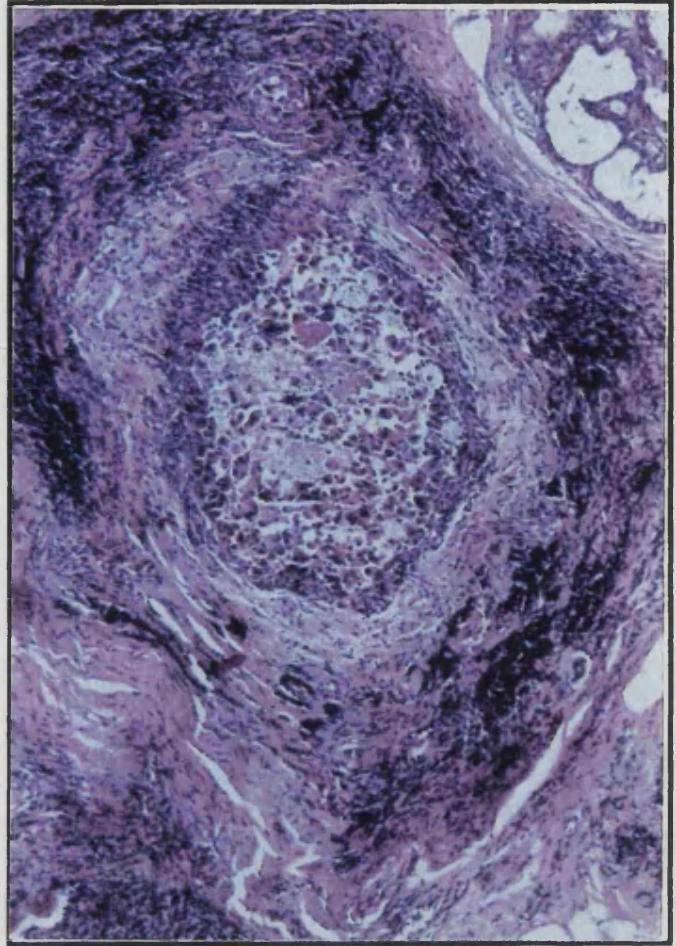
B. En las porciones periféricas del ducto se aprecian células de citoplasma oxífilo y núcleos hipercromáticos bizarros acompañados por restos celulares picnóticos y material necrótico en las porciones centrales. Las células neoplásicas no rebasan la basal. H.E., 20 x

C. Obsérvese la intensa necrosis central. H.E., 40 x

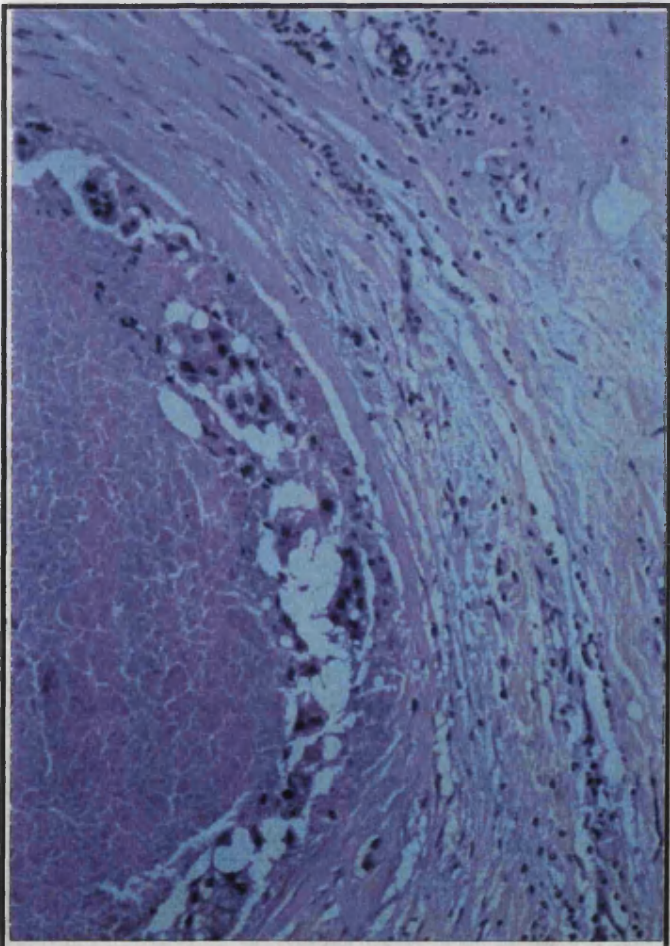
D. Puede comprobarse el intenso pleomorfismo y atipia nuclear. H.E. 100 x



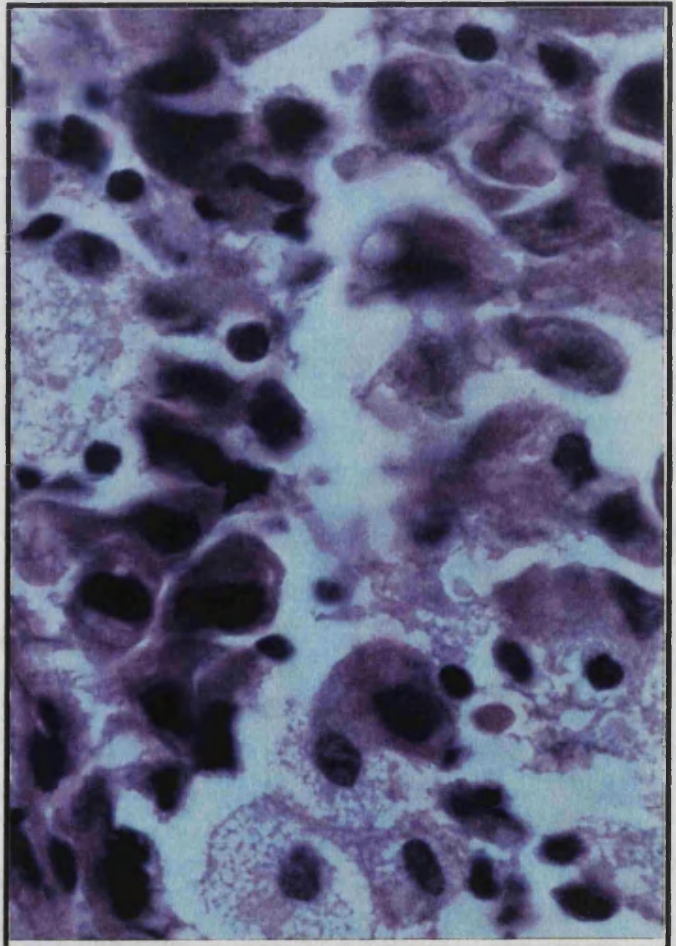
A



B



C



D

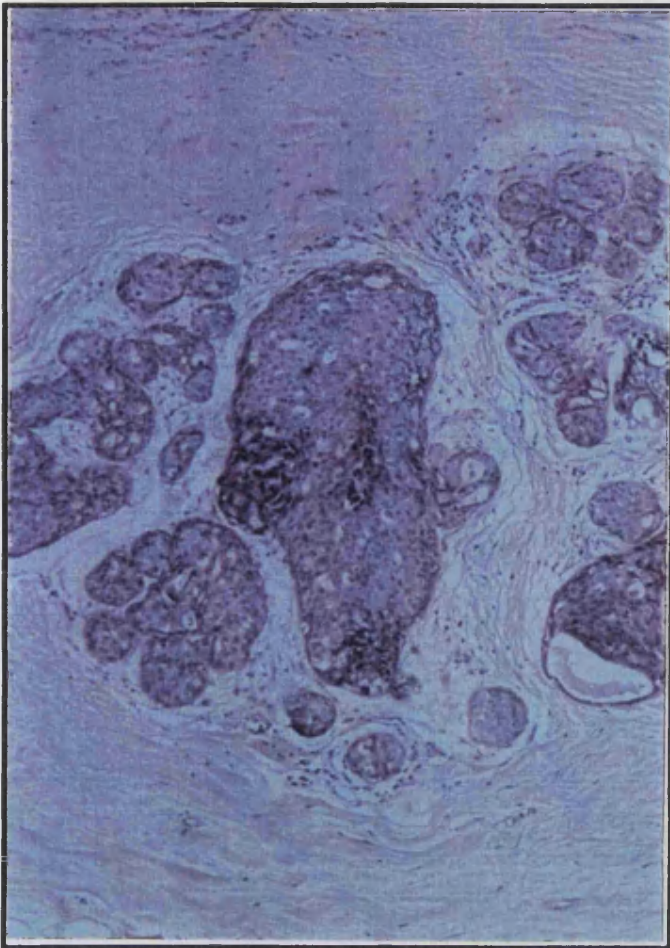
Figura nº 9: Carcinoma intraductal de tipo sólido.

A. Se aprecia un ducto y acinos lobulillares distendidos por neoformación carcinomatosa. H.E., 10 x

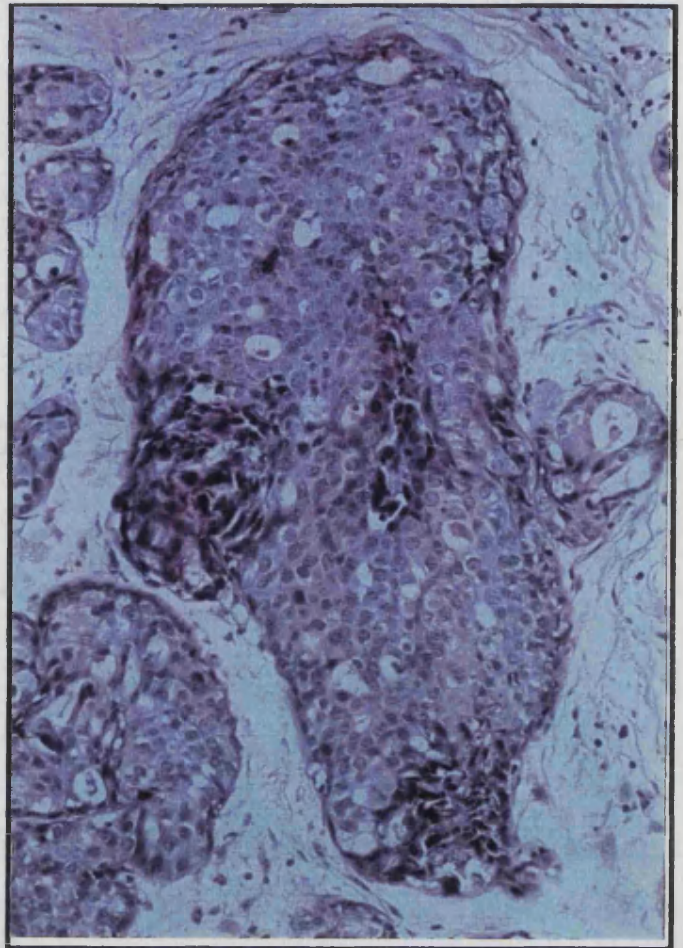
B. Ducto ocupado por una población de grandes células con anisocitosis moderada que crece según un patrón predominantemente sólido (aunque se observan ocasionales luces de pequeño tamaño y contorno romo). H.E., 20 x

C. Células carcinomatosas de contorno poligonal identificable, citoplasma vacuolado, núcleo vesicular con uno o varios nucleolos. En los extremos diagonalmente opuestos existen dos pequeños grupos de células con núcleo picnótico-hipercromático y citoplasma oxífilo. H.E., 40 x

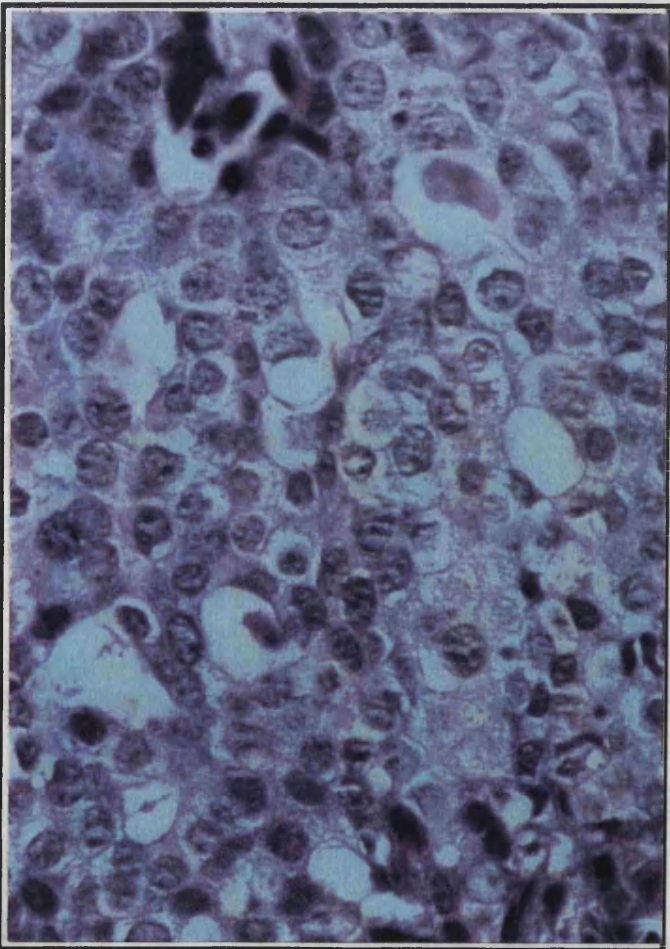
D. Obsérvese una pequeña luz delimitada por células dotadas de un prominente núcleo con ostensibles nucleolos. Células de núcleo hipercromático aparentemente picnótico con citoplasma retraído. H.E., 40x



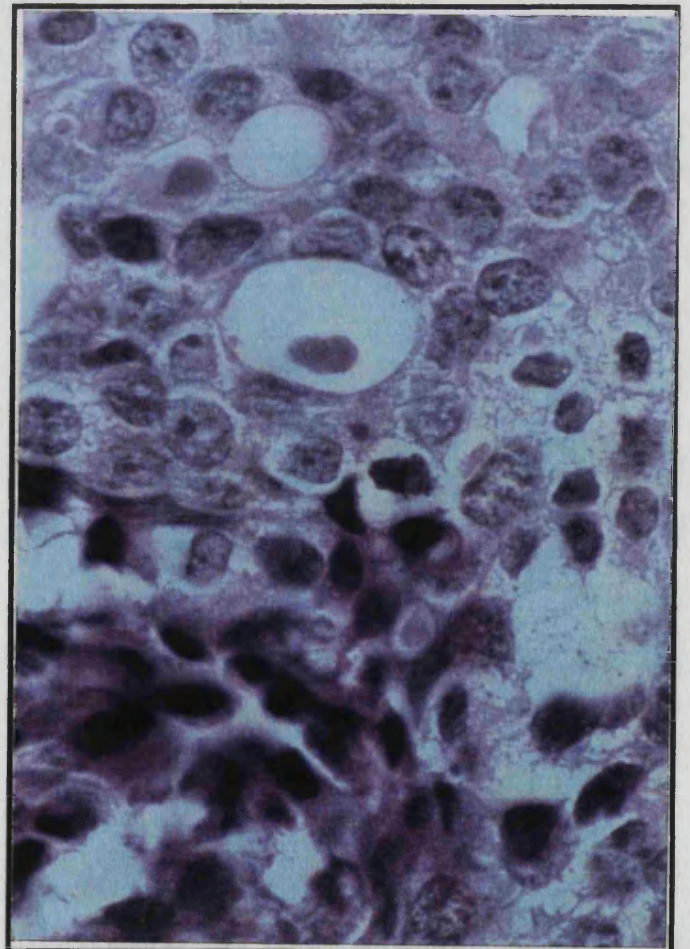
A



B



C



D

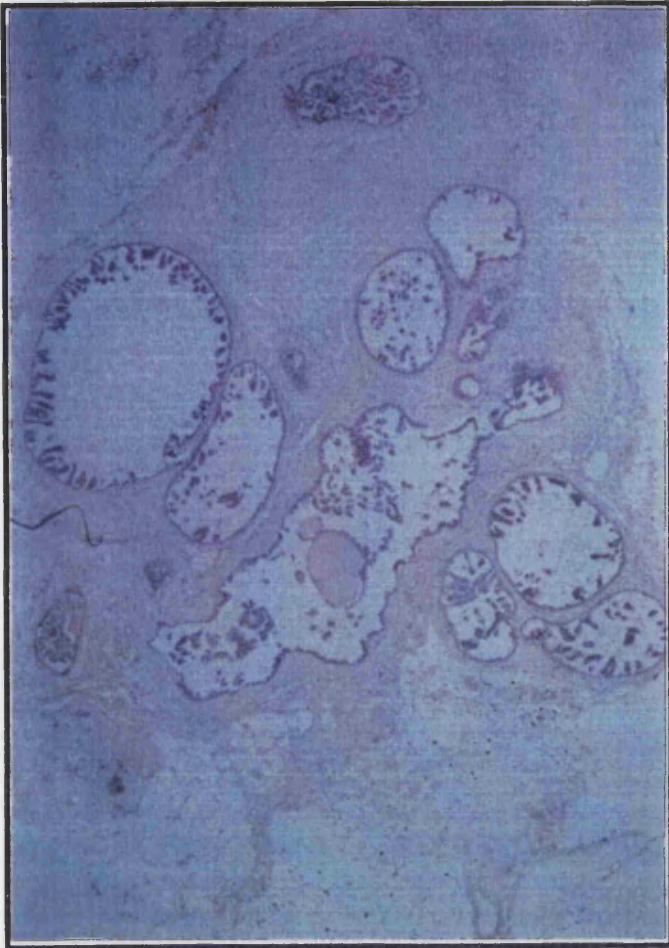
Figura nº 10: Carcinoma intraductal de tipo micropapilar.

A. Ductos distendidos que presentan cortas proyecciones intraluminales perpendicularmente dispuestas con respecto a la basal ductal. H.E., 2,5 x

B. Tales proyecciones están constituidas por una única población celular que presenta hipercromatismo nuclear (con las características barras trabeculares). A este aumento ya puede comprobarse que carecen de estroma vasculo-conectivo. H.E., 10 x

C. Obsérvese cómo la base de implantación de dichas barras trabeculares es más estrecha que el vástago y también cómo el extremo apical es bulboso y de mayor anchura. Se comprueba la ausencia de estructuras estrómicas. H.E., 20 x

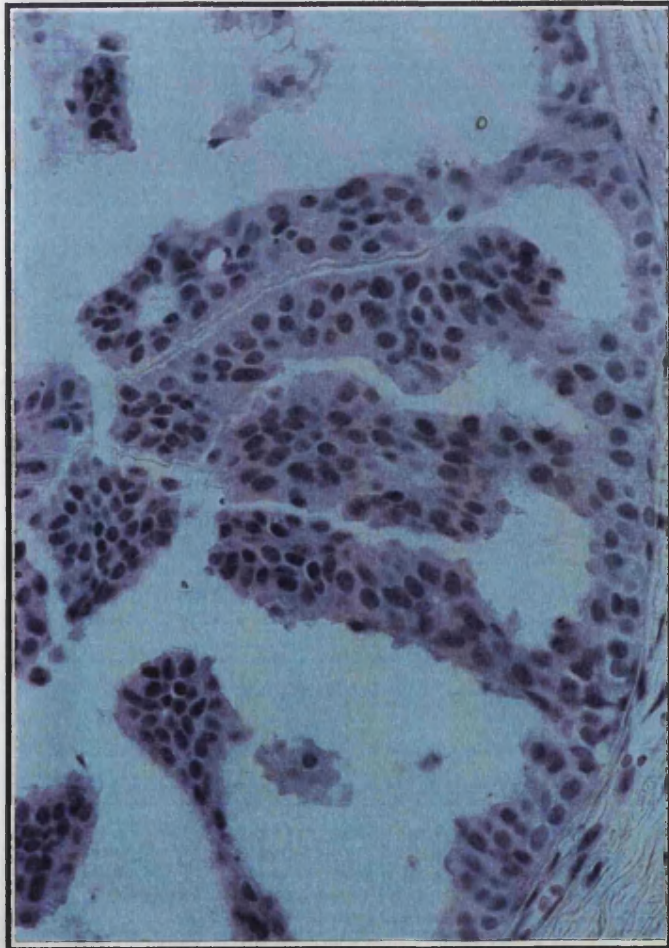
D. Existe monotonía citológica y núcleos homogéneos con un pequeño nucleolo. H.E., 40 x



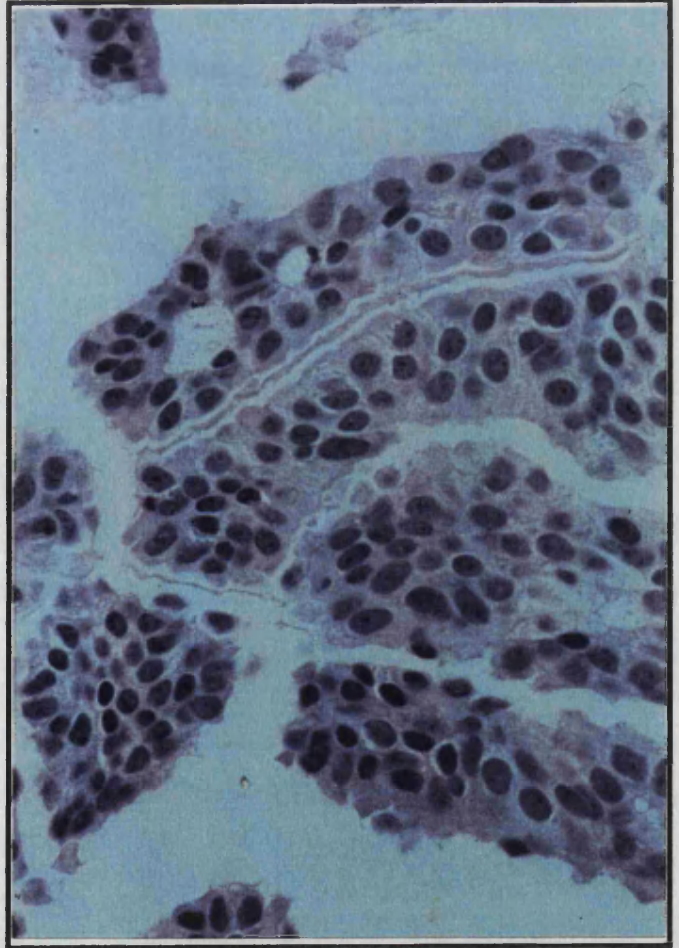
A



B



C



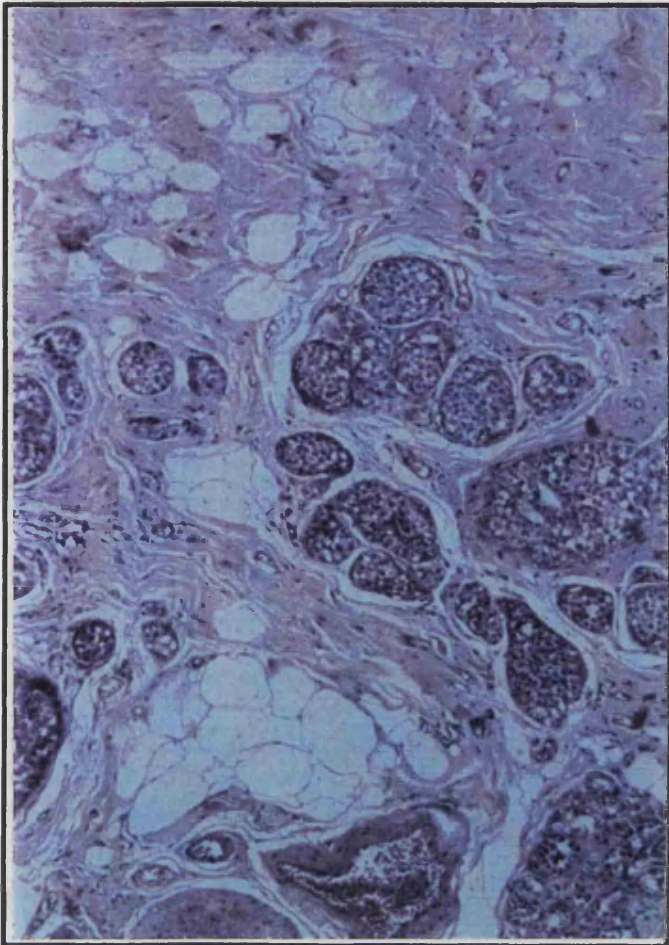
D

Figura nº 11: Carcinoma lobulillar in situ.

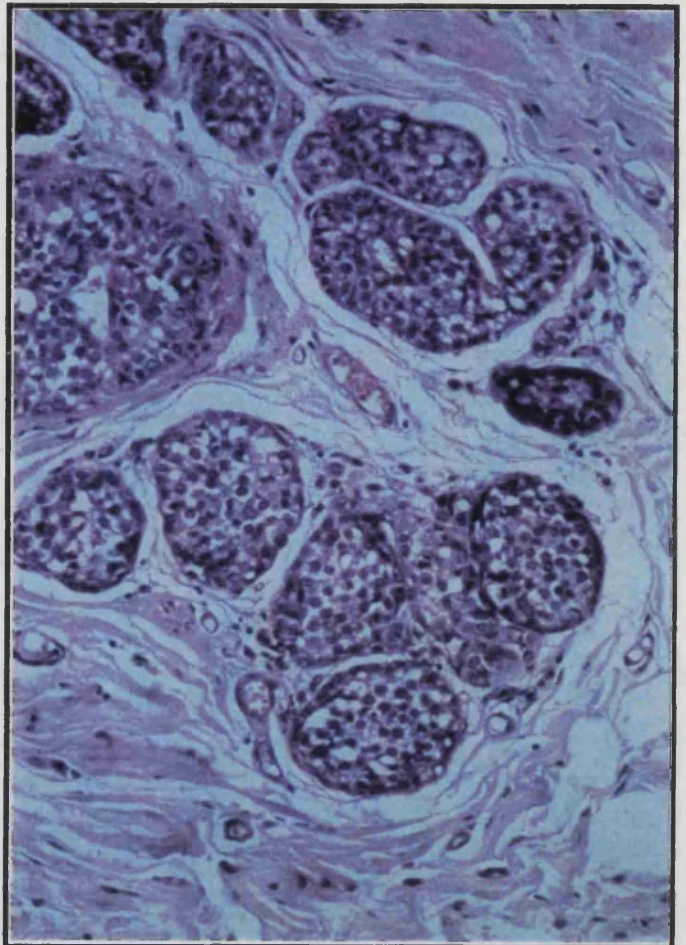
A. Acinos lobulillares distendidos de contorno periférico romo que están ocupados por una población celular homogénea. H.E., 10 x

B. Obsérvese la característica morfología en saco de perdigones(núcleos redondos de tamaño homogéneo instalados sobre un fondo claro). H.E., 20 x

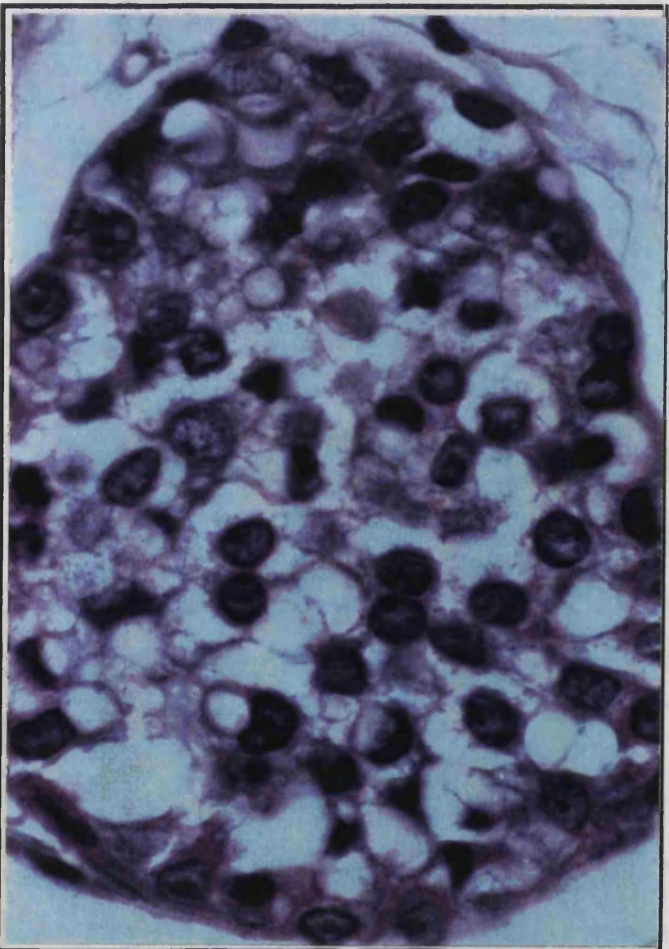
C y D. Las células neoplásicas presentan contornos poligonales, citoplasma translúcido y núcleo redondeado con pequeños nucleolos. H.E., 63 x



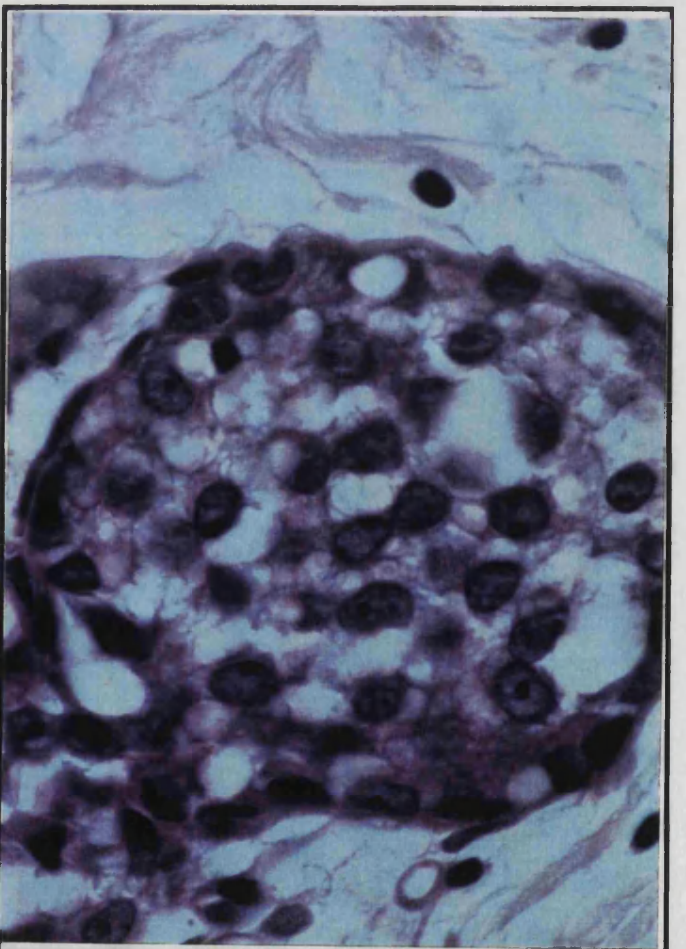
A



B



C



D

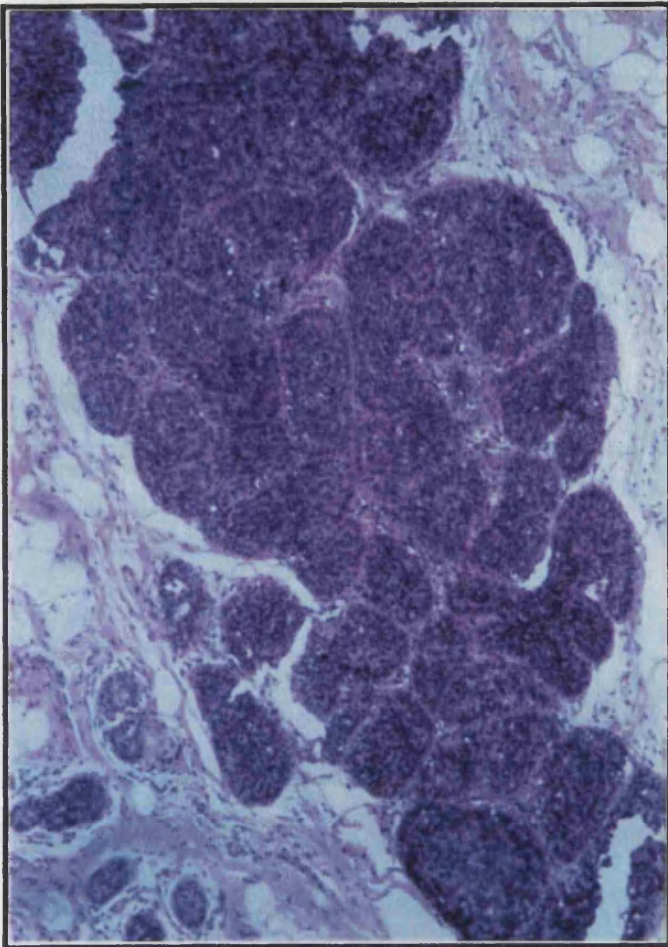
Figura nº 12: Carcinoma lobulillar in situ.

A. Acinos lobulillares distendidos por la presencia de pequeñas células. H.E., 10 x

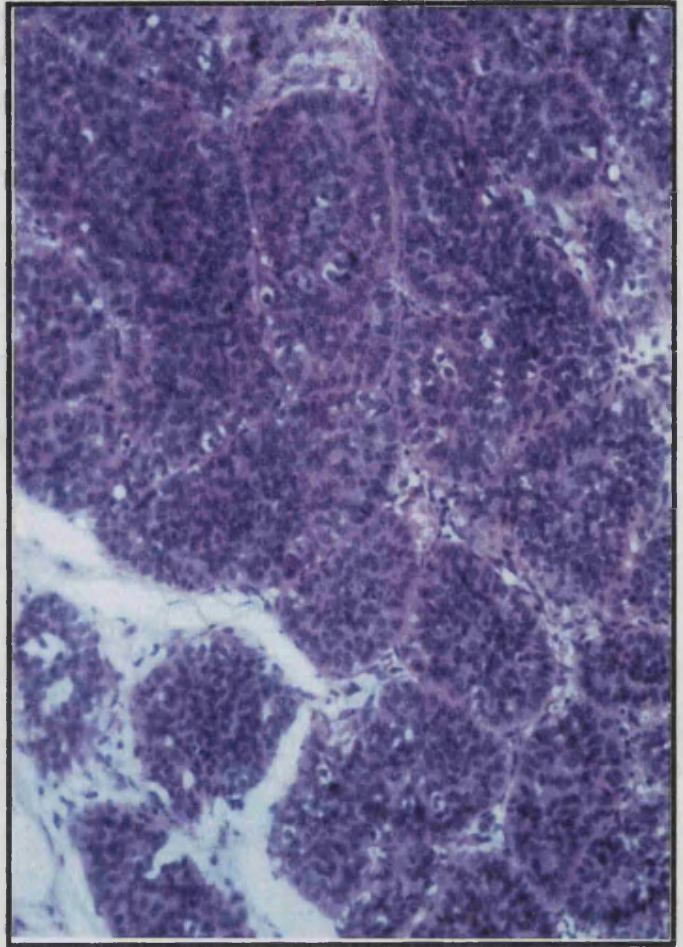
B. En las porciones periféricas algunos acinos todavía presentan pequeñas luces intercelulares (signo morfológico de la hiperplasia lobulillar atípica pre-existente). H.E., 20 x

C. Aun cuando no existe la monotonía citológica propia del carcinoma lobulillar in situ convencional ni la clásica morfología acinar en "saco de perdigones", la ocupación de los acinos es completa y la distensión es muy pronunciada. H.E., 40x

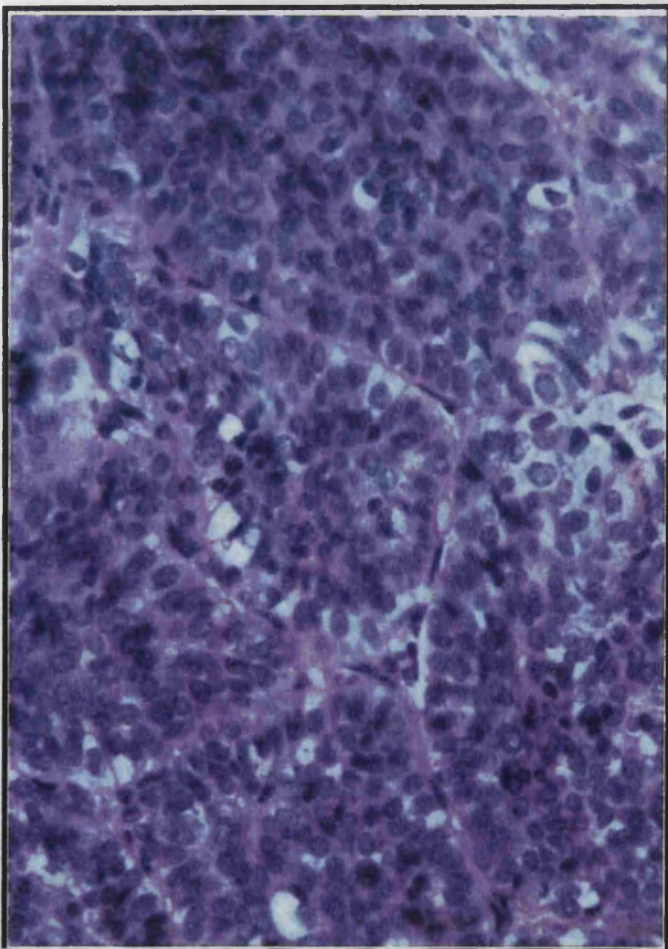
D. Obsérvense los núcleos con pequeños nucleolos y cromocentros. H.E., 63 x



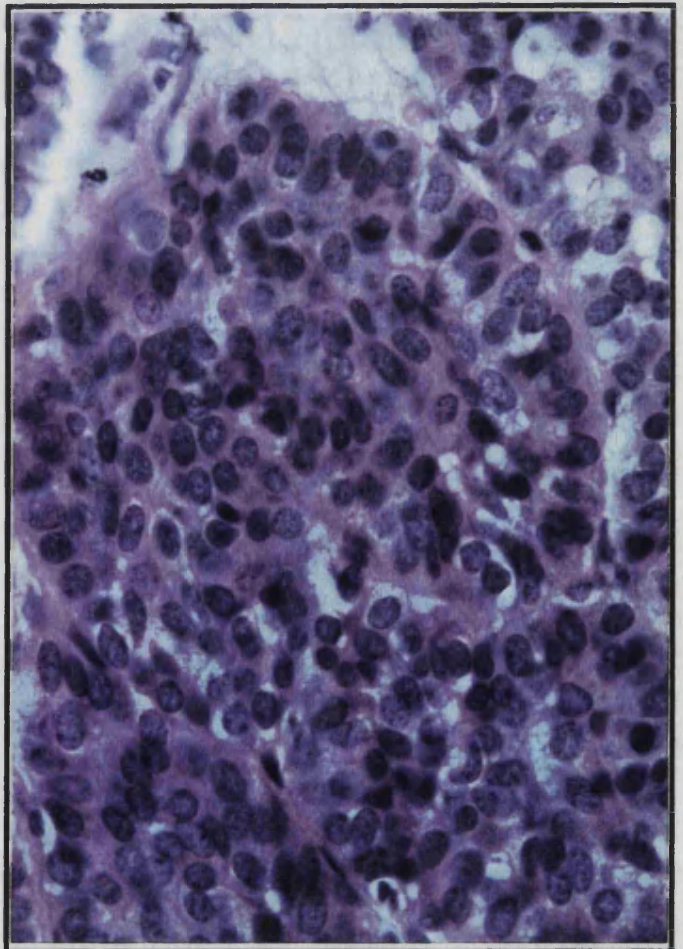
A



B



C



D

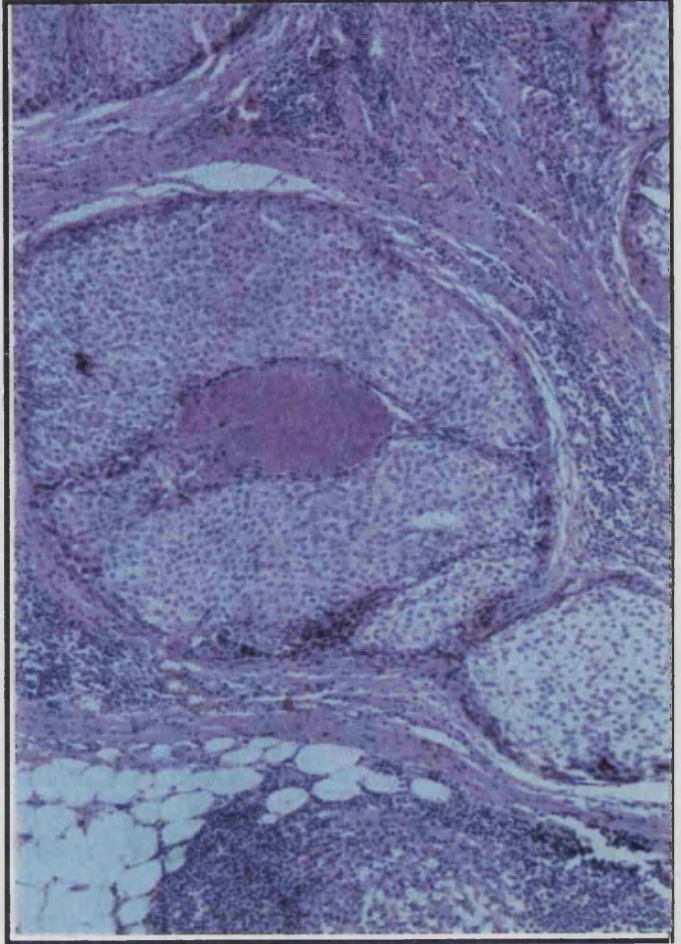
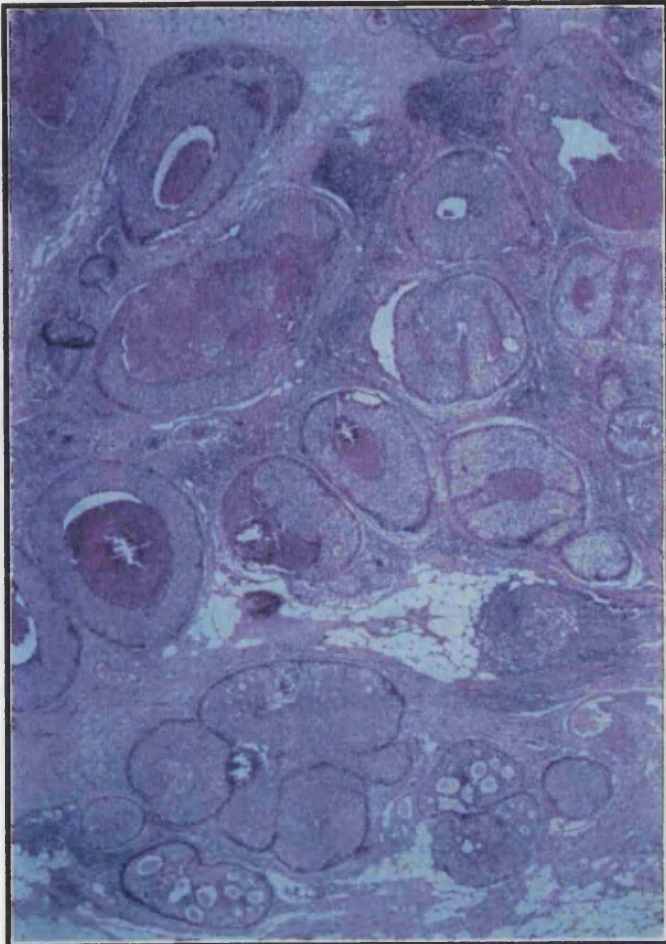
Figura nº 13: Carcinoma ductal infiltrante de tipo comedo.

A. Ductos con patrón característico de comedocarcinoma. En la franja inferior existe crecimiento carcinomatoso intraductal de tipo cribiforme. H.E. 2,5 x

B. Obsérvese la característica necrosis central. H.E., 10 x

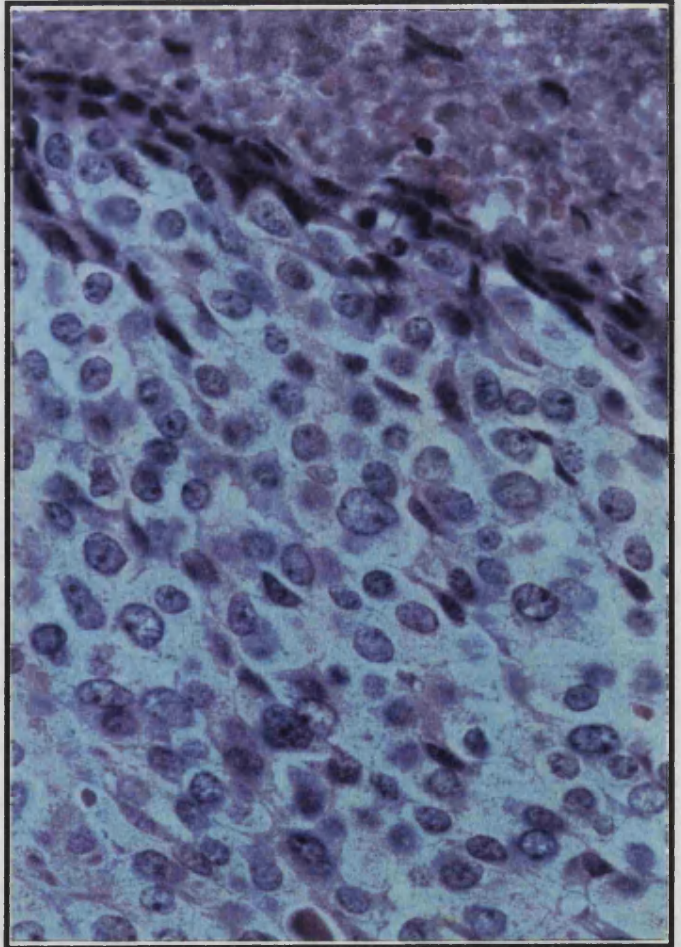
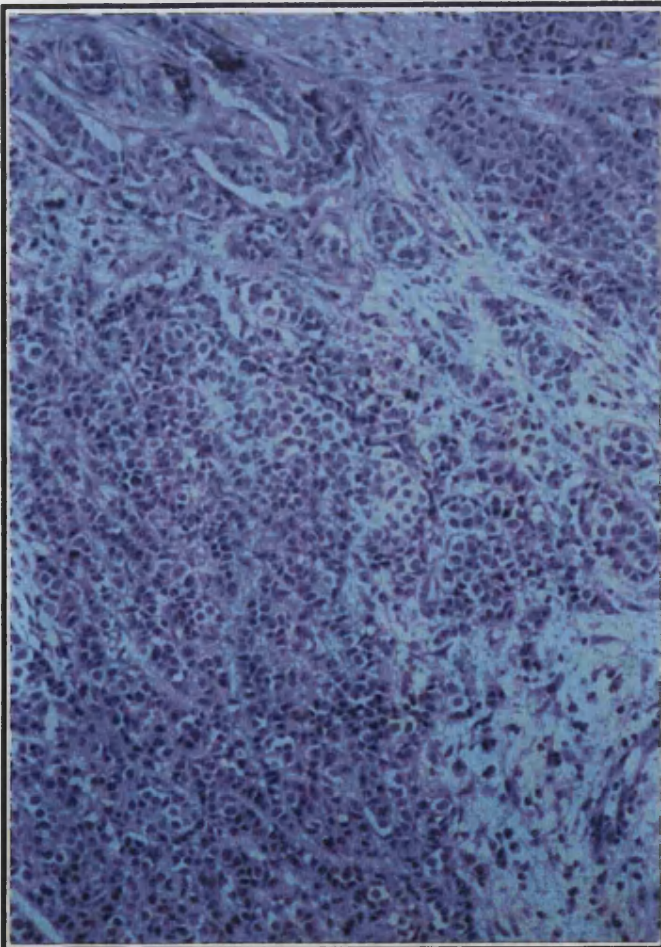
C. Componente infiltrativo constituido por nidos sólidos, trabéculas y cordones celulares que disecan irregularmente el estroma. H.E., 20 x

D. Obsérvense los núcleos vesiculares característicos con uno o varios nucleolos. H.E., 63 x



A

B



C

D

Figura nº 14: Carcinoma lobulillar infiltrante.

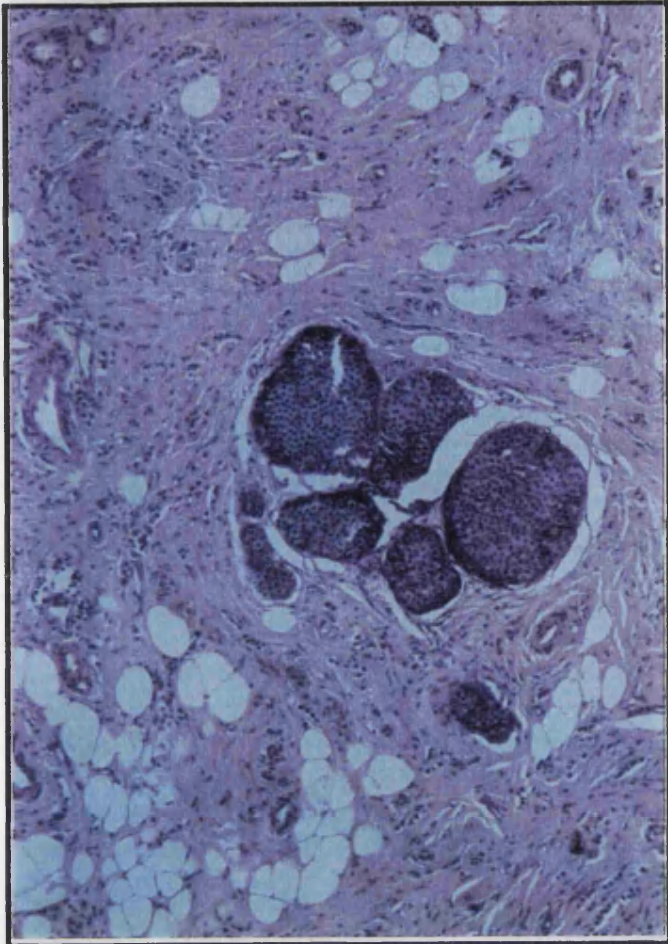
A. En la porción central existen cinco acinos lobulillares de contorno romo y marcadamente distendidos adoptando la característica morfología en "saco de perdigones". A este aumento ya se aprecia el componente infiltrativo constituido por "filas indias" de pequeñas células carcinomatosas. H.E., 2'5 x

B. El componente in situ está constituido por pequeñas células poligonales de citoplasma claro, núcleo redondo homogéneo y morfológicamente monótonas. Es evidente la organización en "filas indias" del componente infiltrativo. H.E., 20 x

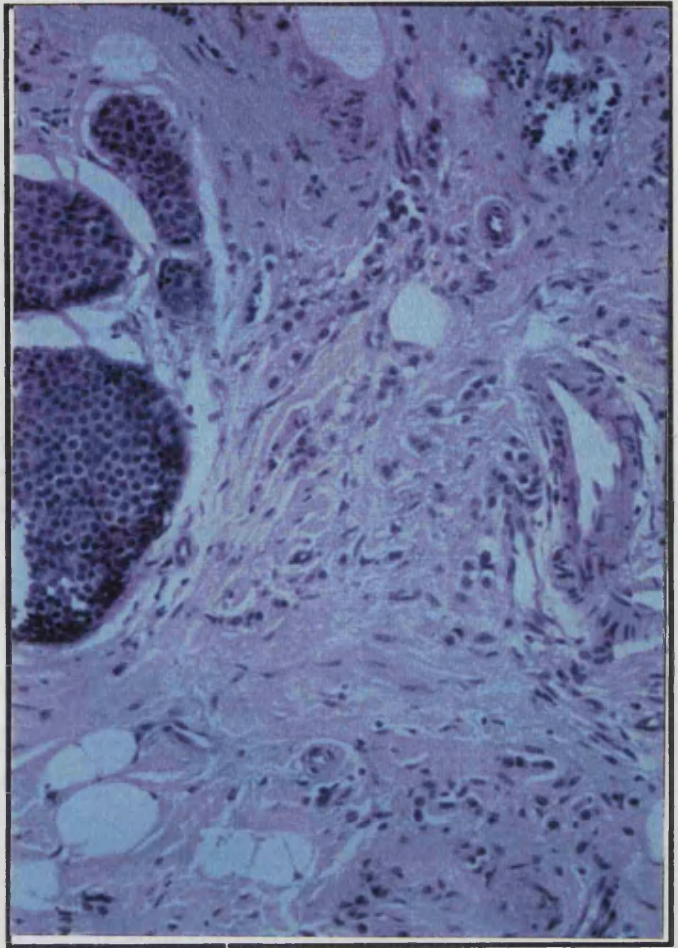
C. En el centro existe un ducto cuyo estroma de sostén periférico contiene células carcinomatosas constituyendo las características "dianas periductales". H.E., 20 x

D. Las células carcinomatosas son de pequeño tamaño y presentan un citoplasma vacuolado y un núcleo con escasos detalles cromatínicos. H.E., 63 x

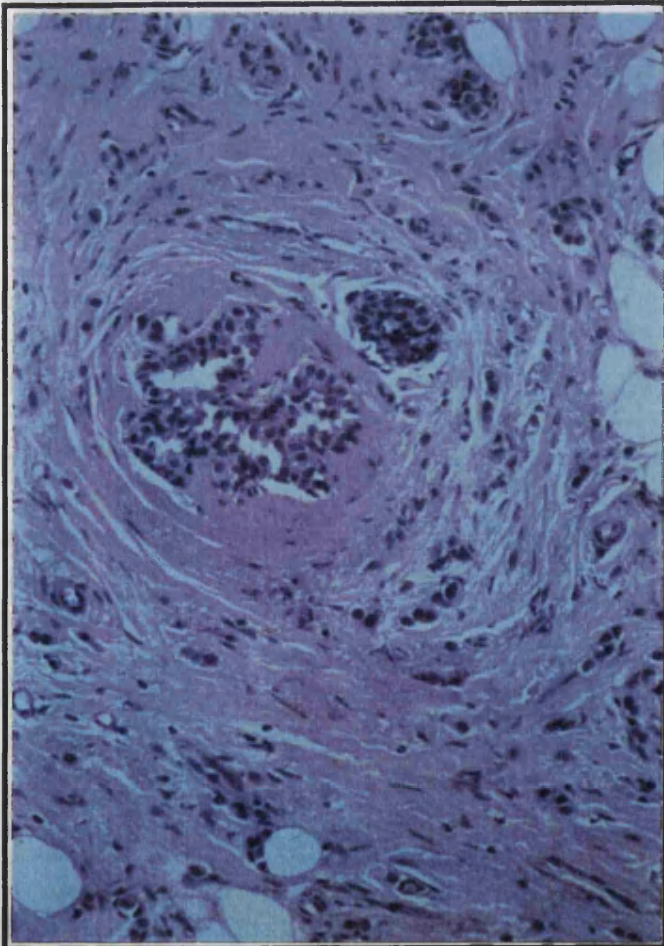
Figura nº 14



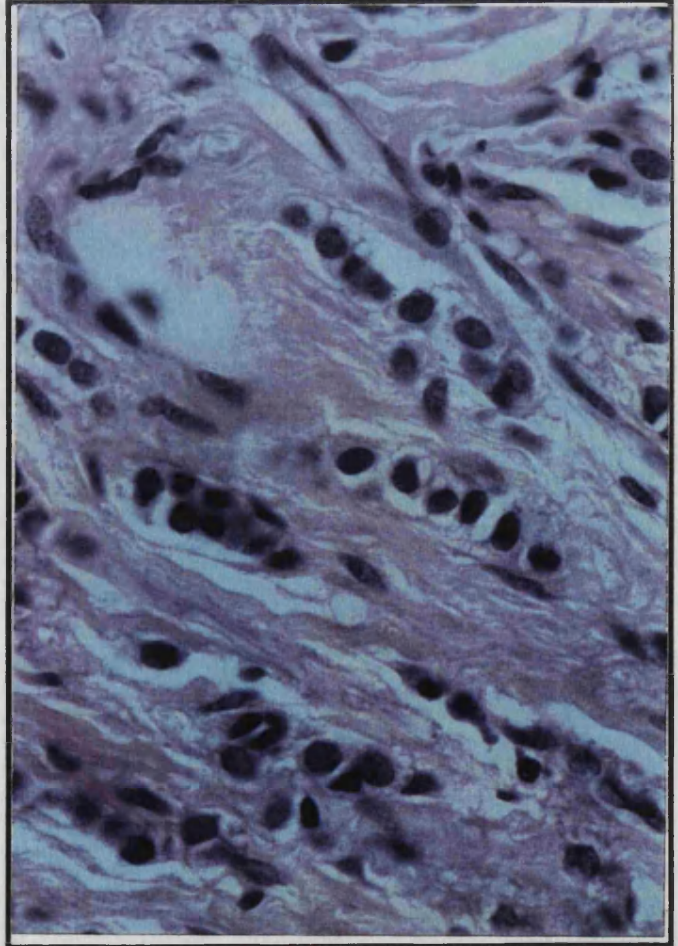
A



B



C



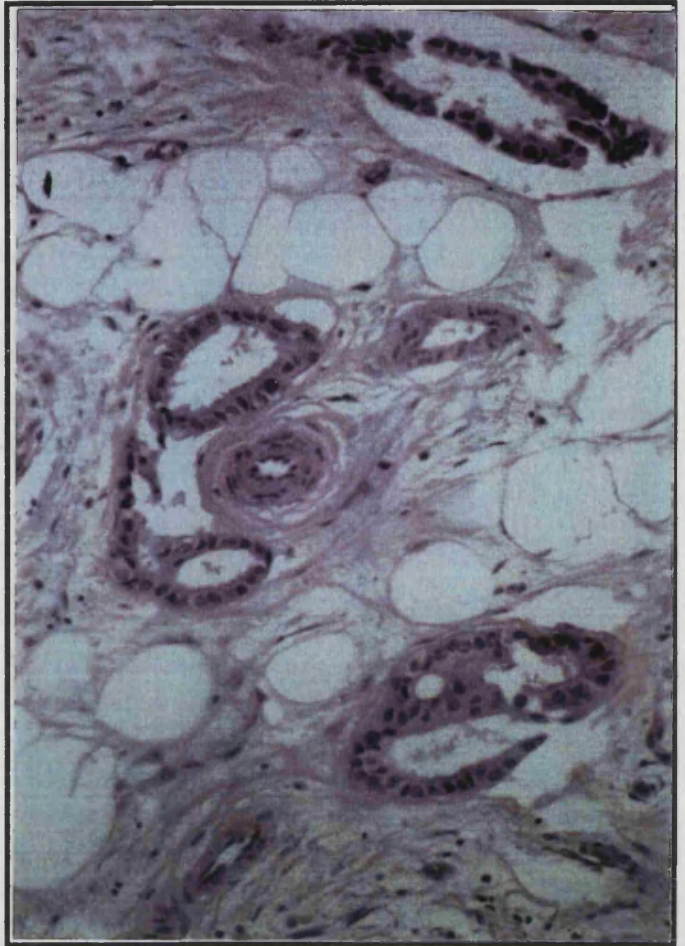
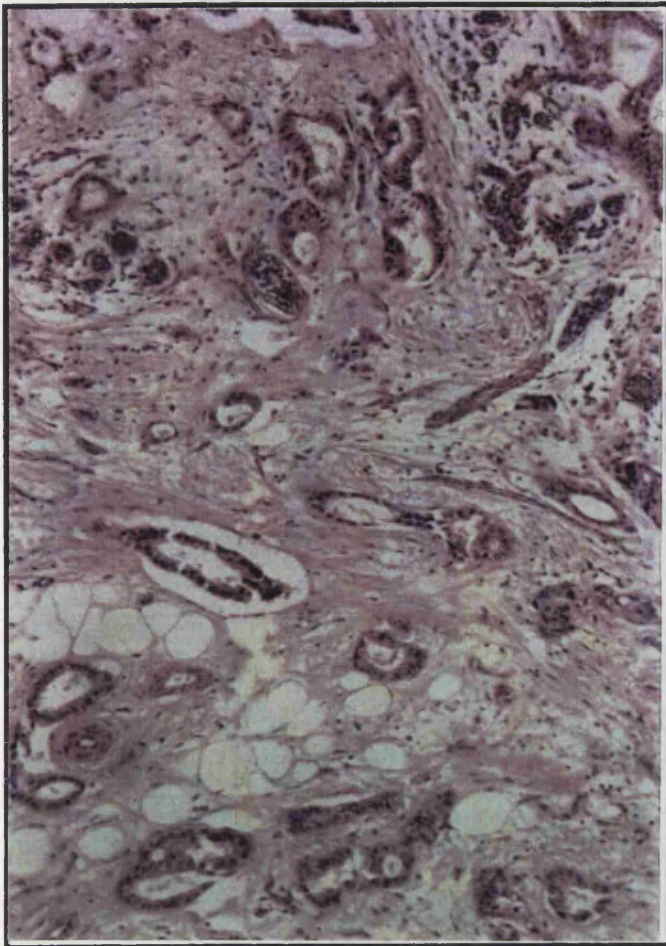
D

Figura nº 15: Carcinoma tubular.

A. Estructuras tubuliformes delimitadas por células cuboidales de pequeño tamaño y núcleo hipercromático. H.E., 10 x

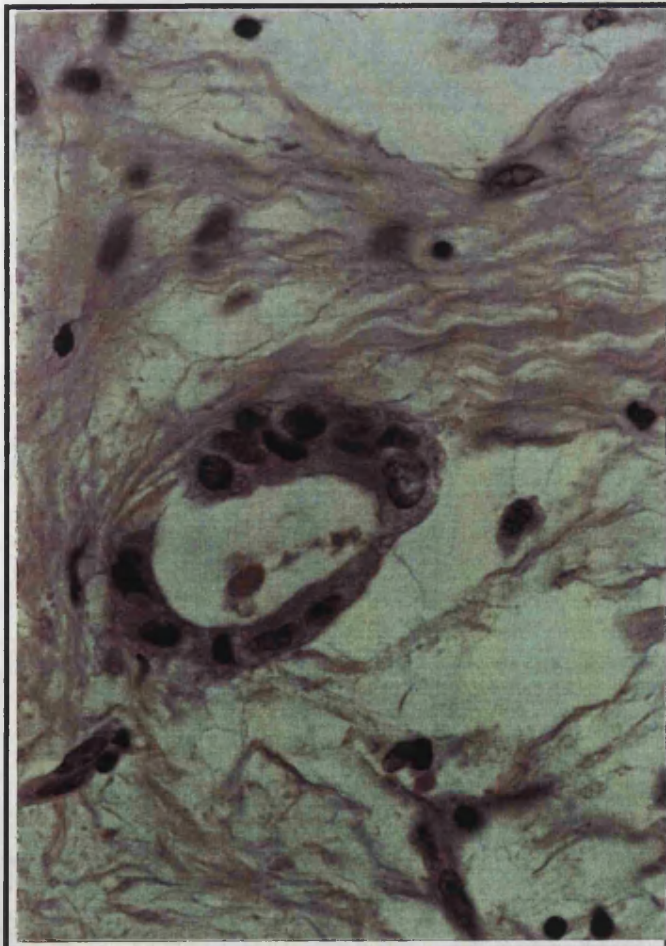
B. A este aumento se comprueba la ausencia de delimitación mioepitelial..E., 20 x

C y D. Existe hipercromatismo nuclear, atipia con anisonucleosis y resulta patente la ausencia de células mioepiteliales. H.E., 40 x



A

B



C

D

TABLAS

HIPERPLASIA DUCTAL SIN ATIPIAS. RECLUS - II

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	Ø M	FA	FP	Citofot	CMF
13	Papilomat. R - II	33.45	21.74	7.10	0.98	0.88	1.25 Aneupl	1 Diploide
35	Epiteliosis R - II	32.71	21.35	6.97	0.98	0.89	1 Diploide	1 Diploide
50	Papilomat. R - II	19.92	16.85	5.51	0.98	0.86	1 Diploide	1 Diploide
55	Epiteliosis R - II	38.69	22.94	7.34	0.99	0.92	1.25 Aneupl	1 Diploide
56	Papilomat. R - II	25.74	18.77	6.12	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
65	Epiteliosis R - II	32.96	21.36	7.31	0.98	0.88	1 Diploide	1 Diploide
79	Papilomat. R - II	23.84	17.88	5.83	0.99	0.93	1.4 Aneupl	1.2 Aneupl
82	Epiteliosis R - III	35.17	21.79	7.19	0.99	0.92	1.25 Aneupl	1 Diploide
90	Epiteliosis R - II	26.86	19.18	6.07	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
112	Epiteliosis R - II	36.74	22.62	7.33	0.98	0.91	1 Diploide	1 Diploide
125	Epiteliosis R - II	24.57	18.38	6.01	0.99	0.91	1.75 Aneup	1 Diploide
127	Epiteliosis R - II	36.27	29.29	7.25	0.98	0.91	1 Diploide	1 Diploide
154	Papilomat. R - II	25.64	21.28	6.58	0.98	0.81	1 Diploide	1 Diploide
158	Epiteliosis R - II	27.13	19.87	6.84	0.99	0.85	1 Diploide	1 Diploide
167	Epiteliosis R - II	43.36	24.28	7.93	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide

TABLA Nº 1:

HIPERPLASIA DUCTAL CON ATIPIAS. RECLUS - III

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	Ø M	FA	FP	Citofot	CMF
27	Papilomatosis III	53.73	27.43	9.04	0.99	0.89	2.25 Aneupl	1 Diploide
40	Papilomatosis III	33.84	21.73	7.10	1.02	0.88	1 Diploide	1 Diploide
61	Epiteliosis R - III	28.25	19.71	6.24	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
73	Papilomatosis III	30.16	22.47	6.81	0.96	0.80	1.25 Aneupl	1 Diploide
74	Papilomatosis III	29.43	20.16	6.39	0.99	0.90	1.4 Aneupl	1.2 Aneupl
77	Epiteliosis R - III	30.78	27.39	7.99	0.96	0.74	1 Diploide	1 Diploide
85	Papilomatosis III	40.28	23.52	7.83	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
155	Hip. Ductal R - III	90.18	34.81	10.84	0.99	0.91	1.25 Aneupl	2.2 Aneupl
147	Hip. Ductal R - III	37.62	22.65	7.5	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
163	Hip. Ductal R - III	39.24	23.06	7.21	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide

TABLA Nº 2:

ABREVIATURAS:

A = Area (μ^2); P = Perímetro (μ); Ø M = Diámetro máximo (μ); FA = Factor forma área
 FP = Factor forma perímetro; Citofot = Citofotometria; CMF = Citometria de flujo

CARCINOMA INTRADUCTAL

Caso	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	FP	Citofot	CMF
26	Ca. Intraductal	42.88	24.36	8.04	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
39	Ca. Intraductal	42.41	23.80	7.77	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
41	Ca. Intraductal	36.82	22.33	7.35	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
60	Ca. Intraductal	30.84	20.35	6.57	0.99	0.92	1.5 Aneupl	1.2 Aneupl
86	Ca. Intraductal	53.55	26.83	8.79	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
92	Ca. Intraductal	52.80	26.95	8.43	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
100	Ca. Intraductal	32.07	21.02	6.57	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
102	Ca. Intraductal	38.18	23.14	7.33	0.99	0.89	1 Diploide	1 Diploide
115	Ca. Intraductal	34.16	21.79	7.18	0.98	0.90	1 Diploide	1 Diploide
118	Ca. Intraductal	44.87	28.45	8.33	0.97	0.84	1 Diploide	1 Diploide
119	Ca. Intraductal	59.36	28.27	8.88	0.99	0.92	1.75 Aneupl	1 Diploide
133	Ca. Intraductal	62.89	29.57	9.73	0.98	0.89	1 Diploide	1 Diploide
156	Ca. Intraductal	92.25	35.71	11.67	0.98	0.89	2.4 Aneupl	1 Diploide

TABLA Nº 3

CARCINOMA PAPILAR NO INVASOR

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	FP	Citofot	CMF
48	Ca.Papilar Int	48.79	25.93	8.62	0.99	0.90	1.4 Aneupl	1.1 Diploide
108	Ca.Papilar Int	51.46	26.44	8.36	0.99	0.91	1.5 Aneupl	1 Diploide
128	Ca.Papilar Int	34.90	21.63	6.71	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
130	Ca.Papilar Int	42.88	24.42	8.01	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
134	Ca.Papilar Int	51.29	26.55	8.47	0.98	0.90	1.25 Aneupl	1 Diploide
138	Ca.Papilar Int	31.91	20.83	6.60	0.95	0.92	1 Diploide	1 Diploide
141	Ca.Papilar Int	42.36	23.85	7.87	0.99	0.92	1.25 Aneupl	1.4 Aneupl
145	Ca.Papilar Int	49.81	26.06	8.29	0.99	0.91	1.4 Aneupl	1.7 Aneupl

TABLA Nº 4

ABREVIATURAS:

A = Area (μ^2); P = Perimetro (μ); ø M = Diámetro máximo (μ); FA = Factor forma área
 FP = Factor forma perimetro; Citofot = Citofotometria; CMF = Citometria de flujo

CARCINOMAS INFILTRANTES

TABLA Nº 5

Caso n°	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	F. P	Citofot	CMF
2	Ca. Tubular	46.02	25.26	9.04	0.98	0.91	2 Tetrapl.	1 Dipl.
3	Ca. Ductal Inf	42.60	26.18	9.24	0.98	0.82	1.6 Aneupl	1 Dipl.
5	Ca. Ductal Inf	56.34	28.66	9.62	0.99	0.85	1 Diploide	1.4 Aneup
10	Ca. Ductal Inf	41.85	23.71	7.93	0.98	0.92	1.9 Tetrapl.	1.7 Aneup
17	Ca. Ductal Inf	44.16	24.89	8.31	0.98	0.88	2 Tetraplo.	2.1 Tetrapl
20	Ca. Tubular	41.22	23.90	7.66	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
31	Ca. Tubular	59.09	28.88	9.16	0.98	0.89	1.75 Aneup.	1 Diploide
44	Ca. Tubular	18.84	16.11	5.20	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
46	Ca. Ductal Inf	70.68	31.71	10.39	0.98	0.86	2 Tetrapl.	1.2 Aneup.
59	Ca. Apocrino	63.00	29.03	9.07	0.99	0.92	1.5 Aneupl.	1 Diploide
64	Ca. Ductal Inf	51.42	27.81	8.72	0.97	0.85	1 Diploide	1.3 Aneupl
83	Ca. Ductal Inf	27.86	19.68	6.64	0.99	0.89	1 Diploide	1 Diploide
84	Ca. Ductal Inf	57.20	27.76	9.01	0.99	0.92	1.75 Aneupl	1.5 Aneupl
87	Ca. Ductal Inf	58.85	28.23	9.05	0.99	0.92	1 Diploide	1.6 Aneupl
89	Ca. Ductal Inf	72.19	31.16	9.90	0.99	0.91	1.5 Aneupl.	1 Diploide
91	Ca. Ductal Inf	40.64	26.14	8.53	0.97	0.87	1 Diploide	1 Diploide
93	Ca. Ductal Inf	44.50	24.88	7.58	1.00	0.91	2 Tetrapl.	1 Diploide
95	Ca. Ductal Inf	50.83	26.32	8.53	0.99	0.91	1 Diploide	1.3 Aneupl
98	Ca. Ductal Inf	68.99	30.66	9.63	0.99	0.91	1.9 Tetrapl.	2.1 Tetrapl
99	Ca. Ductal Inf	52.47	26.82	8.62	0.99	0.91	1 Diploide	1.1 Diploid
101	Ca. Coloide	64.64	30.18	9.82	0.99	0.89	2.4 Aneupl.	1.8 Aneupl
103	Ca. Medular	42.66	25.05	8.67	0.97	0.84	1 Diploide	1 Diploide
104	Ca. Ductal Inf	42.34	24.07	8.19	0.98	0.90	1.5 Aneupl.	1 Diploide
105	Ca. Ductal inf.	45.12	25.33	8.78	0.98	0.86	1.7 Aneupl.	1 Diploide
107	Ca. Papilar Inf.	56.98	27.99	8.90	0.99	0.90	1.4 Aneupl.	1 Diploide
114	Ca. Ductal Inf	75.00	32.18	10.26	0.94	0.90	1.5 Aneupl.	2.1 Tetrapl
120	Ca. tubular	97.74	36.43	11.39	0.99	0.92	1.25 Aneupl.	1 Diploide
136	Ca. Medular	50.88	26.91	8.33	0.99	0.88	1 Diploide	1.6 Aneupl
137	Ca. Ductal Inf	50.89	27.00	8.32	0.99	0.88	1.75 Aneupl.	2 Tetrapl.
142	Ca. Ductal Inf.	56.98	27.99	8.90	0.99	0.90	1.47 Aneupl	1.7 Aneupl
149	Ca. Lob. Infilt.	33.03	22.42	7.01	0.98	0.89	1.25 Aneupl.	1.1 Aneup
153	Ca. Ductal Infilt.	43.16	25.20	8.41	0.98	0.82	1.5 Aneupl.	2.4 Aneupl
160	Ca. Lob. Infilt.	44.02	24.62	7.93	0.98	0.90	1.8 Aneupl.	1.5 Aneupl

HIPERPLASIA LOBULILLAR SIN ATIPIAS. RECLUS - II

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	Ø M	FA	FP	Citofot	CMF
6	Hip. Lob. R - II	29.46	20.48	7.05	0.99	0.87	1.25 Aneup	1 Diploide
7	Hip. Lob. R - II	37.38	22.77	7.48	0.98	0.89	1.75 Aneupl	1 Diploide
9	Hip. Lob. R - II	32.72	21.30	7.09	0.98	0.89	1.9 Tetrapl.	1 Diploide
14	Hip. Lob. R - II	32.71	21.14	7.20	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
16	Hip. Lob. R - II	31.25	20.91	6.73	0.98	0.89	1 Diploide	1 Diploide
21	Hip. Lob. R - II	30.70	20.58	6.85	0.98	0.90	1 Diploide	1.2 Aneup
34	Hip. Lob. R - II	31.11	20.76	6.75	0.98	0.90	1.5 Aneupl.	1 Diploide
38	Hip. Lob. R - II	33.25	21.63	6.88	0.99	0.89	1.4 Aneupl.	1 Diploide
47	Hip. Lob. R - II	27.66	19.54	6.38	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
57	Hip. Lob. R - II	31.62	20.62	6.60	0.99	0.93	1 Diploide	1 Diploide
62	Hip. Lob. R - II	24.56	18.68	6.33	0.97	0.86	1 Diploide	1 Diploide
63	Hip. Lob. R - II	32.90	21.35	7.05	0.99	0.90	2 Tetrapl.	2.2 Aneup
68	Hip. Lob. R - II	41.70	32.42	8.78	0.95	0.80	1 Diploide	1 Diploide
70	Hip. Lob. R - II	29.75	20.89	7.06	0.98	0.87	1 Diploide	2 Tetrapl
71	Hip. Lob. R - II	30.18	27.23	7.46	1.17	0.72	1 Diploide	1 Diploide
78	Hip. Lob. R - II	32.96	20.96	6.96	0.99	0.93	1.4 Aneupl.	1 Diploide
88	Hip. Lob. R - II	41.42	23.80	7.73	0.99	0.90	1.25 Aneupl.	1 Diploide
94	Hip. Lob. R - II	27.60	19.63	6.16	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
96	Hip. Lob. R - II	32.40	21.39	6.99	0.99	0.88	1.4 Aneupl	1 Diploide
97	Hip. Lob. R - II	26.71	19.28	6.23	0.99	0.89	1.25 Aneupl	1 Diploide
113	Hip. Lob. R - II	30.81	20.61	7.01	0.98	0.90	1 Diploide	1 Diploide
116	Hip. Lob. R - II	29.13	20.08	6.74	0.99	0.90	1.4 Aneupl.	1 Diploide
129	Hip. Lob. R - II	31.32	20.67	6.75	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
135	Hip. Lob. R - II	35.55	22.61	7.28	0.99	0.87	1 Diploide	1.5 Aneupl
139	Hip. Lob. R - II	30.34	22.34	7.33	0.98	0.83	1 Diploide	1 Diploide
151	Hip. Lob. R - II	16.16	15.36	4.90	0.99	0.88	1 Diploide	1 Diploide
162	Hip. Lob. R - II	33.11	21.47	6.98	0.99	0.89	1 Diploide	1 Diploide
164	Hip. Lob. R - II	24.30	18.35	5.98	0.99	0.90	1.25 Aneupl	1.1 Aneupl
124	Hip. Lob. R - II	36.92	22.35	7.43	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
147	Hip. Lob. R - II	32.10	20.98	6.71	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide

TABLA Nº 6

HIPERPLASIA LOBULILLAR CON ATIPIAS. RECLUS - III

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	FP	Citofot	CMF
1	Hip. Lob. R - III	28.14	19.90	6.61	0.98	0.87	1.4 Aneupl.	1 Diploide
4	Hip. Lob. R - III	26.90	16.40	6.44	0.98	0.88	1.25 Aneupl.	1 Diploide
15	Hip. Lob. R - III	29.28	20.16	6.71	0.98	0.89	1.4 Aneupl	1 Diploide
19	Hip. Lob. R - III	39.69	23.18	7.76	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
28	Hip. Lob. R - III	30.63	21.09	6.74	0.98	0.87	1.4 Aneupl	1 Diploide
30	Hip. Lob. R - III	31.01	21.17	6.75	0.97	0.86	1 Diploide	1 Diploide
32	Hip. Lob. R - III	27.20	19.46	6.36	0.98	0.89	1 Diploide	1 Diploide
37	Hip. Lob. R - III	40.15	23.55	7.80	0.98	0.89	1 Diploide	1.3 Aneupl
42	Hip. Lob. R - III	18.30	15.98	5.10	0.99	0.89	1 Diploide	1 Diploide
52	Hip. Lob. R - III	30.71	20.62	6.74	0.99	0.90	1.75 Aneupl	1 Diploide
58	Hip. Lob. R - III	33.43	21.39	6.79	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
66	Hip. Lob. R - III	36.38	22.26	7.21	0.99	0.91	1 Diploide	1.5 Aneupl
122	Hip. Lob. R - III	42.04	24.05	7.51	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
161	Hip. Lob. R - III	41.62	24.45	7.92	0.98	0.88	1 Diploide	1 Diploide
165	Hip. Lob. R - III	42.94	24.12	7.78	0.99	0.92	1.5 Aneupl	1.1 Diploid

TABLA Nº 7

CARCINOMA LOBULILLAR IN SITU

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	FP	Citofot	CMF
43	Ca. Lob. In situ	46.02	25.26	9.04	0.98	0.91	1 Diploide	1 Diploide
49	Ca. Lob. In situ	27.82	19.19	6.23	0.99	0.93	1 Diploide	1 Diploide
69	Ca. Lob. In situ	37.59	26.37	7.92	0.97	0.82	1.9 Tetrapl	1 Diploide
76	Ca. Lob. In situ	37.36	22.37	7.36	0.99	0.92	2.25 Aneupl	1.1 Diploid
150	Ca. Lob. In situ	30.82	20.54	6.67	0.99	0.91	1.25 Aneupl	1.1 Diploid
166	Ca. Lob. In situ	40.61	23.43	7.61	0.99	0.92	1.25 Aneupl	1.1 Diploid
143	Ca. Lob. In situ	24.50	18.85	6.26	0.97	0.85	1.25 Aneupl	1 Diploide
144	Ca. Lob. In situ	21.38	17.34	5.96	0.98	0.88	1.4 Aneupl.	1 Diploide

TABLA Nº 8

BREVIATURAS:

A = Area (μ^2); P = Perimetro (μ); ø M = Diámetro máximo (μ); FA = Factor forma área
 FP = Factor forma perimetro; Citofot = Citofotometria; CMF Citometria de flujo

ADENOSIS

Caso n°	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	FP	Citofot	CMF
12	Adenosis Quistica	33.62	21.11	6.67	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
22	Adenosis Quistica	27.02	19.55	6.49	0.98	0.88	1.5 Aneupl.	1 Diploide
24	Adenosis Escleros	37.16	23.12	7.61	0.98	0.87	1.5 Aneupl.	1 Diploide
25	Adenosis Quistica	40.18	23.20	7.56	0.99	0.92	1.3 Aneupl.	1 Diploide
33	Adenosis Microgl.	26.30	19.38	6.07	0.98	0.90	1 Diploide	1 Diploide
36	Adenosis Tumoral	33.80	21.89	7.38	0.98	0.88	1 Diploide	1 Diploide
45	Adenosis Simple	25.30	18.72	6.37	0.99	0.89	1 Diploide	1 Diploide
51	Adenosis Simple	30.57	20.67	7.02	0.98	0.89	1.25 Aneupl.	1 Diploide
81	Adenosis Tumoral	42.90	24.21	7.48	0.99	0.91	1.25 Aneupl.	1 Diploide
146	Adenosis Simple	21.16	17.59	6.29	0.97	0.84	1 Diploide	1 Diploide

TABLA N° 9

ABREVIATURAS:

A = Area (μ^2); P = Perimetro (μ); ø M = Diámetro máximo (μ); FA = Factor forma área
 FP = Factor forma perimetro; Citofot = Citofotometria; CMF= Citometria de flujo

METAPLASIA APOCRINA

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	FP	Citofot	CMF
23	Metapl. Apocrina	20.55	16.60	5.43	0.99	0.93	1.5 Aneupl.	1 Diploide
29	Metapl. Apocrina	36.79	22.53	7.13	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
53	Metapl. Apocrina	29.60	19.88	6.28	0.99	0.93	1 Diploide	1 Diploide
72	Metapl. Apocrina	30.71	20.25	6.55	0.99	0.92	1 Diploide	1 Diploide
75	Metapl. Apocrina	40.78	23.06	7.87	0.99	0.93	1 Diploide	1 Diploide
80	Metapl. Apocrina	24.38	18.00	5.72	0.99	0.94	1 Diploide	1 Diploide
152	Metapl. Apocrina	24.88	18.62	9.72	0.99	0.91	1.25 Aneupl.	1 Diploide
157	Metapl. Apocrina	27.29	19.35	6.84	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
159	Metapl. Apocrina	29.29	20.02	6.26	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
169	Metapl. Apocrina	22.94	17.90	6.04	0.98	0.89	1 Diploide	1 Diploide

TABLA Nº 10

ESCLEROSIS RADIAL

Caso nº	Diagnostico	A.	P.	ø M	FA	FP	Citofot	CMF
18	Esclerosis Radial	30.08	20.30	6.64	0.98	0.91	1 Diploide	1 Diploide
54	Esclerosis Radial	41.06	23.75	7.98	0.98	0.90	1 Diploide	1 Diploide
67	Esclerosis Radial	30.10	20.29	6.44	0.93	0.91	1.25 Aneupl.	1 Diploide
109	Esclerosis Radial	39.57	23.39	7.60	0.99	0.90	1 Diploide	1.5 Aneupl.
110	Esclerosis Radial	30.86	20.69	6.69	0.99	0.90	1.1 Diploide	1 Diploide
121	Esclerosis Radial	31.77	20.93	6.72	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
126	Esclerosis Radial	31.39	20.77	6.48	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
131	Esclerosis Radial	31.77	20.93	6.96	0.99	0.90	1 Diploide	1 Diploide
132	Esclerosis Radial	34.18	21.78	7.09	0.99	0.89	1 Diploide	1 Diploide
140	Esclerosis Radial	36.37	22.31	7.35	0.99	0.91	1 Diploide	1 Diploide
168	Esclerosis Radial	34.23	21.60	7.09	0.99	0.91	1.25 Aneupl.	1 Diploide
170	Esclerosis Radial	23.55	18.57	6.40	0.98	0.85	1 Diploide	1 Diploide

TABLA Nº 11

ABREVIATURAS:

A = Area (μ^2); P = Perimetro (μ); ø M = Diámetro máximo (μ); FA = Factor forma área;
 FP = Factor forma perimetro; Citofot = Citofotometria; CMF Citometria de flujo

ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR MORFOMETRIA

	Area μ^2		Perímetro μ		Diámetro Máximo μ		Forma Area		Forma Perímetro		Nº casos Frec.	
	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.		
H. Lobulillar s/a	31.26	4.91	21.34	2.86	6.90	0.65	0.99	0.01	0.88	0.04	30	18.3 %
H. Lobulillar c/a	33.23	7.07	21.19	2.59	6.95	0.74	0.98	0.01	0.89	0.02	15	9.1 %
H. Ductal s/a	30.80	6.64	21.17	3.05	6.76	0.70	0.99	0.01	0.89	0.03	15	9.1 %
H. Ductal c/a	41.35	18.75	24.29	4.51	6.70	2.22	0.99	0.02	0.88	0.06	10	6.1 %
Ca. in situ Papilar	44.18	7.54	24.46	2.22	7.87	0.79	0.98	0.01	0.91	0.01	8	4.9 %
Ca. in situ Ductal	47.93	16.81	25.58	4.29	7.43	1.96	0.99	0.01	0.90	0.02	13	7.9 %
Ca. in situ Lob.	33.26	8.50	21.67	3.22	7.13	1.050	0.98	0.01	0.89	0.04	8	4.9 %
Adenosis	31.80	6.99	20.94	2.16	6.89	59	0.98	0.01	0.89	0.02	10	6.1 %
Metapl. Apocrina	28.72	6.25	19.62	2.02	6.78	1.25	0.99	0	0.92	0.02	10	6.1 %
Esclr. Radial	32.91	4.66	21.28	1.42	6.95	0.49	0.98	0.02	0.90	0.02	12	7.3 %
Ca. Ductal Infiltr.	52.10	12.11	26.97	2.97	7.84	2.60	0.98	0.01	0.89	0.03	21	12.8 %
Ca. Tubular	52.58	29.12	26.12	7.41	6.49	3.27	0.99	0.01	0.91	0.01	5	3.0 %
Ca. Apocrino	63.00	0	29.03	0	9.07	0	0.99	0	0.92	0	1	0.6 %
Ca. Coloide	64.64	0	30.18	0	9.82	0	0.99	0	0.89	0	1	0.6 %
Ca. Lobulillar	38.53	7.77	23.52	1.56	7.47	0.65	0.98	-	0.90	0.01	2	1.2 %
Ca. Medular	46.77	5.81	25.98	1.32	8.50	0.24	0.98	0.01	0.86	0.03	2	1.2 %
Ca. Papilar	56.98	0	27.99	0	8.90	0	0.99	0	0.90	0	1	0.6 %

ANALISIS ESTADISTICO DE LAS LESIONES MEDIANTE LA T de STUDENT

		AREA					GRUPO DE LESIONES DUCTALES
GRUPO		GRUPO					
		2	3	4	5	1	
		2			*	*	*
3					*		
4	*						
5	*						
1	*	*					

Tabla nº 13

		PERIMETRO					GRUPO DE LESIONES DUCTALES
GRUPO		GRUPO					
		2	3	4	5	1	
		2		*	*	*	*
3	*				*		
4	*						
5	*						
1	*	*					

Tabla nº 14

AREA Y PERIMETRO

	1	2	3
4	*	*	*

* p < 0.05

- Gr 1.- Adenosis
- Gr 2.- Metaplasia Apocrina
- Gr 3.- Esclerosis Radial
- Gr 4.- Hiperplasia Ductal con atipias + Carcinoma Papilar in situ intraductal

Tabla nº 15

ANALISIS ESTADISTICO DE LAS LESIONES MEDIANTE χ^2

CITOMETRIA ESTATICA

GRUPO	GRUPO				
	2	3	4	5	1
2					*
3					*
4					
5					*
1	*	*		*	

GRUPO DE LESIONES DUCTALES

- Gr 1.- Carcinomas Ductal Infiltrante
- Gr 2.- Hiperplasia Ductal sin atipias
- Gr 3.- Hiperplasia Ductal con atipias
- Gr 4.- Carcinoma Papilar Intraductal
- Gr 5.- Carcinoma in situ intraductal

* p < 0.05

Tabla nº 16

CITOMETRIA ESTATICA

	1	2	3
4	*	*	*

* p < 0.05

- Gr 1.- Adenosis
- Gr 2.- Metaplasia Apocrina
- Gr 3.- Esclerosis Radial
- Gr 4.- Hiperplasia Ductal con atipias + Carcinoma Papilar in situ intraductal

Tabla nº 17

CITOMETRIA DE FLUJO

GRUPO	GRUPO				
	2	3	4	5	1
2					*
3					*
4					
5					*
1	*	*		*	

GRUPO DE LESIONES DUCTALES

- Gr 1.- Carcinomas Ductal Infiltrante
- Gr 2.- Hiperplasia Ductal sin atipias
- Gr 3.- Hiperplasia Ductal con atipias
- Gr 4.- Carcinoma Papilar Intraductal
- Gr 5.- Carcinoma in situ intraductal

* p < 0.05

Tabla nº 18

CITOMETRIA DE FLUJO

	1	2	3
4	*	*	*

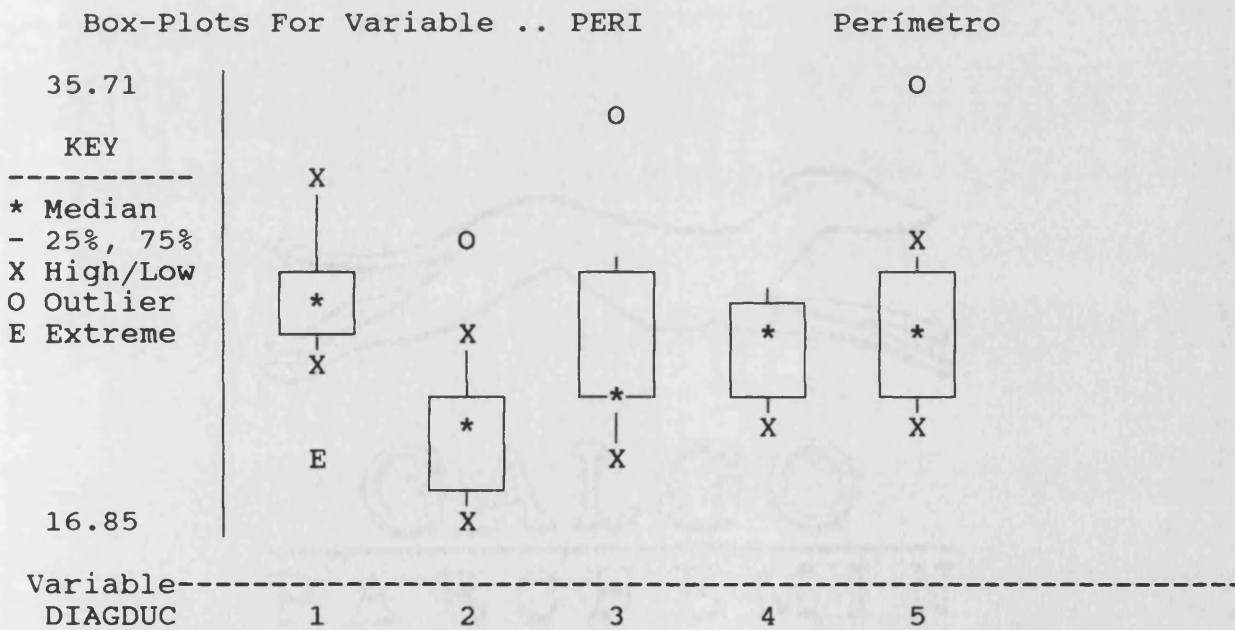
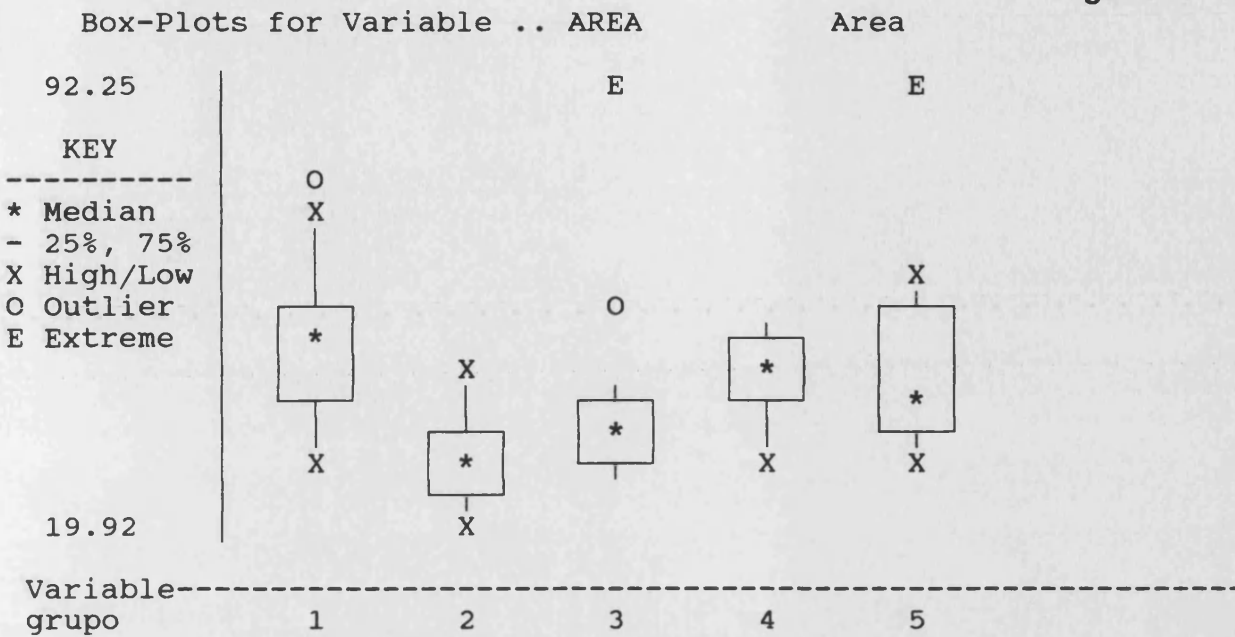
* p < 0.05

- Gr 1.- Adenosis
- Gr 2.- Metaplasia Apocrina
- Gr 3.- Esclerosis Radial
- Gr 4.- Hiperplasia Ductal con atipias + Carcinoma Papilar in situ intraductal

Tabla nº 19

FIGURAS

Figura nº 16

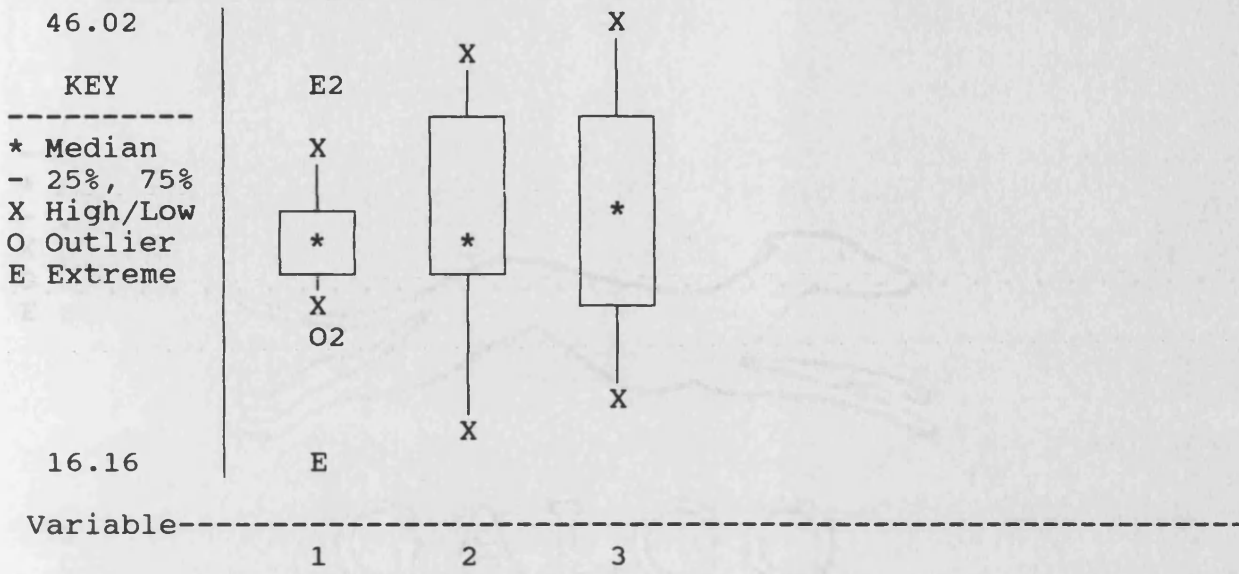


- | | |
|--------------------|---|
| Ca. ductal inf. | 1 |
| Hip. ductal s/a | 2 |
| Hip. ductal c/a | 3 |
| Ca. in situ pap. | 4 |
| Ca. in situ intra. | 5 |

Box-Plots For Variable .. AREA

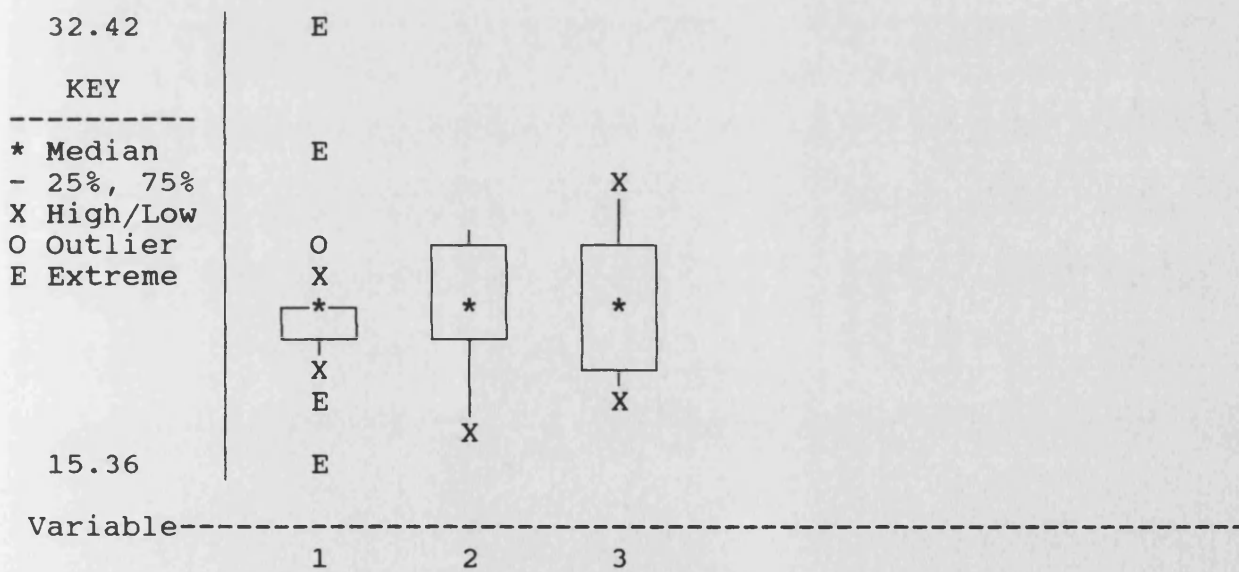
Area

Figura nº 19



Box-Plots For Variable .. PERI

Perímetro

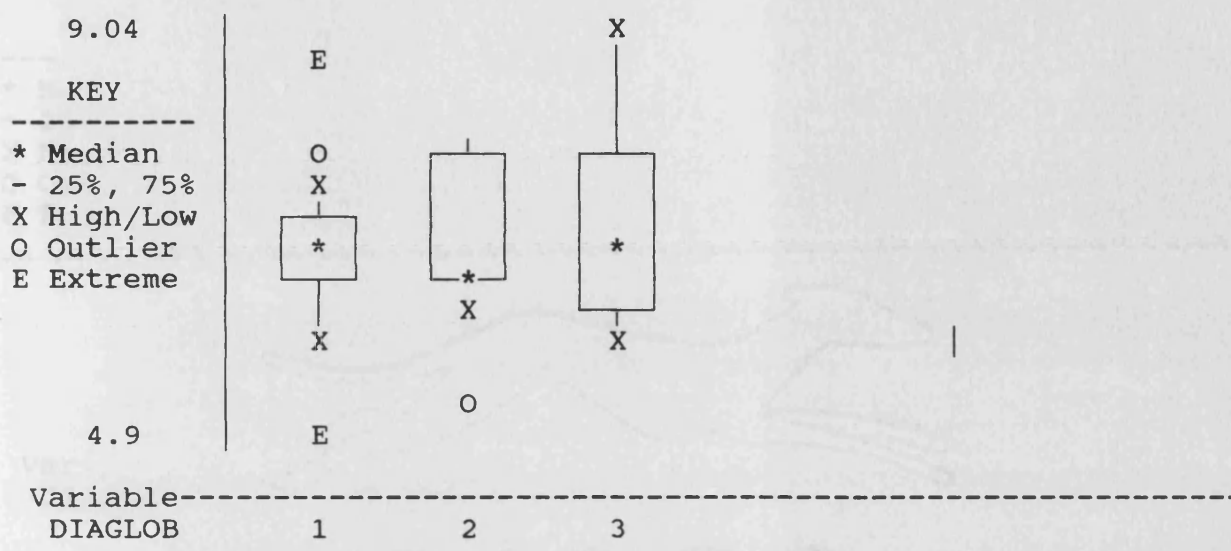


Hiperplasia Lobulillar sin Atipias 1
 Hiperplasia Lobulillar con Atipias 2
 Carcinoma Lobulillar in situ 3

Figura nº 20

Box-Plots For Variable .. DIAMMAX

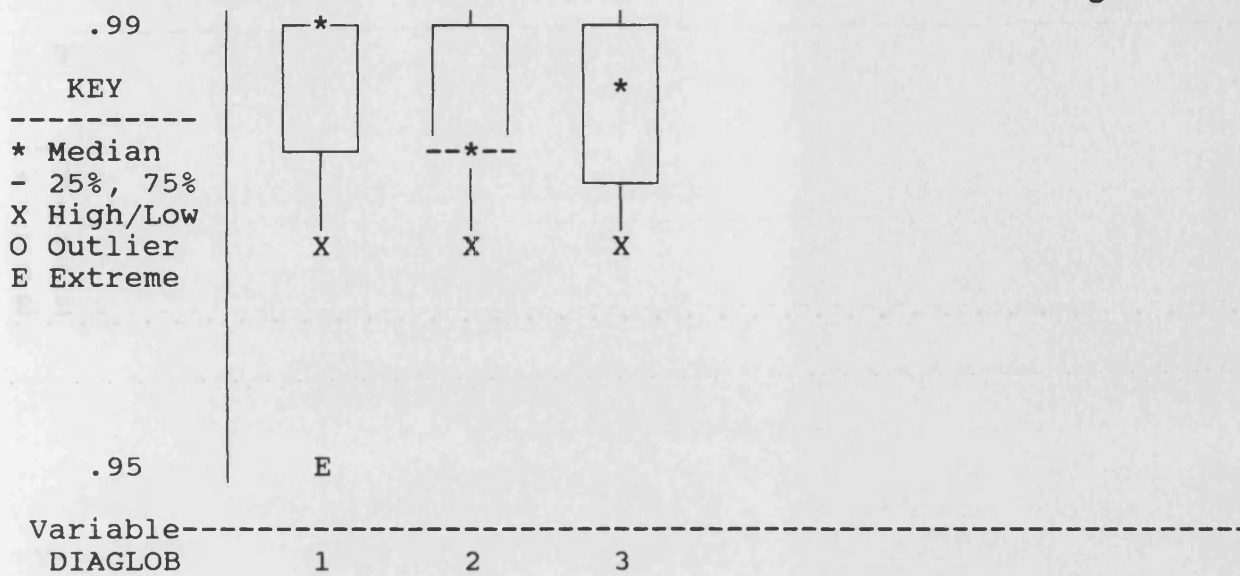
Diám. máx.



- Hiperplasia Lobulillar sin Atipias 1
- Hiperplasia Lobulillar con Atipias 2
- Carcinoma Lobulillar in situ 3

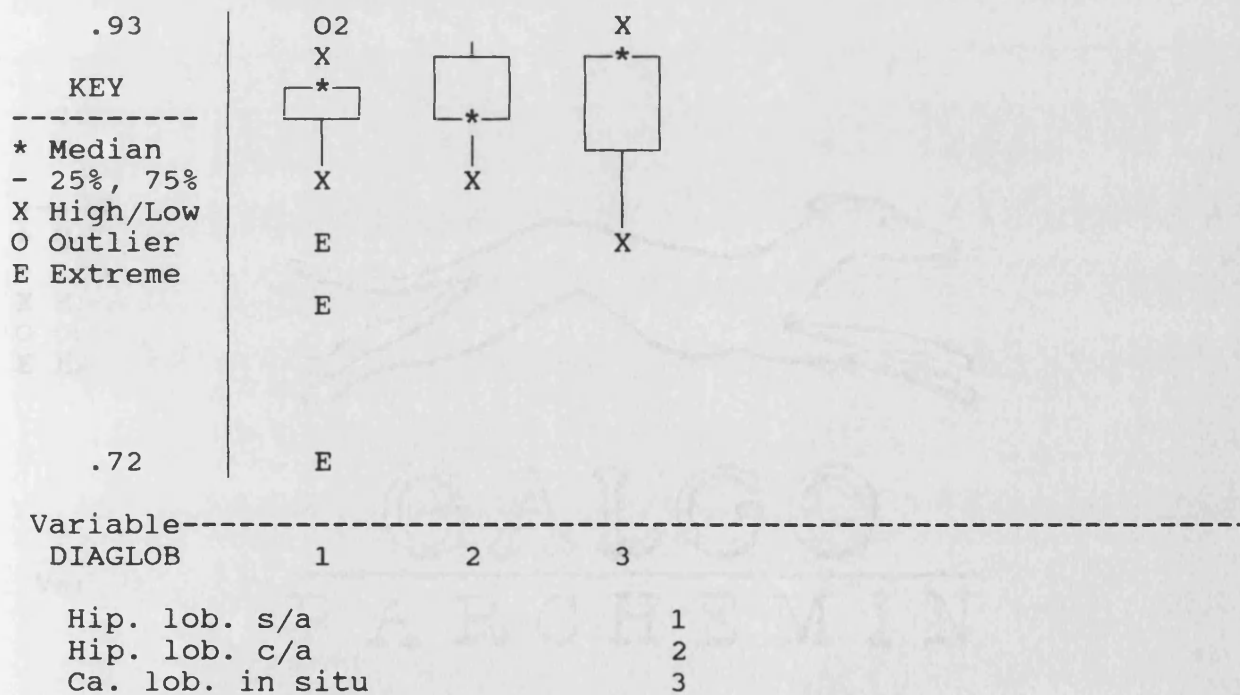
Box-Plots For Variable .. FORMAREA

Forma área
Figura nº 21



Box-Plots For Variable .. FORMPERI

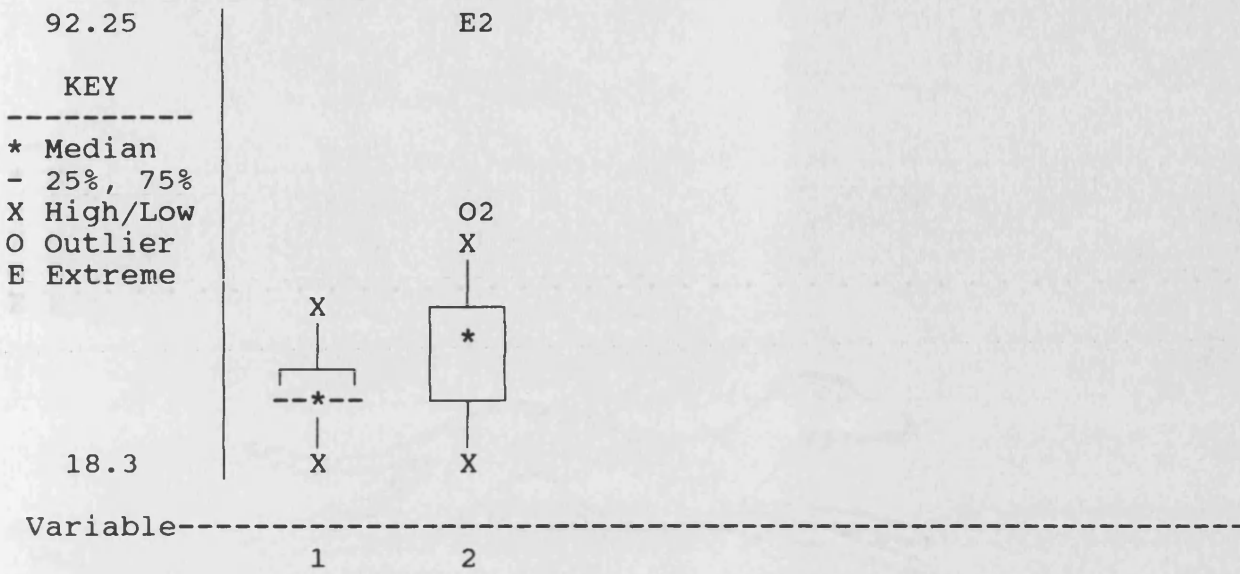
Forma per.



Box-Plots For Variable .. AREA

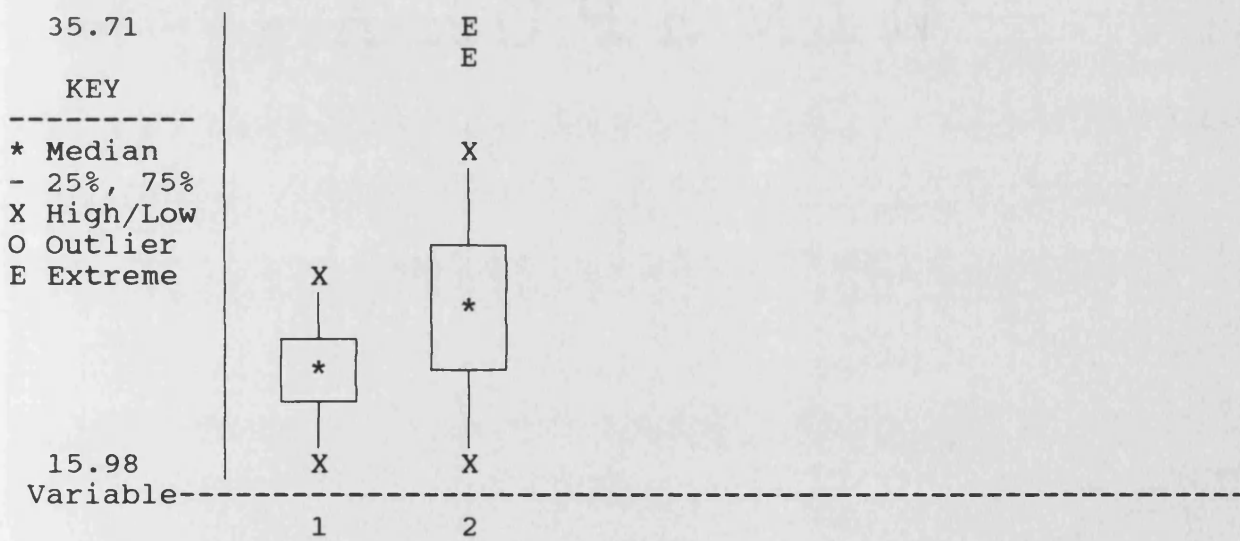
Area

Figura nº 22



Box-Plots For Variable .. PERI

Perímetro

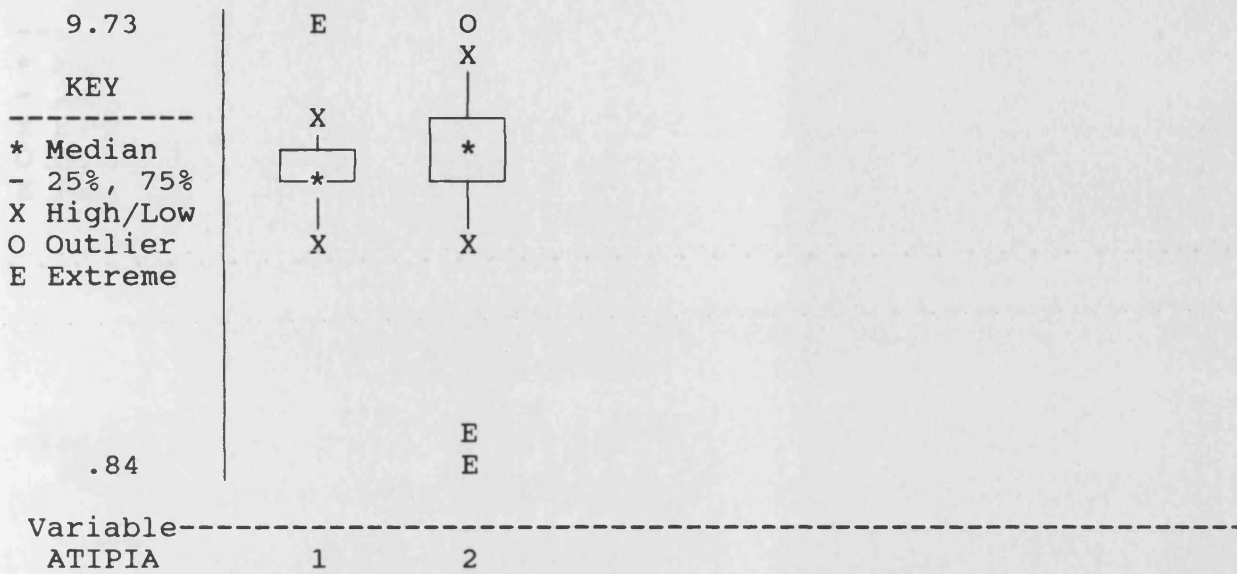


Adenosis, Metaplasia Apocrina y Esclerosis Radial 1
 Hiperplasia ductal y Lobulillar con Atipias
 más Carcinoma Intraductal y Lobulillar 2

Figura nº 23

Box-Plots For Variable .. DIAMMAX

Diám. máx.

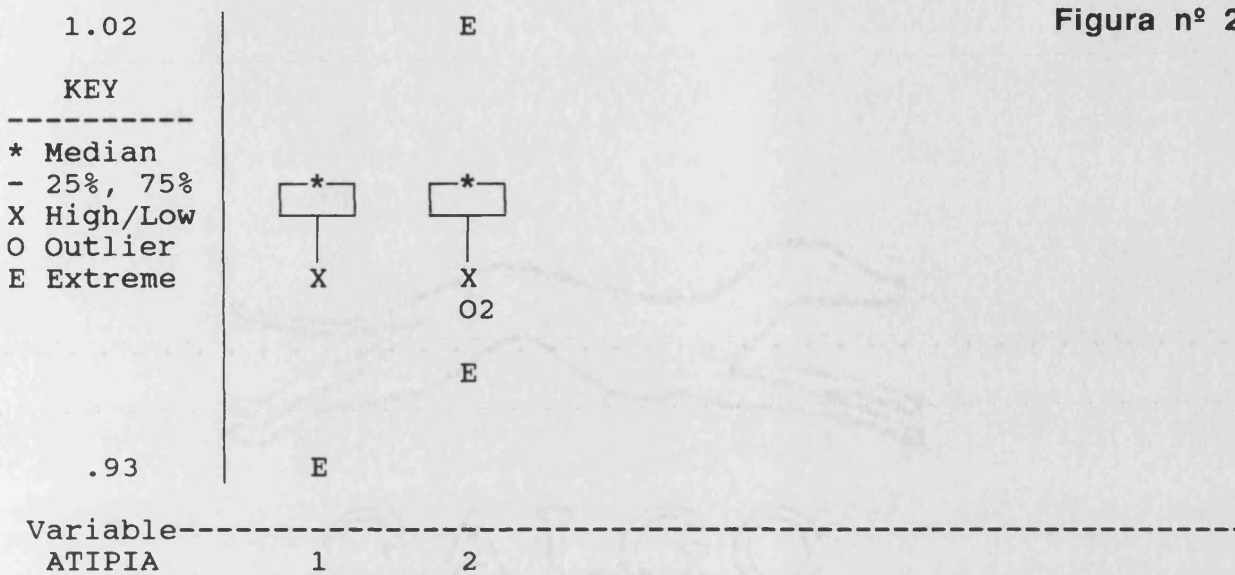


Adenosis, Metaplasia Apocrina y Esclerosis Radial	1
Hiperplasia ductal y Lobulillar con Atipias más Carcinoma Intraductal y Lobulillar	2

Box-Plots For Variable .. FORMAREA

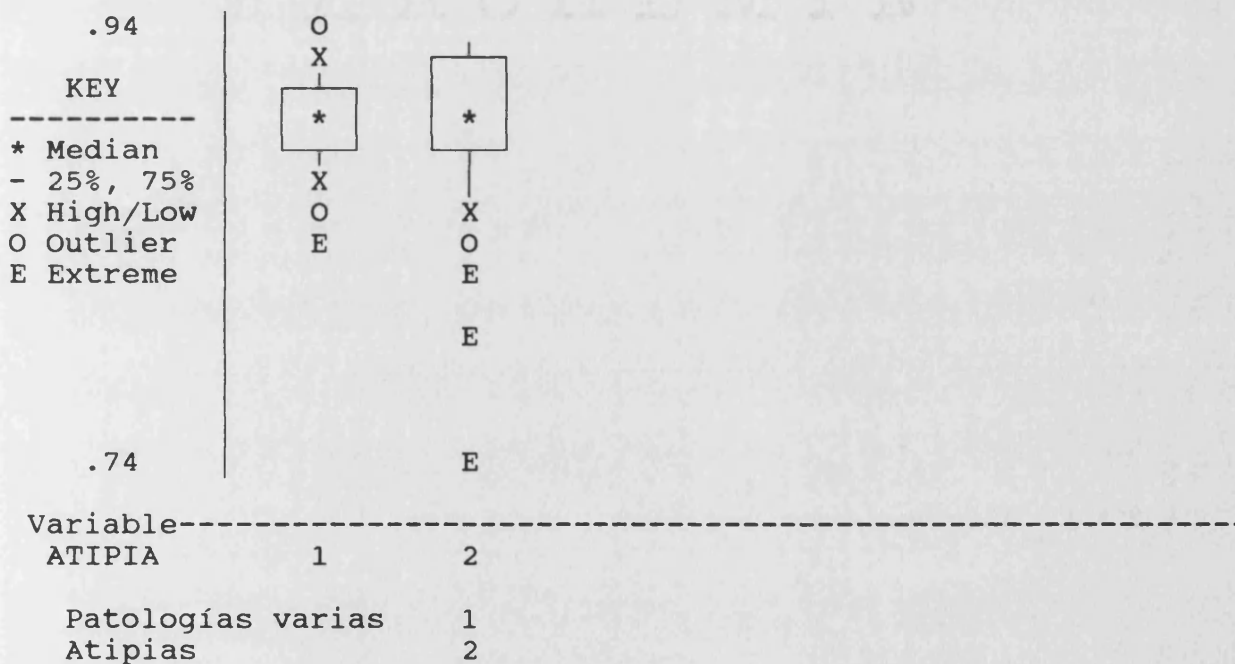
Forma área

Figura nº 24

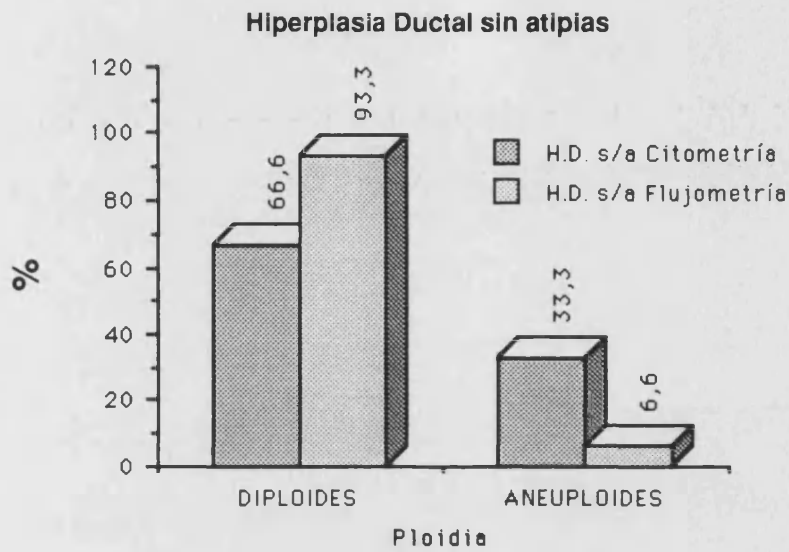


Box-Plots For Variable .. FORMPERI

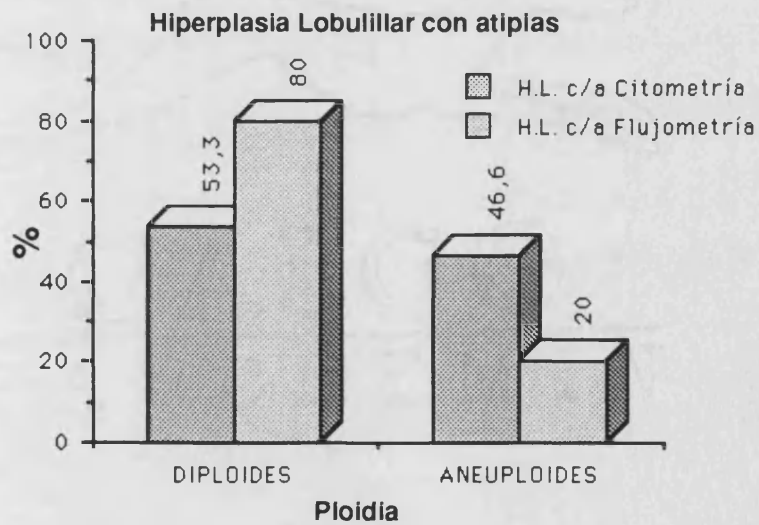
Forma per.



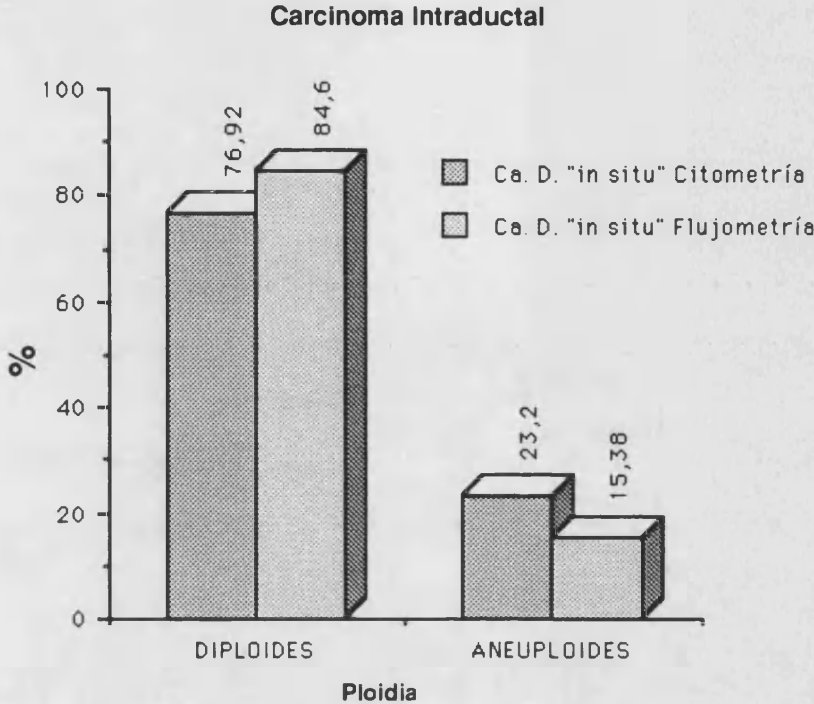
GRAFICAS



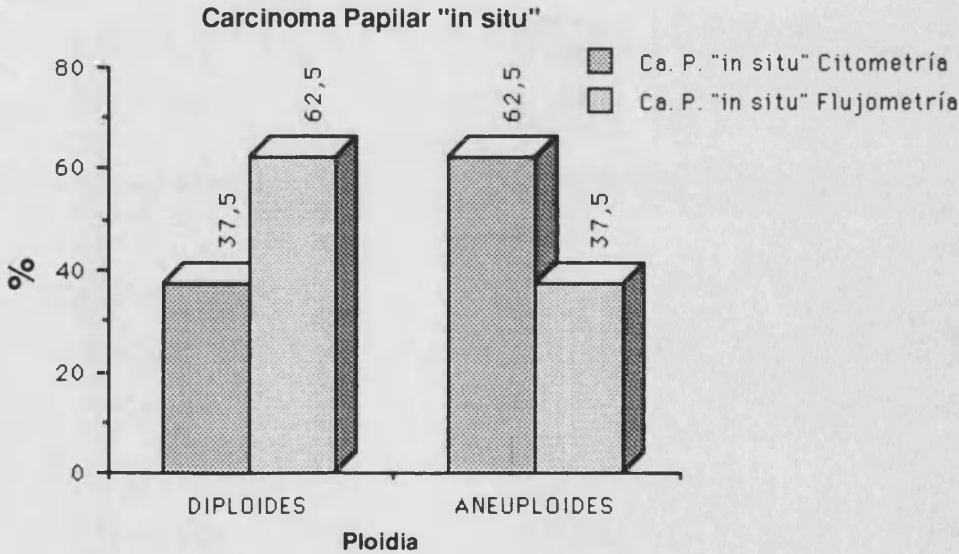
Gráfica nº 1



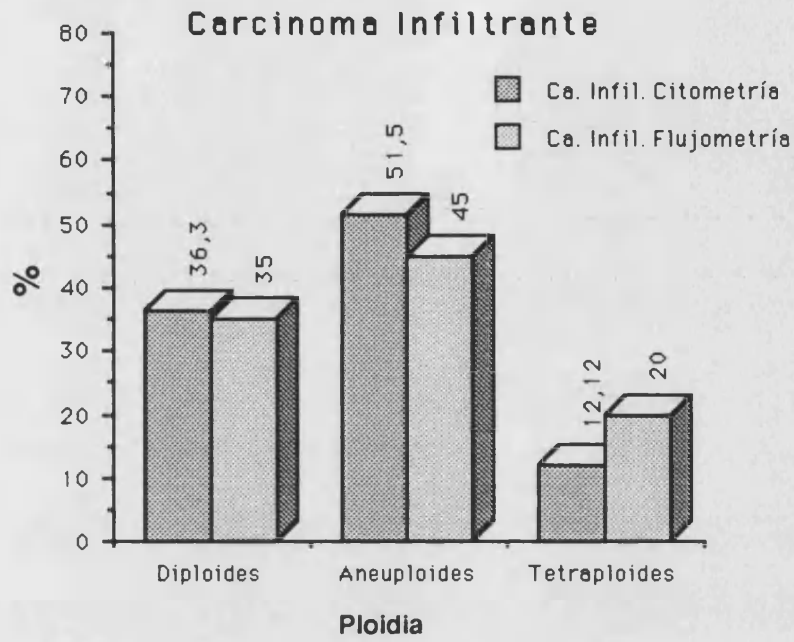
Gráfica nº 2



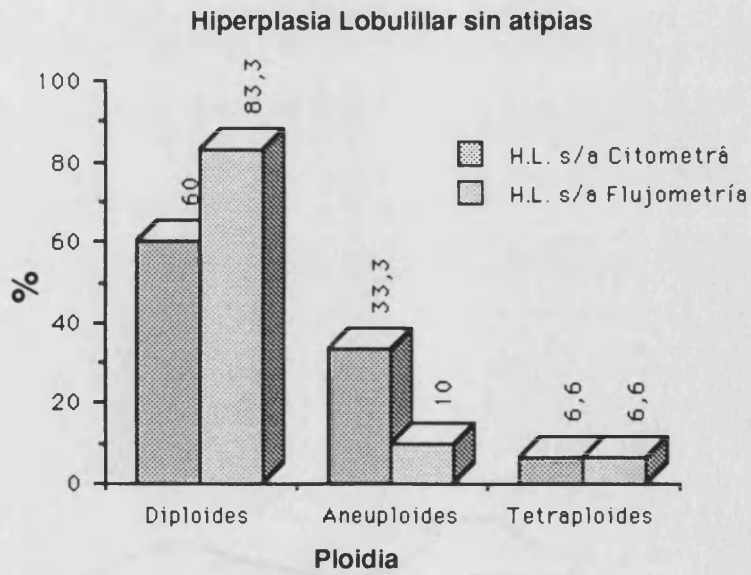
Gráfica nº 3



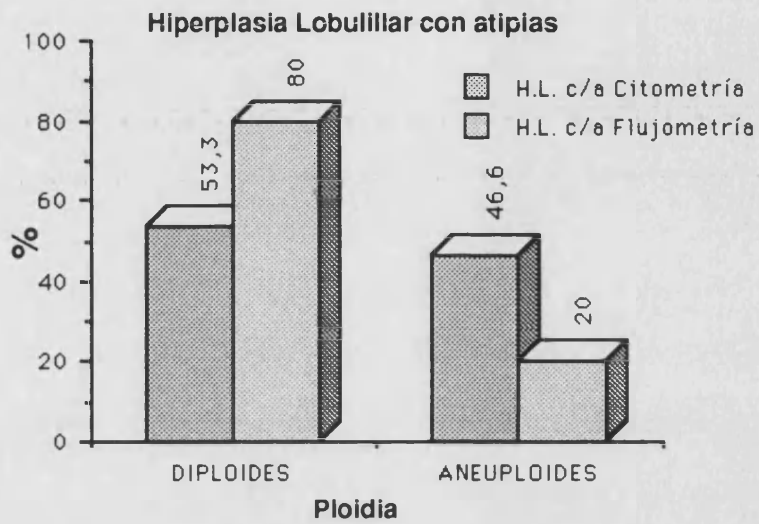
Gráfica nº 4



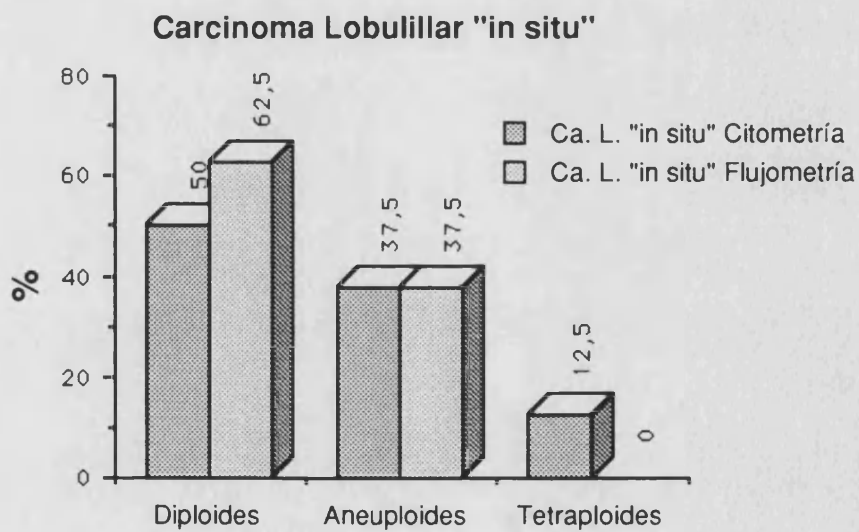
Gráfica nº 5



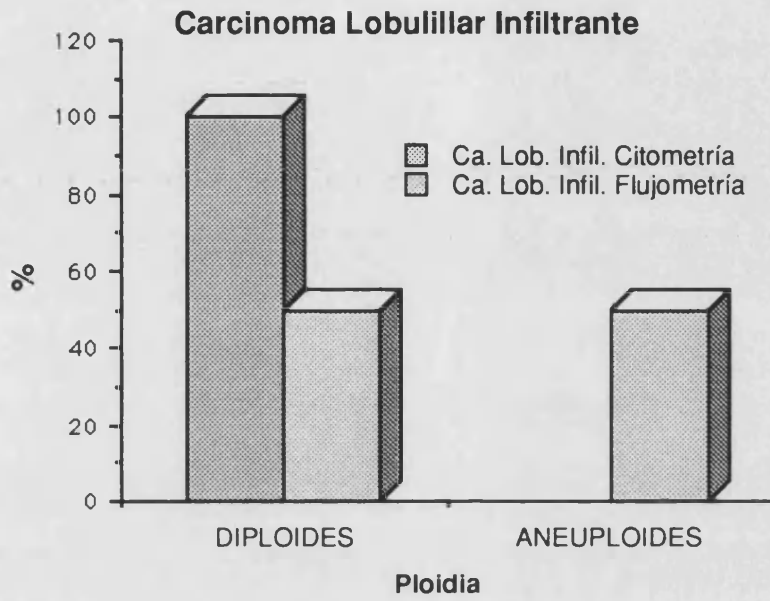
Gráfica nº 6



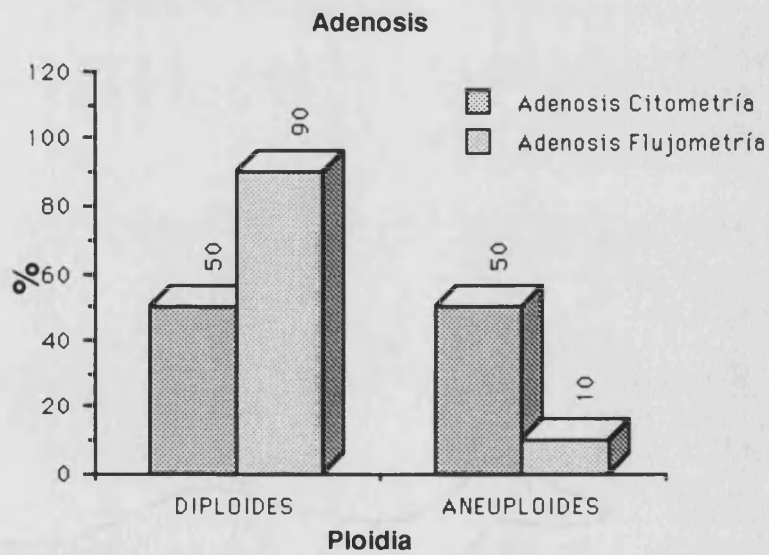
Gráfica nº 7



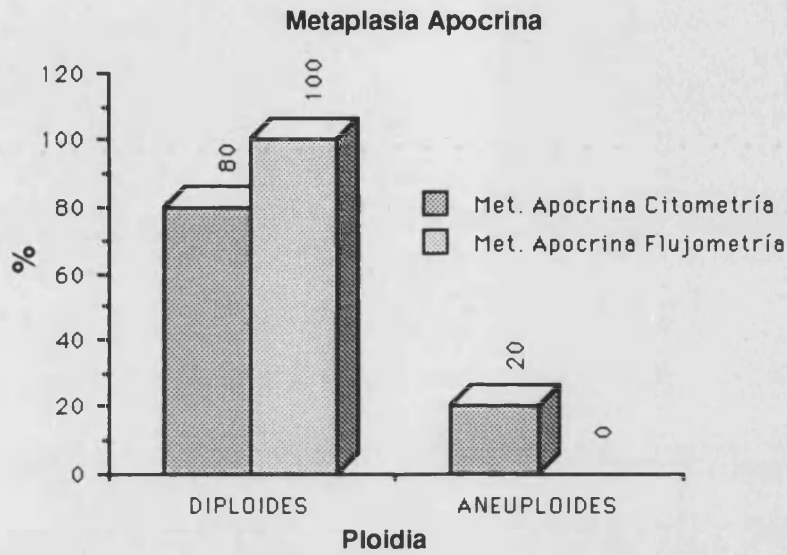
Gráfica nº 8



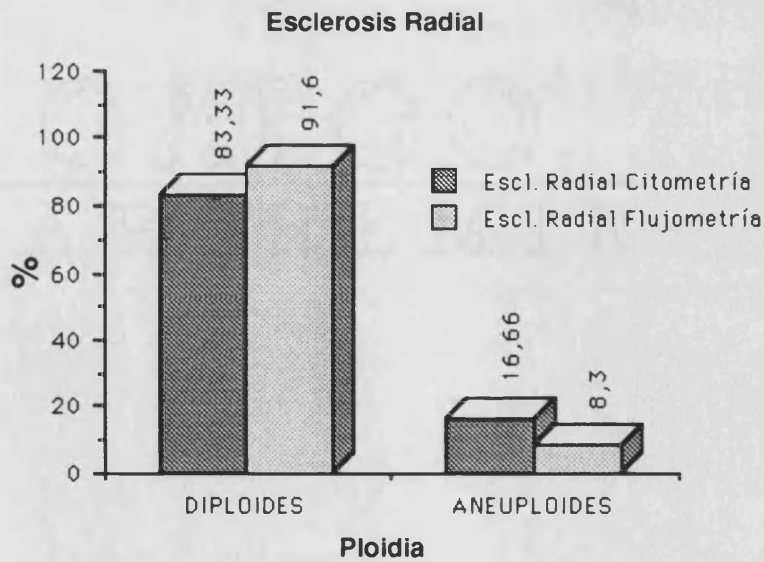
Gráfica nº 9



Gráfica nº 10

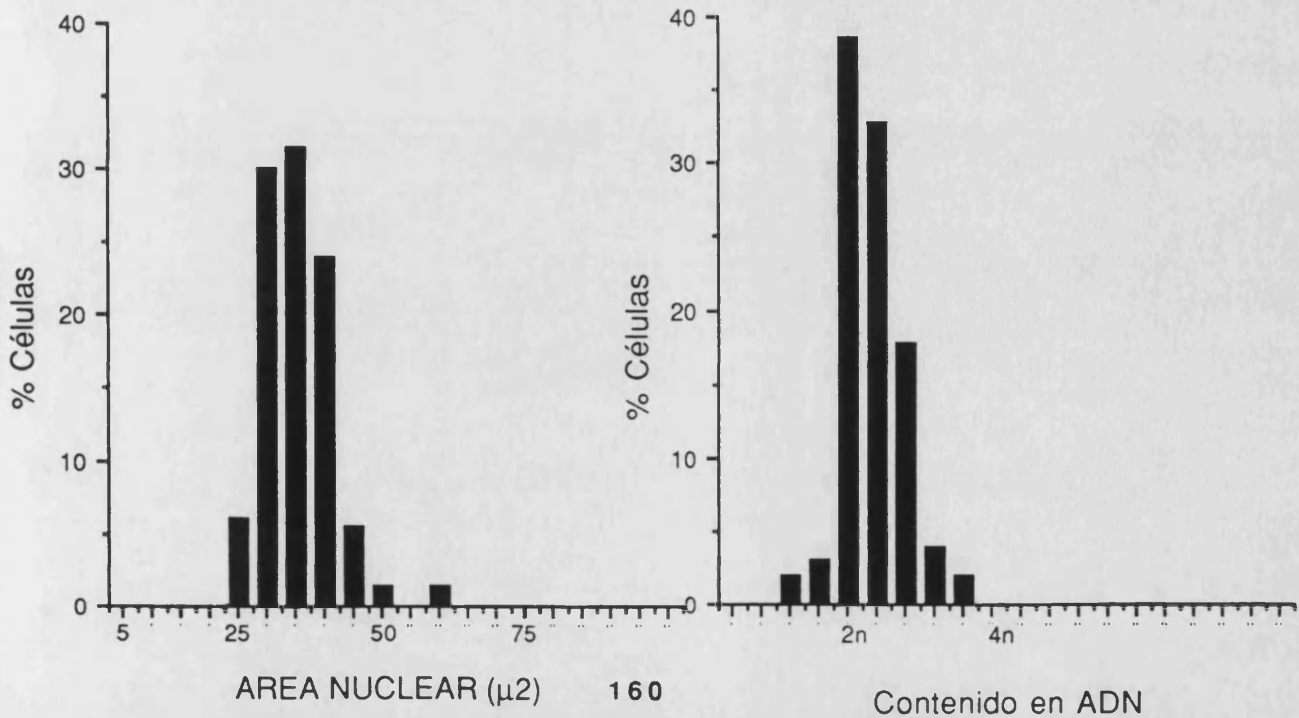
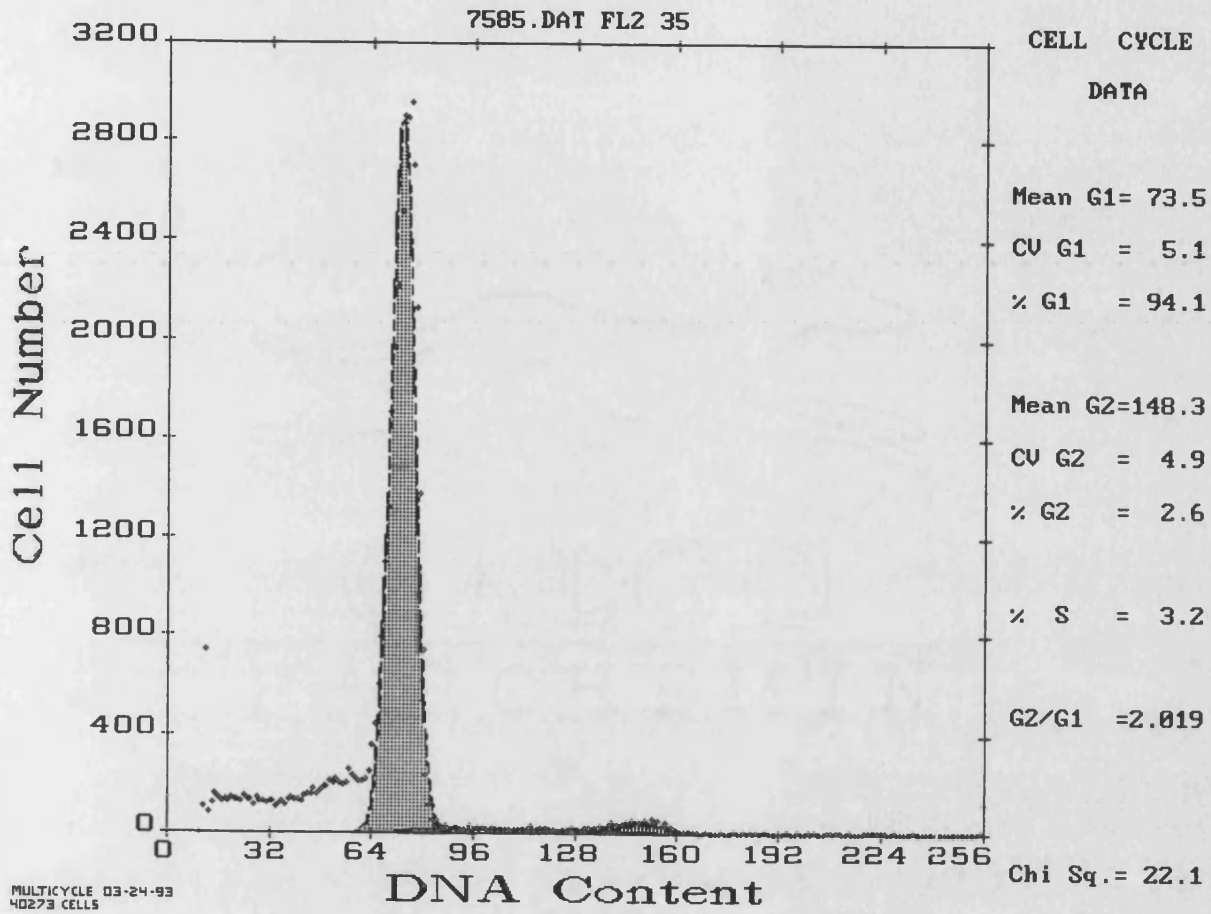


Gráfica nº 11

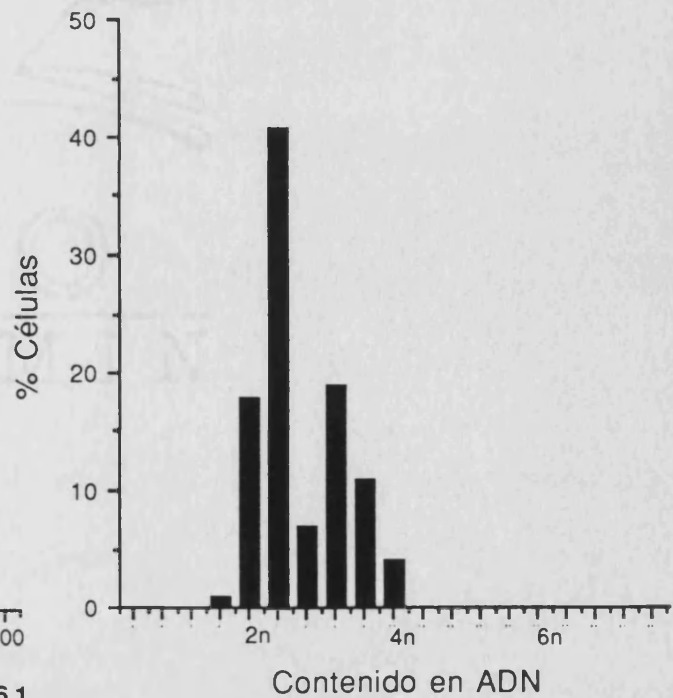
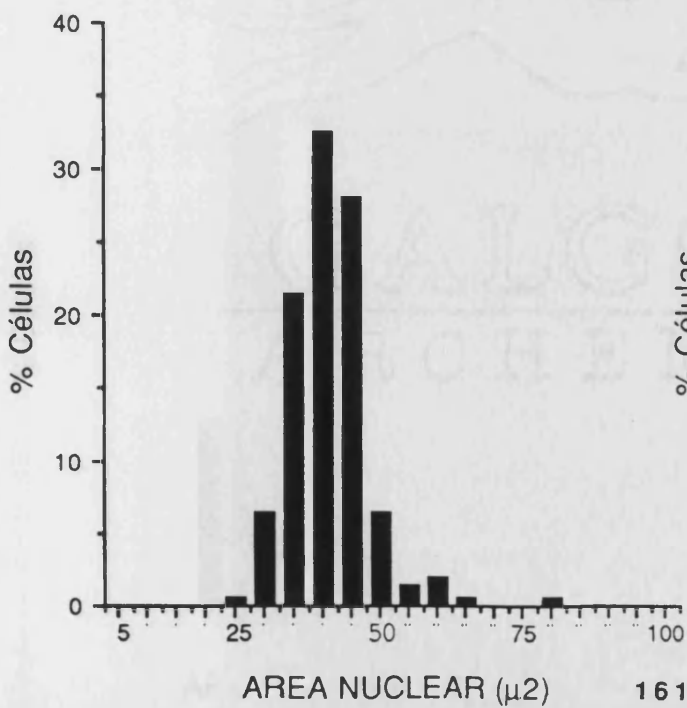
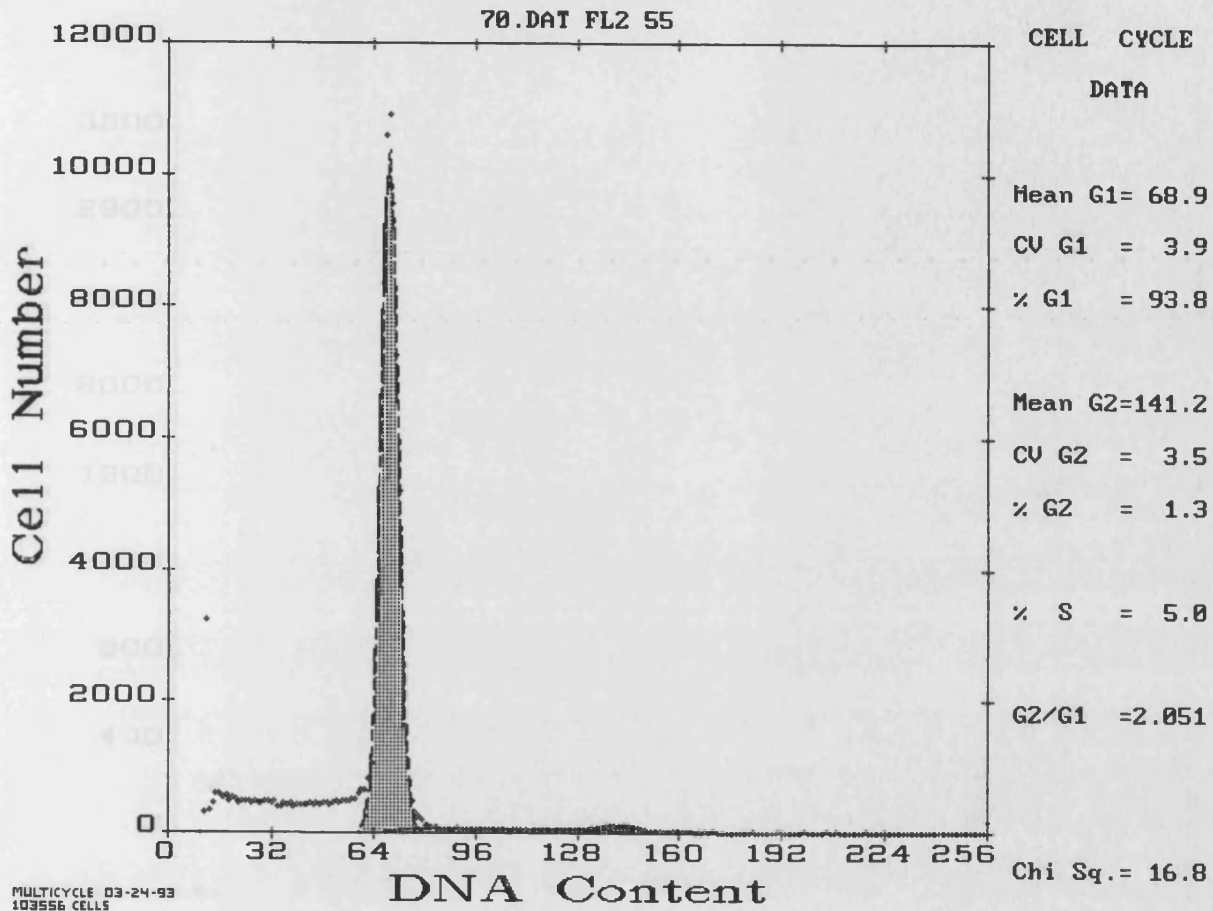


Gráfica nº 12

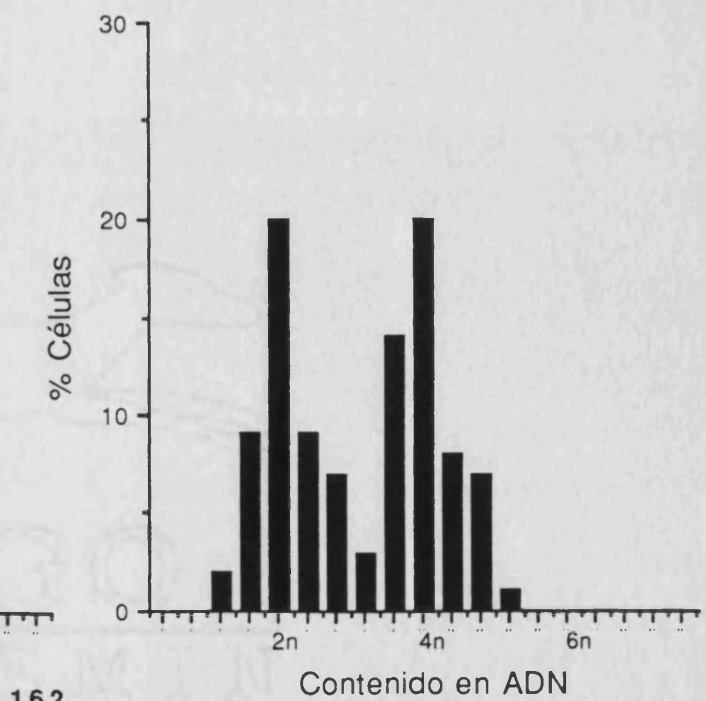
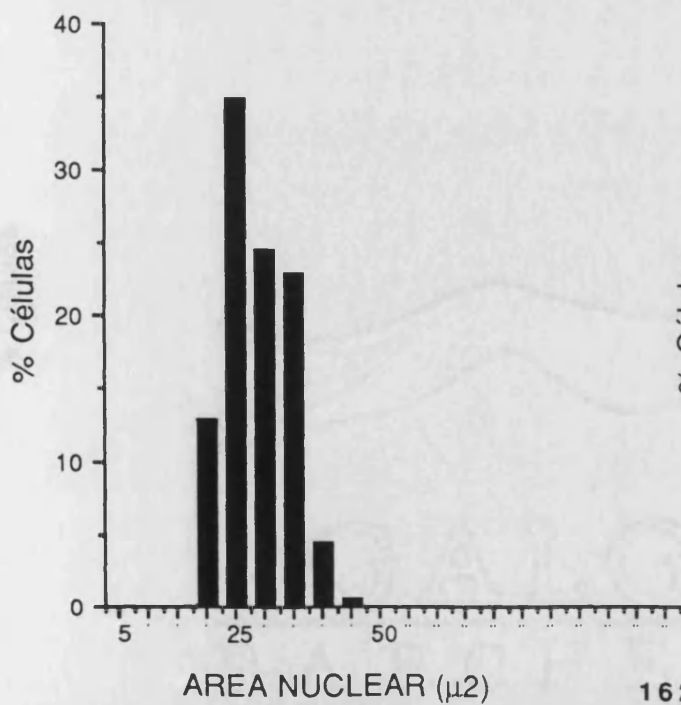
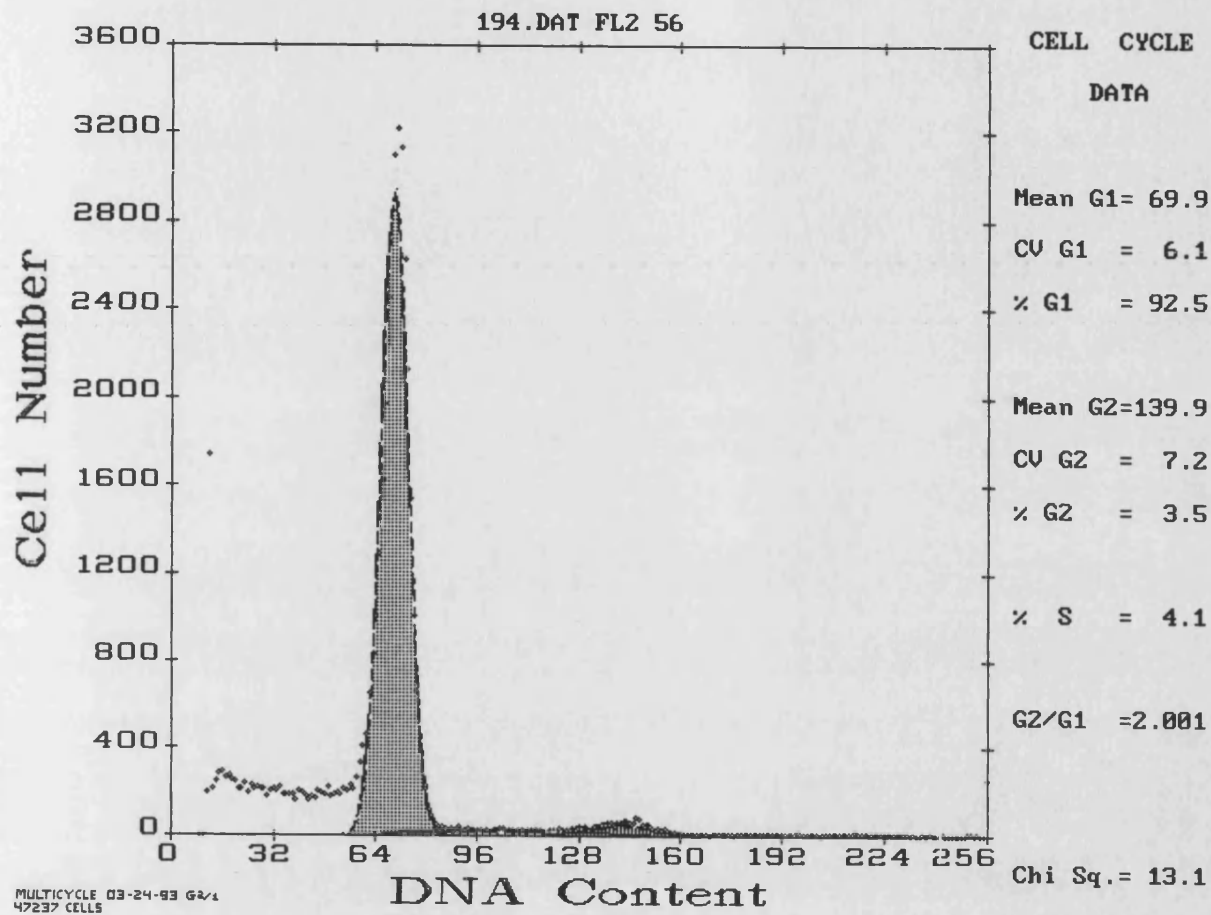
EPITELIOSIS SIN ATIPIAS



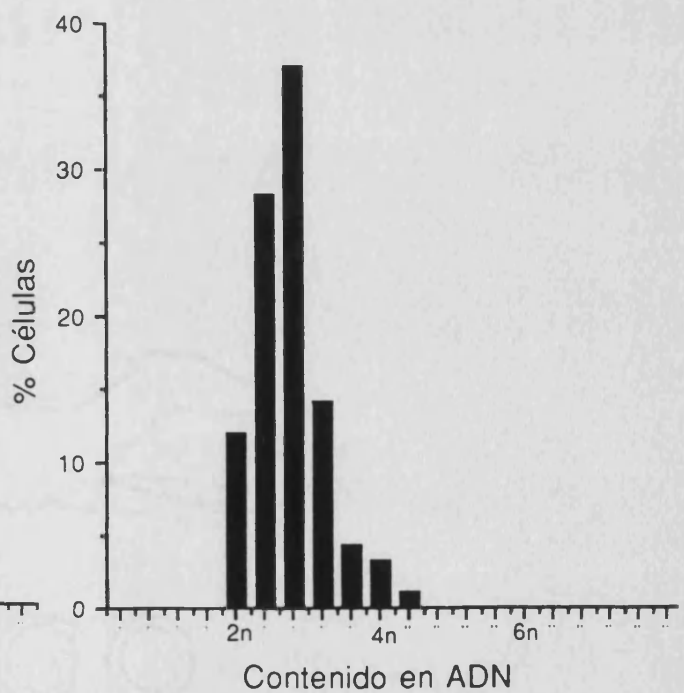
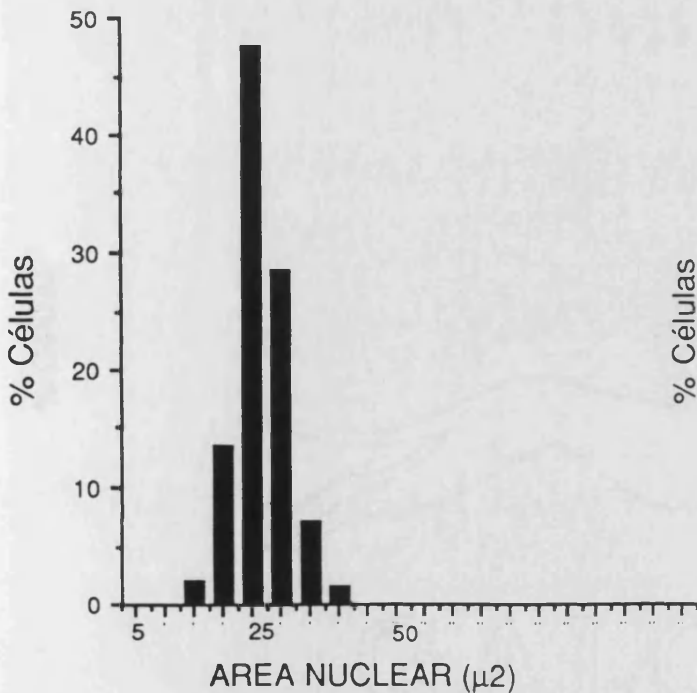
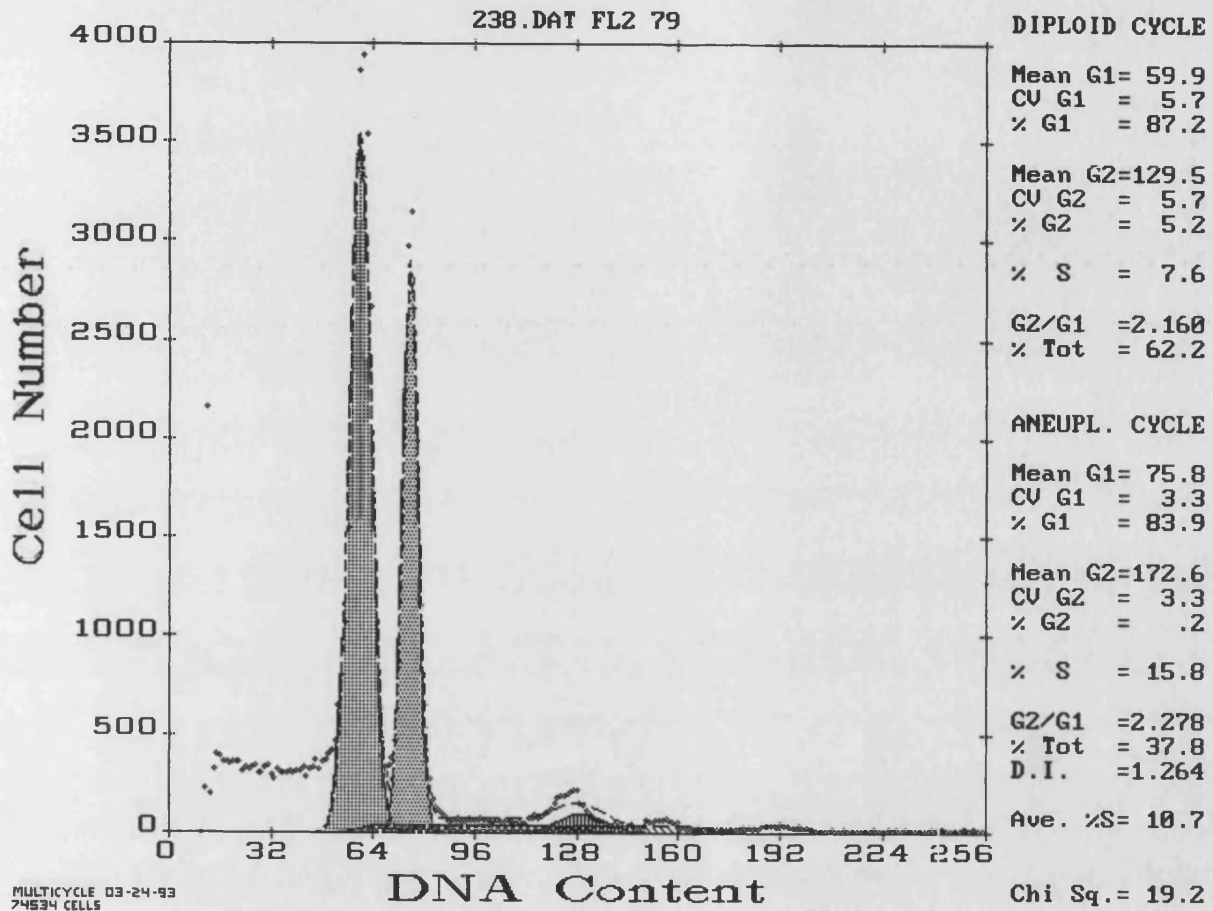
EPITELIOSIS SIN ATIPIAS



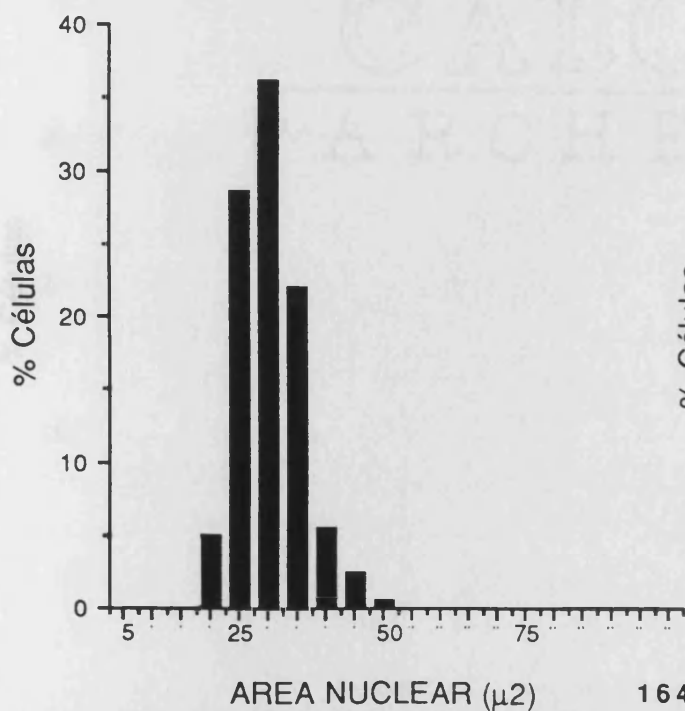
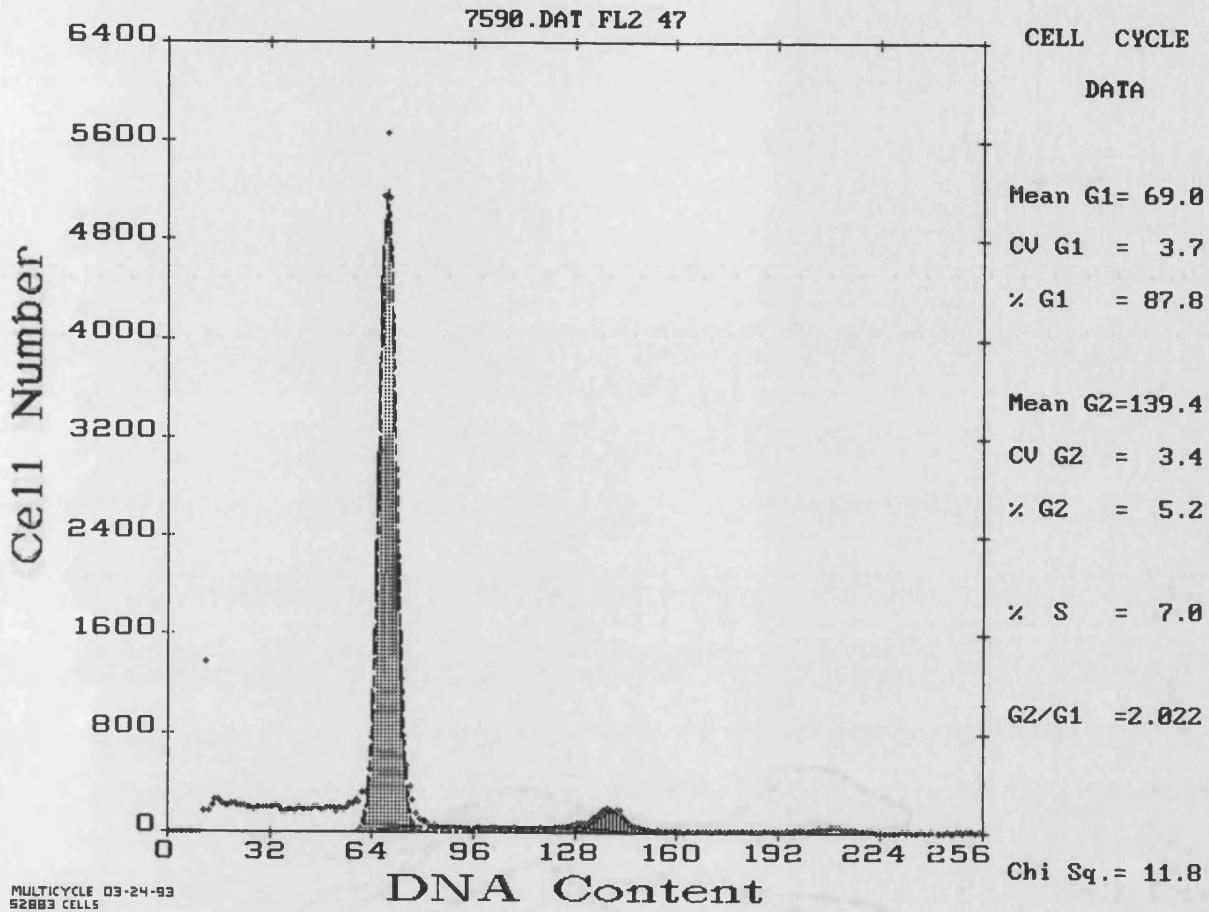
PAPILOMATOSIS SIN ATIPIAS



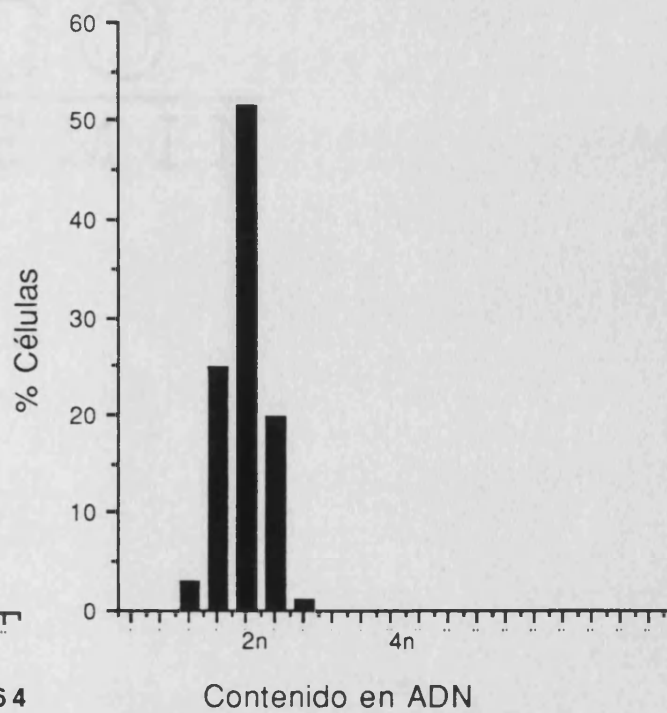
PAPILOMATOSIS SIN ATIPIAS



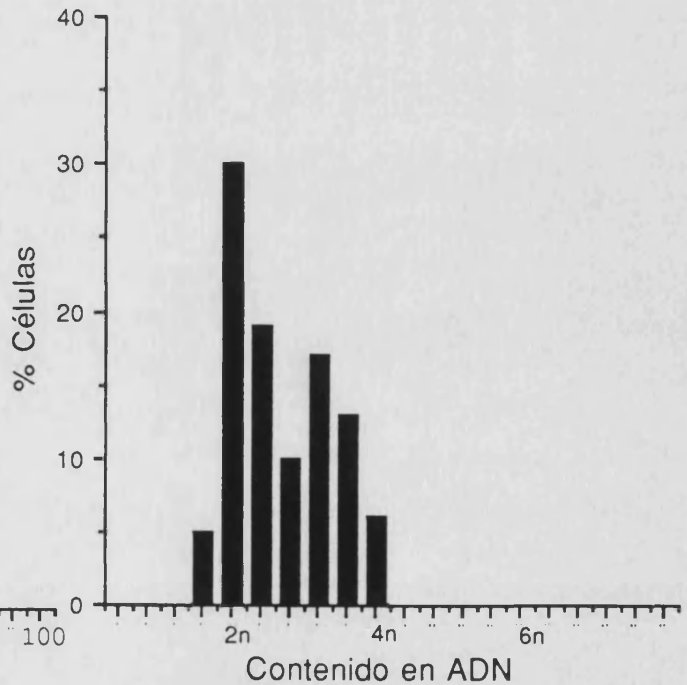
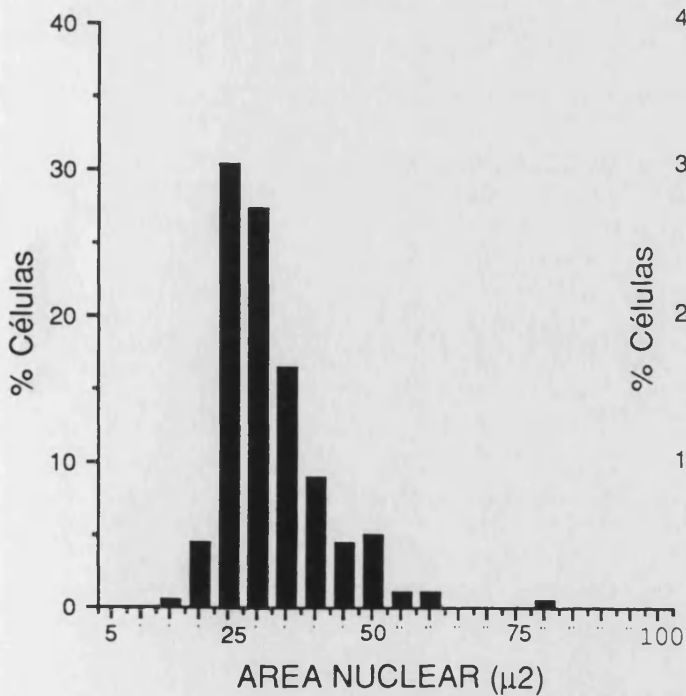
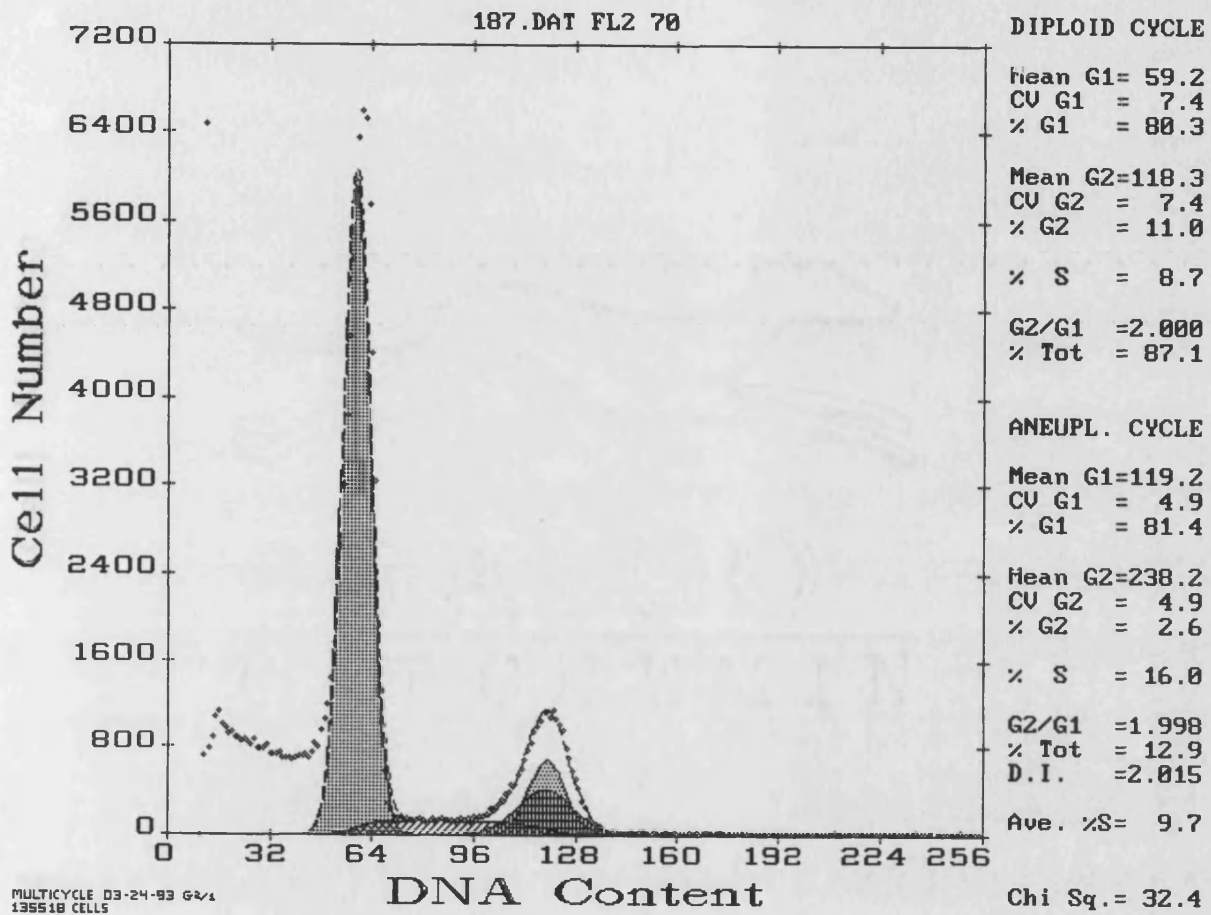
HIP. LOBULILLAR SIN ATIPIAS



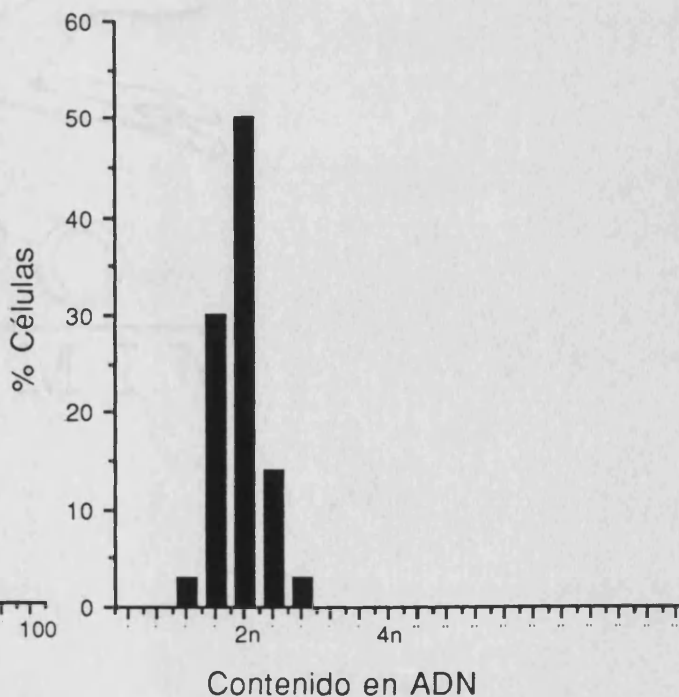
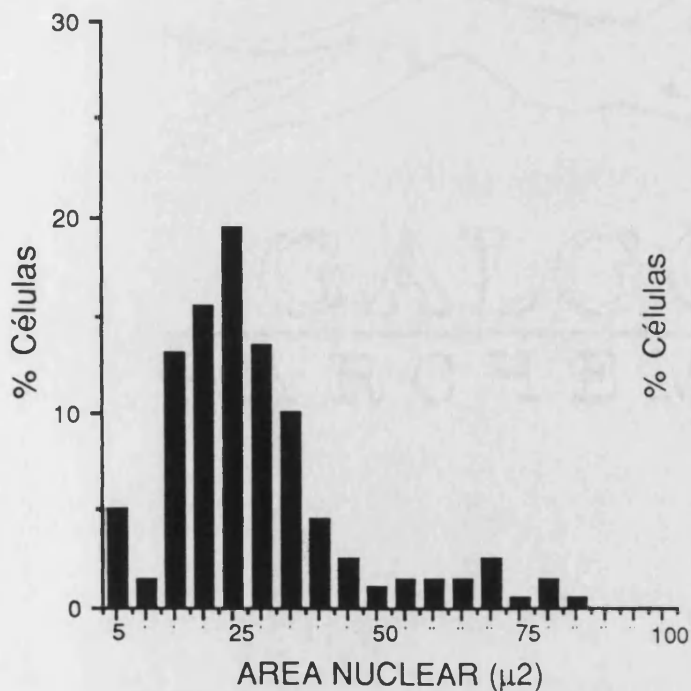
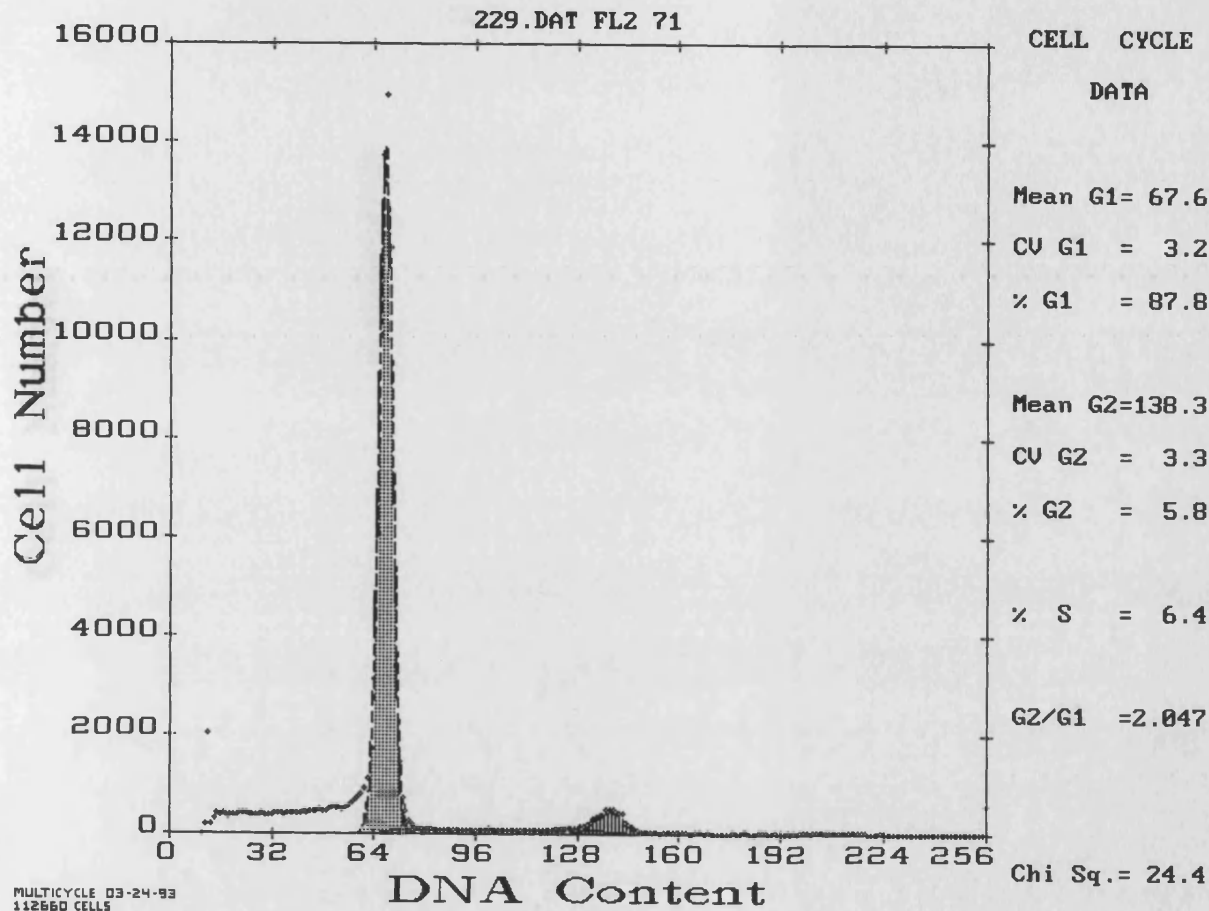
164



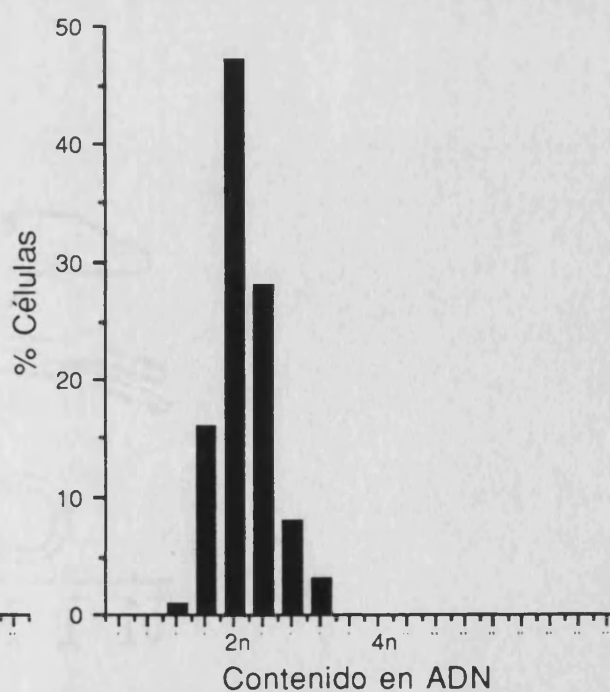
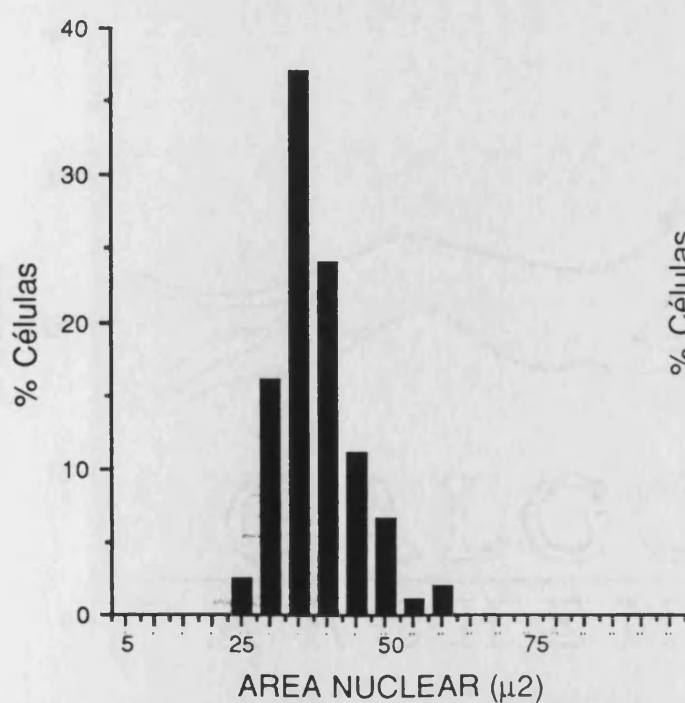
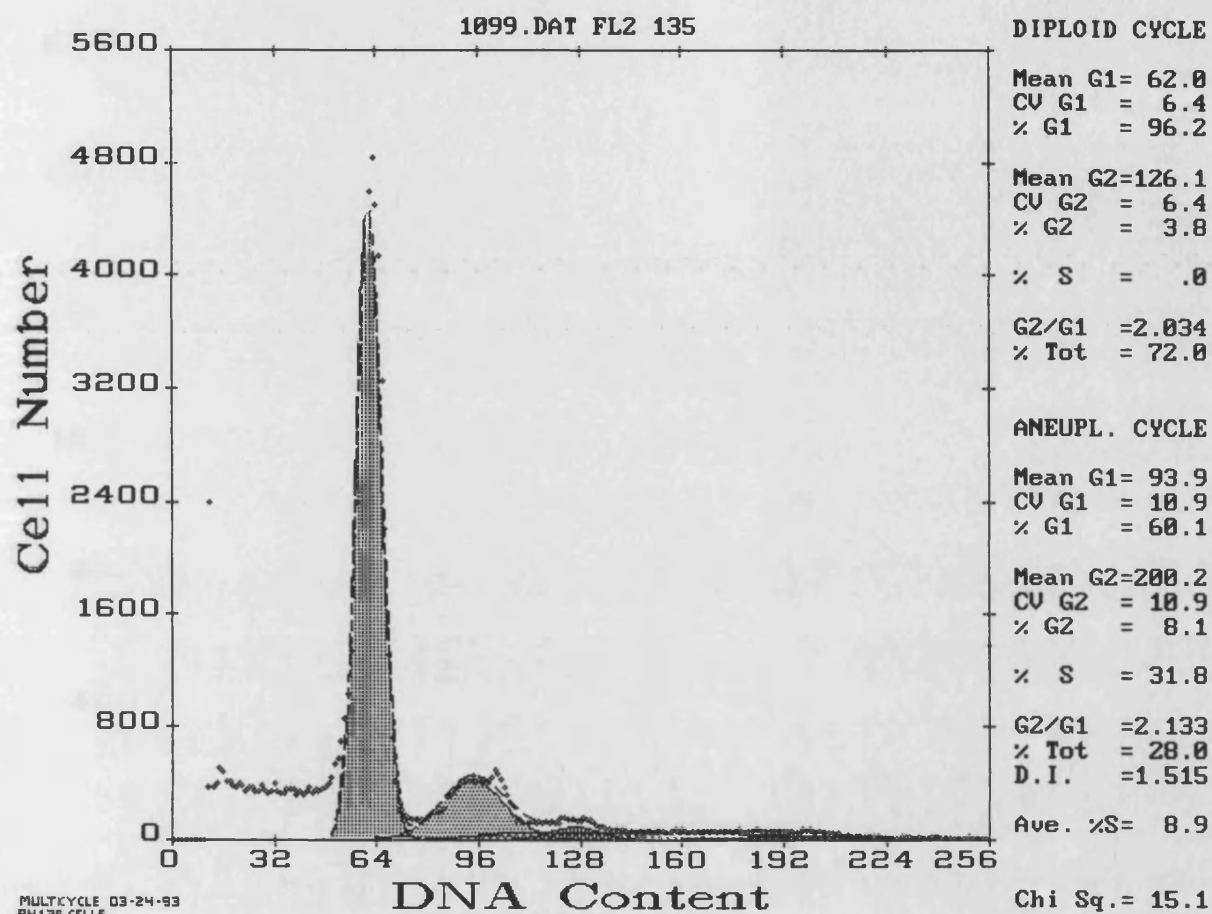
HIP. LOBULILLAR SIN ATIPIAS



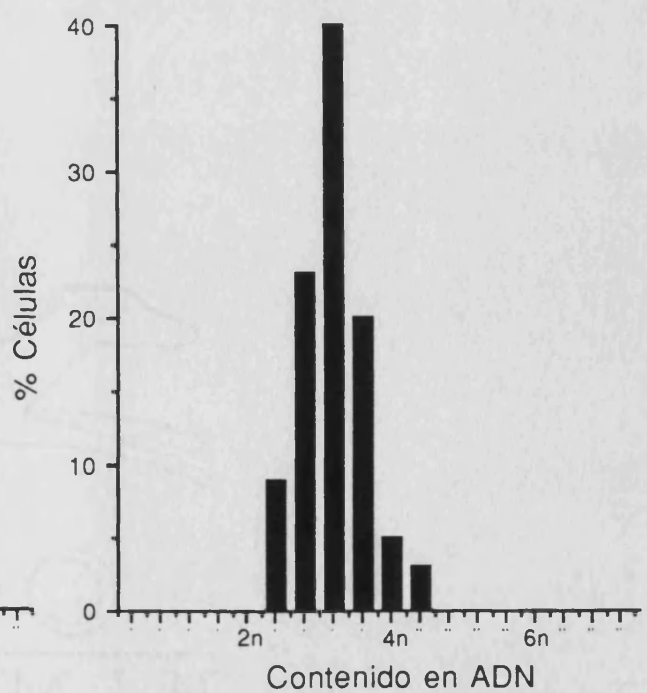
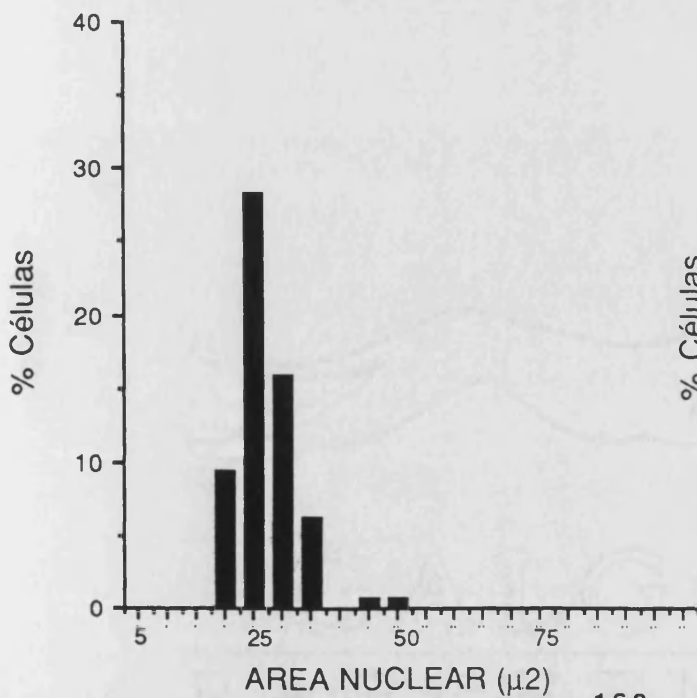
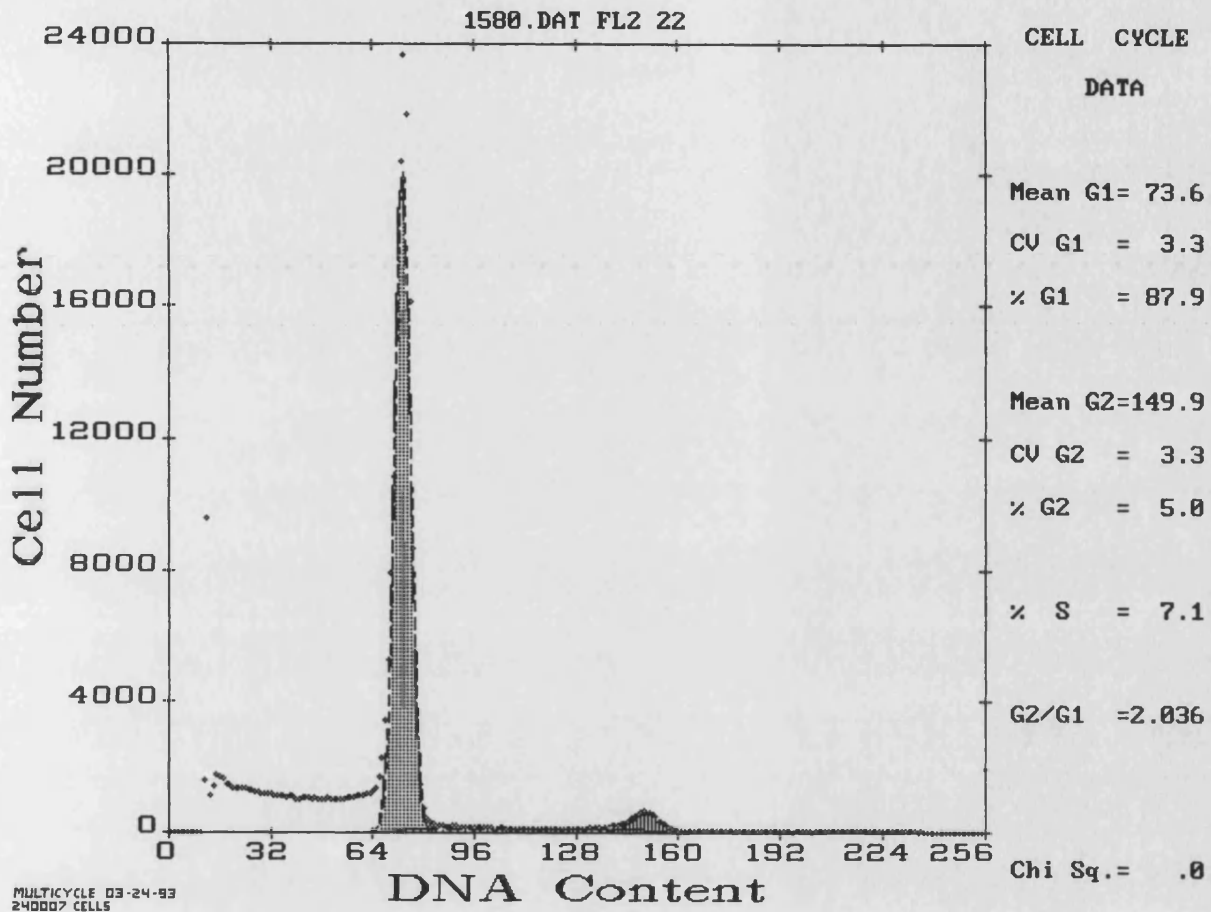
HIP. LOBULILLAR SIN ATIPIAS



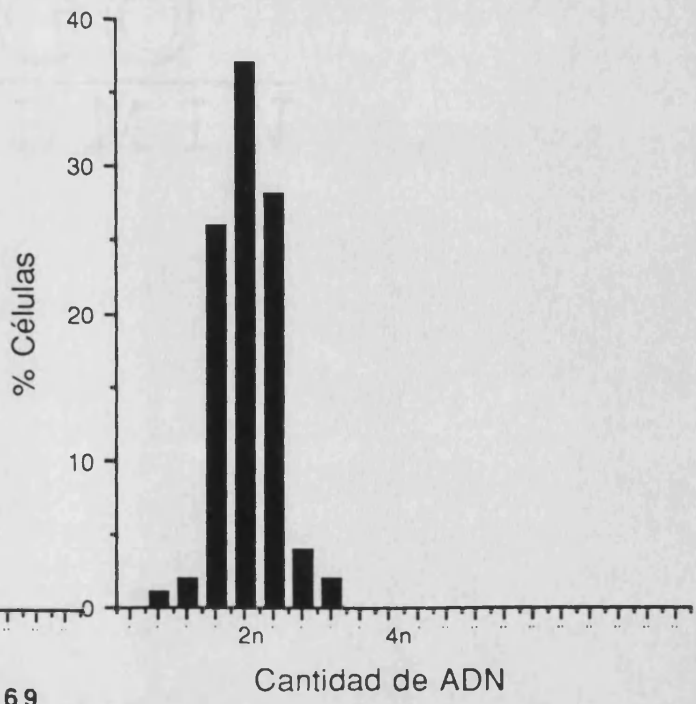
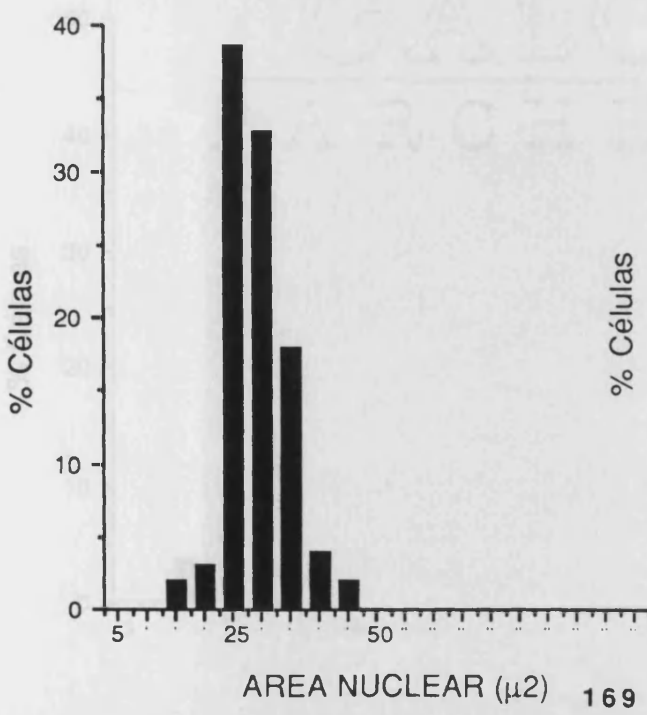
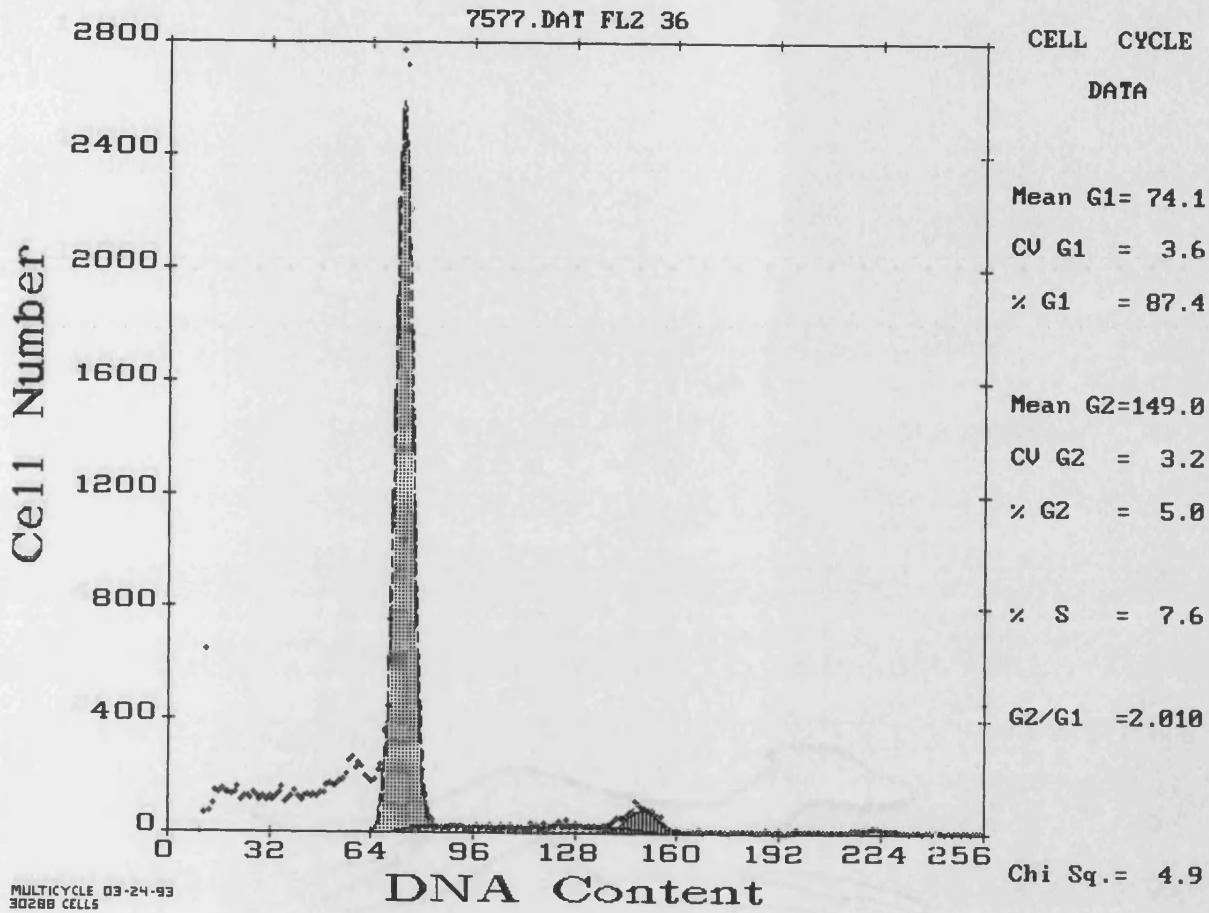
HIP. LOBULLAR SIN ATIPIAS



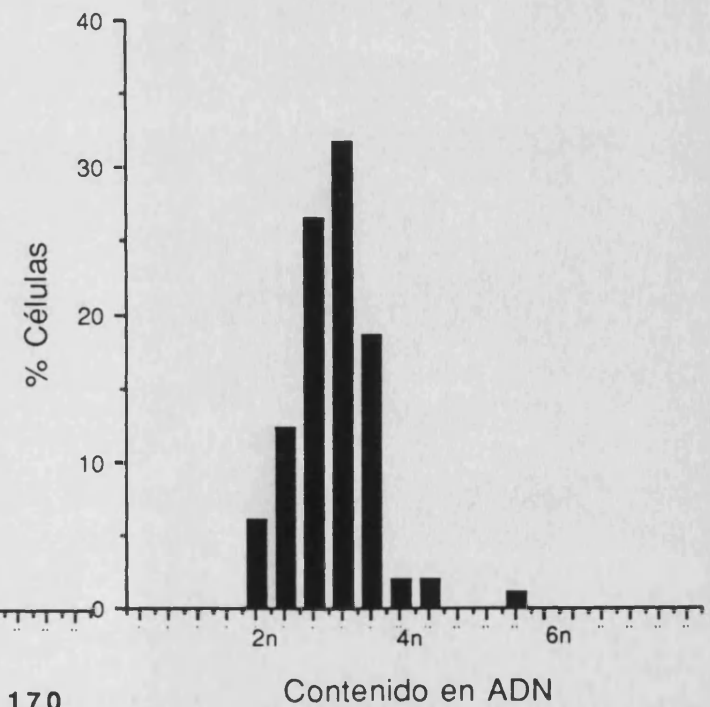
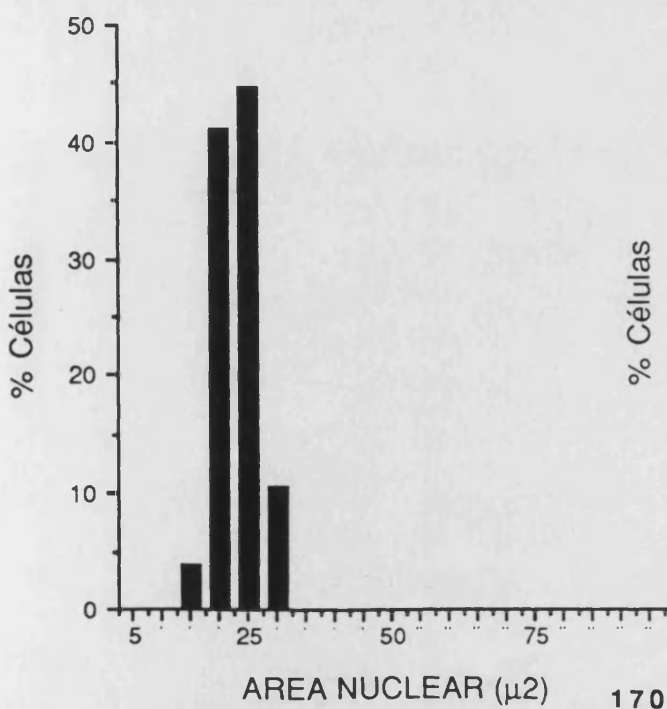
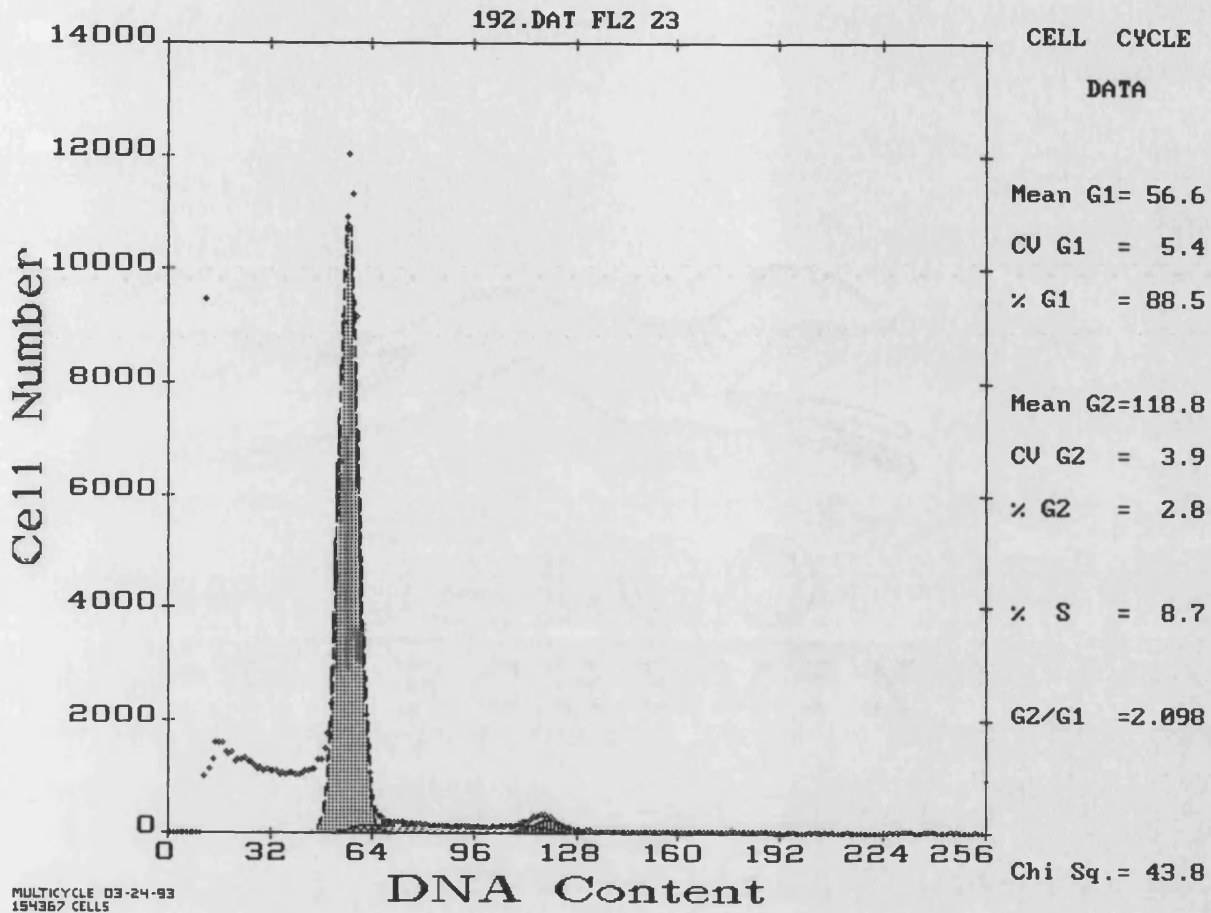
ADENOSIS QUISTICA



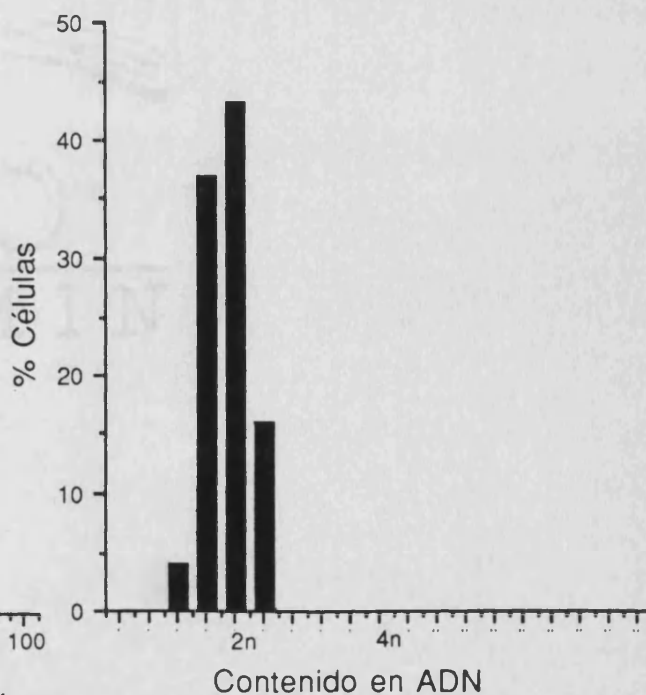
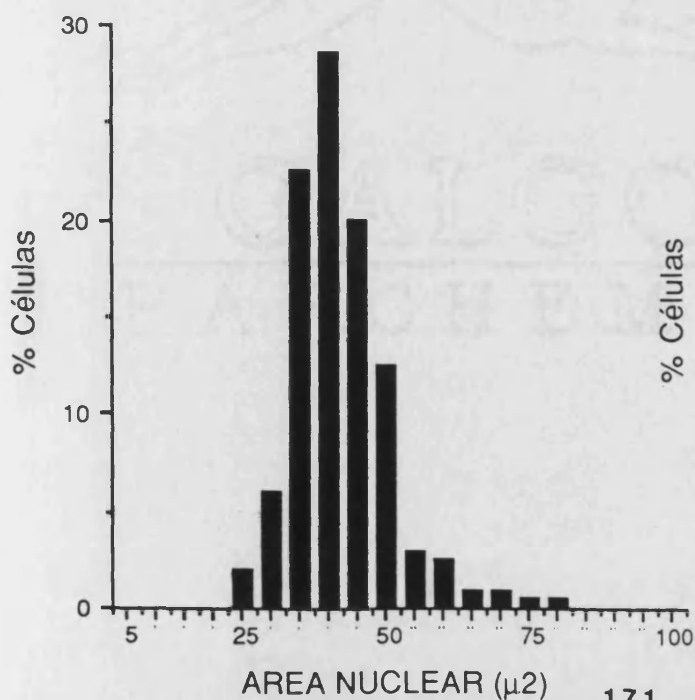
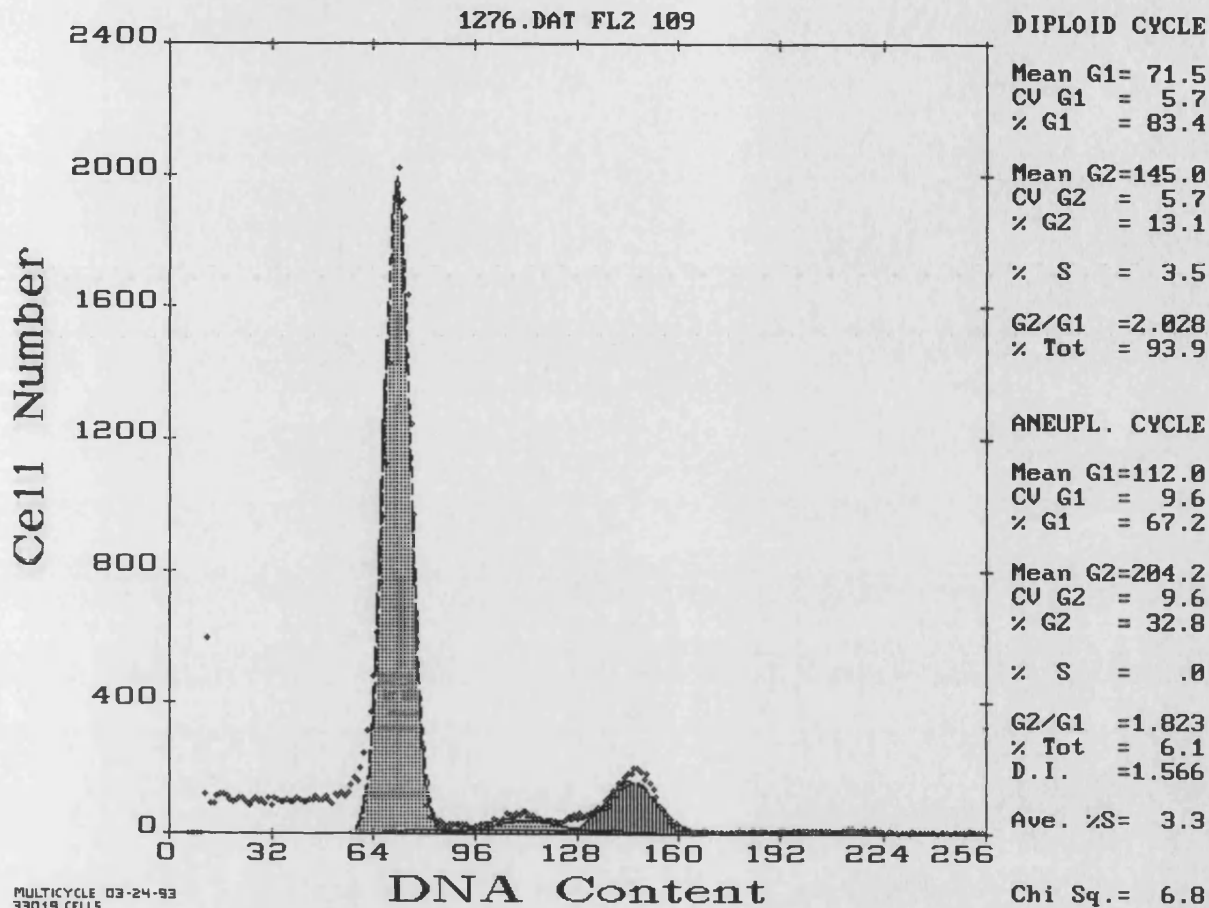
ADENOSIS TUMORAL



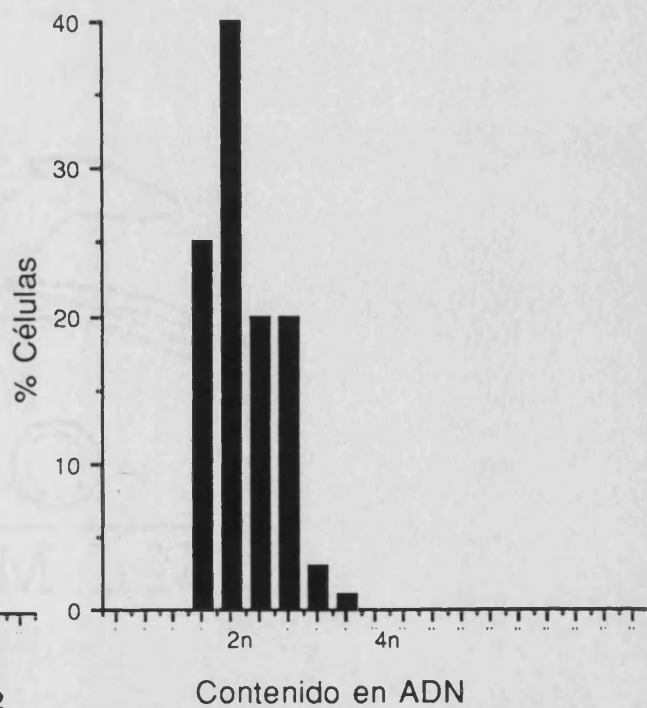
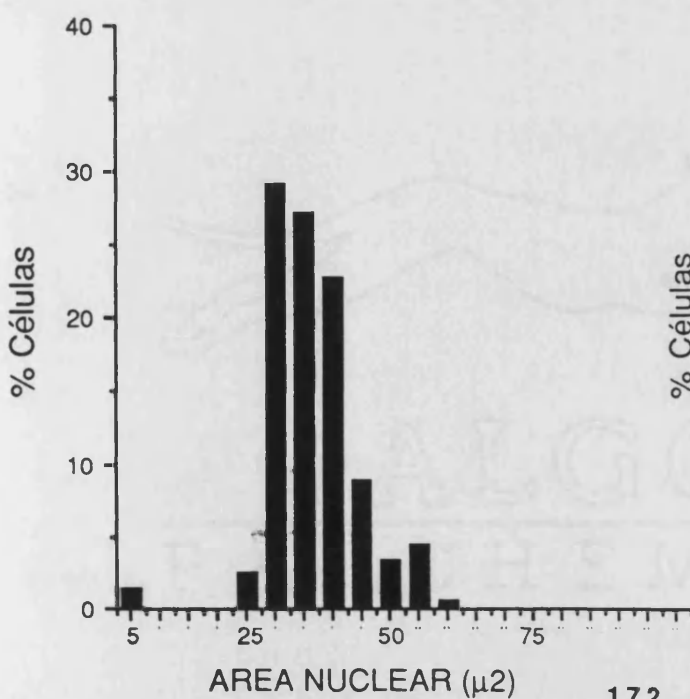
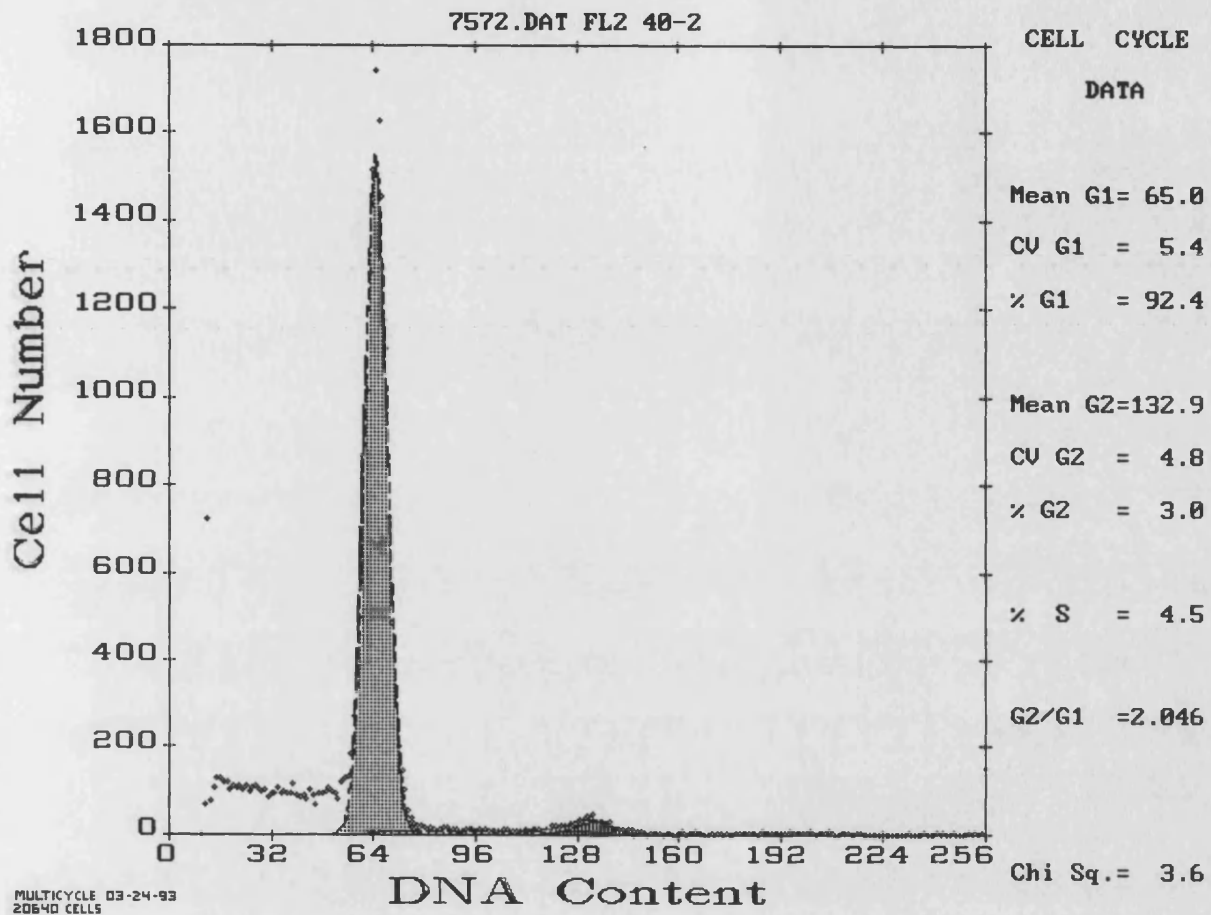
METAPLASIA APOCRINA



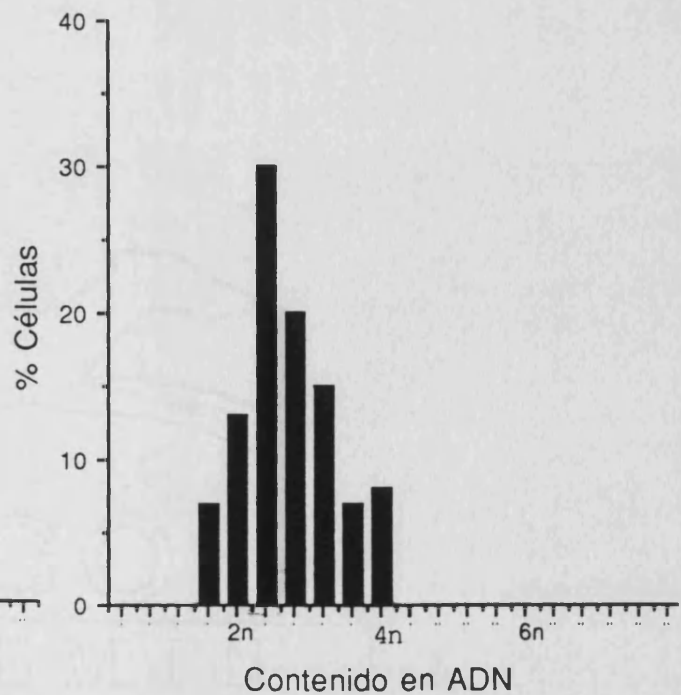
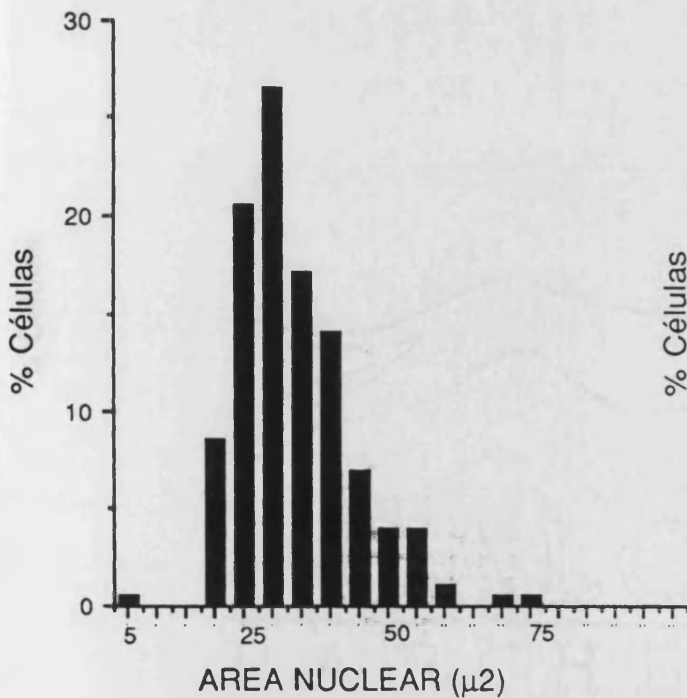
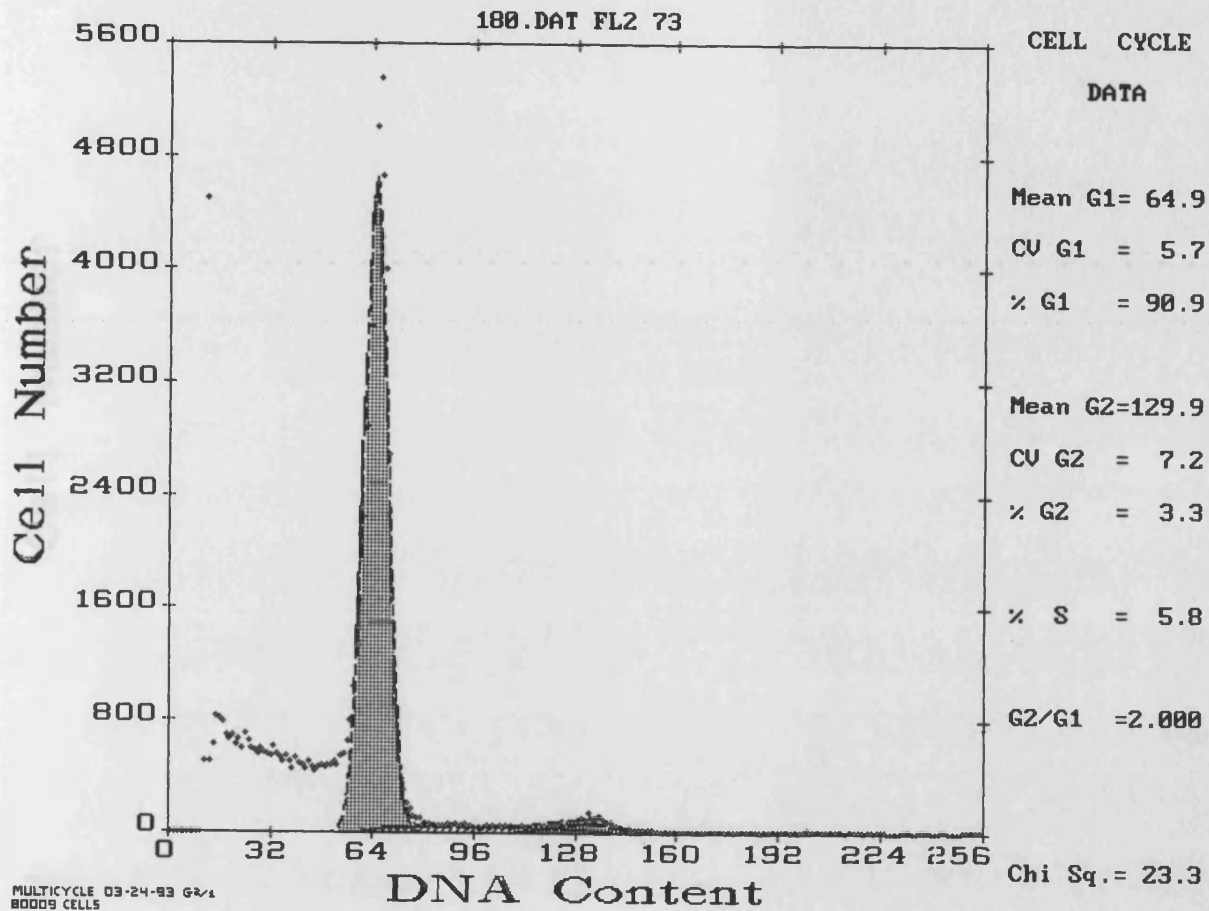
ESCLEROSIS RADIAL



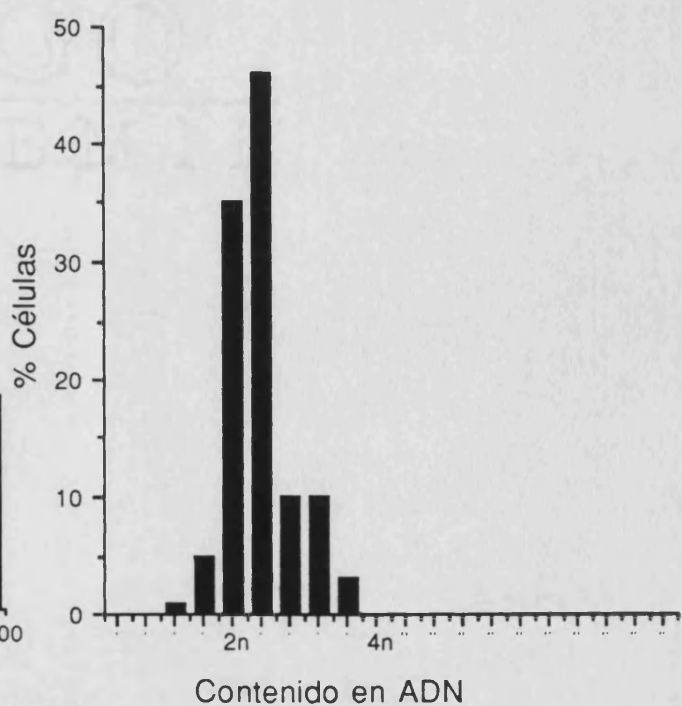
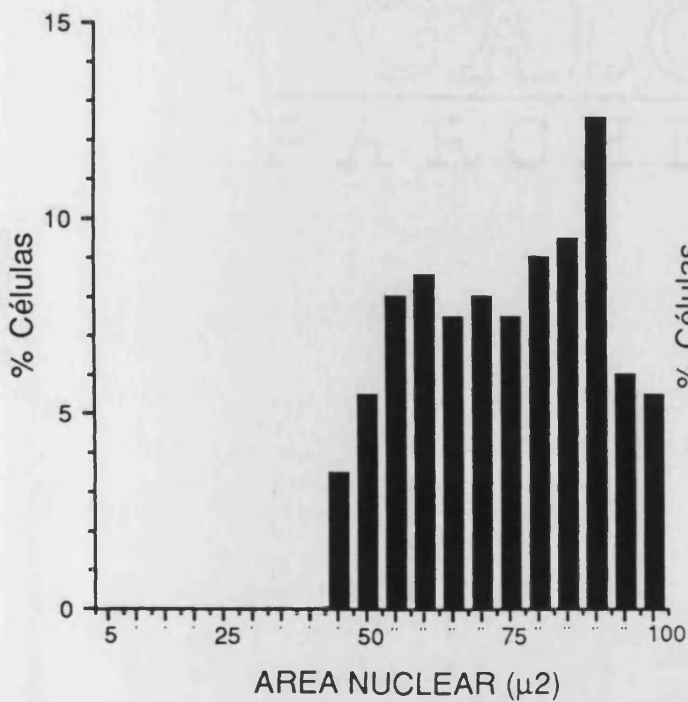
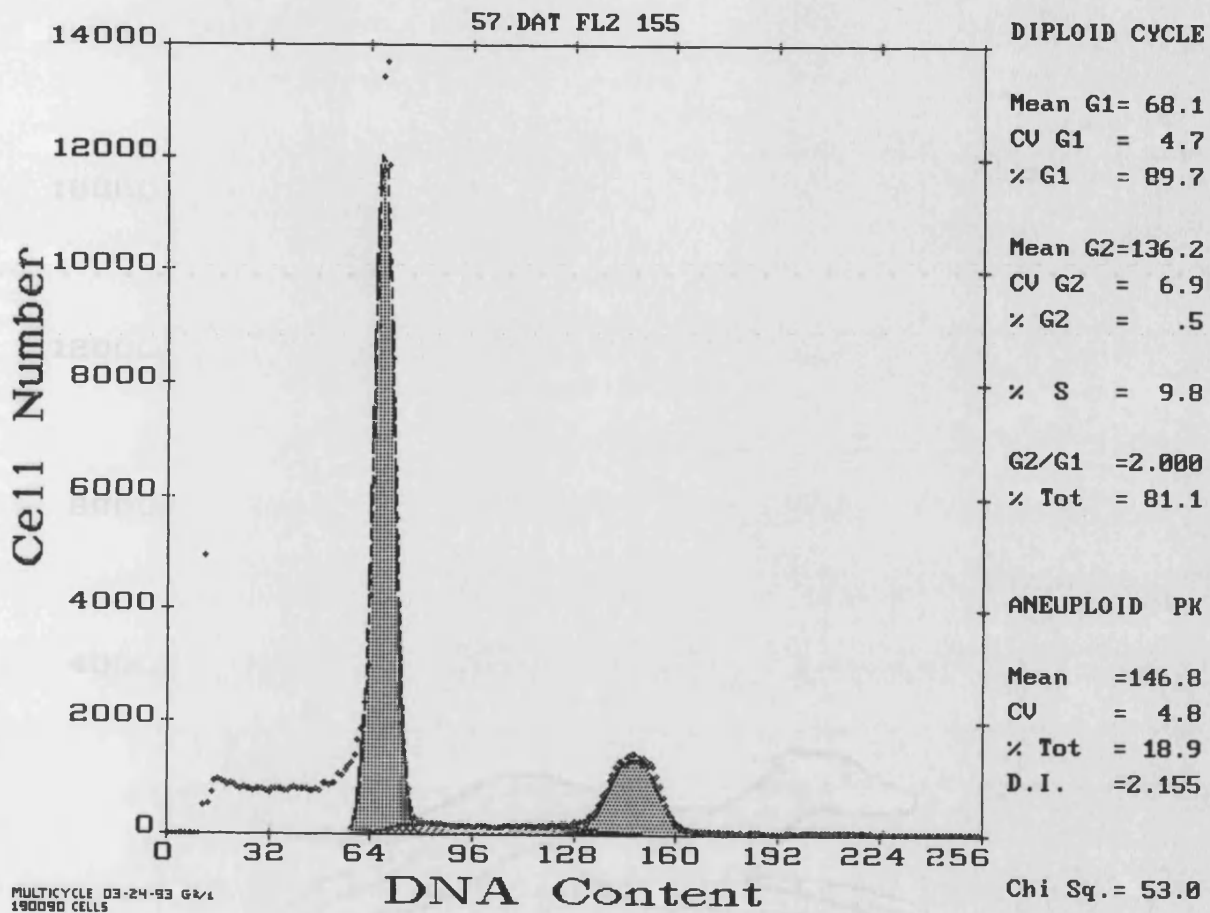
PAPILOMATOSIS CON ATIPIAS



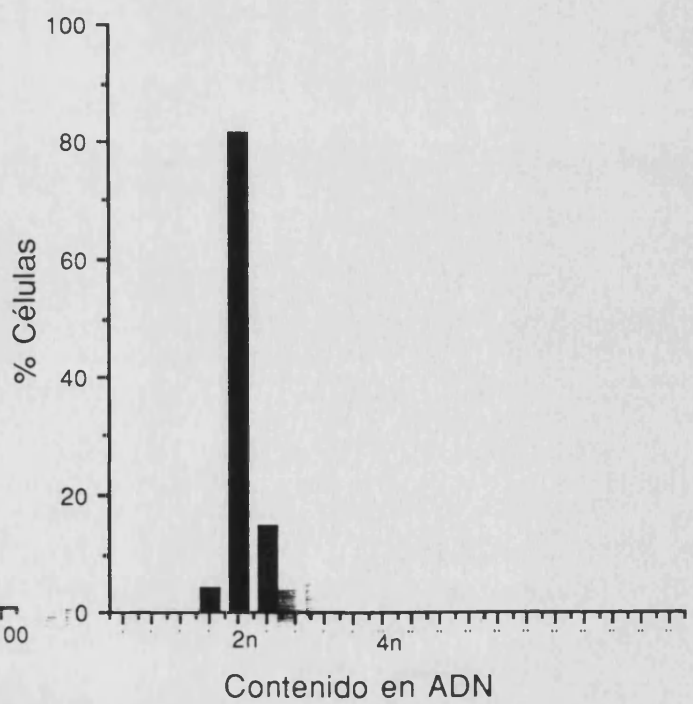
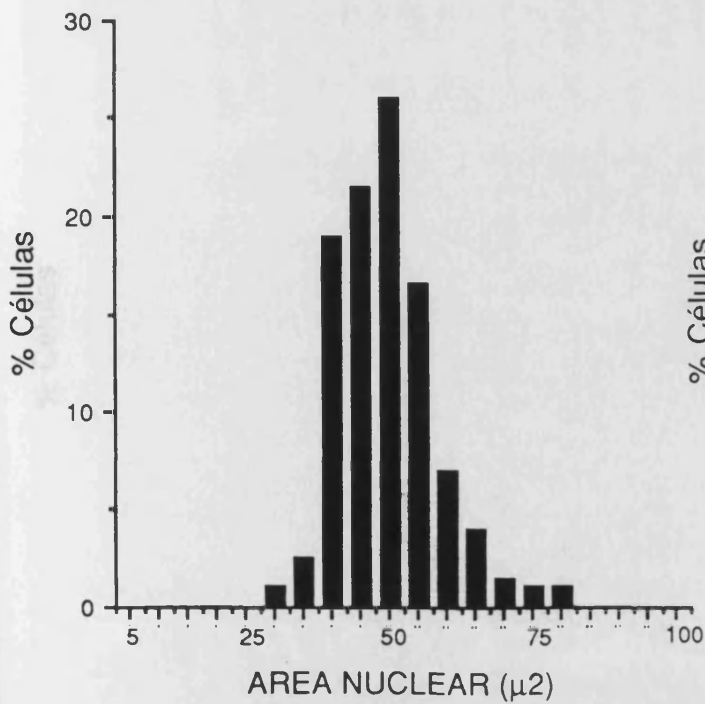
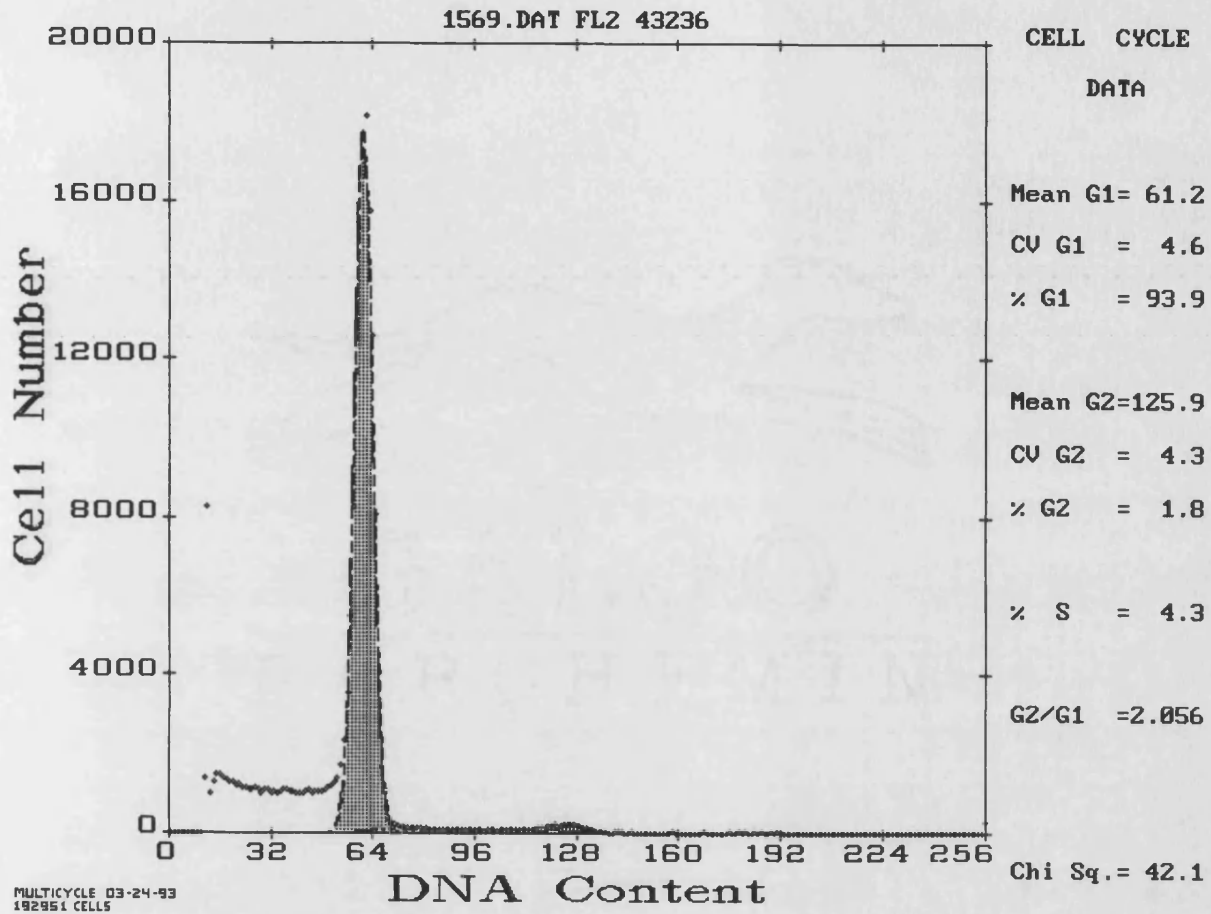
PAPILOMATOSIS CON ATIPIAS



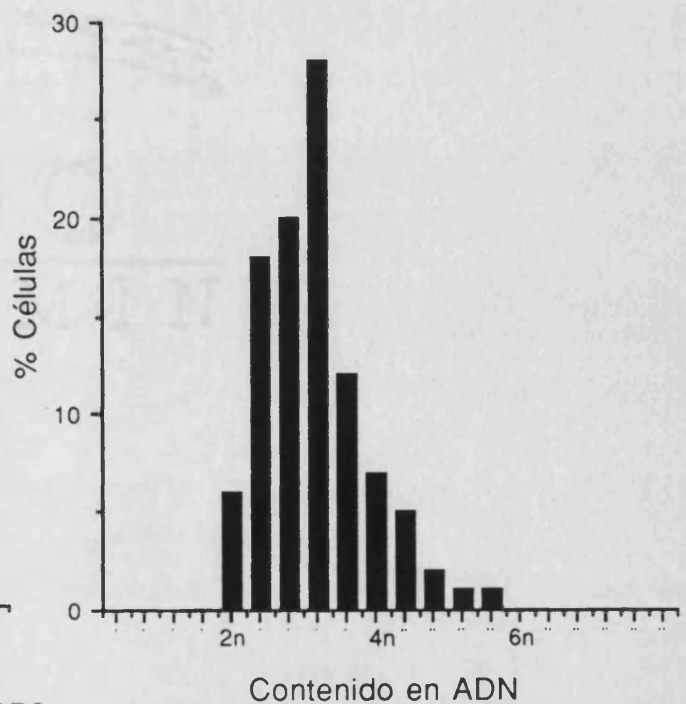
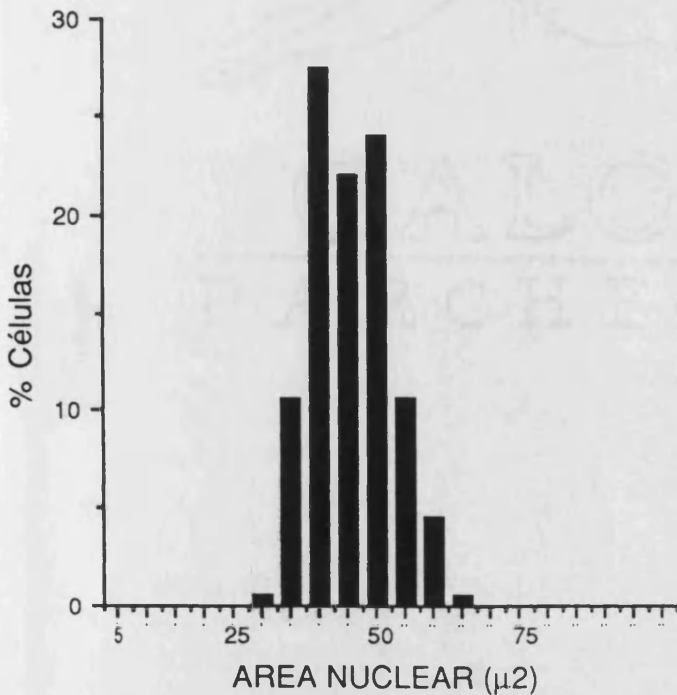
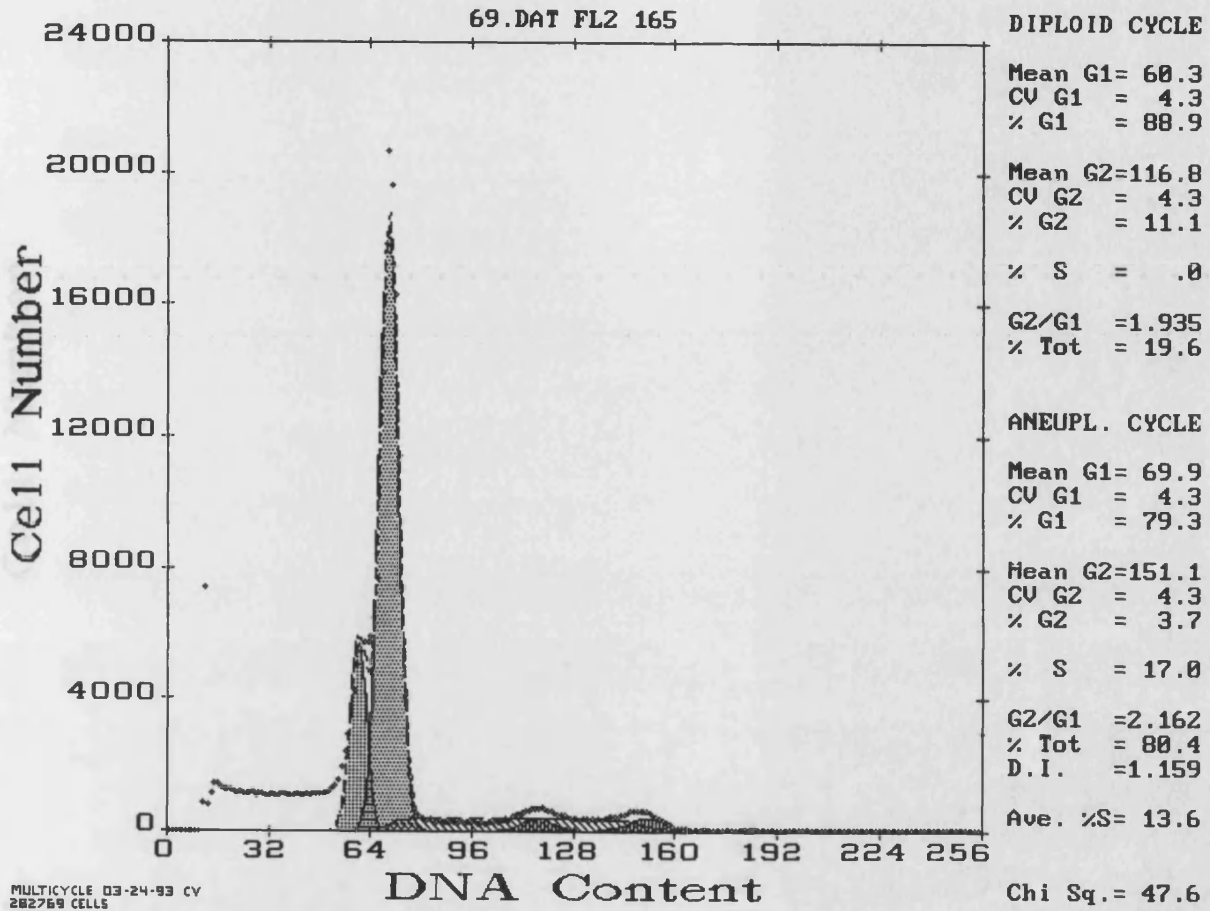
HIP. DUCTAL CON ATIPIAS



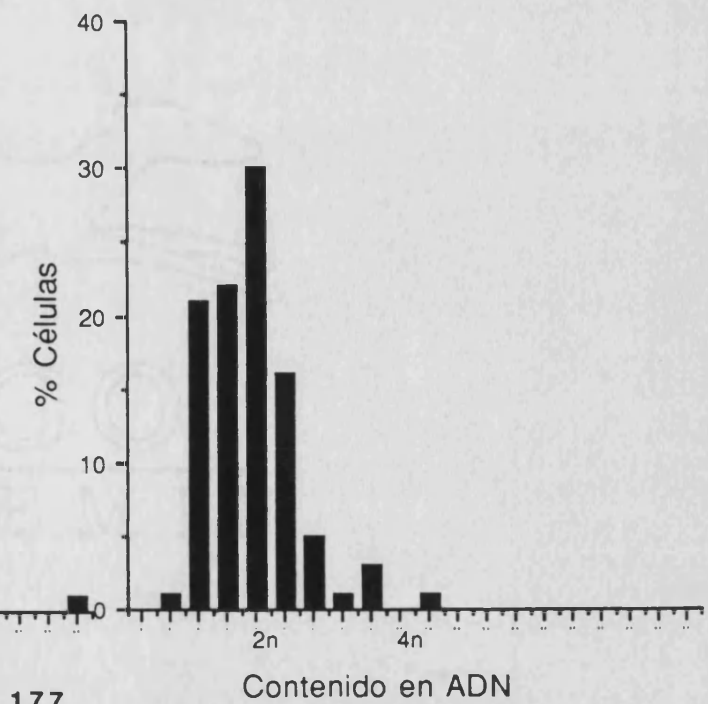
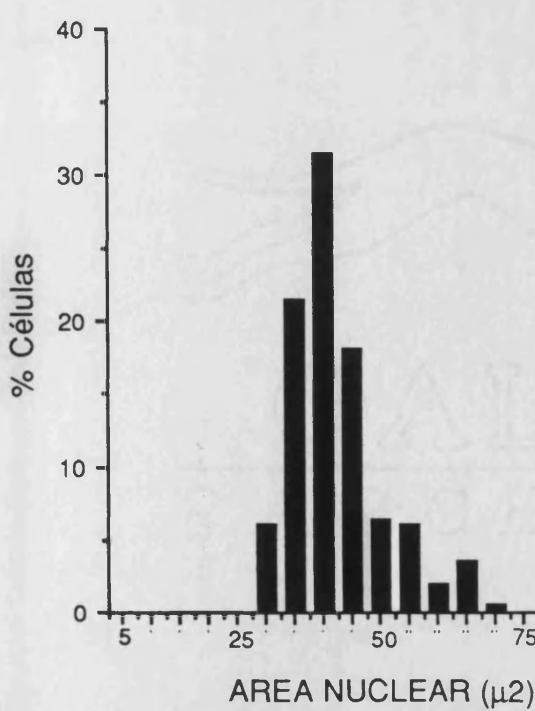
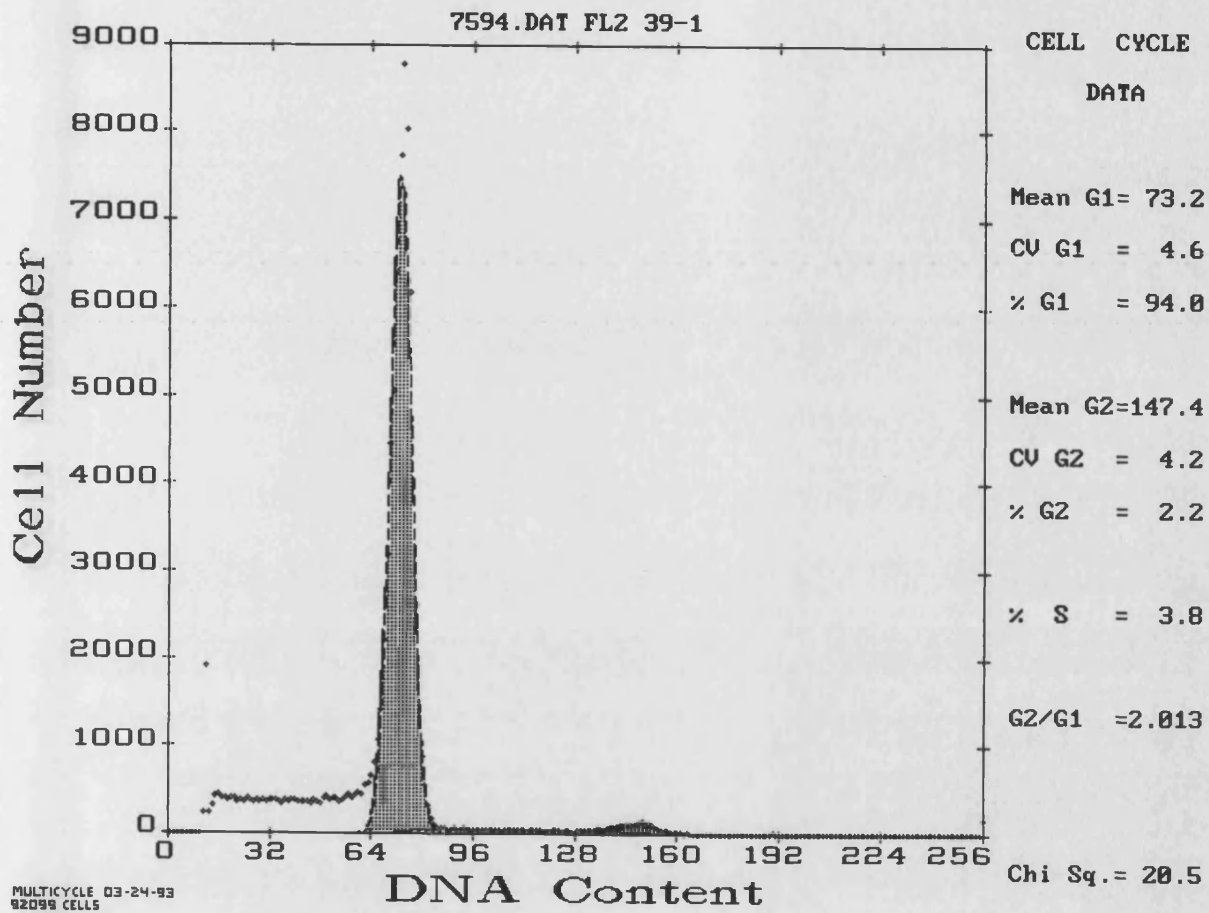
HIP. LOBULILLAR CON ATIPIAS



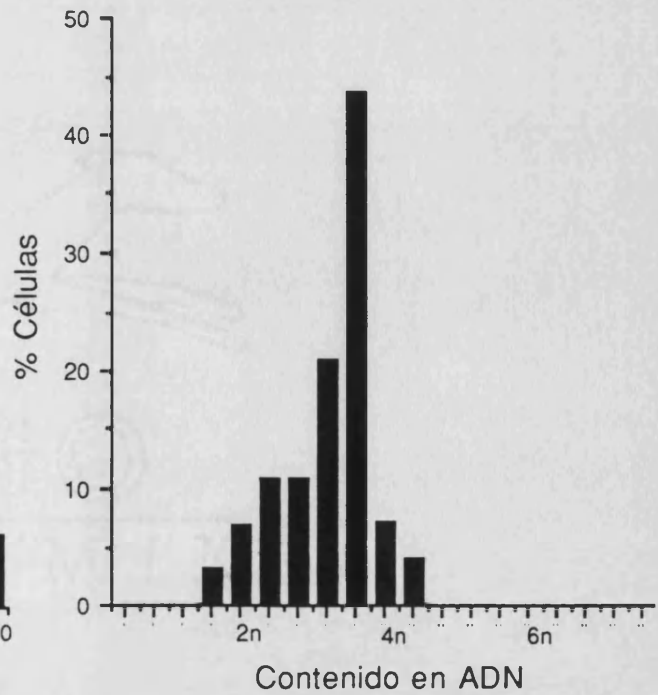
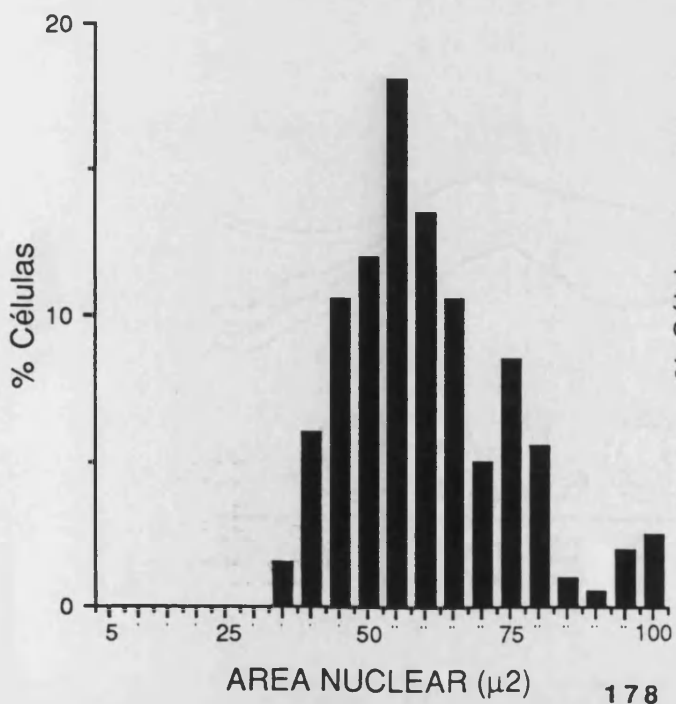
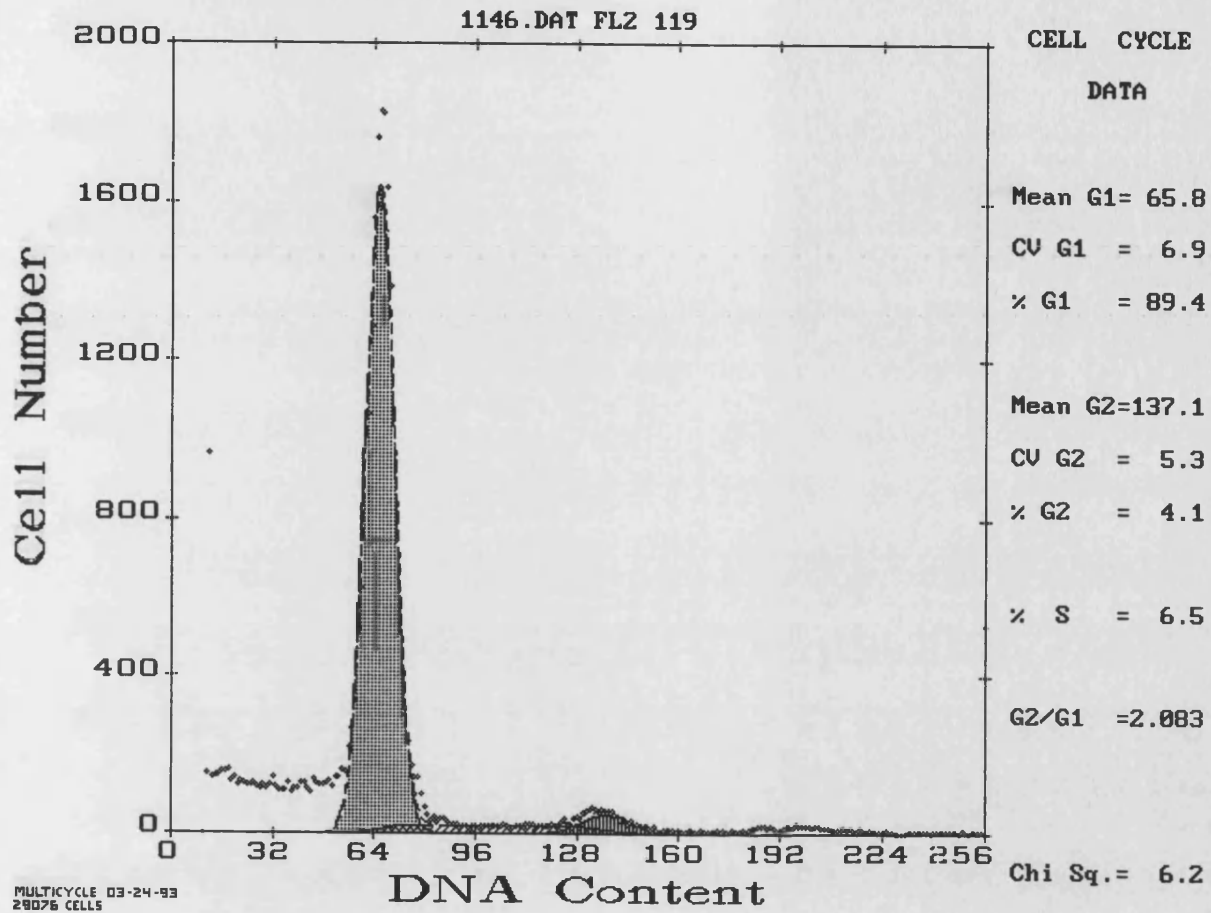
HIP. LOBULLAR CON ATIPIAS



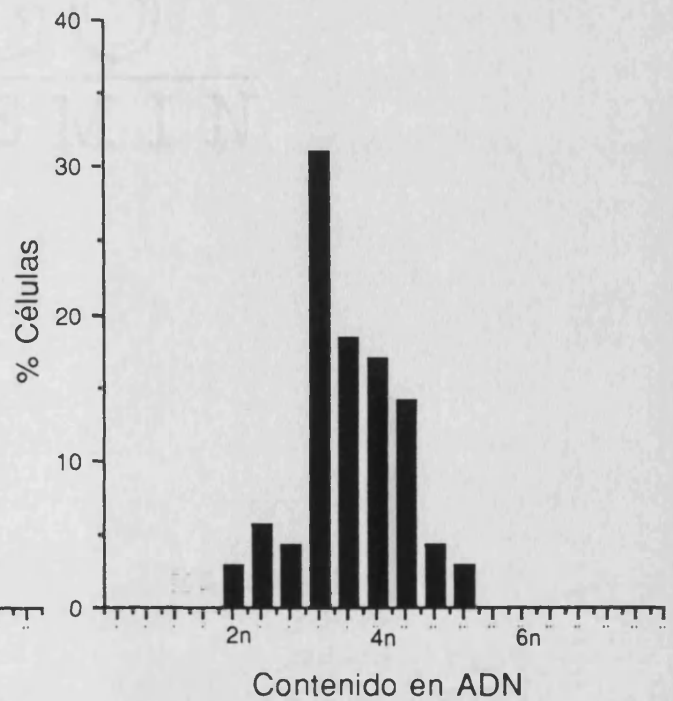
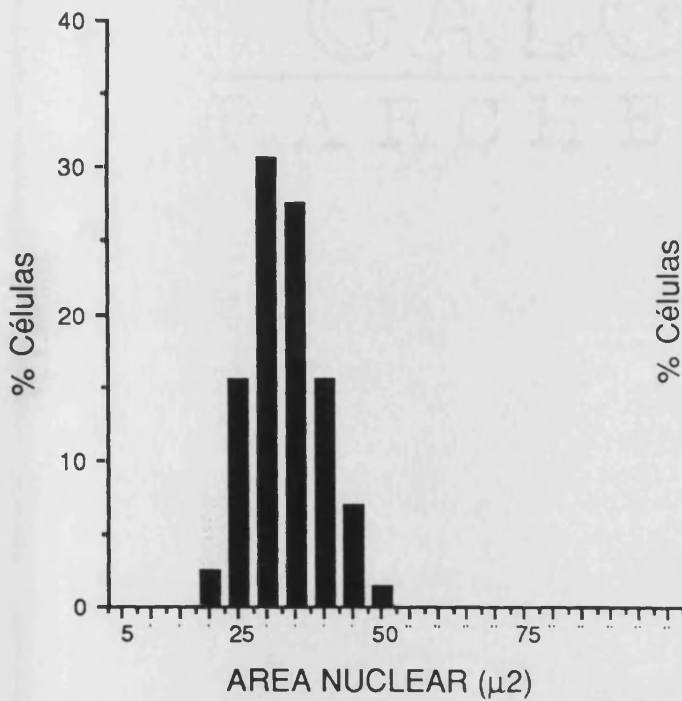
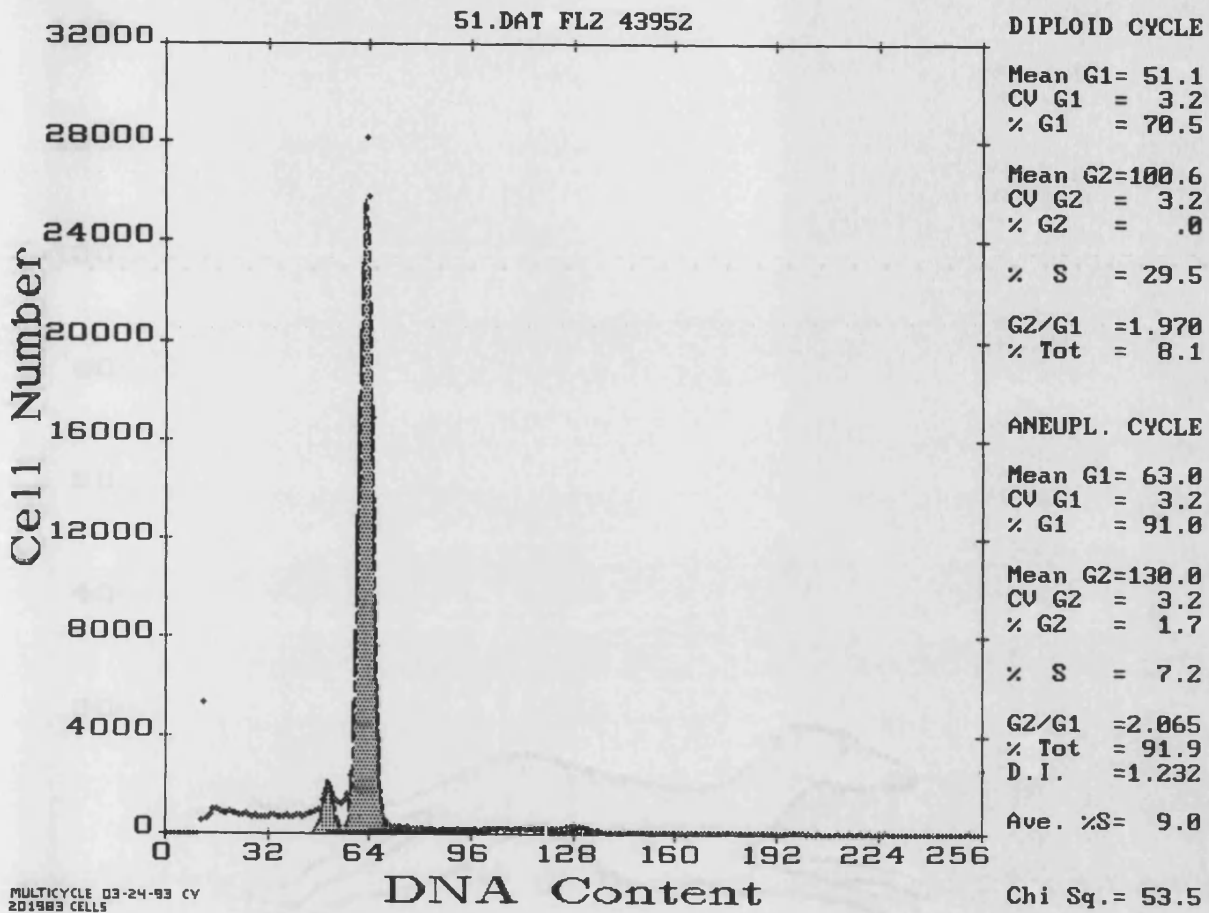
CARCINOMA INTRADUCTAL



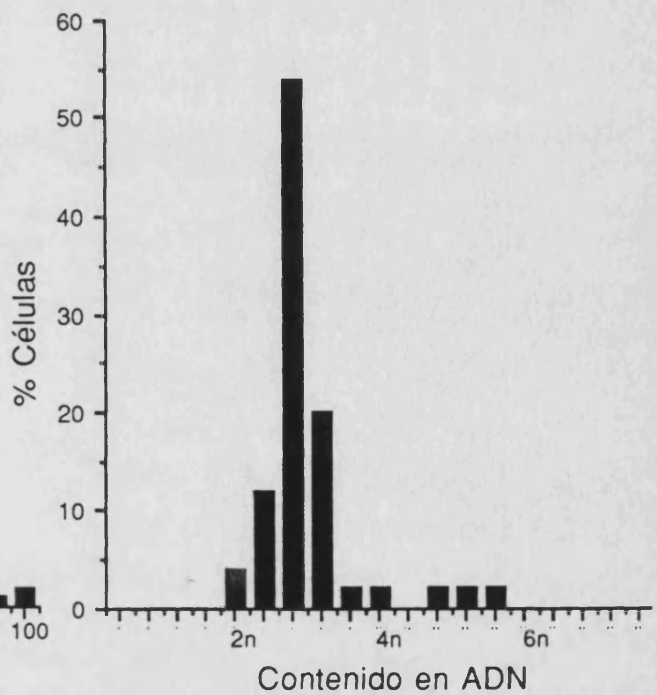
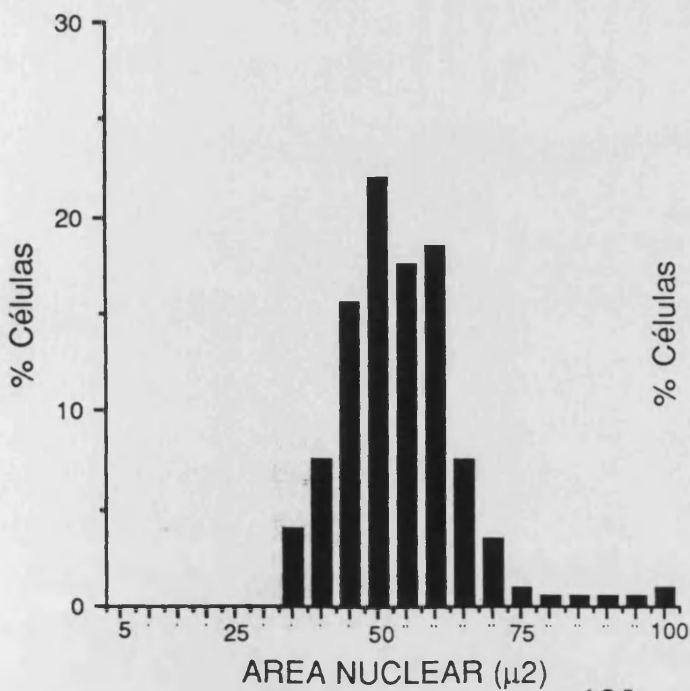
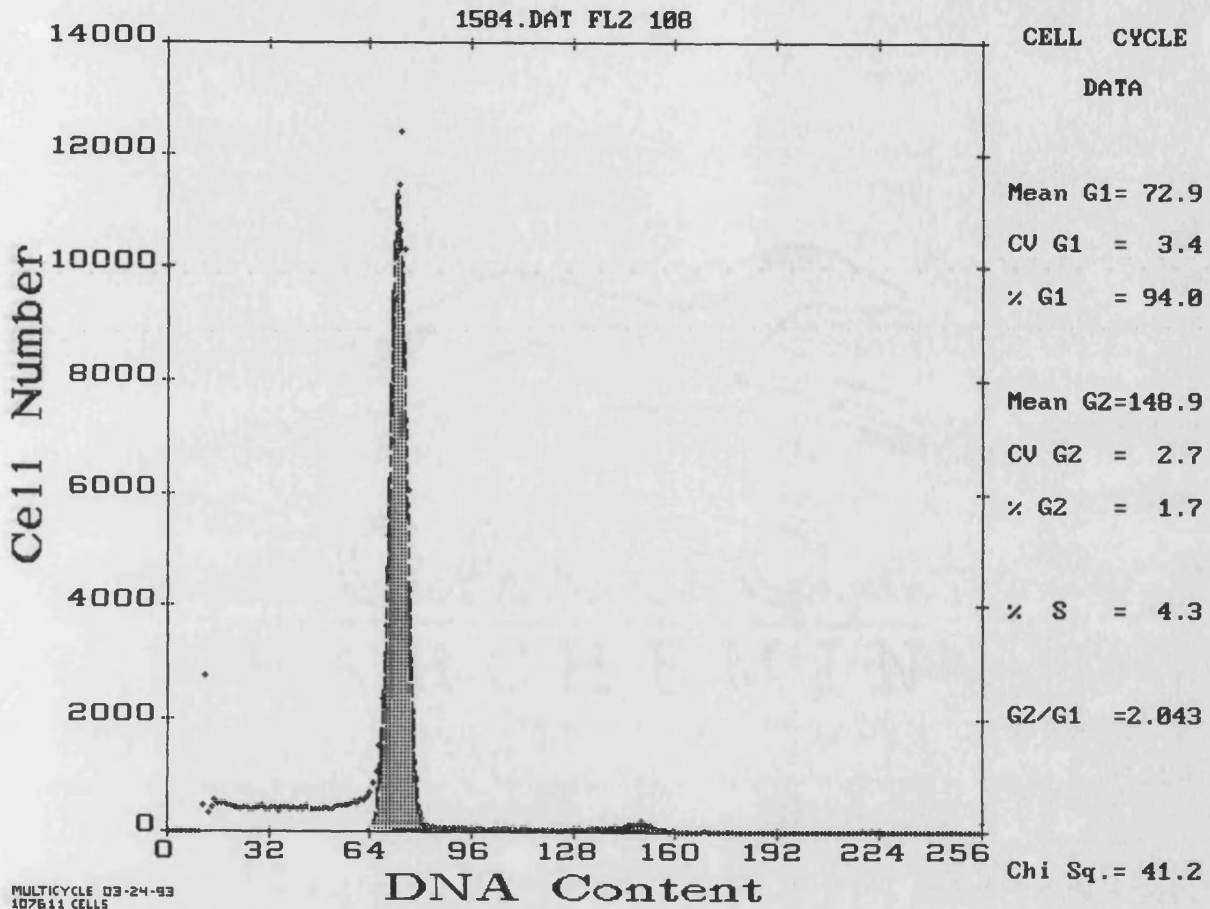
CARCINOMA INTRADUCTAL



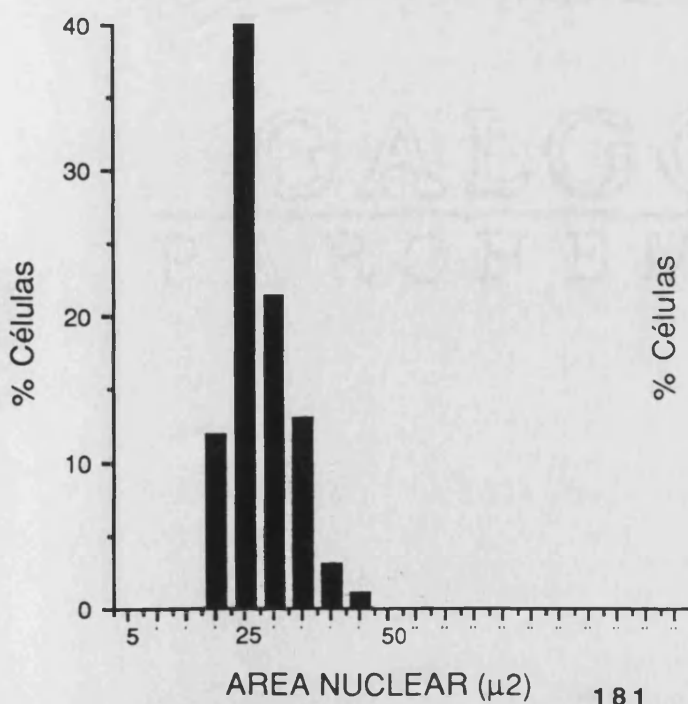
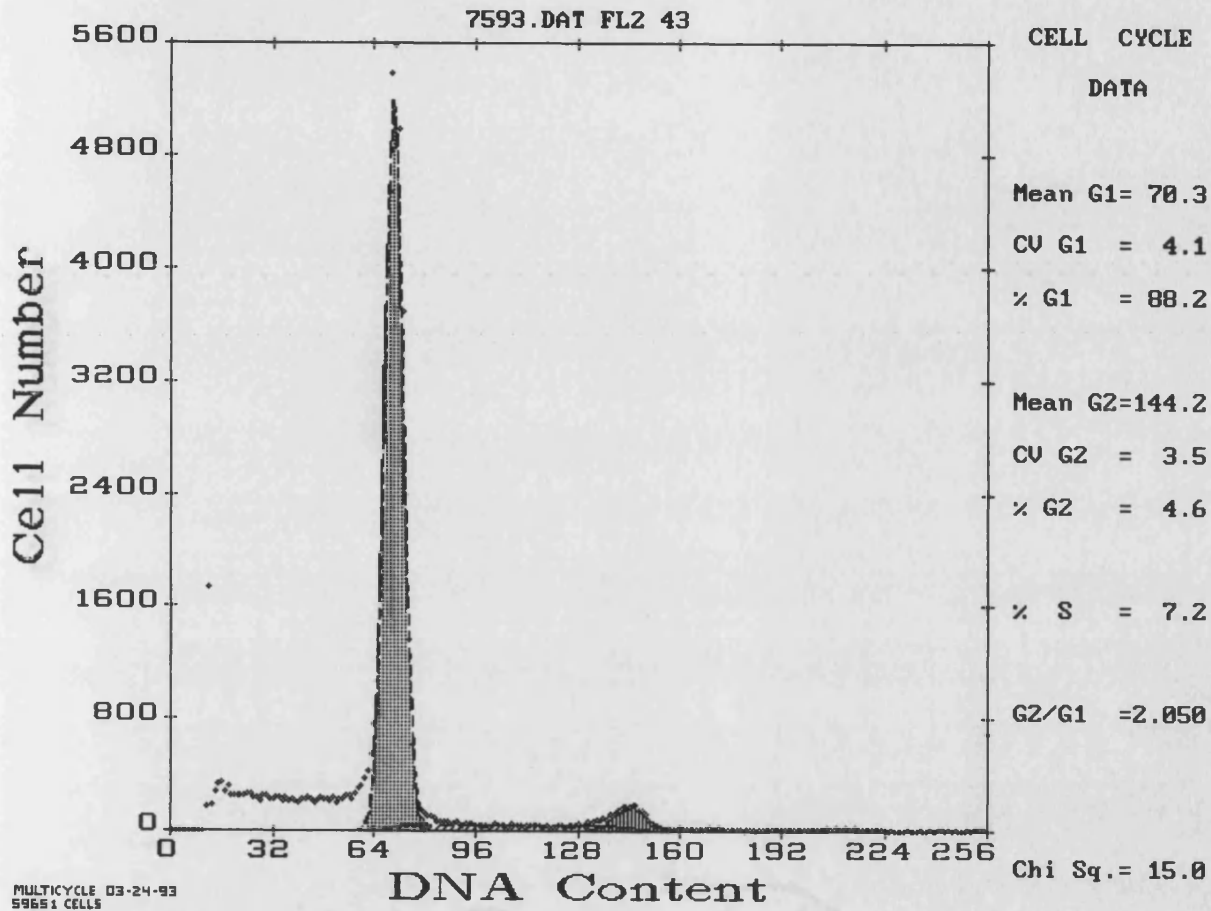
CARCINOMA INTRADUCTAL



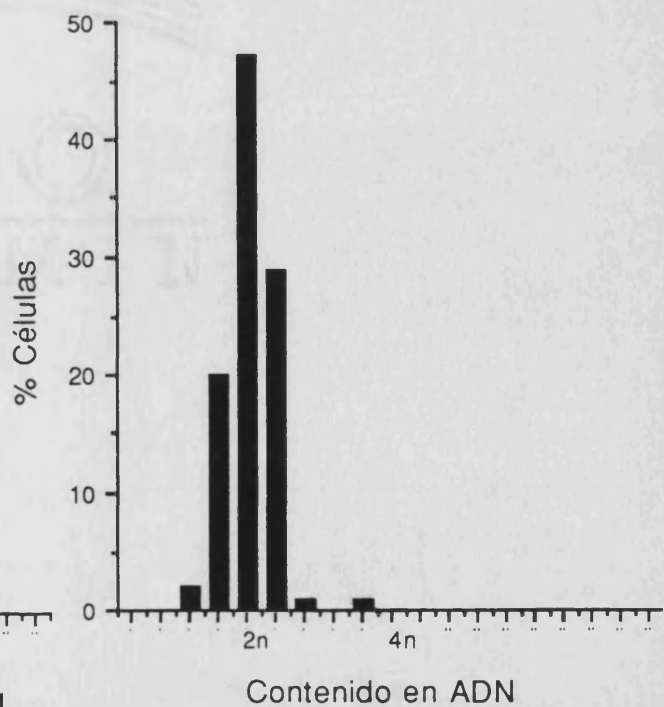
CA. PAPILAR NO INVASOR



CA. LOBULILLAR IN SITU

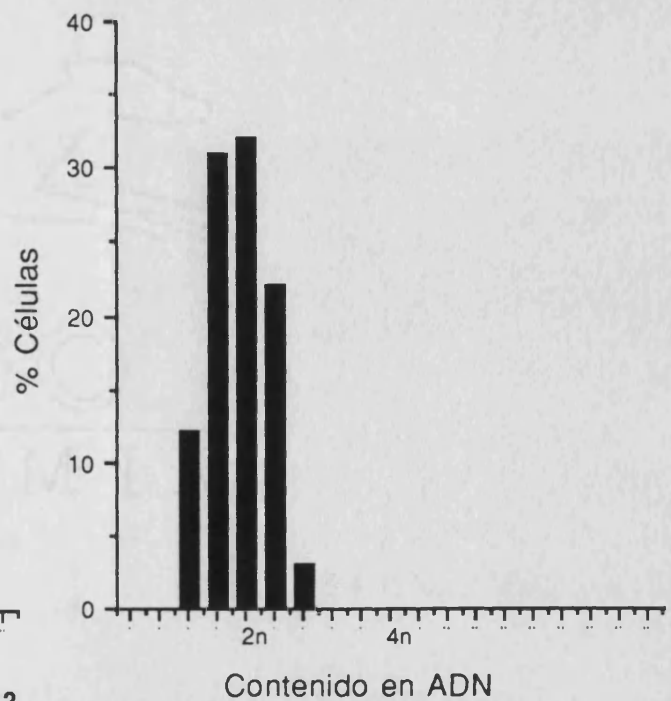
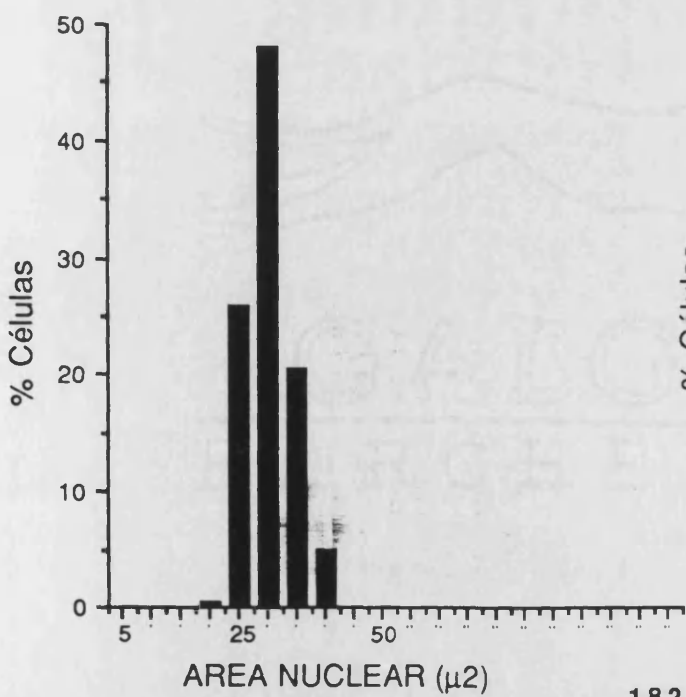
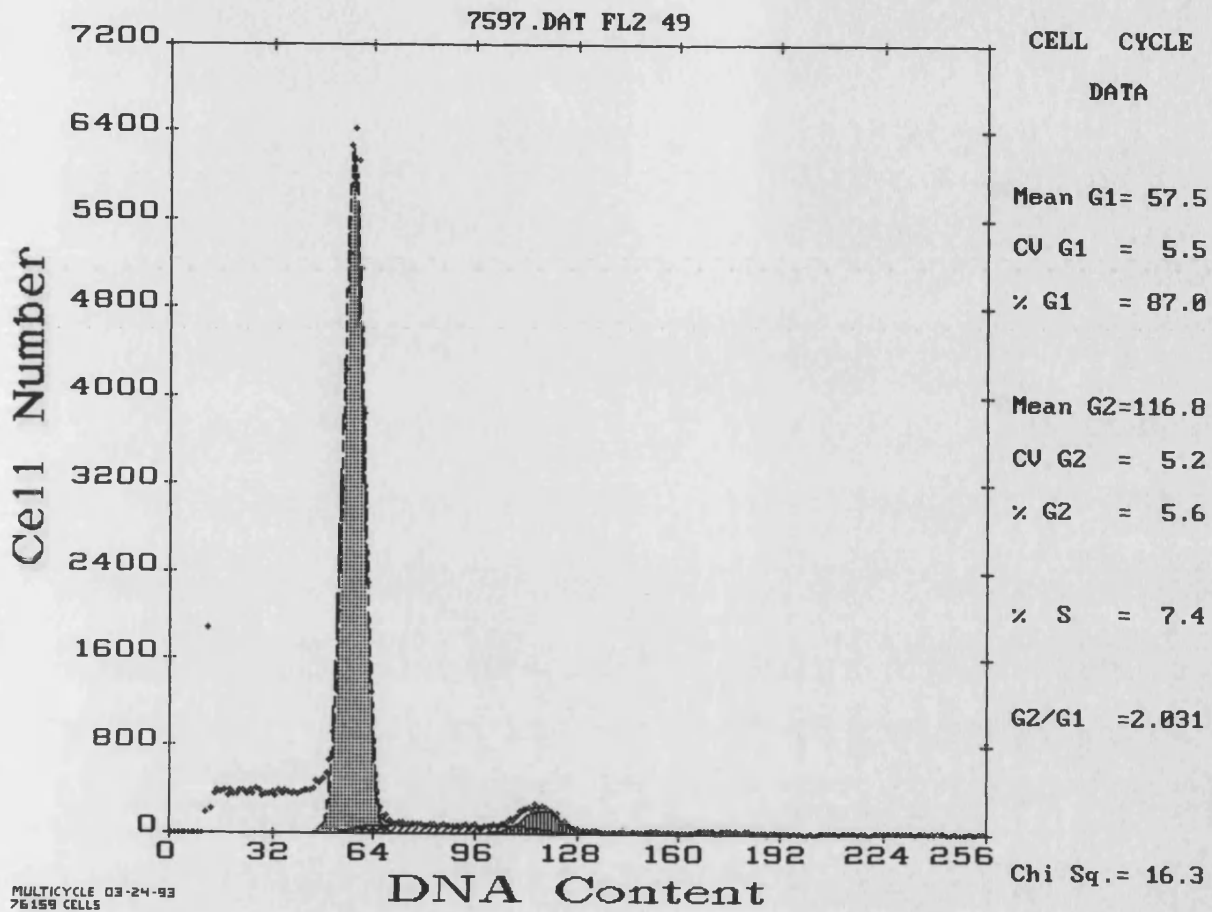


181

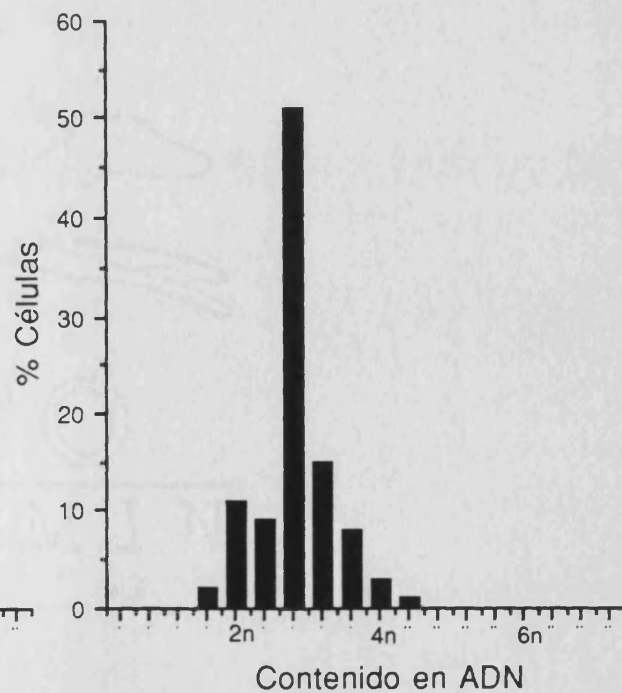
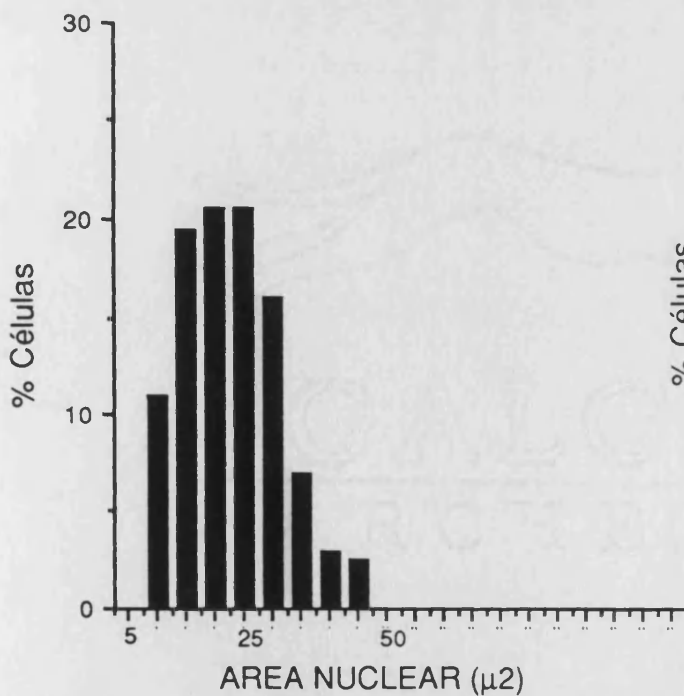
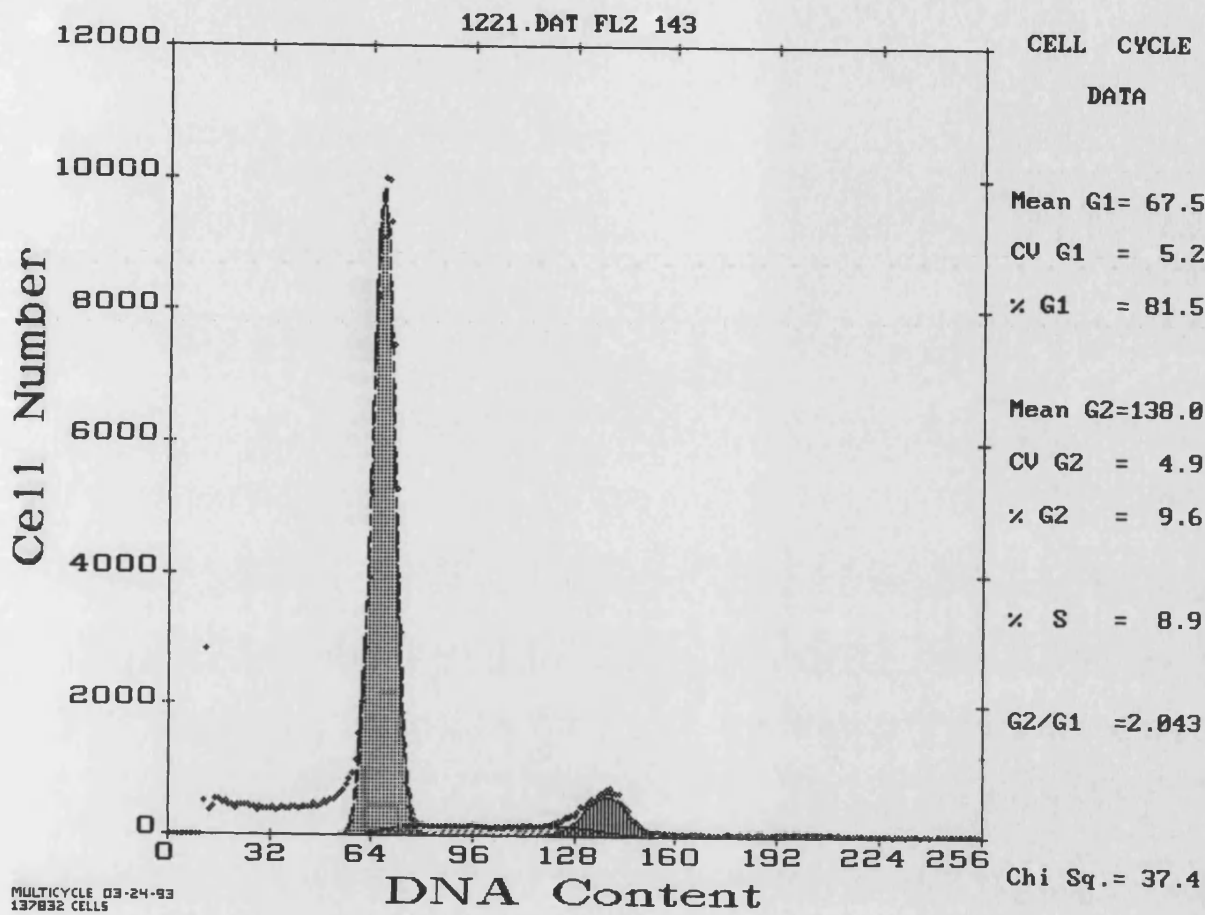


Contenido en ADN

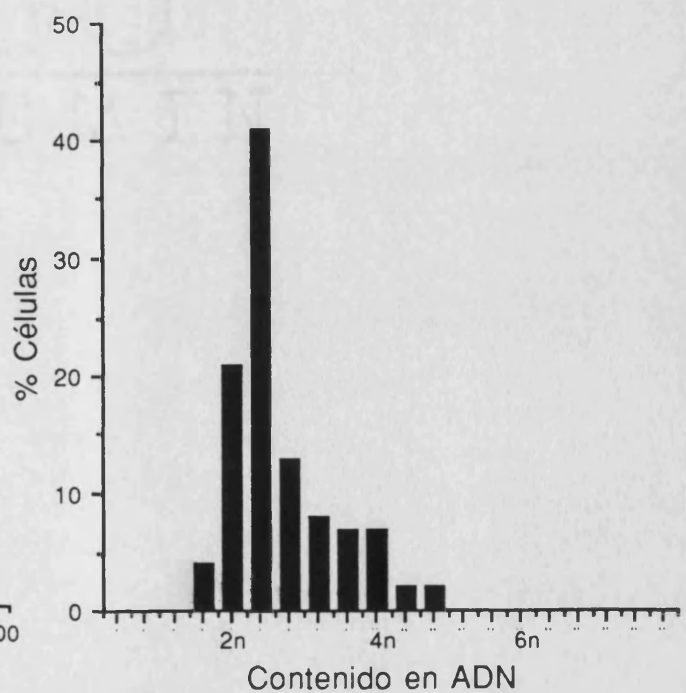
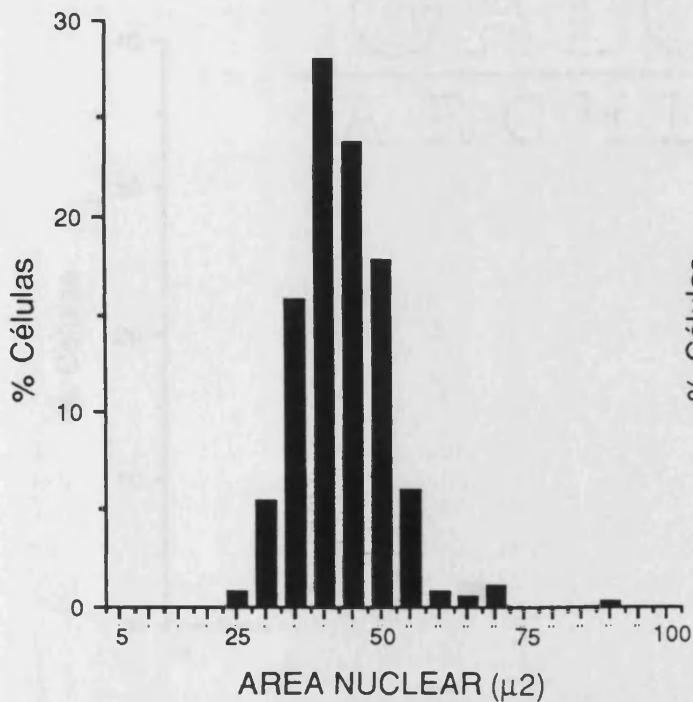
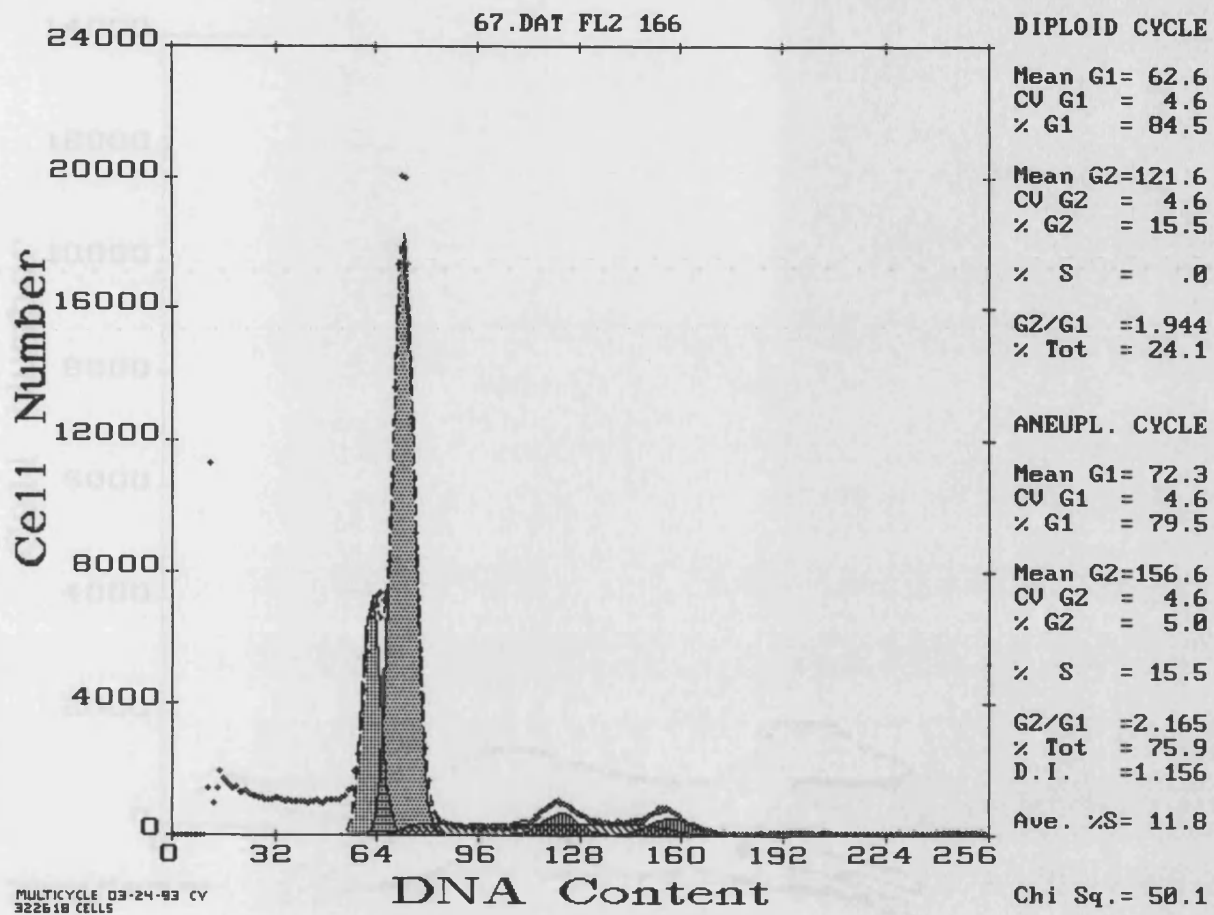
CA. LOBULILLAR IN SITU



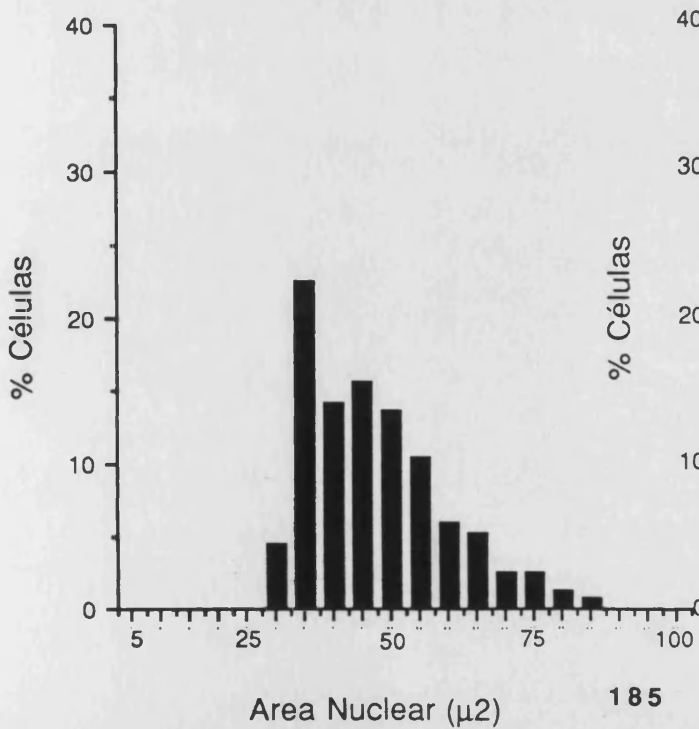
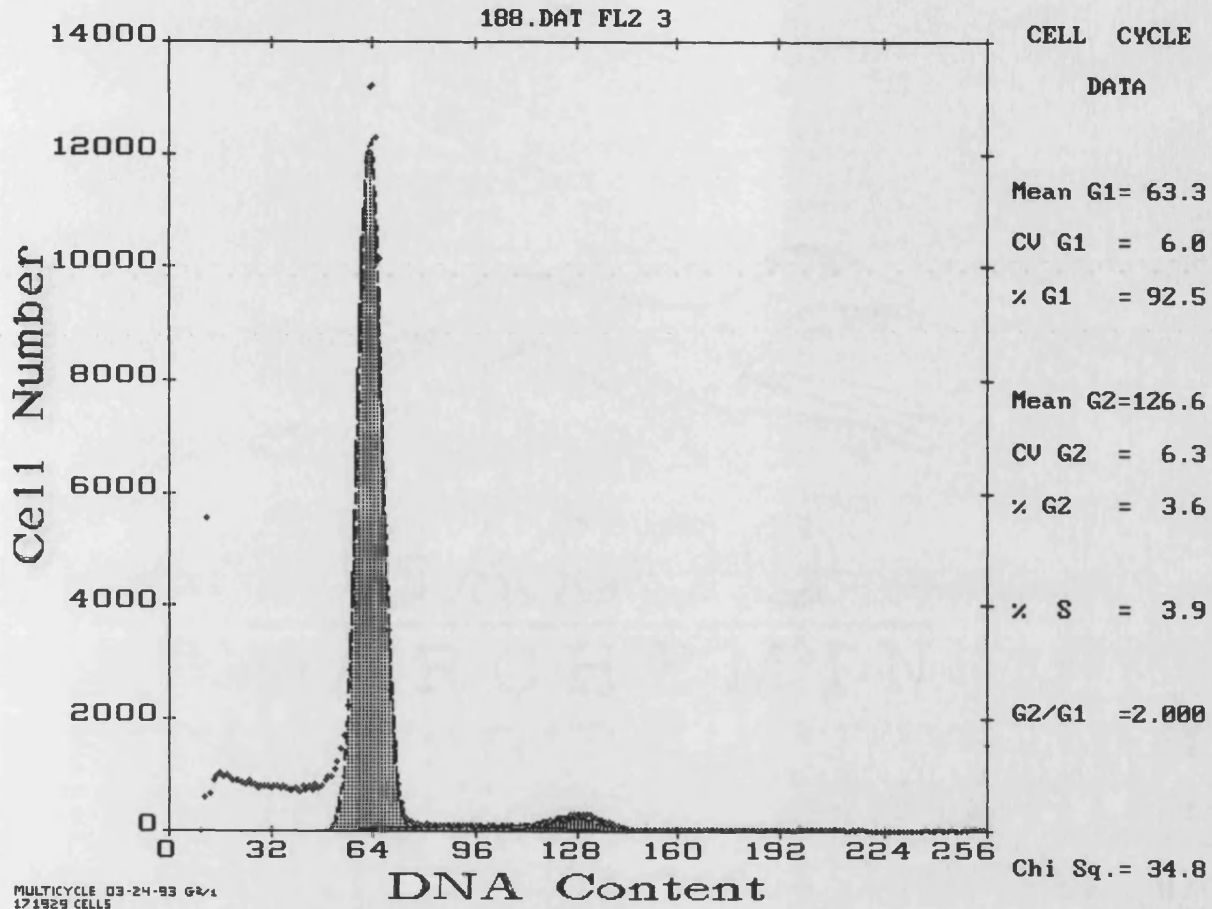
CA. LOBULILLAR IN SITU



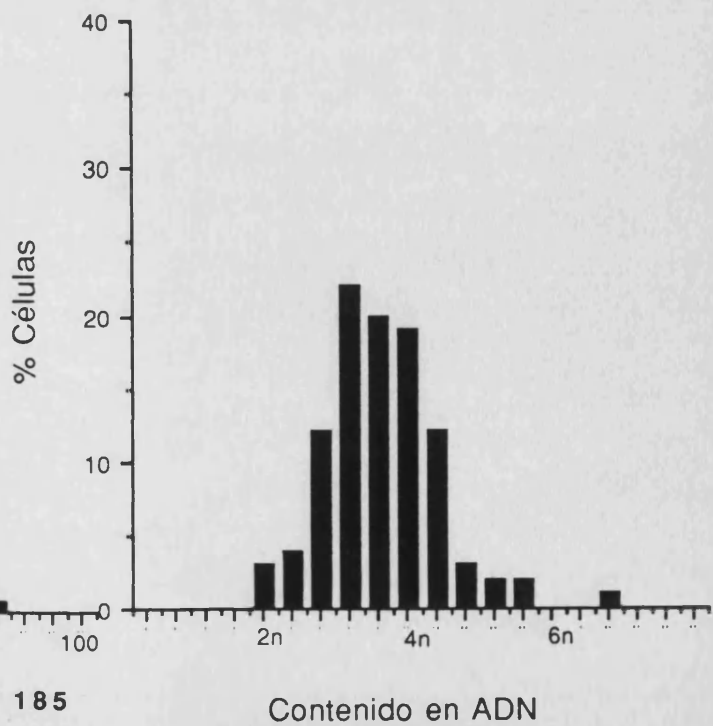
CA. LOBULILLAR IN SITU



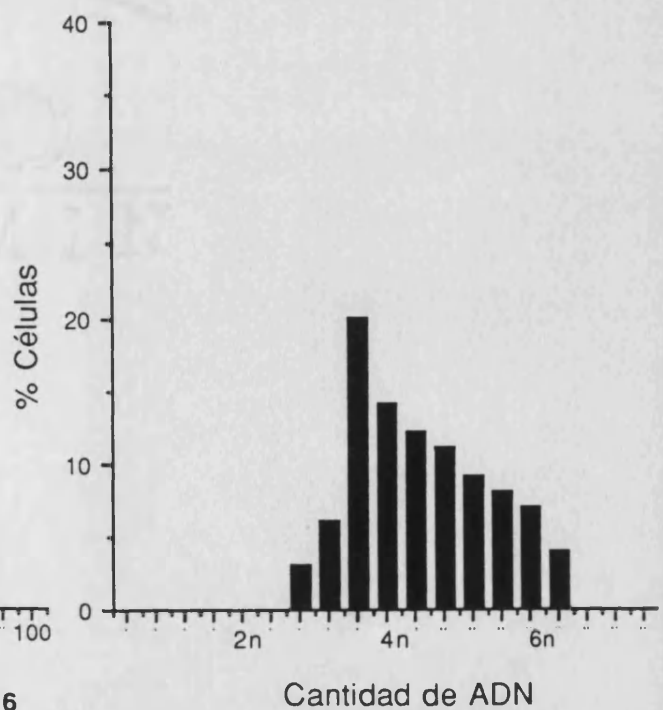
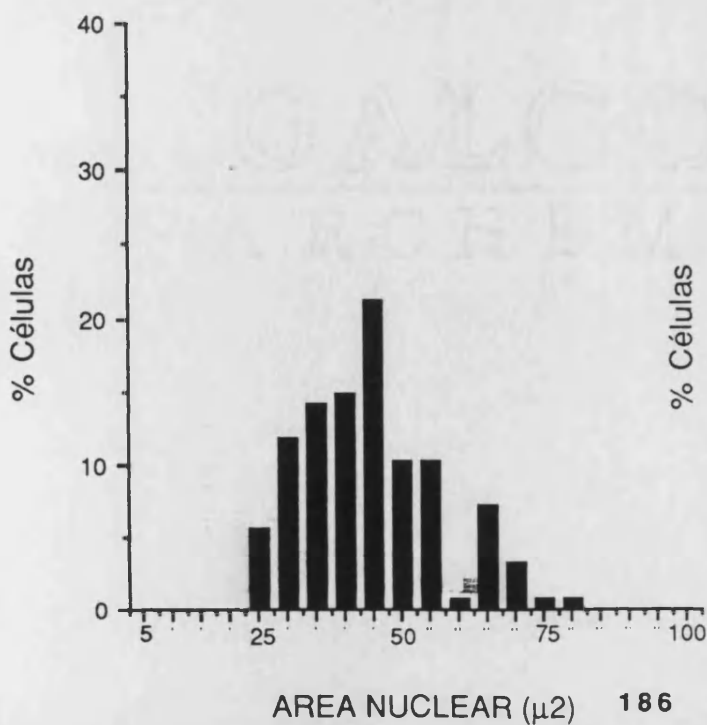
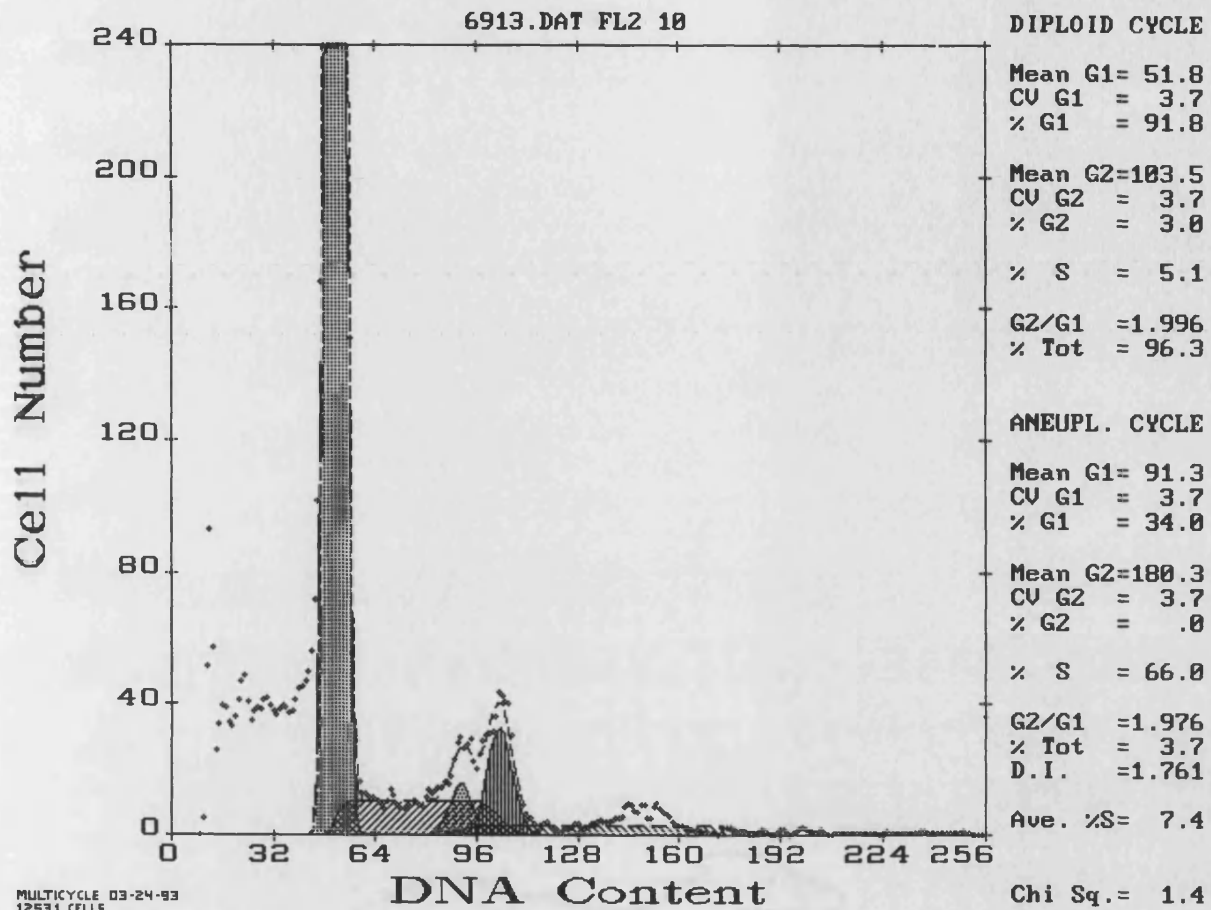
CA. DUCTAL INFILTRANTE



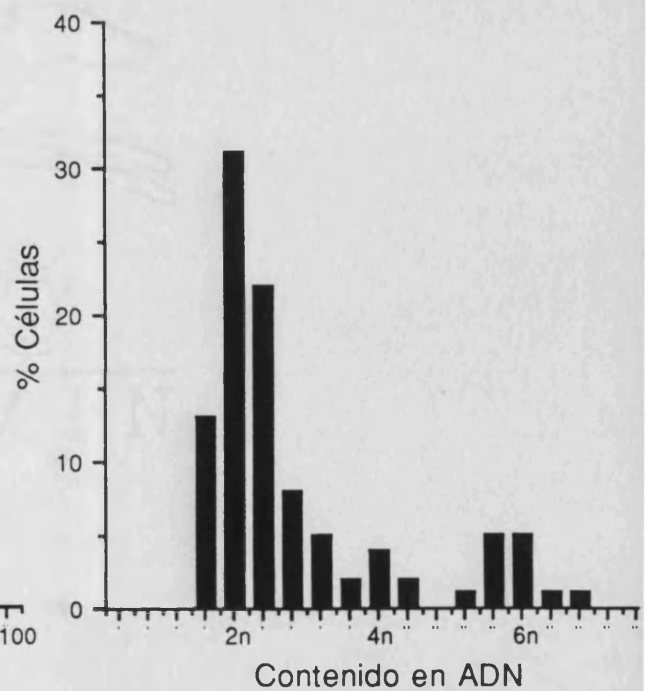
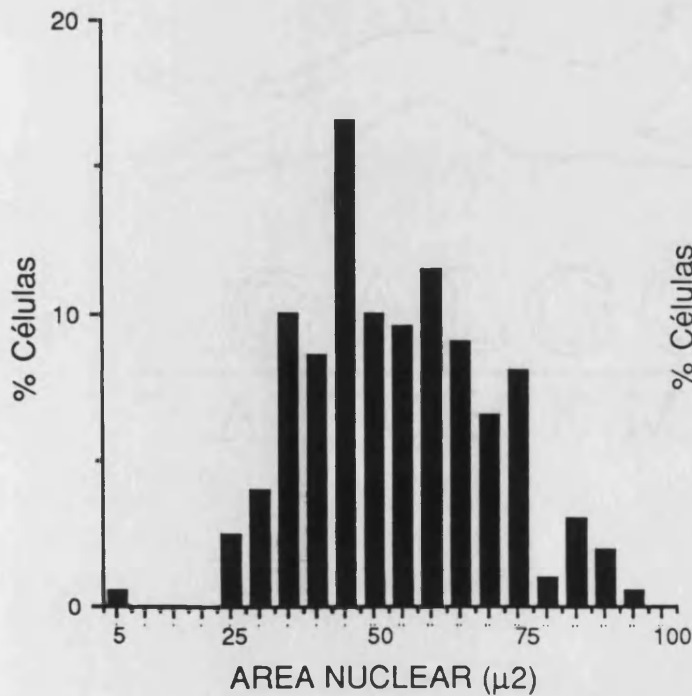
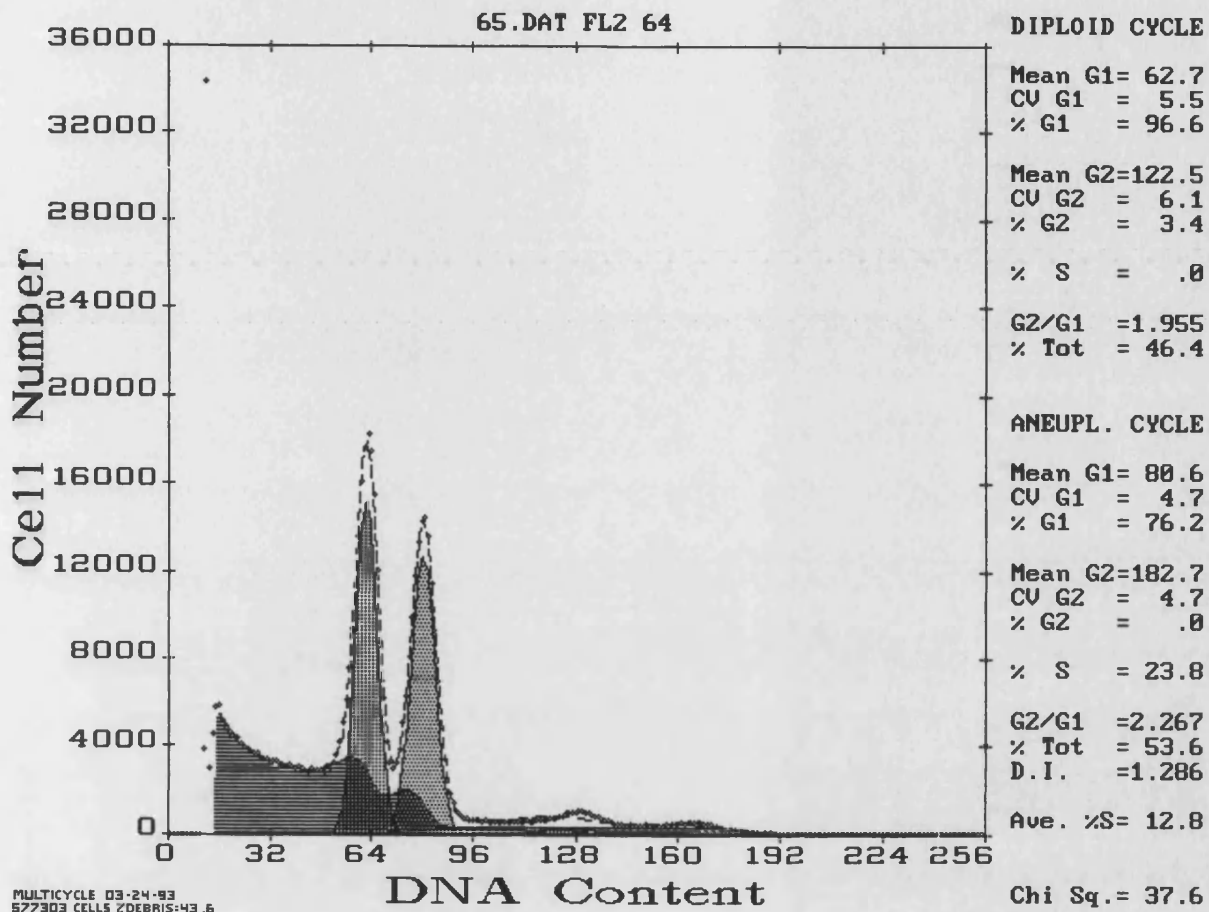
185



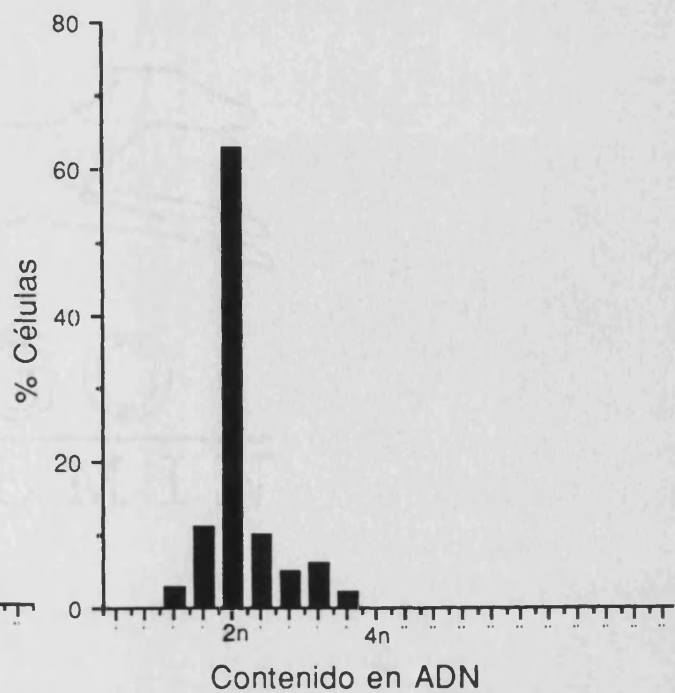
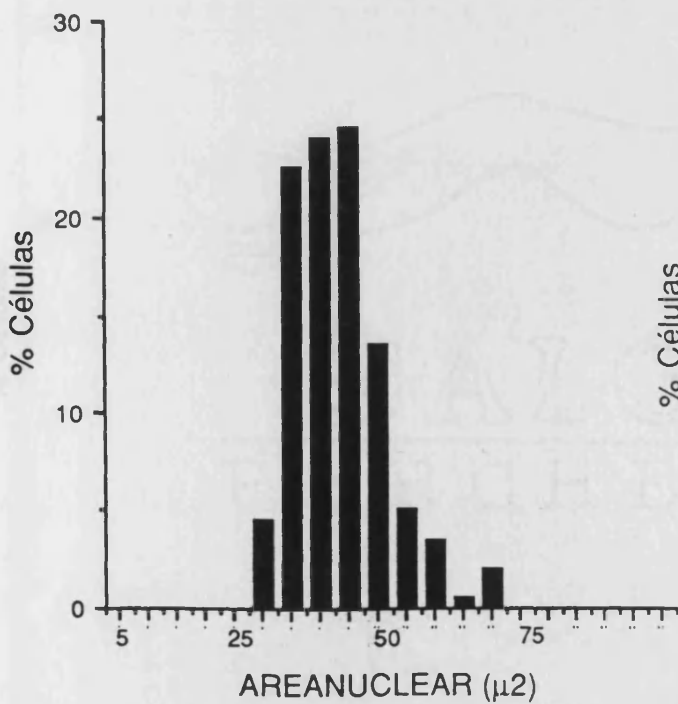
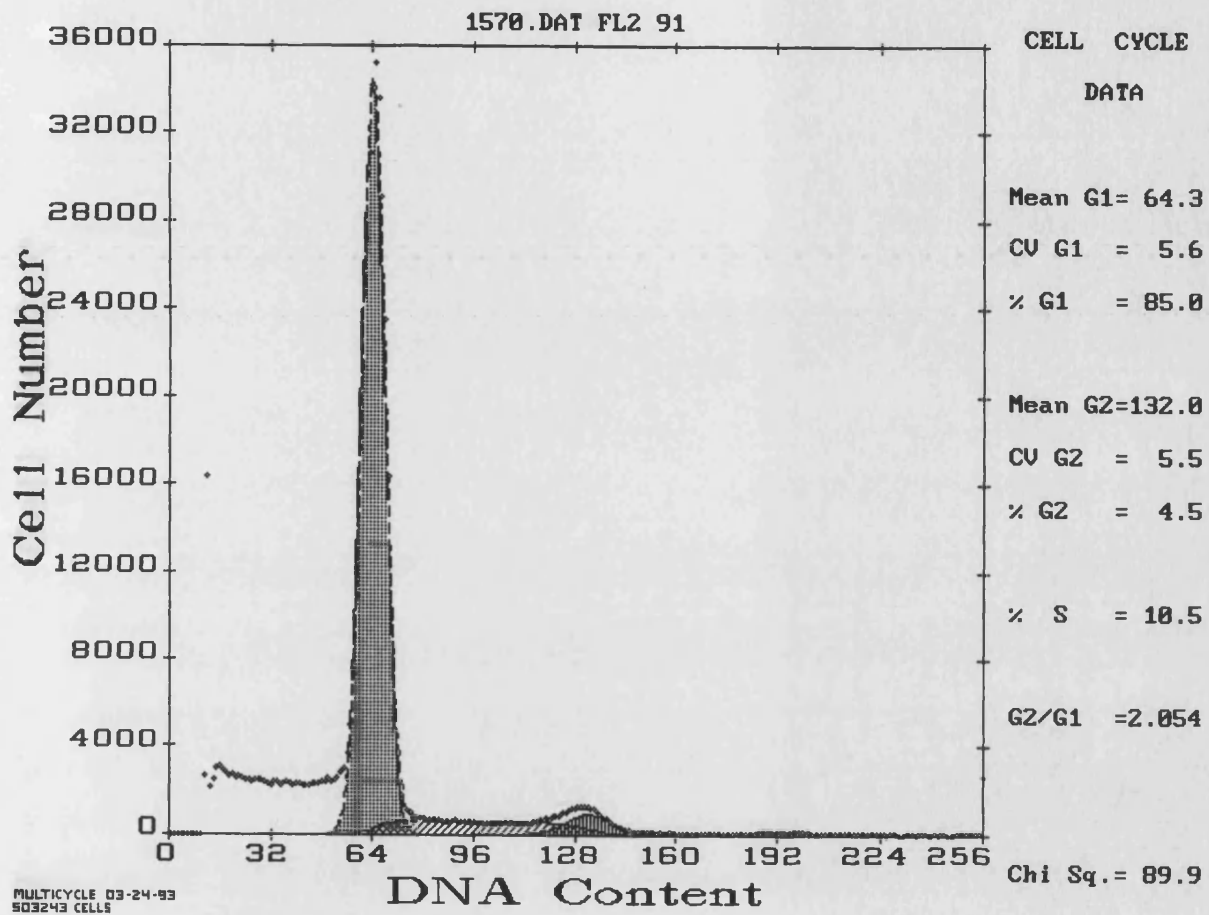
CA. DUCTAL INFILTRANTE



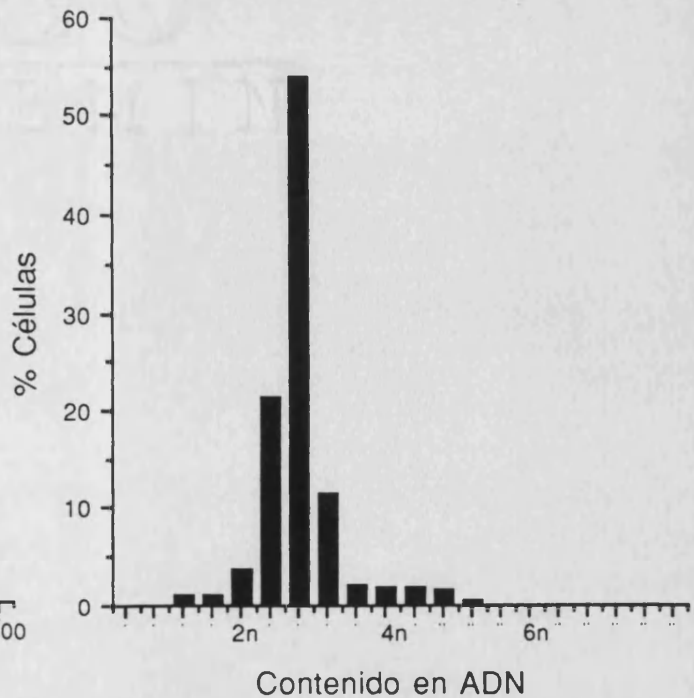
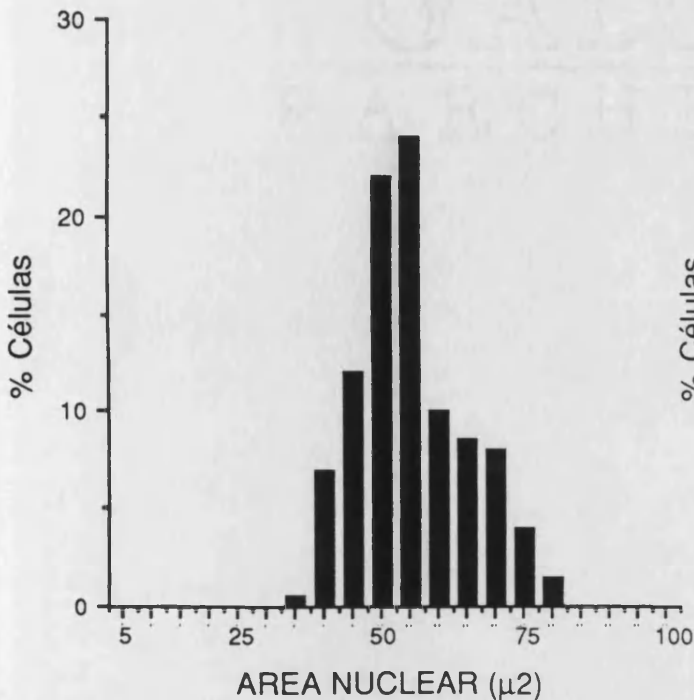
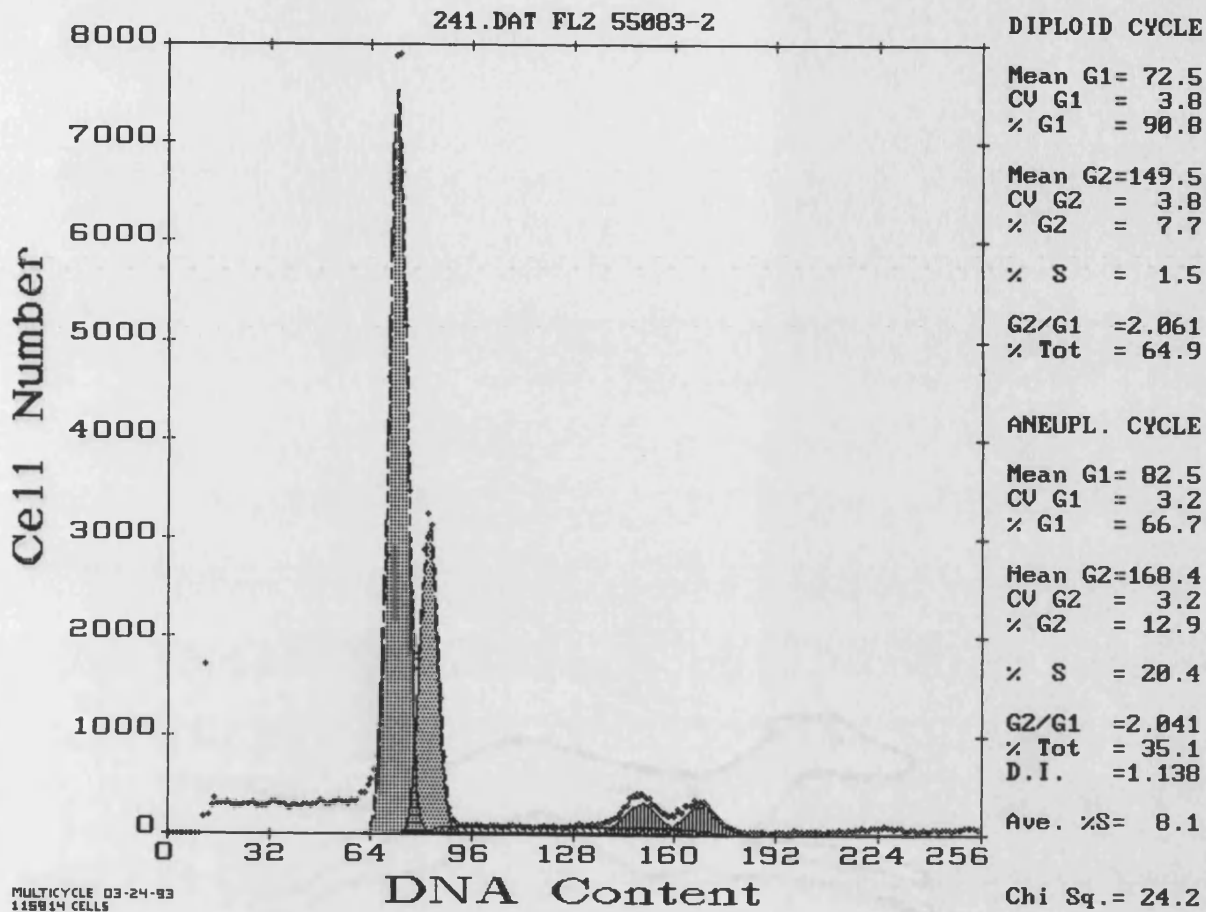
CA. DUCTAL INFILTRANTE



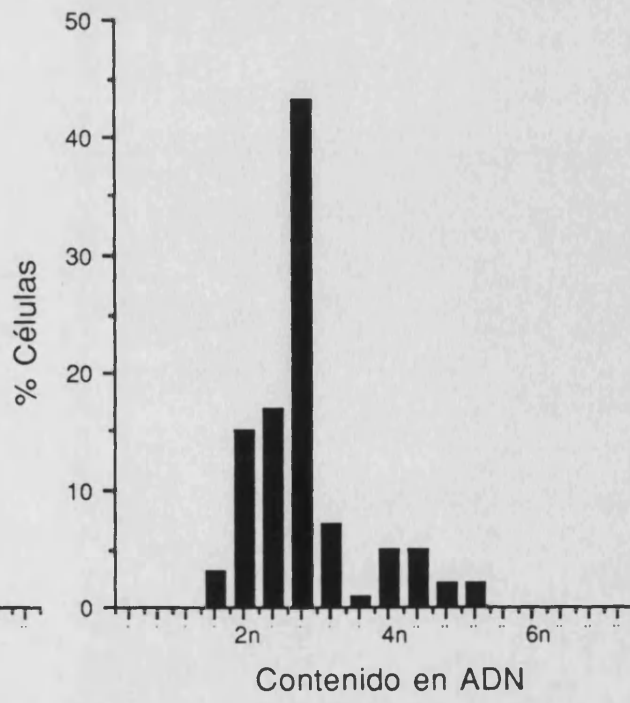
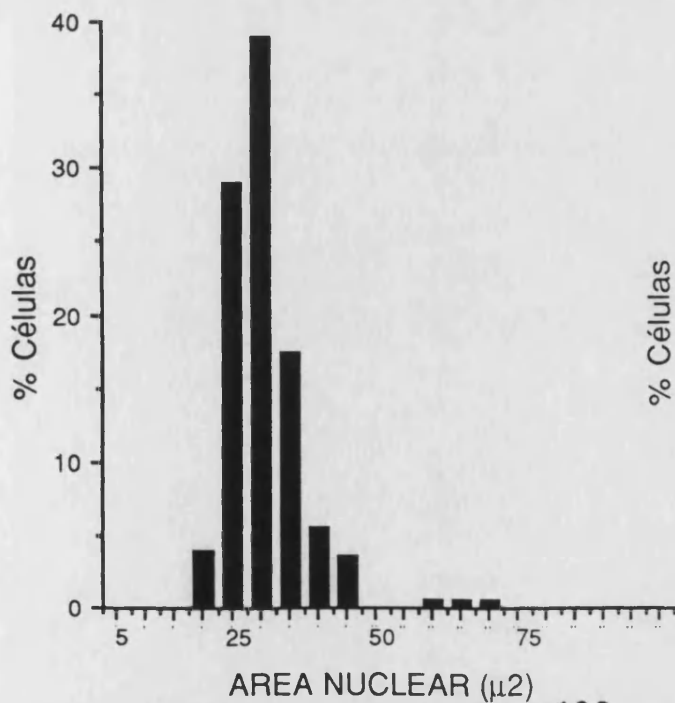
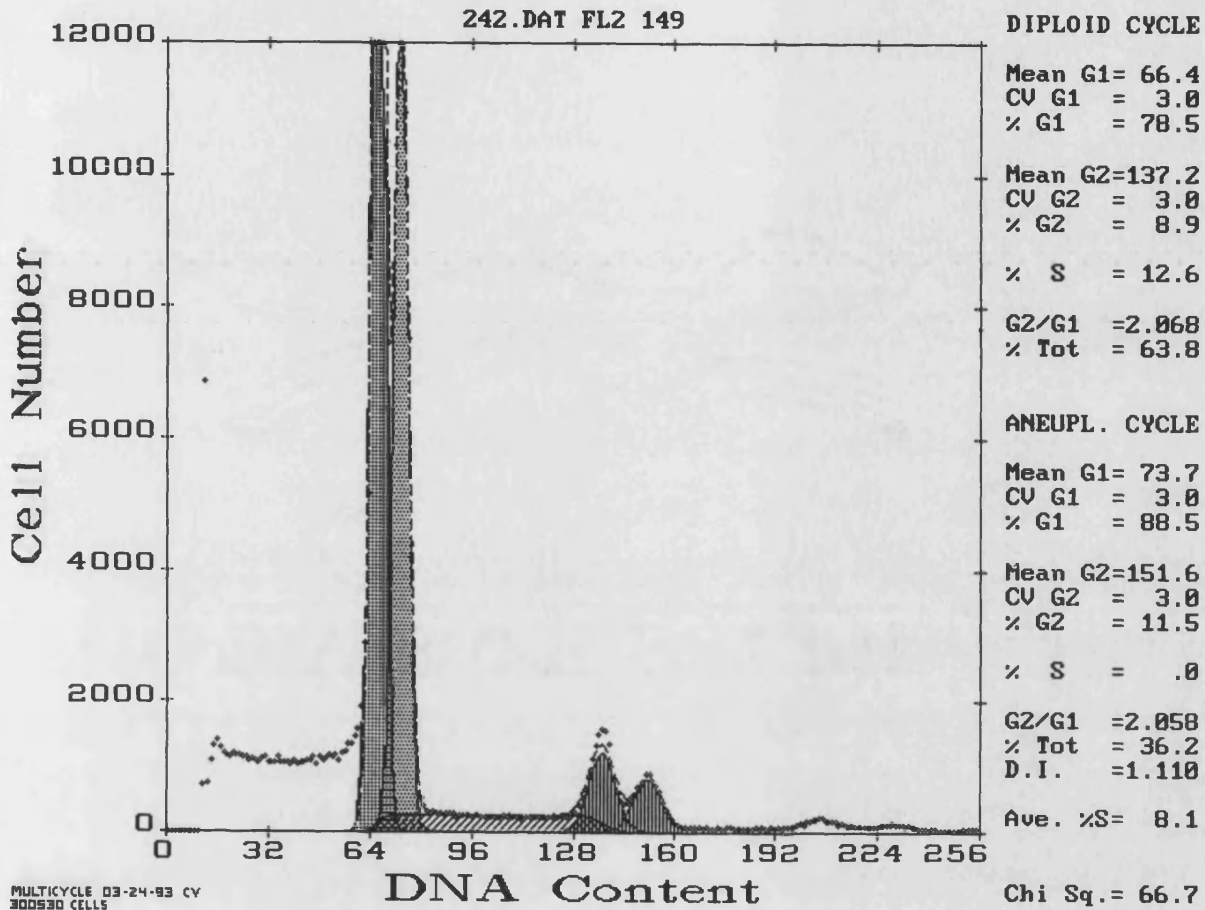
CA. DUCTAL INFILTRANTE



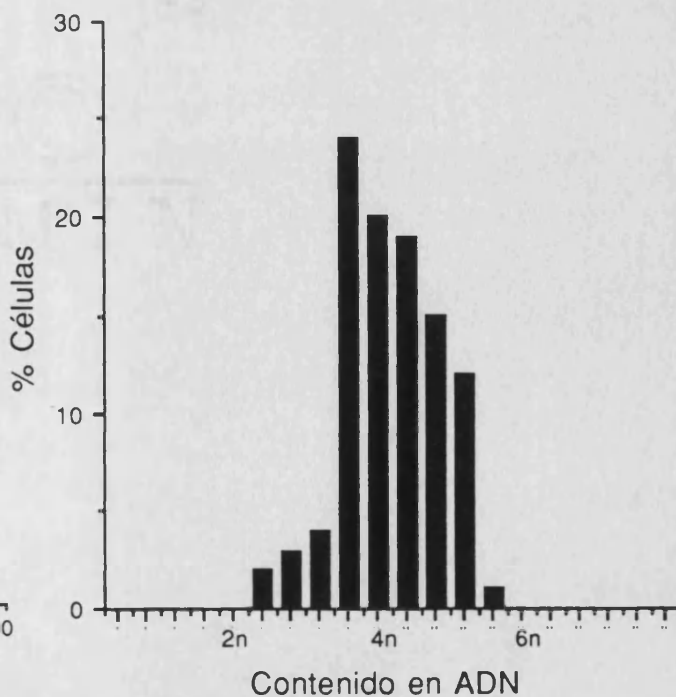
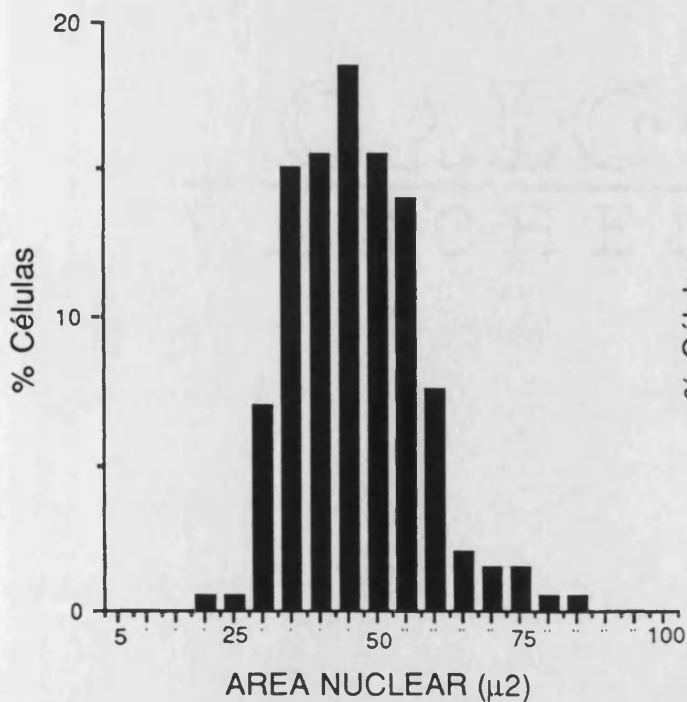
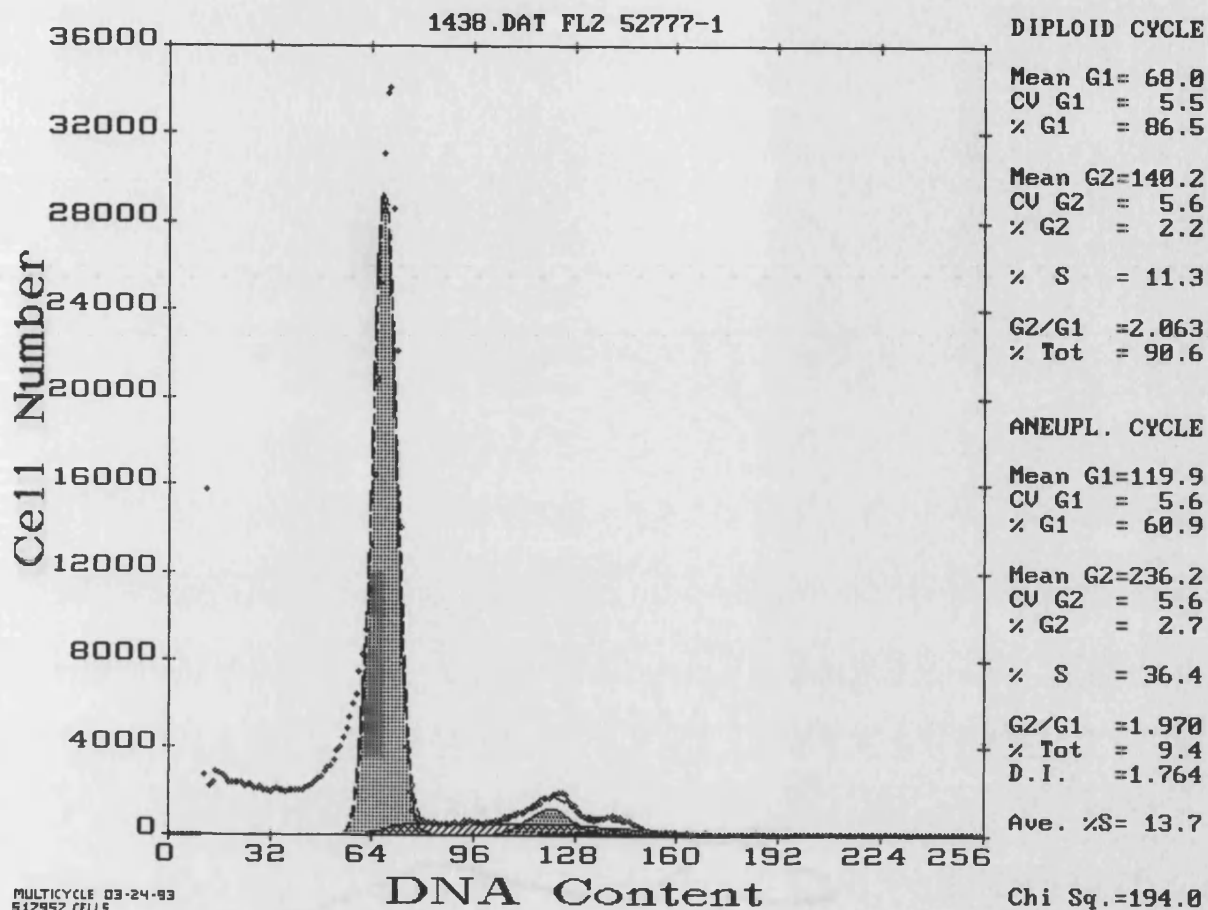
CA. DUCTAL INFILTRANTE.



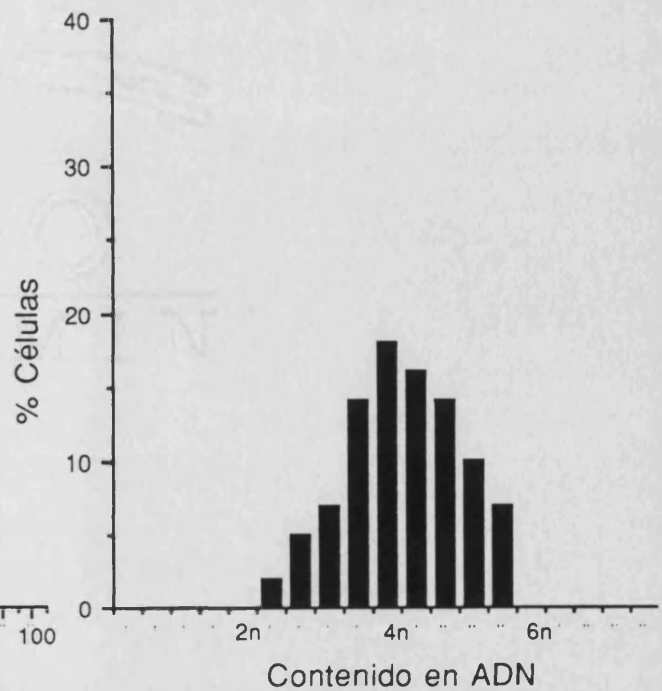
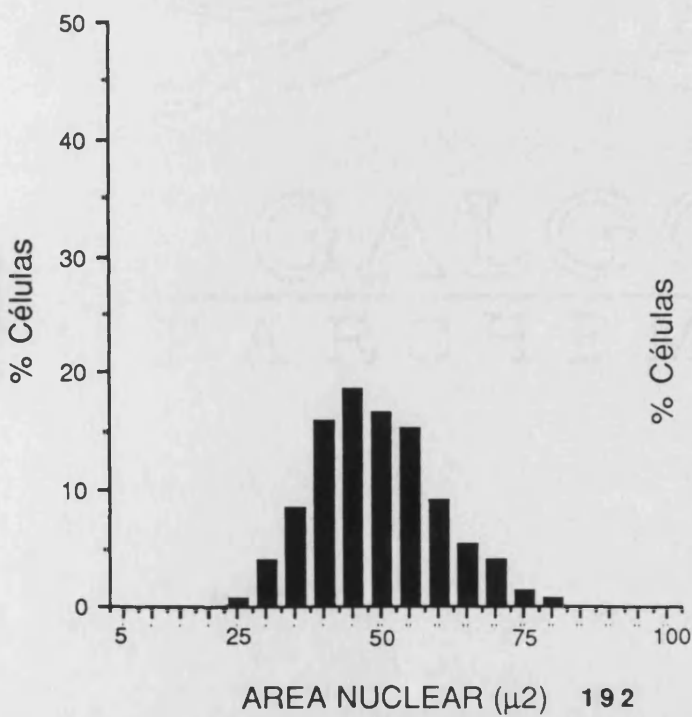
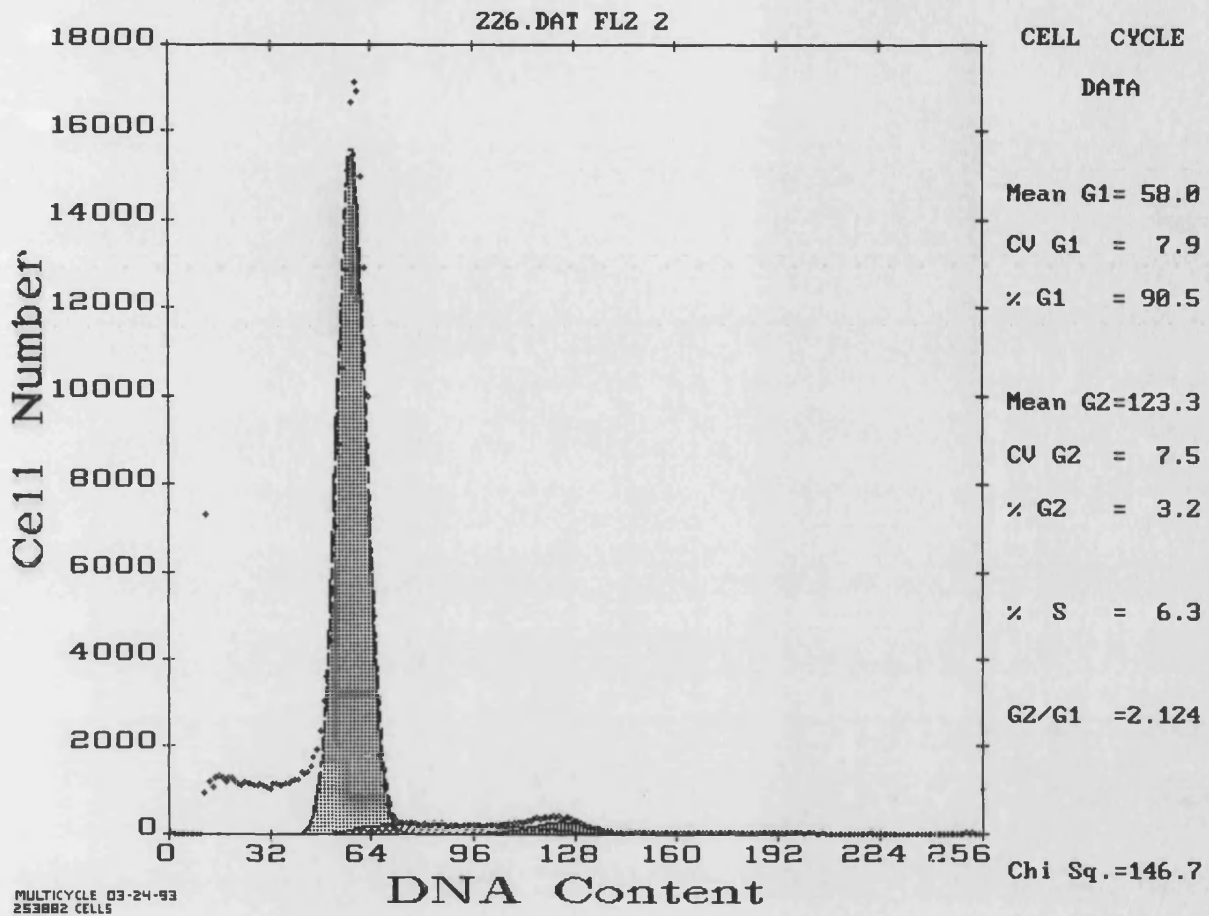
CA.LOBULILLAR INFILTRANTE



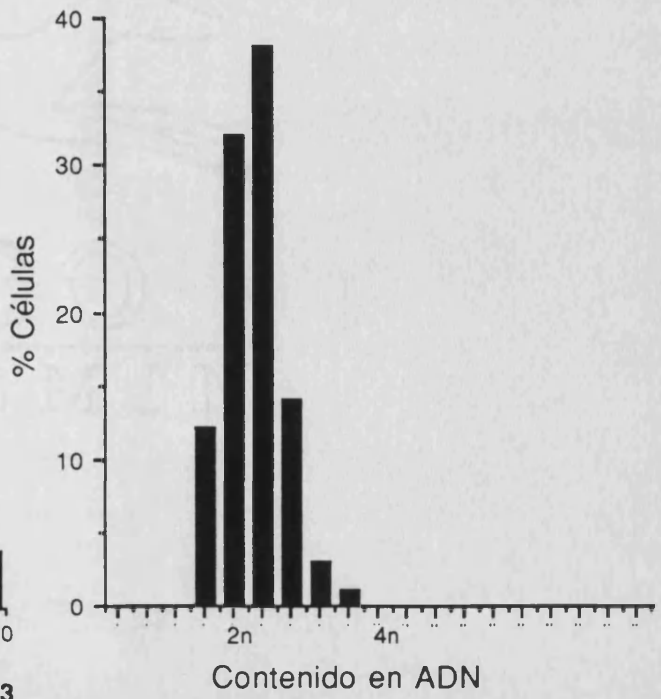
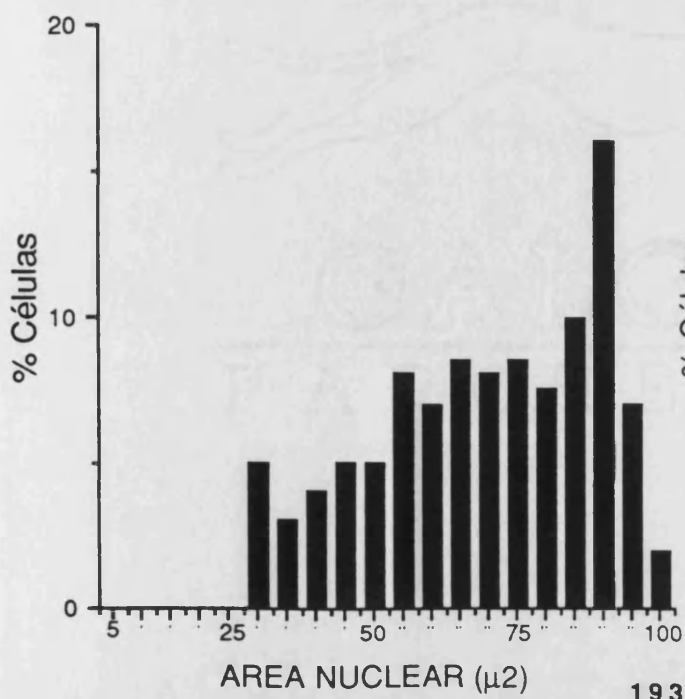
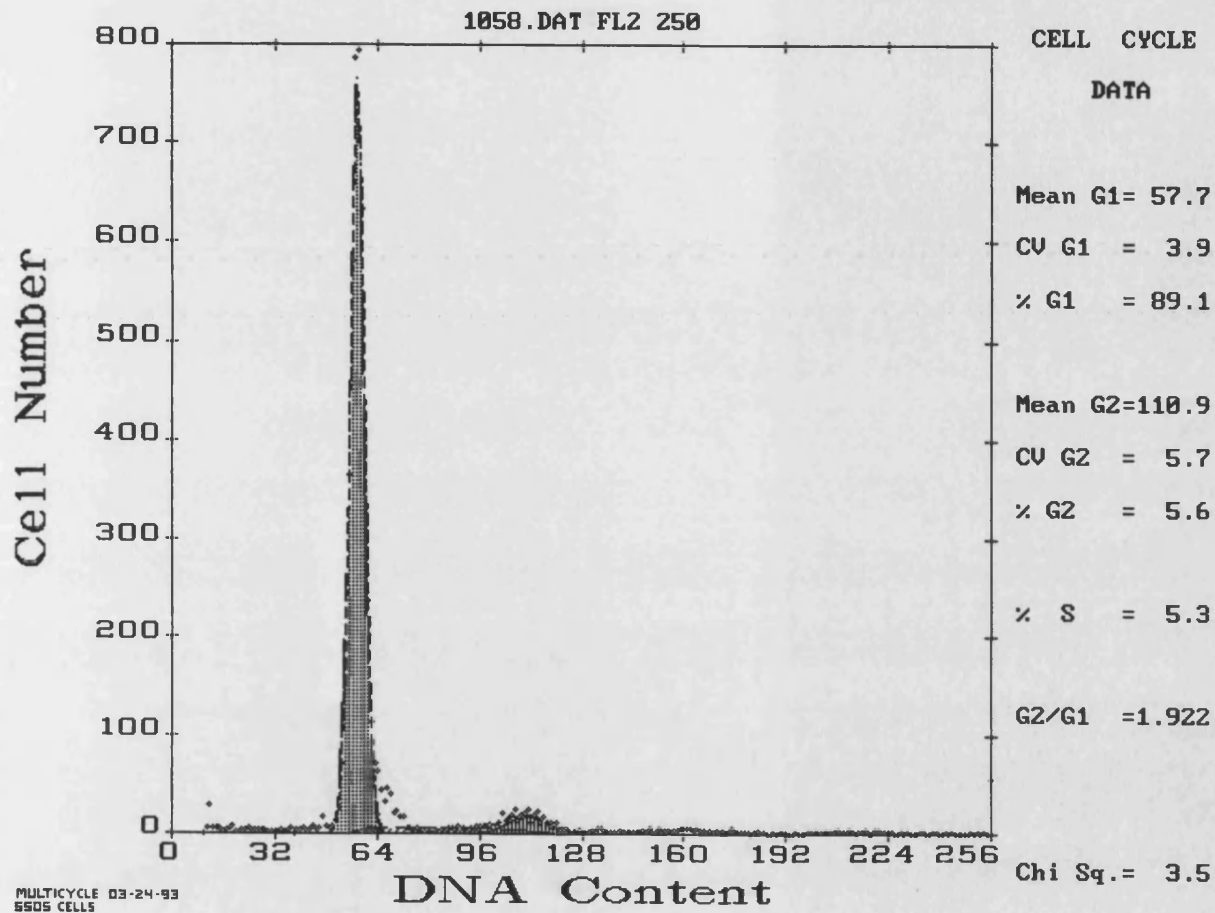
CA. LOBULLAR INFILTRANTE



CARCINOMA TUBULAR



CARCINOMA TUBULAR



DISCUSSION

DISCUSION :

Al valorar los resultados obtenidos por otros grupos y por nosotros en lo concerniente a la morfometría y citofotometría de la mastopatía proliferativa (con o sin atipias) y del carcinoma in situ, conviene hacer dos precisiones iniciales.

En primer lugar, debemos constatar que éstas lesiones han sido catalogadas de acuerdo con criterios histopatológicos (pues no existen clasificaciones citogenéticas, bioquímicas, morfométricas, etc.) y secundariamente cuantificadas siguiendo la conducta habitual en la bibliografía. Por consiguiente, si un determinado grupo de investigadores sobrediagnostica o infradiagnostica histopatológicamente la mastopatía proliferativa con atipia (por poner un ejemplo), se obtendrán unos ulteriores resultados cuantitativos que, pudiendo tener un valor operativo entre los miembros del grupo, no resultan comparables a las mediciones de lesiones etiquetadas con un mismo diagnóstico por otro grupo.

Esta supuesta subjetividad desaparecería si se comparasen los resultados citofotométricos de diversos grupos de trabajo que clasificasen sistemáticamente las lesiones (objeto de comparación) de acuerdo con criterios citofotométricos. Lo mismo vale invirtiendo el orden de las técnicas

En segundo lugar, podría muy bien ocurrir que un determinado tipo de lesión con signos histopatológicos bien caracterizados y, por consiguiente, con alta concordancia intersubjetiva por parte de los patólogos, corresponda en realidad a un conjunto heterogéneo de procesos con distinto significado biológico. Así, en hematopatología, nadie se escandaliza ante la idea de que la leucemia morfológicamente linfoblástica, constituye un grupo enorme de procesos con características inmunológicas, cinéticas, citogenéticas, etc. marcadamente dispares.

Se acepta que, en la génesis de un carcinoma de mama, existen unos estadios morfológicamente identificables que incluyen a la hiperplasia florida sin atipias, hiperplasia atípica, carcinoma in situ y, eventualmente, carcinoma invasor. (CADY, 1990; GALLAGER, 1980; PAGE, 1987); de forma que la hiperplasia atípica es, o bien un marcador de incremento de riesgo de cancer de mama, o bien es por sí misma, una lesión premaligna (BLACK, 1969; PAGE, 1985; WELLINGS, 1975).

PAGE y col (1985) en un estudio de seguimiento realizado sobre una extensa serie de mujeres que presentaban hiperplasia atípica, encuentran que el riesgo relativo de padecer carcinoma ductal infiltrante de mama es 4 veces superior al que presentan aquellas mujeres que no padecen esta lesión.

Basados en estas premisas, establecemos la importancia de éstas lesiones como base para realizar sobre ellas técnicas especiales como son la morfometría y la cuantificación de ADN.

MORFOMETRIA:

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que hacen referencia al estudio de la morfometría nuclear en relación con el cáncer de mama (DZIURA, 1979; ZAJDELA, 1979; VAN BOGAERT, 1980; CORNELISSE, 1981; BAAK, 1982; VAN DER LINDEN, 1986). Los parámetros medidos han sido muy variados, incluyendo desde el área y perímetro nuclear hasta los diámetros máximos y mínimos y factores de forma. El material empleado en dichos trabajos ha variado desde extensiones citológicas (DZIURA, 1979, BOON, 1982), hasta bloques de tejido incluidos en parafina. Por otra parte, hemos encontrado menor cantidad de estudios referidos a lesiones benignas y a su comparación con lesiones malignas.

Nosotros hemos analizado el área, perímetro, diámetro máximo y dos factores de forma en una serie de lesiones benignas y borderline y las hemos comparado con lesiones malignas. Hallamos que el parámetro más discriminante ha sido el área nuclear junto con el perímetro, atendido que son con los que mejor hemos podido separar cada una de las lesiones, desde las hiperplasias sin atipias hasta el carcinoma infiltrante. Aunque en la bibliografía, los parámetros morfométricos más utilizados han sido, con diferencia, el área nuclear (DZIURA, 1979; BOON, 1982, BAAK, 1985, PIENTA, 1991. Según KING (1991), el área nuclear y la forma del núcleo ($\text{perímetro}^2 / \text{área}$) permiten separar las lesiones no proliferativas de las hiperplasias atípicas y los carcinomas.

BHATTACHARJEE (1985), utiliza tres aspectos morfométricos (área, eje mayor y eje menor) para diferenciar las epiteliosis de los carcinomas intraductales y, así mismo, encuentra que el área nuclear es el aspecto morfométrico que mejor discrimina las lesiones.

Aunque aplicado a un tema que no nos ocupa directamente, como es la predicción pronóstica de pacientes con cancer de mama, (BAAK, 1985) y SHARKEY, 1983), también encuentran que la media del área nuclear, junto con otros parámetros no morfométricos, como son el grado histológico, estado de los ganglios linfáticos, índice de actividad mitótica e índice de celularidad, son los más importantes predictores del pronóstico de éstas pacientes.

Por el contrario, VAN DER LINDEN (1986 a) y VAN DER LINDEN (1986 b), en un estudio de carcinomas de mama y de sus metástasis axilares, no encuentran el área nuclear como un parámetro morfométrico discriminante para predecir recurrencias, si no que le fueron más útiles el factor forma ($4\pi \times \text{area}/\text{perimetro}^2$) y la relación de ejes de la célula.

A pesar de estos resultados, si bien el diámetro nuclear, así como los factores de forma, han sido utilizados en la mayoría de los estudios morfométricos, se han mostrado menos discriminantes que el área nuclear y, por ello, sus resultados han sido menos utilizados (PIENTA, 1991).

Al igual que TOSI (1985), hemos encontrado que los factores de forma proporcionan resultados muy similares en todos los tipos de lesiones, por lo que ni siquiera hemos podido separar, basados en éstos parámetros, las lesiones benignas de las malignas. Ello es debido, quizás, a que los núcleos de las lesiones estudiadas pueden ser grandes o pequeños, pero normalmente son de perfiles regulares.

Por el contrario, para VAN DER LINDEN (1986 a) y VAN DER LINDEN (1986 b), el factor de forma sí que fué un predictor de recurrencias ($p < 0.05$) en un estudio comparativo de dos grupos de pacientes con y sin recurrencia.

La mayoría de los autores no utilizan factores de forma en sus trabajos de morfometría en la patología mamaria (MAEHLE, 1982, BHATTACHARJEE, 1984, UITERLINDE, 1988; CAVALLARI, 1990; PIENTA, 1991).

La media del área nuclear y del perímetro, en nuestro trabajo, fué de valor considerable para distinguir diferentes tipos de procesos dentro del grupo de lesiones ductales y dentro del grupo de patología varia, pero no fue así para distinguir a los diferentes tipos de procesos dentro del grupo de lesiones lobulillares.

En efecto, analizando nuestros resultados, encontramos que, por término medio, los núcleos procedentes de las hiperplasias ductales sin atipias (media del área nuclear de $31.26 \mu^2$) son más pequeños que los procedentes de las hiperplasias ductales con atipias (área nuclear media de $33.23 \mu^2$) y éstos a su vez más pequeños que los procedentes de los carcinomas in situ, ya sean de tipo papilar (media del área nuclear de $44.18 \mu^2$) o intraductal, (media del área nuclear de $47.93 \mu^2$), comedo o no comedo. De la misma forma, también podíamos distinguir perfectamente a todas estas lesiones previamente citadas de los carcinomas ductales infiltrantes (media del área nuclear de $52.10 \mu^2$), ya que éstos últimos muestran los núcleos más grandes. Como vemos, efectivamente, existe una progresión creciente desde la hiperplasia ductal sin atipias hasta el carcinoma ductal infiltrante, de manera que los núcleos más pequeños corresponden a la hiperplasia ductal sin atipias y los más grandes a los carcinomas infiltrantes. (Resultados que han sido estadísticamente significativos, considerando al grupo de lesiones ductales en conjunto).

Los resultados obtenidos en los perímetros nucleares han mostrado igualmente la misma progresión creciente desde las hiperplasias ductales sin atipias hasta los carcinomas in situ.

Numerosos autores (BAAK, 1985; UYTERLINDE, 1988; VAN DER LINDEN, 1987; PIENTA, 1991), destacan que la media del área nuclear es mayor en los carcinomas que en las lesiones benignas. Según CORNELISSE (1981), el área nuclear puede discriminar el 60% de carcinomas y el 95% de lesiones benignas.

Hallazgos similares han obtenido BHATTACHARJEE y col. (1985) que encuentran una clara diferencia entre tejido mamario normal, epiteliosis y carcinoma intraductal, en lo que a la media del área nuclear se refiere.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por KING y cols. (1991), los cuales encuentran que el área nuclear sirve para separar las lesiones no proliferativas de la hiperplasia atípica y del carcinoma infiltrante, pero en cambio, no pueden distinguir utilizando el área nuclear, la hiperplasia sin atipias de la hiperplasia con atipias. Si en lugar de considerar a la media del área nuclear, consideran la media de diferentes parámetros nucleares (área, perímetro, diámetro máximo y diámetro mínimo), encuentran que existe una transición desde las lesiones benignas hasta las malignas, puesto que estos

parámetros mostraron un valor intermedio entre las lesiones no proliferativas y el carcinoma intraductal o el carcinoma infiltrante.

Análogamente GUSKI y cols. (1988) encuentran diferencias significativas entre proliferación epitelial sin y proliferación epitelial con atipias.

Así mismo, nuestros resultados concuerdan, en cierta medida, con los de DZIURA y col. (1979), los cuales encuentran una diferencia clara entre la media del área nuclear en las hiperplasias ductales (no especifican si con o sin atipias) y los carcinomas intraductales. En cambio, no pueden distinguir entre el carcinoma intraductal y el carcinoma ductal infiltrante. Quizás debido a que solo estudian 2 casos de carcinoma intraductal, número claramente insuficiente para establecer una comparación.

Sin embargo es importante señalar que todos los resultados observados hasta el momento, son sólo válidos cuando el estudio se realiza sobre una amplia población, ya que de éste modo podemos establecer la media de todos los casos y obtener una cifra estimativa. Sin embargo, cuando tenemos ante nosotros un caso individual, no podemos adoptar una conducta operativa concreta dada la superposición de valores de ciertos casos pertenecientes a lesiones distintas.

Así vemos cómo el caso con núcleos más pequeños que medimos de hiperplasia ductal sin atipias, fué de $19.92 \mu^2$ y el más grande, fué de $43.36 \mu^2$, claramente superponible con los resultados obtenidos en la hiperplasia ductal con atipias cuyo rango fué de $29.43 \mu^2$ para los núcleos más pequeños y de $53.73 \mu^2$ para el caso con núcleos más grandes. A su vez, estos datos son superponibles con los obtenidos en el carcinoma intraductal, cuyos rangos fueron de $32.07 \mu^2$ para el caso con núcleos más pequeños y de $92.25 \mu^2$ para el caso con núcleos más grandes y, por último, éstos datos también se superponen con los que hemos observado en el carcinoma ductal infiltrante que fueron de $27.86 \mu^2$ para el caso con núcleos más pequeños y de $75.00 \mu^2$ para el caso con núcleos más grandes.

De éste modo, queda reflejado claramente que, si bien cada tipo de lesión suele presentar unas cifras por dentro de unos rangos determinados, siempre hay algún caso que se sale de los límites más o menos previstos. Por ésta razón no se debe emplear la morfometría para determinar casos aislados, si no que debe utilizarse clínicamente haciendo media con otros casos, o por lo menos, utilizando otros datos adicionales como son las características histológicas.

Estas mismas consideraciones son las que hacen DZIURA y col. (1979), los cuales también encuentran que los valores límites obtenidos en las hiperplasias ($36.4 \mu^2$ y $49.0 \mu^2$) se solapan parcialmente con los encontrados en el carcinoma intraductal (cuyos rangos son de $47.1 \mu^2$ a $59.8 \mu^2$) y, a su vez todos ellos se solapan parcialmente con los del carcinoma ductal infiltrante ($42.7 \mu^2$ a $66.9 \mu^2$).

En el grupo de patología varia, nos sucedió lo mismo que hemos visto para el grupo de lesiones ductales. Es decir, que tanto la adenosis, en sus cinco variantes (simple, quística, esclerosante, microglandular y tumoral) con una media del área nuclear de $31.80 \mu^2$, la metaplasia apocrina, con una media del área nuclear de $28.72 \mu^2$ y la esclerosis radial, con una media del área nuclear de $32.91 \mu^2$, fueron perfectamente comparables con la hiperplasia ductal con atipias, cuya media del área nuclear fué de $41.35 \mu^2$ y con el carcinoma intraductal, con una media del área nuclear de $47.93 \mu^2$ ó con el carcinoma in situ de tipo papilar, cuya área nuclear media fué de $44.18 \mu^2$.

Al igual que sucedía con el grupo de lesiones anteriores, los rangos de la adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial, se superponen con los de la hiperplasia ductal con atipias y carcinoma intraductal, por lo que éstos datos sólo son valorables cuando estudiamos un número determinado de casos en el cual podemos efectuar la media, y menos fidedignos cuando los consideramos individualmente. No se han efectuado comparaciones de éste tipo en la bibliografía, por lo que no hemos podido contrastar nuestros resultados a nivel de morfometría. Pero nuestros resultados sí que apoyan la hipótesis establecida en el Consensus Meeting en Octubre de 1985 (HUTTER y cols., 1986) de que la adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial, no incrementan el riesgo de padecer cancer.

Lo mismo ha sucedido en el grupo de lesiones lobulillares, en donde tampoco hemos podido contrastar nuestros resultados con la bibliografía, puesto que no se han hecho estudios de lesiones lobulillares a nivel de morfometría.

Los resultados obtenidos en este grupo de lesiones, no permiten distinguir a los diferentes tipos de lesiones tan claramente como lo hemos hecho en el grupo de lesiones ductales. En efecto, hemos encontrado que la media del área nuclear en las hiperplasias lobulillares sin atipias fué de $31.26 \mu^2$, prácticamente no distinguible de la media del área nuclear obtenida en la hiperplasia lobulillar con atipias. Lo mismo sucede con la media del área

nuclear del carcinoma lobulillar in situ, que fué de $33.26 \mu^2$. Solo hemos medido dos casos de carcinoma lobulillar infiltrante, cuya media del área nuclear fué de $38.53 \mu^2$, aunque consideramos que el número de casos es insuficiente para establecer una comparación. Vemos, por tanto, que a nivel de la morfometría, no es factible separar los diferentes tipos de lesiones lobulillares. Estos resultados son en cierta medida previsibles, puesto que histológicamente tanto la hiperplasia lobulillar con atipias como el carcinoma in situ, muestran una población monótona de células, mal discernibles por sus características morfológicas. (PAGE y col. , 1987).

No hemos encontrado una clara correlación entre los resultados obtenidos por morfometría (área nuclear) y cantidad de ADN en cada una de las lesiones, ya que si bien en algunos casos, efectivamente, a un área nuclear grande, le correspondía una cantidad de ADN aneuploide por citometría (tanto estática como de flujo), no siempre sucedió así y nos hemos encontrado con casos en los que el área nuclear era grande y en cambio la cantidad de ADN fué normal (diploide) y viceversa. Estos datos han sido corroborados por otros autores (LOPEZ y cols., 1991).

Por el contrario, UYTERLINDE y cols. (1987) encuentran una correlación positiva con el Índice de ADN en el 63% de los casos. Quizá esto sea debido a que el tamaño nuclear, aunque intrínsecamente correlacionado con el contenido en ADN, también depende de otros factores tales como el estado metabólico de las células, el grado de expresión celular, etc.

CITOFOTOMETRIA:

Al igual que sucede con el estudio de la morfometría, también vemos cómo en éstos últimos años se han publicado numerosos trabajos que hacen referencia al estudio del contenido de ADN de carcinomas de mama, por medio de la citofotometría (ERHARDT, 1987; BOCKING, 1989; CHRISTOV, 1989; MORAN, 1984; LOPEZ GINES, 1991; LEE, 1992 ...). También, aunque en menor número, hemos recogido algunas publicaciones que hacen referencia al contenido de ADN que presentan las lesiones benignas-borderline de la mama (OLINICI, 1987; DE POTER, 1987; GUSKI, 1988; NORRIS, 1988; KING, 1991).

A este respecto, nosotros hemos analizado 102 lesiones benignas de mama y 29 carcinomas in situ, en los cuales hemos estudiado la cantidad de ADN y la hemos comparado con los carcinomas infiltrantes.

Dentro del grupo de lesiones ductales, hemos encontrado que el 66'6% de las hiperplasias ductales sin atipias fueron diploides y el 33'3% de los casos fueron aneuploides. Revisadas las lesiones diploides, encontramos que la mayoría de las células mostraban un bajo contaje mitótico y estos hallazgos indican que muchas de las células en dichas lesiones se encontraban en fase G0-G1 del ciclo celular. Los 5 casos aneuploides fueron revisados minuciosamente y sólo uno de ellos estaba asociado a un carcinoma ductal infiltrante. Los otros 4, formaban parte del contexto de una mastopatía fibroquística sin atipias Reclus II, si bien mostraron un mayor incremento en la actividad mitótica.

Nuestros resultados son discordantes a los aportados por otros autores (KOYAMA, 1965; EMSON, 1966; DE POTTER, 1987; KING, 1991) pues todos ellos encuentran una distribución de ADN diploide o diploide-tetraploide, mientras que nuestra distribución, si bien mayoritariamente es diploide, encontramos un 30% aproximadamente de aneuploidias.

Por contra, estos hallazgos concuerdan con los de IZUO y col. (1971b), el cual encuentra que 5 casos de 26 papilomatosis fueron aneuploides. Estos 5 casos aneuploides estaban dentro del grupo de pacientes que con posterioridad desarrollaron carcinoma. Nosotros podemos afirmar que sólo uno de ellos era concomitante con un carcinoma. De los otros 4, hasta el momento, no tenemos conocimiento de que hayan desarrollado carcinoma. Si ésto ocurriera, el valor pronóstico de este resultado sería altamente significativo para la clínica.

En las hiperplasias ductales con atipias, también encontramos que el 60% de los casos fueron diploides, mientras que el 40% fueron aneuploides. Vemos cómo aquí ha aumentado ligeramente el porcentaje de casos aneuploides, coincidiendo con los resultados obtenidos por TEPLIZ (1990), los cuales encuentran que la mitad de sus casos fueron euploides y la otra mitad fueron aneuploides. Así mismo, CARPENTER y cols. (1987) obtienen similares resultados a los nuestros, es decir, el 30% de las lesiones proliferativas con atipias fueron aneuploides.

Por el contrario, DE POTTER y cols. (1987) observan que 6 de 7 hiperplasias atípicas eran diploides-tetraploides y la restante, tetraploide, pero no encontraron ningún caso aneuploide.

Revisados nuestros casos aneuploides, observamos que todos ellos, menos uno, estaban asociados o bien a un carcinoma de tipo intraductal o bien a un carcinoma infiltrante.

En los carcinomas in situ de tipo intraductal, encontramos que el 61'5% fueron diploides (8/13), el 23'2% fueron aneuploides (3/13) y 2 casos fueron tetraploides. Los 3 casos aneuploides fueron de tipo comedo que, sabemos por histología, son citológicamente polimorfos. Los 2 casos tetraploides mostraron un patrón sólido. Esta distribución fué debida quizás al incremento de la síntesis de ADN en la preparación de las células para la división.

En cambio en los carcinomas in situ de tipo papilar, encontramos que sólo el 37'5% de los casos eran diploides (3/8), mientras que el 62'5% fueron aneuploides (5/8) semejándose más sus rasgos citofotométricos a los del carcinoma infiltrante. De estos aneuploides, 2 de ellos estaban asociados a un carcinoma papilar infiltrante, pero los otros 3 estaban claramente circunscritos en su basal.

Vemos por tanto que existe una clara discordancia entre un tipo (intraductal) y otro (papilar in situ) no explicable en base a los presentes análisis.

Resultados similares son los observados por KOYAMA (1965), EMSON (1967) CARPENTER y cols. (1987), ERHARDT Y cols. (1987) y ERICSON (1992), los cuales también encuentran una distribución de ADN en los carcinomas in situ entre diploide y aneuploide, predominando ésta última, sobre todo en los casos de carcinoma in situ asociado a carcinoma infiltrante. Así

mismo, DE POTTER y cols. (1987), también encuentran un aumento de las aneuploidias en los carcinomas in situ.

Estos hallazgos sugieren la hipótesis de que las lesiones aneuploides de la mama muestran un mayor riesgo de progresar hacia un carcinoma invasor y que el estudio del contenido en ADN celular podría ser la base para establecer un índice pronóstico para el desarrollo de lesiones invasoras.

Los carcinomas ductales infiltrantes estudiados, mostraron un mayor porcentaje de casos aneuploides y tetraploides, disminuyendo el número de casos diploides, hallazgo que hemos encontrado también en el resto de la bibliografía (AUER y cols. (1980), ERHARDT y cols. (1986), GUAZZI y cols. (1985), KEYHANI-ROFAGHA, (1990), PIENTA (1989) ...

Así pues, viendo nuestros resultados no resulta factible diferenciar claramente por esta técnica a las hiperplasias ductales con atipias del carcinoma in situ de tipo intraductal, aunque sí del carcinoma in situ de tipo papilar. Estos datos apoyarían el trabajo aportado por VISSCHER y cols. (1991) que encuentran un significativo contenido anormal de ADN en las hiperplasias ductales atípicas, similar al encontrado en los carcinomas in situ de bajo grado.

Estos datos también apoyarían la hipótesis de que las hiperplasias ductales atípicas aneuploides tengan una mayor predisposición a desarrollar un carcinoma in situ y que, a su vez, tendrían mayor tendencia a transformarse en un carcinoma invasor. Este último, al ser aneuploide, tendría también un comportamiento más agresivo, demostrado en otros trabajos (ERHARDT y col. 1987) en los cuales se ha estudiado concomitantemente la cantidad de ADN presente en un carcinoma in situ y un carcinoma infiltrante en un mismo paciente. Ambos muestran la misma distribución de ADN, es decir, si uno era diploide, el otro también y viceversa, si uno era aneuploide, el otro también.

En el grupo de lesiones lobulillares, hallamos que el porcentaje de aneuploidias fue creciendo, aunque de forma mínima desde las lesiones menos agresivas a las más agresivas, de forma que encontramos que en la hiperplasia lobulillar sin atipias, el 33'3% de los casos fueron aneuploides y el 6'6%, tetraploides; en la hiperplasia lobulillar con atipias, el 46'6% de los casos fué aneuploide y no hubo casos tetraploides, mientras que en el carcinoma lobulillar in situ, el porcentaje de casos aneuploides fué del 37'5 y 12'5% fueron tetraploides. Por consiguiente, en este tipo de alteraciones, sí que podemos separar cada tipo de lesión, aunque de forma mínima.

Estos resultados no han podido ser contrastados en la bibliografía, puesto que en la línea lobulillar no se ha realizado este tipo de estudio. Solo hemos podido encontrar un trabajo de LUDWIG y col. (1973) referente al contenido en ADN del carcinoma lobulillar in situ viendo que 1 caso de 8, fué aneuploide, mientras que los otros 7 mostraron una distribución diploide-tetraploide.

En lo que respecta al grupo de patología varia, las cosas están más claras, ya que hay una gran diferencia entre metaplasia apocrina y esclerosis radial por un lado, comparadas con las lesiones con atipias, ya sean ductales o lobulillares. Así, mientras que en la metaplasia apocrina y esclerosis radial el porcentaje de casos diploides fué respectivamente de 80% y 83'33%, ya hemos visto que en la hiperplasia ductal con atipias fué del 60%, en el carcinoma in situ de tipo intraductal del 61'5%, en el de tipo papilar del 37'5% y en la hiperplasia lobulillar con atipias y carcinoma lobulillar in situ, del 50% aproximadamente, luego existe efectivamente una diferencia clara entre las primeras lesiones y las ultimas, que segun HUTTER, no incrementan el riesgo de padecer cancer.

Revisados los casos nuevamente a nivel de microscopía óptica, se comprobó que un caso de esclerosis radial que fué aneuploide estaba asociado a un carcinoma invasor de tipo tubular, no sucediendo lo mismo con el otro caso de esclerosis radial y los 2 casos de metaplasia apocrina, que formaban parte de sendas lesiones de mastopatía fibroquística sin atipias.

En lo concerniente a la metaplasia apocrina nuestros resultados difieren en cierta medida con respecto a los hallazgos de IZUO y col. (1987), ya que si bien todos sus casos menos uno fueron diploides (igual que hemos encontrado nosotros), ellos observan una cantidad importante de células en el rango tetraploide, cosa que no nos sucede a nosotros. Estos autores además, apoyan la idea de que la metaplasia apocrina puede sufrir una transformación hacia carcinoma apocrino, mientras que nosotros pensamos que esta transformación parece poco probable a tenor de los resultados que hemos obtenidos, claramente separables del grupo de los carcinomas.

Sorprendentemente, el 50% de las adenosis fueron diploides y el otro 50% aneuploides, a pesar de que, una vez revisadas a nivel histológico, se comprobó que correspondían a casos de adenosis quística, esclerosante o tumoral, que no mostraban atipias. No hemos encontrado una explicación lógica para este tipo de resultados. Este tema queda abierto y por tanto pendiente de estudios complementarios.

CITOMETRIA DE FLUJO

Lo mismo que sucede con la morfometría y con la citometría estática, con la citometría de flujo también se han realizado abundantes trabajos que determinan la cantidad de ADN, la ploidia, cantidad de células en fase S, etc. relativos al carcinoma de mama (OLSZEWSKI, 1981; MORAN, 1984; FALLENIUS, 1986; UYTERLINDE, 1987; LEWIS, 1990; FUHR, 1991; BOSARI, 1992), pero son muy pocos los relacionados con las lesiones benignas y lesiones borderline de la mama (CHASSEVENT, 1984; MORAN, 1984; SPYRATOS, 1987; CHRISTOV, 1989; AASMUNDSTAD, 1990 y KILLEEN, 1991). Incluso en la mayoría de éstos, el trabajo se refiere fundamentalmente al estudio de carcinomas de mama y tratan el tema de las lesiones benignas, solo de pasada y muy superficialmente.

Esto es debido a que, efectivamente, se piensa que todas las lesiones benignas tienen una cantidad de ADN normal (diploide), pero esto no siempre sucede así, como ahora veremos.

En nuestro trabajo de citometría de flujo nos hemos encontrado con que, si bien las alteraciones de la cantidad de ADN no son tan abundantes como las de citometría estática, ellas también están presentes.

Dentro del grupo de lesiones ductales, encontramos que en la hiperplasia ductal sin atipias, todos los casos menos uno, fueron diploides, es decir que fueron diploides el 93'3% de los casos. El único caso aneuploide correspondió a una papilomatosis sin atipias, pero que mostraba una mayor cantidad de mitosis. Constatamos, además, que esta lesión fué aneuploide.

En las hiperplasias ductales con atipias, encontramos 2 casos aneuploides de 10, es decir, que el 20% de las lesiones fueron aneuploides y el 80% diploides.

Hallazgos similares han obtenido SPYRATOS y cols. (1987), los cuales estudian 27 hiperplasias atípicas y 15 hiperplasias sin atipias y encuentran que todos los casos son diploides, menos un caso de hiperplasia atípica, que fué aneuploide. Ellos piensan que sería necesario un largo seguimiento para interpretar el significado de este pico aneuploide.

Nosotros hemos revisado los dos casos aneuploides y hemos observado que dicha aneuploidía se confirma tanto por citometría estática como por

citometría de flujo. Si bien la alteración en la cantidad de ADN ha sido pequeña en los dos casos cuando las hemos estudiado por citometría estática, uno de los casos mostró una cantidad de ADN 2.2 por citometría de flujo. La única explicación plausible es que ésta hiperplasia con atipias estaba al lado de un carcinoma in situ con fuertes atipias, el cual lógicamente formaba parte del material que se utilizó para citometría de flujo. El segundo caso, histológicamente no presenta atipias tan importantes que pudieran justificar la presencia de ese pequeño pico aneuploide.

El resto de los trabajos existentes en la bibliografía referidos a lesiones benignas, encuentran que todos los casos son diploides (MORAN, 1984; CHASSEVENT Y cols., 1984; CHRISTOV y cols. 1989).

Todos los carcinomas in situ de tipo intraductal excepto uno fueron diploides. El caso aneuploide presentó un índice de ADN de 1'2. Análogamente, los carcinomas in situ de tipo papilar fueron todos diploides excepto 2 que fueron aneuploides (Índice de ADN de 1.4 y 1.7). Los tres casos fueron aneuploides tanto por citometría estática como por citometría de flujo.

Revisados nuevamente los casos aneuploides, hemos encontrado que el carcinoma intraductal era de tipo comedón, como ya hemos comentado anteriormente y de los 2 casos de carcinoma in situ de tipo papilar, uno de ellos estaba asociado a un carcinoma de tipo papilar.

Hallazgos similares han encontrado AASMUNDSTAD y col. (1990), los cuales también vieron una correlación entre la ploidía y tipo histopatológico. Los carcinomas intraductales de tipo comedón estuvieron predominantemente asociados con histogramas aneuploides, confirmando la idea de que éstos carcinomas tienen un comportamiento más agresivo. Sin embargo éstos autores no encuentran una relación significativa entre el tipo histopatológico y el seguimiento clínico. Nosotros para este estudio no hemos realizado seguimiento clínico de estos enfermos.

Los resultados son similares a los encontrados por KILLEEN y col. (1991) que apoyan la idea de que el grupo de carcinomas intraductales de tipo comedo muestran mayor número de aneuploidías comparados con el grupo de carcinomas in situ de tipo no comedón.

Sin embargo, nosotros hemos hallado que si bien los carcinomas in situ de tipo comedo tienen mayor tendencia a ser aneuploides que los de tipo no

comedo, los carcinomas in situ de tipo papilar (en nuestra casuística) han mostrado un mayor número de aneuploidías tanto por citometría estática como por citometría de flujo e incluso la media del área nuclear también fué mayor en este tipo de carcinoma.

Al igual que ocurre con la citometría estática, por medio de la citometría de flujo no podemos diferenciar las hiperplasias ductales con atipias del carcinoma in situ.

En el grupo de lesiones lobulillares los resultados fueron similares. En las hiperplasias lobulillares sin atipias encontramos 4 casos aneuploides, 1 tetraploide y 25 diploides. El número de aneuploidías que hemos encontrado aquí es mayor que el que hemos visto en las hiperplasias ductales sin atipias, si bien hemos de tener presente que se han estudiado más casos de hiperplasia lobulillar que de hiperplasia ductal (30 frente a 15). No hemos encontrado ninguna explicación lógica para este tipo de resultados, ya que todas las hiperplasias lobulillares formaban parte de un contexto de mastopatía fibroquística sin atipias y ningún caso estuvo asociado a carcinoma infiltrante.

En las hiperplasias lobulillares con atipias encontramos 2 casos aneuploides y los 13 restantes fueron diploides. Probablemente estos dos casos aneuploides correspondan a lesiones predecesoras de carcinomas lobulillares in situ aneuploides.

Estos resultados no son comparables con los existentes en la bibliografía ya que cuando hablan de lesiones benignas en ninguno de los casos incluyen hiperplasias lobulillares.

Por contra todos los casos de carcinoma lobulillar in situ que hemos estudiado, fueron diploides. A pesar de que el carcinoma lobulillar in situ según ROSEN (1987) es un marcador de riesgo bilateral de neoplasia invasora (cuya histología no necesariamente es la de un carcinoma lobulillar infiltrante), nuestros resultados no constatan la existencia de aneuploidia que pudiera justificar este comportamiento.

Como ya hemos comentado anteriormente, sólo hemos estudiado 2 casos de carcinoma lobulillar infiltrante que fueron uno diploide y otro aneuploide, por lo que no nos permite hacer ningún comentario al respecto.

Con el grupo de patología varia (adenosis, metaplasia apocrina y esclerosis radial), hemos hallado resultados similares a los vistos hasta ahora. Es decir, encontramos 1 caso aneuploide en las adenosis y en la esclerosis radial. Todos los demás fueron diploides, lo mismo que todos los casos de metaplasia apocrina. El caso de adenosis que fué aneuploide correspondía a una adenosis tumoral que no mostraba ningun signo de atipia, al menos histológicamente, si bien dá un aspecto seudotumoral, pero que no justifica la aneuploidía que hemos encontrado con citometría de flujo. La esclerosis radial formaba parte de una mastopatía fibroquística con atipias (Reclus III) y quizás por ello fue aneuploide.

Estos datos no coinciden exactamente con los de la bibliografía, puesto que todas las lesiones benignas estudiadas por citometría de flujo han sido diploides (MORAN, 1984; CHASSEVENT y cols., 1984; CHRISTOV y cols., 1989).

En contra de los resultados de IZUO y cols. (1987) tampoco con citometría de flujo hemos encontrado ninguna población tetraploide en la metaplasia apocrina.

La separación de diferentes tipos de lesiones atendido al grado de atipia histológica, ya sean lesiones ductales o lobulillares, no ha sido posible con la citometría de flujo ya que los porcentajes de aneuploidías vistos con esta técnica son muy bajos. Quizás la citometría de flujo tendría más valor a nivel individual, ya que cabe esperar que los casos aneuploides con esta técnica corresponden a lesiones con gran cantidad de células aneuploides y, probablemente, con un comportamiento más agresivo. Por ésta razon, sugerimos que estos pacientes deben vigilarse más intensamente.

ANALOGIAS Y DIFERENCIAS DE LA CITOMETRIA ESTATICA CON RESPECTO A LA CITOMETRIA DE FLUJO.

Ya hemos señalado a lo largo de toda la exposición, la importancia de cuantificar la cantidad de ADN para aportar datos más objetivos a unas lesiones que de por sí, son subjetivas. Para ello existen dos métodos que, en teoría, deberían conducirnos a los mismos resultados. Nosotros en un afán de aportar un mayor número de datos y a su vez para contrastar los resultados por uno y otro método, hemos utilizado los dos, es decir, citofotometría (citometría estática) y citometría de flujo. Ambos presentan ventajas e inconvenientes que pasamos a comentar seguidamente:

- La citometría de flujo permite medir una gran cantidad de células en muy poco tiempo. En efecto las células analizadas con citometría de flujo son a razón de 3×10^5 células por minuto.

- La citometría estática solo permite medir varios centenares de células, que por otro lado, requieren varias horas de medida.

- Pero por contra, el inconveniente de la citometría de flujo radica en que el material a medir tiene que estar en forma de suspensión celular y en nuestro caso en particular trabajamos con muestras de tejido sólido incluidas en parafina, por tanto en esa suspensión celular estará incluido, no solo la lesión que queremos analizar sino también el tejido acompañante, como es el estroma y elementos inflamatorios, amén de otras patologías que acompañan a la lesión en cuestión, motivo de la medida. También incluirá tejido en necrosis y células rotas, si es que lo hubiere en la preparación. Todo lo cual hará que aparezca un debris en los histogramas de ADN que pueden enmascarar los resultados si no se tiene en cuenta.

- En cambio con la citometría estática podemos seleccionar las células a medir, puesto que la medición se efectúa de célula a célula y de este modo se pueden elegir células aisladas, bien conservadas, que no muestran necrosis ni están rotas ni tampoco superpuestas con otras. De forma que la medición es mucho más limpia y más exacta que con la citometría de flujo.

- En contraposición, la citometría de flujo proporciona mejor resolución que la citofotometría debido en parte al gran número de células analizadas por citometría de flujo y a las características especiales de ésta técnica. En los carcinomas con múltiples poblaciones celulares aneuploides, la citometría de

flujo produce mucha mejor definición de los diferentes picos. Además es superior en detectar carcinomas con un pico aneuploide en el rango casi-diploide. En contraste, la citofotometría puede no distinguir con nitidez tumores aneuploides en el rango casi-diploide de los tumores diploides, aunque el uso de descriptores cuantitativos en los histogramas, tales como el coeficiente de variación, puede ser de ayuda en estos casos.

- Otra ventaja de la citometría de flujo es la capacidad de medir la fracción de células tumorales en la fase S del ciclo celular, un componente importante del análisis cuantitativo del ADN. Cosa que no se puede realizar tan claramente con la citometría estática. Sin embargo, existen otros métodos que nos permiten medir esta fracción sin necesidad de utilizar la citometría de flujo como son el estudio del Ki-67 y la PCNA/cyclin (BACUS y cols., 1989; DAWSON y cols., 1990).

En nuestros grupos de lesiones hemos encontrado las siguientes analogías y diferencias:

Dentro del grupo de lesiones ductales hemos encontrado las siguientes analogías entre la citometría estática y la citometría de flujo: 73 % en la hiperplasia ductal sin atipias, Reclus II; 70% en la hiperplasia ductal con atipias, Reclus III; 84'6% en el carcinoma in situ de tipo intraductal y 75% en el carcinoma in situ de tipo papilar. Las diferencias que encontramos en todos éstos casos fueron las mismas, es decir, que fueron aneuploides por citometría estática y diploides por citometría de flujo.

Estos resultados son explicables porque, como hemos visto anteriormente, con la citometría estática medimos exclusivamente la zona de la lesión en cuestión, solo 100 núcleos seleccionados, mientras que con la citometría de flujo medimos no solo la lesión deseada sino las lesiones acompañantes y el estroma circundante. Por tanto para que la citometría dé valores aneuploides es necesario que haya un número considerable de células con la cantidad de ADN alterada.

Tanto en el carcinoma ductal infiltrante como en los otros tipos de carcinomas, las analogías fueron sólo del 38% y ello es debido a que en los carcinomas aumentan las alteraciones del ADN apareciendo mayor número de aneuploidías y tetraploidías que son mayoritariamente recogidas por citometría estática, pero que aumentan considerablemente las diferencias entre ambas técnicas.

En el grupo de lesiones lobulillares hemos encontrado menos analogías que en el grupo de lesiones ductales. Ellas han sido las siguientes: Hiperplasia lobulillar sin atipias (Reclus II: 53%; Hiperplasia lobulillar con atipias (Reclus III): 40% y carcinoma lobulillar in situ: 5%. La mayoría de las diferencias estriban en que casos que son diploides por citometría de flujo, son diploides por citometría estática.

Los pocos casos que fueron aneuploides por citometría de flujo y diploides por citometría estática fué debido a que en el mismo bloque utilizado para citometría de flujo había otras lesiones más atípicas o bien carcinomatosas.

En el grupo de patología varia encontramos las siguientes analogías: Adenosis: 40%, Metaplasia apocrina: 80% y Esclerosis radial: 75%.

Los casos discordantes se debieron a que la mayoría fueron por citometría estática aneuploides mientras que por citometría de flujo fueron diploides. Solo hubo 2 casos que fueron diploides por citometría estática y aneuploides por citometría de flujo. Correspondían a una esclerosis radial que estaba asociada a una mastopatía con atipias (Reclus III) y por eso dió aneuploide por citometría de flujo y el otro caso correspondía a una adenosis tumoral, que como hemos visto anteriormente no mostraba atipias que puedan justificar este resultado. Un análisis posterior esperamos que nos aclare esta anomalía.

En líneas generales hemos encontrado que existe una buena correlación entre el Índice de ADN obtenido por análisis de imagen y citometría de flujo en cuanto a las lesiones benignas de la mama se refiere, aunque siempre encontramos alguna excepción, como es el caso de la adenosis. Ello está de acuerdo con los resultados obtenidos por DAWSON y cols. (1990). En cambio ésta correlación no es tan buena entre los carcinomas.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por LOPEZ y cols. (1991), los cuales también encuentran diferencias entre los Índices de ADN obtenidos por citometría estática y citometría de flujo en un estudio realizado sobre 22 carcinomas, encontrando también un mayor número de aneuploidias a nivel de citometría estática comparada con la citometría de flujo.

Por el contrario estos resultados no coinciden con los encontrados por CORNELISSE y cols. (1985), DAWSON y cols. (1990), BAUER y cols. (1990), LEE y cols. (1991) y LEE y cols. (1992) en cuanto a los carcinomas infiltrantes se

refiere. Nosotros sólo encontramos aproximadamente un 50% de analogías entre las técnicas, mientras que sus analogías son aproximadamente del 80%.

En lo que sí estamos de acuerdo con todos ellos es en que la citometría de flujo mide un gran número de células y proporciona unos histogramas con mayor resolución que la citofotometría, ya que con la primera se pueden detectar carcinomas aneuploides con un pico anormal cerca del rango diploide. En estos tumores, la citometría de flujo puede demostrar la presencia de 2 picos, uno en el rango diploide y el otro cerca del diploide, mientras que con la citometría estática, este pico cerca del diploide no se pone evidencia.

Por contra la citofotometría es más sensible en detectar poblaciones tetraploides y poblaciones celulares altamente aneuploides.

Resumiendo podemos decir que nuestro estudio indica que la citofotometría y la citometría de flujo muestran resultados comparables en el análisis de la ploidía del ADN en la mayoría de lesiones benignas y en algunos carcinomas. Los dos métodos parecen ser técnicas complementarias en que cada una ofrece ventajas e inconvenientes sobre la otra. Lo ideal sería realizar las dos técnicas, de manera que la información proporcionada por la combinación de las dos técnicas, mejoraría el valor de la cuantificación del ADN. Dos datos a resaltar serían que la citometría de flujo es más costosa que la citofotometría y que esta última permite realizar el análisis morfométrico y la evaluación de estudios inmunohistoquímicos, luego ésta última puede ser una solución alternativa en aquellos laboratorios donde no se disponga de citómetro de flujo.

FINALMENTE, vamos a esbozar lo que sería el patrón morfológico y citofotométrico de las lesiones displásicas-border line de la mama.

1.- Mastopatía fibroquística. Reclus grado II (Displasia mamaria sin atipias):

Abarca toda una serie de lesiones proliferativas sin atipias de la mama, con aumento del número de células epiteliales y mioepiteliales y/o el número de lobulillos mamarios, como son la hiperplasia ductal (que incluye a la epiteliosis y papilomatosis) y la hiperplasia lobulillar.

Estas lesiones sin atipias, muestran una media del área nuclear en torno a las $30 \mu^2$ y el análisis citofotométrico demuestra que entre el 60 y el 70% de estas lesiones son diploides cuando el contenido en ADN se obtiene por citometría estática y del 90% aproximadamente cuando el análisis se realiza por citometría de flujo.

2.- Mastopatía fibroquística. Reclus grado III (Displasia mamaria con atipias):

Corresponde a un grupo de lesiones proliferativas con atipias de la mama, con aumento del número de células epiteliales y mioepiteliales y/o el número de lobulillos mamarios y distorsión del patrón proliferativo celular. Abarca igualmente a la hiperplasia ductal con sus dos variantes y a la hiperplasia lobulillar.

Estas lesiones atípicas muestran una media del área nuclear en torno a las $40 \mu^2$; si bien éstos datos son válidos para las hiperplasias ductales con atipias, pero no para las hiperplasias lobulillares con atipias, cuyos resultados se confunden con los del grupo de mastopatía fibroquística. Reclus grado II. Por lo morfométricamente, no se puede distinguir a la hiperplasia lobulillar sin atipias de la hiperplasia lobulillar con atipias, como ya hemos mencionado anteriormente, comprobado estadísticamente.

En cuanto al análisis citofotométrico vemos que éstas lesiones atípicas presentaban un contenido en ADN diploide entre el 50 y el 60% de los casos cuando lo determinamos por citometría estática y del 80% cuando lo determinamos por citometría de flujo. Vemos por tanto que el número de casos aneuploides ha aumentado en este grupo con respecto al grupo de displasia mamaria sin atipias. (Estadísticamente significativo, $p < 0.05$)

3.- Carcinoma in situ (ductal, papilar, lobulillar):

Corresponde a una neoformación que crece en el interior de los ductos o lobulillos y que está constituida por células que pueden ser o bien morfológicamente homogéneas y de límites bien definidos o bien constituida por grandes células con amplio citoplasma y prominentes núcleos con groseros detalles cromatínicos y actividad mitótica.

Morfométricamente están caracterizados porque presentan una media del área nuclear de aproximadamente $45 \mu^2$ en el grupo de carcinomas in situ de tipo ductal y papilar, pero no fué así en el grupo de carcinoma in situ de tipo lobulillar, que no es estadísticamente separable de la hiperplasia lobulillar con atipias.

La citometría estática demostró que fueron diploides entre el 37'5% y el 76'92% de los casos, por tanto vemos como por ésta técnica no podemos separar a los carcinomas in situ ni de las lesiones proliferativas con atipias ni del grupo de carcinomas infiltrantes.

Por último, la citometría de flujo demostró que entre el 60 y el 80% de los casos fueron diploides, por tanto tampoco esta técnica nos permite separar a los carcinomas in situ de la mastopatía fibroquística con atipias, pero sí de los carcinomas infiltrantes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

- 1.- Del estudio microscópico de 165 lesiones proliferativas de la glándula mamaria con caracter displásico, neoplásico in situ y carcinomas invasores se confirma la dificultad de objetivar las alteraciones histológicas, particularmente las displasias proliferativas de ductos y lobulillos sin o con atipias, frente al carcinoma ductal y lobulillar in situ.
- 2.- Basados en criterios microscópicos distinguimos displasias proliferativas sin atipias (Reclus II), displasias proliferativas con atipias (Reclus III), Carcinomas in situ y Carcinomas invasores (ductales y lobulillares).
- 3.- El estudio morfométrico de cada una de las lesiones presentes en la displasia mamaria, muestra factores discriminantes, estadísticamente válidos, a nivel de área y perímetro nuclear entre hiperplasia ductal sin atipias, hiperplasia ductal con atipias y carcinoma (in situ e invasor).
- 4.- Existe un gradiente creciente, estadísticamente significativo, en la media del área y perímetro nuclear desde las hiperplasias ductales no atípicas hasta los carcinomas ductales infiltrantes.
- 5.- No ocurre lo mismo con la hiperplasia lobulillar sin atipias, atípica, carcinoma lobulillar in situ e invasor: en estos procesos el área y perímetro nuclear de las células no ofrece diferencias significativas.
- 6.- Los dos factores de forma estudiados (forma del área y forma del perímetro), así como el diámetro máximo, tanto en lesiones proliferativas sin atipias, como con atipias o carcinomas (in situ e invasores), carecen de valor discriminativo estadísticamente válido.
- 7.- Existe una buena correlación entre el Índice de ADN obtenido por citometría estática y citometría de flujo, en material incluido en parafina. Esta concordancia es mayor en las lesiones displásicas que entre los carcinomas.
- 8.- Ambas técnicas: citometría estática y citometría de flujo sobre lesiones incluidas en parafina, resultan complementarias entre sí. La citometría estática gana en especificidad al poder medir la lesión seleccionada previamente. La citometría de flujo gana en sensibilidad al detectar mayor número de núcleos y poder establecer la fracción proliferativa (índice proliferativo) de la lesión.

9.- En las lesiones ductales existe un progresivo aumento de alteraciones de la ploidía, desde la displasia ductal atípica al carcinoma intraductal frente a la displasia ductal sin atipias. Sólo existe significación estadística entre displasia ductal sin atipias y carcinomas infiltrantes.

10.- En el grupo de las lesiones lobulillares también hay un progresivo aumento de la aneuploidía (estadísticamente no significativo) desde la hiperplasia lobulillar sin atipias, pasando por la hiperplasia lobulillar con atipias hasta el carcinoma (in situ e invasor). Esta diferencia es exclusivamente apreciable con citometría estática, mientras que la citometría de flujo carece de capacidad discriminante entre éstas lesiones.

11.- Tanto la metaplasia apocrina como la esclerosis radial presentan dominio de células diploides, confirmables por ámbas técnicas.

12.- Las alteraciones de la ploidía presentes en los carcinomas infiltrantes son mayores que las vistas en cualquier otro tipo de lesión proliferativa glandular. Los carcinomas intraductales (in situ) tipo papilar y comedón muestran un porcentaje de aneuploidía semejante al de los carcinomas invasores.

13.- Analizadas globalmente (morfometría y ploidía) las llamadas displasias proliferativas sin atipias (ductales y lobulillares asociadas): Reclus II, poseen un patrón diferencial estadísticamente significativo frente al carcinoma in situ e invasor.

14.- No existen diferencias significativas referidas a la morfometría y ploidía entre las displasias proliferativas con atipias (ductales y lobulillares asociadas): Reclus III y el carcinoma in situ, pero sí frente al carcinoma invasor (particularmente a nivel de lesiones ductales).

15.- Basado en el presente estudio se confirma la existencia de una tendencia progresiva (estadísticamente significativa salvo a nivel lobulillar) entre lesiones displásicas benignas, carcinoma in situ y carcinoma invasor de la glandula mamaria.

BIBLIOGRAFIA

Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Kosma, V.M., Marin, m.S., Alhava, E. and Syrjanen, K.,

Tumor size, nuclear morphometry, mitotic indices as prognostic factors in axillary-lymph-node-positive breast cancer.

Eur. Surg. Res. **24(3)**: p. 160-168. (1992)

Aaltomaa, S., Lipponen, P., Papinaho, S., Kleml, P., Kosma, V.M., Marin, S., Eskelinen, M., Alhava, E. and Syrjanen, K.,

Nuclear morphometry and DNA flow cytometry as poprognostic factors in female breast cancer.

Eur. J. Surg. **158(3)**: p. 135-141. (1992)

Aasmundstad, T.A. and Haugen, O.A.,

DNA ploidy in Intraductal breast carcinomas.

Eur. J. Cancer. **26(9)**: p. 956-959. (1990)

Abandowitz, H.M., Ow, K.T., Hardy, D., Keightley, D.D., Sarfaty, G.A. and Nash, A.R.,

Relationship between flow cytometric parameters, steroid receptors, and menopausal status in breast cancers.

Oncology. **44**: p. 24-29. (1987)

Alvarez, I., Kaminska-Eddy, B., Mouradlan, J., Breuer, B. and Zuna, R.,

Impact of carcinoma in situ on DNA ploidy analysis of invasive ductal carcinoma of the breast., in Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology.

New Orleans, March, 13-19. p. 45. (1993)

Ambros, R.A.,

Reproducibility of nuclear morphometric measurements in benign human epithelial cells. Simulation of variations in routine tissue processing.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **13**: p. 407-410. (1991)

Anderson, J.R.,

Patologia de Muir. Compendio de Anatomia Patológica y Patologia General. ed. ESPAXS, E. : (Barcelona) (1977)

Anderson, W.A.D. and Scottl, T.M.,

Anatomia patológica básica. Ediciones Doyma, S.A. ed. ed. 1ª Edición Esp., 9.E.N. : (1983)

Arnerlov, C., Emdin, S.O., Lundgren, B., Roos, G., Soderstrom, J., Bjersing, L., Norberg, C. and Anggulst, K.A.,

Mammographic growth rate, DNA ploidy, and S-phase fraction analysis in breast carcinoma. A prognostic evaluation in a screened population.

Cancer. **70(7)**: p. 1935-1942. (1992)

Ashikari, R., Huvos, A.G., Snyder, R.E., Lucas, J.C., Hutter, R.V.P., McDivitt, R.W. and Schottenfeld, D.,

A clinicopathologic study of atypical lesions of the breast.

Cancer. **33**: p. 310-317. (1974)

Atkin, N.B.,

Principles and application of the Deeley integration microdensitometer., in Introduction to Quantitative Cytochemistry II., Ed. Wied, G.L.y.B., G.F., Ed. Wied, G.L.y.B., G.F.: Academic Press (New York and London) (1970)

Atkin, N.B.,

Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast.

Brit. Med. J. **1**: p. 271-272. (1972)

Atkin, N.B.,

Accumulation of polyploid cells and G2-phase cells during ascites tumor growth.

Virchows Arch. (B). **16**: p. 311-318. (1979)

Atkin, N.B.,

Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases.

Br. J. Cancer. **40**: p. 210-221. (1979)

Auer, G., Askensten, U. and Ahrens, O.,

Cytophotometry.

Hum. Pathol. **20**: p. 518-527. (1989)

Auer, G., Erikson, E. and Azavedo, E.,

Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans.

Cancer Res. **44**: p. 394-396. (1984)

Auer, G.U., Arrhenius, E., Granberg, P. and Fox, C.H.,

Comparison of DNA distributions in primary human breast cancers and their metastases.

Europ. J. Cancer. **16**: p. 273-278. (1979)

Auer, G.U., askensten, U., Erhardt, K., Fallenius, A. and Zetterberg, A.,
Comparison between slide and flow cytophotometric DNA measurements in breast tumors.
Anal. Quant. Cytol. Histol. **9**(2): p. 138-146. (1987)

Auer, G.U., Casperson, T.O. and Wallgren, A.S.,
DNA content and survival in mammary carcinoma.
Anal. Quant. Cytol. Histol. **2**(3): p. 161-165. (1980)

Azzopardi, J.G.,
Problems in breast Pathology. ed. In Bennington, J.L.(E.).M.P.i.P. Vol. 11.,:
W.B. Saunders Co. (Philadelphia) (1979)

Azzopardi, J.G.,
Benign and malignant proliferative epithelial lesions of the breast; a review.
Eur. J.Cancer Clin. Oncol. **19**: p. 1717-1720. (1985)

Baak, J.P.A.,
The relative prognosis significance of nucleolar morphometry in invasive ductal breast cancer.
Histopathology. **9**: p. 437-444. (1985)

**Baak, J.P.A., Kurver, P.H.J., Snoonlewaat, A.J.E., De Graef, S., Makkink, B.
and Boon, M.E.,**
Prognostic indicators in breast cancer: morphometric methods.
Histopathology. **6**: p. 327-332. (1982)

Baak, J.P.A. and Oort, J.,
A manual of morphometry in diagnostic pathology., , Verlag, S., Verlag, S.: .,p.: 57-59.
(Berlin) (1983)

Baak, J.P.A. and Persljin, J.P.,
In search for the best qualitative microscopical or morphometrical predictor of oestrogen
receptor in breast cancer.
Path. Res. Pract. **178**: p. 307-314. (1984)

Baak, J.P.A., Van Dop, H., Kurver, P.H.J. and Hermans, J.O.,
The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer.
Cancer. **56**: p. 374-382. (1985)

Bahr, G.F.,
Frontiers of quantitative cytochemistry. A review of recent developments and potentials.
Anal. Quant. Cytol. **1**: p. 1-18. (1979)

Baldetorp, B., Ferno, M., Gallenius, A., Fallenius-Vecchi, G., Idvall, I., Olsson, H., Sigurdsson, H., Akerman, M. and Killander, D.,

Image cytometric DNA analysis in human breast cancer analysis may add prognostic information in diploid cases with low S-phase fraction by flow cytometry.

Cytometry. **13(6)**: p. 577-585. (1992)

Battacharjee, D.K., Harris, M. and Faragher, E.B.,

Nuclear morphometry of epitheliosis and intraductal carcinoma of the breast.

Histopathology. **9**: p. 511-516. (1985)

Becker, R.L., Mikel, U.V. and O'Leary,

Morphometric distinction of sclerosing adenosis from tubular carcinoma of the breast.

Path. Res. Pract. **188**: p. 847-851. (1992)

Becker, R.L., Mikel, U.V. and O'Leary, T.J.,

Morphometric distinction of sclerosing adenosis from tubular carcinoma of the breast.

Pathol. Res. Pract. **188(7)**: p. 847-851. (1992)

Begin, L.R.,

Definition of precancerous and high-risk mammary lesions.

The Canadian Journal of Surgery. **28(3)**: p. 248-251. (1985)

Berlinger, N., Malone, B. and Kay, N.,

A comparison of flow cytometric DNA analyses of fresh and fixed squamous cell carcinomas.

Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. **113**: p. 1301-1306. (1987)

Bichel, P., P.H., S. and Anderson, J.,

Estrogen receptor content and ploidy of human mammary carcinoma.

Cancer. **50**: p. 1771-1774. (1982)

Böcking, A., Chatelain, R., Biesterfeld, S., Noll, E., Biesterfeld, D., Wohltmann, D. and Goecke, C.,

DNA grading of malignancy in breast cancer. Prognostic validity, reproducibility and comparison with other classifications".

Anal. Quant. Cytol. Histol. **11(2)**: p. 73-80. (1989)

Böcking, A., Chatelain, R., Homge, M., Daniel, R., Gillissen, A. and Wohltmann, D.,

Representativity and reproducibility of DNA malignancy grading in different carcinomas.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **11(2)**: p. 81-86. (1989)

Bibliografía

Böcking, A., Hardisson, D. and Sampedro, A.,

Citometría de ADN y automatización en el diagnóstico clínico.

Patología. **23**: p. 243-248. (1990)

Böhm, N. and Sandritter, W.,

DNA in human tumors: A cytophotometric study.

Curr. Top. Pathol. **160**: p. 151-219. (1975)

Boon, M.E., Trott, P.A., Van Kaam, H., Kurver, P.J.H., Leach, A. and Baak, J.P.A.,

Morphometry and cytodiagnosis of breast lesions.

Virchows Archiv A. **396**: p. 9-18. (1984)

Bosari, S., Lee, A.K., Tahan, S.R., Figoni, M.A., Wiley, B.D., Heatley, G.J. and Silverman, M.L.,

DNA flow cytometric analysis and prognosis of axillary lymph node-negative breast carcinoma.

Cancer. **70**(7): p. 1943-1950. (1992)

Bosari, S., Lee, A.K.C., Tahan, S.R., Figoni, M.T., Wiley, B.S., Heatley, G.J. and Silverman, M.L.,

DNA flow cytometric analysis and prognosis of axillary lymph node-negative breast carcinoma.

Cancer. **70**(7): p. 1943-1950. (1992)

Brabel-Pietrusky, R. and Hornstein, O.P.,

Flow cytometry measurement of ploidy and proliferative activity of carcinomas of the oropharyngeal mucosa.

Arch. Dermatol. Res. **273**: p. 121-128. (1982)

Carpenter, R., Gibbs, N., Matthews, J. and Cooke, T.,

Importance of cellular DNA content in pre-malignant breast disease and pre-invasive carcinoma of the female breast.

Br. J. Surg. **74**: p. 905-906. (1987)

Carretero, F.,

La citometría de flujo en el control de calidad de la criopreservación.

Biol. Clin. Hematol. **7**: p. 121-134. (1985)

Carter, D. and Smith, R.R.L.,

Carcinoma in situ of the breast.

Cancer. **40**: p. 1189-1193. (1977)

Casperson and T. Anka, G.,

Recent progress in quantitative cytochemistry: Instrumentation and results., in Introduction to quantitative cytochemistry II, Ed. Wied, G.L.y.B., G.F., Ed. Wied, G.L.y.B., G.F.: Academic Press (New York and London) (1970)

Cavallar, V., Malorana, A., Malorana, M.C., Fano, R.A., Scimone, S. and Trentini, G.P.,

A morphometric comparison of subcellular structures between primary breast tumors and their tumors and their nodal metastases.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **13**(2): p. 123-131. (1990)

Clement, P.B. and Azzopardi, J.G.,

Microglandular adenosis of the breast. A lesion simulating tubular carcinoma.

Histopathology. **7**: p. 169-180. (1983)

Collan, Y.,

Morphometry in pathology: Another look at diagnostic histopathology.

Path. Res. Pract. **179**: p. 189-192. (1984)

Connolly, J., Schnlitt, S., London, S., Dupont, W., Colditz, G. and Page, D.,

Both atypical lobular hyperplasia (ALH) and atypical ductal hyperplasia (ADH) predict for bilateral breast cancer risk.

Lab. Invest. **66**(1): p. 13A. (1992)

Cornelisse, C.J., De Koning, H.R., Arentz, P.W., Raatgever, J.W. and Heerde, P.,

Quantitative analysis of nuclear area variation in benign and malignant breast cytology specimens.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **3**: p. 128-133. (1981)

Cornelisse, C.J., De Koning, H.R., Moolenaar, A.J., Van de Velde, C.J. and Ploem, J.S.,

Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer. Relation to estrogen receptor content and lymph node involvement.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **6**(1): p. 9-18. (1984)

Cornelisse, C.J., Van de Velde, C.J.H., Caspers, R.J.C., Moolenaar, A.J. and Hermans, J.,

DNA ploidy and survival in breast cancer patients.

Cytometry. **8**: p. 225-234. (1987)

Cornelisse, C.J. and Van Driel-Kulker, A.M.,

DNA imagen cytometry on machine-selected breast cancer cells and a comparison between flow cytometry and scanning cytophotometry.

Cytometry. **6**: p. 471-477. (1985)

Coulson, P.B., Thornthwaite, J.T., Woolley, T.W., Sugarbaker, E.V. and Seckinger, D.,

Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival.

Cancer Research. **44**: p. 4187-4196. (1984)

Chalkley, H.W.,

Methods for the quantitative morphologic analysis of tissues.

J. Nat. Cancer Inst. **4**: p. 47-53. (1943)

Chassevent, A., Dauer, A., Bertrand, G., Colc, H., Geslin, J., Bidabe, M.C., George, P. and Larra, F.,

Comparative flow DNA analysis of different cell suspensions in breast carcinoma.

Cytometry. **5**: p. 263-267. (1984)

Chassevent, A., Daver, A., Bertrand, G., Larra, F. and George, P.,

Analyse d'ADN par cytométrie de flux dans les cancers du sein.

Bull Cancer. **71(5)**: p. 494-495. (1984)

Chleco, P. and Boor, P.J.,

Quantitative histochemistry in Pathology and toxicology. An evaluation of the original two-wave length method of Ornstein.

Lab. Invest. **50**: p. 355-362. (1984)

Christov, K., Milev, A. and Todorov, V.,

DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors.

Cancer. **64**: p. 673-679. (1989)

Dawson, R.E., Norton, J.A. and Weinberg, D.S.,

Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by imagen analysis and flow cytometry.

Am. J. Pathol. **136**: p. 1115-1124. (1990)

De Potter, C.R., Praet, M.M., Slavin, R.E., Verbeeck, P. and Roels, H.J.,
Feulgen DNA content and mitotic activity in proliferative breast disease. A comparison with ductal carcinoma in situ.

Histopathology. **11:** p. 1307-1319. (1987)

Deltch, A.D.,

Cytophotometry of proteins., in Introduction to quantitative cytochemistry., Ed. Wied, G.L., Ed. Wied, G.L.: Academic Press (New York and London) (1966)

Delgado, R., Mikuz, G. and Hofstädter, F.,

DNA-Feulgen-Cytophotometric analysis of single cells isolated from paraffin embedded tissue.

Path. Res. Pract. **179:** p. 92-92. (1984)

Dodd, L.G. and El Naggar, A.K.,

Intratumoral heterogeneity of DNA and proliferative activity in primary mammary carcinoma., in Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology. New Orleans, March 13-19. p. 65. ,(1993).

Dowle, C.S., Owainati, A., Robins, A., Burns, K., Ellis, I.O., Elston, C.W. and Blamey, R.W.,

Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer.

Br. J. Surg. **74:** p. 133-136. (1987)

Dressler, L.G.,

Area DNA flow cytometry measurements providing useful information in the management of the node-negative breast cancer patient?.

Cancer Invest. **10(5):** p. 477-486. (1992)

Dressler, L.G. and Bartow, S.E.,

DNA flow cytometry in solid tumors: practical aspects and clinical applications.

Seminars in Diagnostic Pathology. **6:** p. 55-82. (1989)

Dressler, L.G., Eudey, L., Gray, R., Tormey, D.C., McGuire, W.L., Gilchrist, K.W., Clark, m.G.M., Osborne, C.K., Mansour, E.G. and Abeloff, M.D.,

Prognostic potential of DNA flow cytometry measurements in node-negative breast cancer patients: prealiminary analysis of an intergroup study.

Monogr. Natl. Cancer Inst. **11:** p. 167-172. (1992)

Bibliografia

Dressler, L.G., Seamer, L., Owens, M.A., Clark, G.M. and McGuire, W.L.,
Evaluation of a modeling system for S-Phase estimation in breast cancer by flow cytometry.
Cancer Research. **47:** p. 5294-5302. (1987)

Dressler, L.G., Seamer, L.C., Owens, M.A., Clark, G.M. and McGuire, W.L.,
DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens.
Cancer. **61:** p. 420-427. (1988)

Duljndam, W.A.L., Smeulders, A.W.M., Van Duljn, P. and Verwels, A.C.,
Optical errors in scanning stage absorbance cytophotometry. I. Procedures for correcting
apparent integrated absorbance values for distributional glare, and diffraction errors.
J. Histochem. Cytochem. **5:** p. 388-394. (1980a)

Dupont, W.D. and Page, D.L.,
Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease.
N. Engl. J. Med. **17:** p. 146-151. (1985)

Dzlura, B.R. and Bonfiglio, T.A.,
Needle cytology of the breast. A quantitative and qualitative study of the cells of benign and
malignant ductal neoplasia.
Acta Cytologica. **23:** p. 332-340. (1979)

Ellasen, C.A., Cranor, M.L. and Rosen, P.P.,
Atypical duct hyperplasia in the adolescent breast.
Lab. Invest. **64(1):** p. 11A. (1991)

Emdin, S.O.,
Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma.
Cancer. **60:** p. 1282-1287. (1987)

**Erhardt, K., Auer, G., Fallenius, A., Folln, A., Forsslund, G., Silfuersward, C.
and Zetterberg, A.,**
Prognostic significance of nuclear DNA analysis in histological sections in mammary carcinoma.
Am. J. Clin. Oncol. **9(2):** p. 117-125. (1986)

Erhardt, K., Auer, G., Folln, A., Silfuerswård, C. and Skoog, L.,
Comparison between histologic type, estrogen receptor and nuclear DNA content in mammary
carcinoma.
Am. J. Clin. Oncol. (CCT). **9:** p. 83-89. (1986)

Erhardt, K. and Auer, G.U.,

Mammary carcinoma: comparison of nuclear DNA content from in situ and infiltrative components.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **9**: p. 263-267. (1987)

Eriksson, E., Schlimmpenning, H., Sllfversward, C. and Auer, G.,

Immunoreactivity with monoclonal antibody A-80 and nuclear DNA content in benign and malignant human breast disease.

Hum. Pathol. **23**(12): p. 1366-1372. (1992)

**Eskellinen, M., Llupponen, P., Paplnaho, S., Aaltomaa, S., Kosma, V.M.,
Kleml, P. and Syrjanen, K.,**

DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer.

Int. J. Cancer. **51**(4): p. 555-561. (1992)

Fallenius, A.G., Askensten, U.G., Skoog, L.K. and Auer, G.U.,

The reliability of microspectrophotometric and flow cytometric nuclear DNA measurements in adenocarcinomas of the breast.

Cytometry. **8**: p. 260-266. (1987)

Fallenius, A.G., Franzen, S.A. and Auer, G.U.,

Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. A retrospective study of 227 consecutive cases.

Cancer. **65**: p. 521-530. (1988)

Fallenius, A.G., Skoog, L.K., Suane, G.E. and Auer, G.U.,

Cytophotometrical and biochemical characterization of nonpalpable, mammographically detected mammary adenocarcinomas.

Cytometry. **5**: p. 426-429. (1984)

Fand, S.B.,

Environmental conditions for optimal Feulgen hydrolisis., in Introduction to quantitative cytochemistry, II., Ed. Wied, G.L., Ed. Wied, G.L.: Academic Press (New York and London.) (1970)

Fand, S.B.,

Environmental conditions for optimal Feulgen hydrolysis., in Introduction to quantitative cytochemistry, II., Ed. Wied, G.L. and Introduction to quantitative cytochemistry, I., Ed. Wied, G.L. and Introduction to quantitative cytochemistry, I.: 209-221 (New York and London Academic Press) (1970)

Fechner, R.E.,

Lobular carcinoma in situ in sclerosing adenosis. A potential source of confusion with invasive carcinoma.

Am. J. Surg. Pathol. **5**: p. 233-239. (1981)

Felchter, G.E., Mueller, A., Kaufmann, M., Haag, D., Born, I.A., Abel, U., Klenga, K., Kubll, F. and Goertler, K.,

Correlation of DNA flow cytometric results and other prognostic factors in primary breast cancer. Int. J. Cancer. **41**: p. 823-828. (1988)

Ferno, M.e.a.,

Flow cytometric DNA index and S-phase fraction in breast cancer in relation to other prognostic variables and to clinical outcome.

Acta Oncol. **31**(2): p. 157-165. (1992)

Foote, F.W. and Stewart, F.W.,

Comparative studies of cancerous Vs. noncancerous breasts.

Ann. Surg. **121**: p. 6-79. (1945)

Fossa, S.D., Marton, P.F., Knudsen, O.S., Kaalhus, O., Bormer, O. and Vaage, S.,

Nuclear feulgen DNA content and nuclear size in human breast carcinoma.

Human. Pathol. **13**: p. 626-630. (1982)

Fossa, S.D., Thorud, E. and Shoalb, M.C.,

DNA flow cytometry in primary breast carcinoma.

Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A. Pathol. **92**(6): p. 475-480. (1984)

Fossa, S.D., Thorud, E., Vaage, S. and Shoalb, S.C.,

DNA cytometry of primary breast cancer.

Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A Pathol. **91**(4): p. 235-243. (1983)

Frantz, V.K., Pickren, J.W., Melcher, G.W. and Avchincloss, H.J.,
Incidence of chronic cystic disease in so-called "normal breast".
Cancer. **4**: p. 762-783. (1951)

Friedlander, M.L., Hedley, D.W. and Taylor, I.W.,
Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours.
J. Clin. Pathol. **37**: p. 961-974. (1984)

Frierson, H.F.,
Ploidy analysis and S-Phase fraction determination by Flow Cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast.
Am. J.Surg. Pathol. **15**(4): p. 358-367. (1991)

Frierson, H.J.,
Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas.
Hum. Pathol. **24**(1): p. 24-29. (1993)

Fuhr, J.E., Frye, A., Kattline, A.A. and Van Meter, S.,
Flow cytometric determination of breast tumor heterogeneity.
Cancer. **67**: p. 1401-1405. (1991)

Garcia, A.M.,
Studies on DNA in leucocytes and related cells of mammals. II. On the Feulgen reaction and two-wavelength microspectrophotometry.
Histochemie. **3**: p. 178-194. (1962)

Garcia, A.M.,
The one-wavelength, two-area method in ultraviolet cytophotometry. A study of the DNA content of lymphocytes of different sizes.
Acata Cytol. **17**: p. 224-232. (1973)

Garcia, A.M. and Iorco, R.,
Potential sources of error in two - wavelength cytophotometry., in Introduction to quantitative cytochemistry., Ed. Wied, G.L., Ed. Wied, G.L.: Academic Press (New York and London) (1966)

Garcia, A.M. and Iorco, R.,
Potential sources of error in two - wavelength cytophotometry., in New York and London, Ed. Wied, G.L., Ed. Wied, G.L.: (1966)

García-Villanova, A., Fuster Diana, E., Checa Ayet, F., García-Villanova Comas, A., Esteban Rebol, A. and Lombart-Bosch, A.,

Histopronóstico en el carcinoma de mama.

Rev. Senol. y Pat. Mam. **3**(1): p. 3-12. (1990)

Ghall, V.S.,

A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh-frozen breast carcinomas by imagen analysis versus flow cytometry.

Cancer. **70**(11): p. 2668-2672. (1992)

Gnant, M.F., Blijham, G., Reiner, A., Reiner, G., Reynders, M., Schutte, B., Van-Asche, C., Steger, G. and Jakesz, R.,

DNA ploidy and other results of DNA flow cytometry as prognostic factors in operable breast cancer: 10 year results of a randomised study.

Eur. J. Cancer. **28**(2-3): p. 711-716. (1992)

Goldstein, D.J.,

Errors in microdensitometry.

Histochem. J. **13**: p. 251-267. (1981)

Gompel, C., Faverly, D. and Silverberg, S.G.,

Principles and practice of surgical pathology. Second edition. Capitulo 11 ed. ed. Silverberg, S.G. 311-374 :

(Churchill Livingstone) (1990)

Gschwind, R., Umbricht, C.B., Torhorst, J. and Oberholzer, M.,

Evaluation of shape descriptors for the morphometric analysis of cell nuclei.

Path. Res. Pract. **181**: p. 213-222. (1986)

Guazzi, A., Bozzetti, C., Riva, M.I., Zaffe, D. and Cocconi, G.,

Relationship between estrogen receptor concentration and cytomorphometry in breast cancer.

Cancer. **56**: p. 1972-1976. (1985)

Gullén, C.,

Estudio mediante citometría de flujo del DAN en el melanoma maligno: Correlación con los factores pronósticos. 1988, Valencia:

Guski, H., Hufnagl, P., Freitag, H., Wenzelides, K., Voss, K. and Simon, H.

Automated histometry in fibrocystic breast disease.

Ana. Quant. Cytol. Histol. **10**: p. 101. (1988)

Haagensen, C.D.,

Diseases of the breast. ed. Edit., W.B.S. :

(Philadelphie, 1971) (1971)

Haagensen, C.D.,

Enfermedades de la mama. ed. Editorial Medica Panamericana, S.A. :

(Buenos Aires) (1987)

Haagensen, C.D., Lane, N., Lattes, R. and Bodlan, C.,

Lobular neoplasia (so-called lobular carcinoma in situ) of the breast.

Cancer. **42**: p. 737-769. (1978)

Haffty, B.G., Toth, M., Flynn, S., Fluscher, D. and Carter, D.,

Prognostic value of DNA flow cytometry in the locally recurrent.

J. Clin. Oncol. **10**(12): p. 1839-1847. (1992)

Hale, A.J.,

Feulgen microspectrophotometry and its correlation with other cytochemical methods., in

Introduction to quantitative cytochemistry., Ed. Wied, G.L., Ed. Wied, G.L.: Academic Press

(New York and London) (1966)

Hall, T.L. and Fu, Y.S.,

Biology of disease applications of quantitative microscopy in tumor pathology.

Lab. Invest. **53**(1): p. 5-21. (1985)

Hatschek, T., Fagerberg, G., Stål, O., Sullivan, S., Carstensen, J., Grøntoft,

O. and Nordenskjöld, B.O.,

Cytometric characterization and clinical course of breast cancer diagnosed in a population-based screening program.

Cancer. **64**: p. 1074-1081. (1989)

Hedley, D.H., Friedlander, M.L., Taylor, Y.W., Rugg, C.A. and Musgrove, E.A.,

DNA flow cytometry of paraffin-embedded tissue.

Cytometry. **5**: p. 660. (1984)

Hedley, D.W., Friedlander, M.L., Taylor, I.W., Rugg, C.A. and Musgrove, E.A.,
Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using
flow cytometry.

Cytochemistry. **31**(11): p. 1333-1335. (1983)

Hedley, D.W., Rugg, C.A. and Gelber, R.D.,

Association of DNA Index and S-Phase fraction with prognosis of nodes positive early breast
cancer.

Cancer Research. **47**: p. 4729-4735. (1987)

Hedley, D.W., Rugg, C.A., Ng, A.B.P. and Taylor, W.,

Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients.

Cancer Research. **44**: p. 5395-5398. (1984)

Helden, T., Wang, N. and Tribukait, B.,

An improved Hedley method for preparation of paraffin-embedded tissue for flow-cytometric
analysis of ploidy and S-Phase.

Cytometry. **12**: p. 614-621. (1991)

**Hutchinson, W.B., Thomas, D.B., Hamlin, W.B., Roth, G.J., Peterson, A.V. and
Williams, B.,**

Risk of breast cancer in women with benign breast disease.

J. Natl. Cancer. Inst. **65**: p. 13-20. (1980)

Hutter, R.V.P., Albores-Saavedra, J. and Anderson, E.,

Consensus Meeting: Is "Fibrocystic disease" of the breast precancerous?.

Arch. Pathol. Lab. Med. **110**: p. 171-173. (1986)

Izuo, M., Okagaki, T., Richart, R.M. and Lattes, R.,

DNA content in "Apocrine metaplasia" of fibrocystic disease of the breast.

Cancer. **27**: p. 643-650. (1971)

Izuo, M., Okagaki, T., Richart, R.M. and Lattes, R.,

Nuclear DNA content in hyperplastic lesions of cystic disease of the breast with special
reference to malignant alteration.

Cancer. **28**: p. 620-627. (1971)

Jacobsen, A., Poulsen, S., Madsen, E.L., Petersen, S.E. and Hansen, H.S.,
Ploidy level of human breast carcinoma. Relation to histopathologic features and hormone receptor content.

Acta Radiologica Oncology. **23:** p. 103-107. (1984)

James, B.A., Cranor, M.L. and Rosen, P.P.,
Carcinoma of the breast arising in microglandular adenosis.

United States and Canadian Academy of Pathology. Annual Meeting. New Orleans, March 13-19. : p. 16A. (1993)

James, J.,

Extinction effects in Feulgen-DNA scanning photometry of human lymphocytes.

Acta Cytol. **17:** p. 15-18. (1973)

Jarash, E., Nagle, R.B., Kaufmann, M., Maurer, C. and Bocker, W.J.,

Differential diagnosis of benign epithelial proliferations and carcinomas of the breast using antibodies to cytokeratin.

Hum. Pathol. **19:** p. 276-289. (1988)

Kallenberger, A., Hagmann, A. and Meler-Ruge, W.,

Beziehungen zwischen sexchromatinvorkommen, kerngrosse und DNS-Werten in mammatumoren und ihre bedeutung fur die uberlebenszeit.

Schweiz Med. Wochenschr. **97:** p. 678-681. (1967)

Kallioniemi, O.P., Blanco, G., Alavaikko, M., Hietanen, T., Mattila, J., Lauslahti, K., Lehtinen, M. and Kolvula, T.,

Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA Index and S-Phase fraction. A proposed clasification of DNA histograms in breast cancer.

Cancer. **62:** p. 2183-2190. (1988)

Kallioniemi, O.P., Hietanen, T., Mattila, J., Lehtinen, M., Lauslahti, K. and Kolvula, T.,

Aneuploid DNA content and high S-phase fraction on tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer.

Eur. J.Cancer Clin. Oncol. **23:** p. 277-282. (1987)

Kern, W.H. and Brooks, R.N.,

Atypical epithelial hyperplasia associated with breast cancer and fibrocystic disease.

Cancer. **24:** p. 668-675. (1969)

Keyhani-Rofagha, S., O'Toole, R.V., Farrar, W.B., Sckle-Santanello, B., Decenzo, J. and Young, D.,

Is DNA ploidy an independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma?

Cancer. **65**: p. 1577-1582. (1990)

Killeen, J.L. and Namiki, H.,

DNA analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. A comparison with histologic features.

Cancer. **68**: p. 2602-2607. (1991)

King, E.B., Chew, J.D., Hom, J.D., Duarte, L.A., Mayall, B., Miller, T.R., Neuhaus, J.M., Wrench, M.R. and Petrakis, N.L.,

Characterization by imagen cytometry of duct epithelial proliferative disease of the breast.

Modern Pathology. **4**(3): p. 291-296. (1991)

Kintanar, E.B. and Raju, U.,

Further delineation of patterns of atypical ductal hyperplasia (ADH): an analysis of ADN patterns associated with intraductal and invasive carcinoma.

Lab. Invest. **64**(1): p. 12A. (1991)

Klintonberg, C., Wallgren, A., Bjelkenkrantz, J., Carstensen, J., Humla, S., Nordenskjold, B. and Skoog, L.,

DNA distribution, cytosol estrogen receptors and axillary nodes as prognostic predictors in breast carcinoma.

Acta Radiologica Oncology. **24**: p. 253-258. (1985)

Kokal, W.,

Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma.

Jama. **255**: p. 3123-3127. (1986)

Krug, H. and Schönfelder, M.,

Impulscytometrie und Katamnese beim Mammakarzinom.

Acta Histochem (suppl). **30**: p. 117-127. (1984)

Kunicka, J.E.,

DNA in situ sensitivity to denaturation: A new parameter for flow cytometry of normal human colonic epithelium and colon carcinoma.

Cancer Res. **47**: p. 3942-3947. (1987)

Kute, T.E., Muss, H.B. and Cooper, M.R.,

The use of flow cytometry for the prognosis of stage II adjuvant treated breast cancer patients.

Cancer. **6**(8): p. 1810-1816. (1990)

Lee, A.K., Wiley, B., Dugan, J.M., Hamilton, W.H., Loda, M., Heatley, G.J. and Cook, L.,

Quantitative DNA analysis and proliferation in breast carcinomas. A comparison between imagen analysis and flow cytometry.

Pathol. Res. Pract. **188**(4-5): p. 428-432. (1992)

Lelle, R.J., Heldenreich, W., Sauch, G. and Gerdes, J.,

The correlation of growth fractions with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma.

Cancer. **59**: p. 83-88. (1987)

Lewis, W.E.,

Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in node-negative breast cancer patients.

Cancer. **65**: p. 2315-2320. (1990)

LI, J.Y.,

Prognostic significance of cellular DNA ploidy level of the breast cancer.

Chung-Hua-Wai-Ko-Tsa-Chih. **30**(1): p. 35-37. (1992)

Lindholm, J., Van-Diest, P.J., Haffner, D., Mikuz, G. and Weger, A.R.,

A morphometric filter improves the diagnostic value of morphometric analyses of frozen histopathological sections from mammary tumours.

Anal. Cell Pathol. **4**(6): p. 443-449. (1992)

Longin, A., Fontaniere, B., Pinzani, V., Catimel, G., Souchler, C., Clavel, M. and Chauvin, F.,

An imagen cytometric DNA analysis in breast neoplasms. Parameters of DNA aneuyploidy and their relationship with conventional prognostic factors.

Pathol. Res. Pract. **188**(4-5): p. 466-472. (1992)

Lovet, E.J., Schnitzer, B. and Keren, D.F.,

Application of flow cytometry to diagnostic pathology.

Lab. Invest. **50**: p. 115-140. (1984)

Ludwig, A.S., Okagaki, T., Richart, R.M. and Lattes, R.,

Nuclear DNA content of lobular carcinoma in situ of the breast.

Cancer. **31**: p. 1553-1560. (1973)

Llombart-Bosch, A. and Rulz Saurí, A.,

La mastopatía fibroquística (displasia mamaria): histopatología, diagnóstico diferencial y significado biológico como posible proceso precanceroso.

Rev. Senol. Patol. Mam. **2(3)**: p. 108-117. (1989)

Maehle, B.O., Thorensen, S., Skjaerven, R. and Hartvelt, R.,

Mean nuclear area and histological grade of axillary node tumour in breast cancer, related to prognosis.

Br. J. Cancer. **46**: p. 95-100. (1982)

Marcote Valdivieso, E., Campos Ferrer, A., Carrato Mena, A., Arlandis Felix, F., Garcia Vierna, J. and Baltasar Torrejón, A.,

Significación pronóstica de la ploidía del ADN y de la fase S en el cáncer de mama.

Cir. Esp. **53(2)**: p. 88-96. (1993)

Marchevsky, A.M. and Gil, J.,

Methods in laboratory investigation. Applications of computerized interactive morphometry in pathology. II. A model for computer generated diagnosis.

Lab. Invest. **54(6)**: p. 708-716. (1986)

Marluzzi, G.M. and Tosi, P.,

Editorial: Quantitative microscopy today.

Appl. Pathol. **4**: p. 5-8. (1986)

Masters, J.R.W., Camplejohn, R.S., Mills, R. and Rubens, R.D.,

Histological grade, elastosis, DNA ploidy and the response to chemotherapy of breast cancer.

Br. J. Cancer. **55**: p. 455-457. (1987)

Mayall, B.H. and Mendelsohn, M.L.,

Errors in absorption cytophotometry: Some theoretical and practical considerations., in Introduction to quantitative cytochemistry II., Ed. Wied, G.L.y.B., G.F., Ed. Wied, G.L.y.B., G.F.: Academic Press (New York and London) (1970)

Mayr, N.A., Staples, J.J., Robinson, R.A., Vanmetre, J.C. and Hussey, D.H.,

Morphometric studies in intraductal breast carcinoma using computerized image analysis.

Cancer. **67**: p. 2805-2812. (1991)

Mazoujian, G., Pinkus, G.S., Davis, S. and Haagensen, D.E.J.,

Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) of the breast. A marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features.

Am. J. Pathol. **110**: p. 105-112. (1983)

McDivitt, R.W.,

Breast carcinoma.

Hum. Pathol. **9**: p. 3-21. (1978)

McDivitt, R.W., Stevens, J.A., Lee, N.C., Wingo, P.A., Rubin, G.L., Gersell, D. and group., T.c.a.s.h.s.,

Histologic types of benign breast disease and the risk for breast cancer.

Cancer. **69**: p. 1408-1414. (1992)

McDivitt, R.W., Stewart, F.W. and Berg, J.W.,

Tumours of the breast.

Atlas of tumour Pathology. Armed Forces Institute of Pathology ed. ed. series, S. Vol. Fascicle 2.,:

(Washington D.C.) (1968)

McDivitt, R.W., Stone, K.R., Craig, R.B., Palmer, J.P., Meyer, J.S. and Bauer, W.C.,

A proposed classification of breast cancer based on kinetic information.

Cancer. **57**: p. 269-276. (1986)

McGuire, W.L. and Dressler, L.G.,

Emerging impact of flow cytometry in predicting recurrence and survival in breast cancer patients.

JNCI. **75**(3): p. 405-410. (1985)

Mendelsohn, M.L.,

Absorption cytophotometry: Comparative methodology for heterogeneous objects and the two-wavelength method., in Introduction to quantitative cytochemistry., Ed. Wied, G.L.y.B., G.F., Ed. Wied, G.L.y.B., G.F.: Academic Press (New York and London) (1966)

Minkowitz, S., Hedayati, H., Hiller, S. and Gardner, B.,

Fibrous mastopathy. A clinical histopathologic study.

Cancer. **32**: p. 913-916. (1973)

Moldavan, A.,

Photoelectric technique for the counting of microscopical cells.

Science. **80**: p. 188-189. (1934)

Moran, R.E., Black, M.M., Alpert, L. and Straus, M.J.,

Correlation of cell-cycle kinetics, hormone receptors, histopathology and nodal status in human breast cancer.

Cancer. **54**: p. 1586-1590. (1984)

Mossler, J.A., McCarty, K.S. and Woodward, B.H.,

Correlation of mean nuclear area with estrogen receptor content in aspiration cytology of breast carcinoma.

Acta Cytol. **26**(4): p. 417-421. (1982)

Nesland, J.M., Pettersen, E.O., Fossa, S.D., Hole, J. and Johannessen, J.V.,

Nuclear DNA content in breast carcinomas with neuroendocrine differentiation.

Journal of Pathology. **150**: p. 181-185. (1986)

Nielsen, B.B.,

Adenosis tumour of the breast. A clinicopathological investigation of 27 cases.

Histopathology. **11**: p. 1259-1275. (1987)

Nielsen, B.B.,

Adenosis tumour of the breast. A clinicopathological investigation of 27 cases.

Histopathology. **11**: p. 1259-1275. (1987)

Nielsen, M., Thomsen, J.L., Primda, S., Dyreborg, U. and Andersen, J.A.,

Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: A study of 110 medicolegal autopsies.

Br. J. Cancer. **56**: p. 814-819. (1987)

Norris, H.J., Bahr, G.F. and Mikel, U.V.,

A comparative morphometric study of intraductal hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast.

An. Quant. Cytol. Histol. **10**: p. 1-9. (1988)

Nusse, M., Belsker, W., Hoffmann, C. and Tarnok, Ç.,

Flow cytometric analysis of G1 and G2/M phase subpopulations in mammalian cell nuclei using side scatter and DNA content measurements.

Cytometry. **11**: p. 813-821. (1990)

Ohuchi, N., Page, D.L., Merino, M.J., Yigllone, M.J., Kufe, D.W. and Schlom, J.

Expression of tumor-associated antigen (DF3) in atypical hyperplasias and in situ carcinomas of the human breast.

J.N.C.I. **91**: p. 109-117. (1987)

Olinici, C.D., Caluser, I., Galatir, N. and Vaslu, R.,

Morphometrical investigations in benign lesions and diploid breast cancers.

Morphol.Embryol. **33**: p. 279-283. (1987)

Olszewski, W., Darzynkiewicz, Z., Rosen, P.P. and Melamed, M.R.,

Flow cytometry of breast carcinoma: I. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor.

Cancer. **48**: p. 980-984. (1981)

Opfermann, M., Brugal, G. and Vassilakos, P.,

Cytometry of breast carcinoma: Significance of ploidy balance and proliferation index.

Cytometry. **8**: p. 217-224. (1987)

Ornstein, L.,

The distributional error in microspectrophotometry.

Lab. Invest. **1**: p. 250-262. (1952)

Owainati, A.A.R., Robins, R.A. and C., H.,

Tumor aneuploidy, prognostic parameters and survival in primary breast cancer.

Br. J. Cancer. **55**: p. 449-454. (1987)

Page, D.L.,

Cancer risk assesement in benign breast biopsies.

Human Pathology. **17**(9): p. 871-874. (1986)

Page, D.L., Anderson, T.J. and Rogers, L.W.,

Epithelial hyperplasia.

In Diagnostic histopathology of the breast. ed. Edited by Page, D.L.a.A., T.J. 120-156

(Churchill Livingstone) (1987)

Bibliografia

Page, D.L., Dupont, W.D., Rogers, L.W. and Landenberger, M.,
Intraductal carcinoma of the breast. Follow-up after biopsy only.
Cancer. **49:** p. 751-758. (1982)

Page, D.L., Dupont, W.D., Rogers, L.W. and Rados, M.S.,
Atypical hyperplastic lesions of the female breast: A long-term follow-up study.
Cancer. **55:** p. 2698-2708. (1985)

Page, D.L., Nelson, E.H., O'Malley, F.P. and Dupont, W.D.,
Apocrine hyperplasia in the human breast: Associations with malignancy.
Lab. Invest. **66(1):** p. 16A. (1992)

**Page, D.L., Van der Zwaag, R., Rogers, L.W., Willaams, L.T., Walker, W.E.
and Hartmann, W.H.,**
Relation between component parts of fibrocystic disease complex and breast cancer.
J. Natl. Cancer Inst. **61:** p. 1055-1060. (1978)

Page, D.L., W.D., D. and Rogers, L.W.,
Ductal involvement by cells of atypical lobular hyperplasia in the breast: a long-term follow-up
study of cancer risk.
Hum. Pathol. **19:** p. 201-207. (1988)

Palmer, J.O., McDivitt, R.W., Stone, K.R. and Diaz, N.M.,
Flow cytometric S-phase fraction is independent predictor of survival in breast carcinoma.
Lab. Invest. **66-1:** p. 87. (1992)

Palmer, J.O., McDivitt, R.W., Stone, K.R., Rudloff, M.A. and Gonzalez, J.G.,
Flow cytometric analysis of breast needle aspirates.
Cancer. **62(11):** p. 2387-2391. (1988)

Papotti, M., Eusebi, V., Gugliotta, P. and Bussolati, G.,
Immunohistochemical analysis of benign and malignant papillary lesions of the breast.
Am. J. Surg. Pathol. **7:** p. 451-461. (1983)

Patau, K.,
Absorption microphotometry of irregular-shaped objects.
Chromosoma. **5:** p. 341-362. (1952)

Patek, E., Johanisson, E., Kramer, E. and Rlotton, G.,
Microfluorometric grading of mammary tumors: A pilot study.
Anal. Quant. Cytol. **2:** p. 264-271. (1980)

Pesce, C. and Colacino, R.,

Morphometry of the breast fibroadenoma.

Path. Res. Pract. **181**: p. 718-720. (1986)

Pesce, C.M.,

Biology of disease. Defining and interpreting diseases through morphometry.

Lab. Invest. **56(6)**: p. 568-575. (1987)

Pienta, K.J. and Coffey, D.S.,

Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer.

Cancer. **68**: p. 2012-2016. (1991)

Pienta, K.J., Partin, A.W. and Coffey, D.S.,

Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure.

Cancer Research. **49**: p. 2525-2532. (1989)

Powell, S., Masood, S., Johnson, H., Belluco, C., Azama, A., Dee, S., Kahn, L. and Wise, L.,

Prognostic indicators in node negative breast cancer.

Lab. Invest. **66-1**: p. 89. (1992)

Raju, U., Crissman, J.D., Zarbo, R.J. and Gottlieb, C.,

Epitheliosis of the breast: An immunohistochemical characterization and comparison to malignant proliferations of the breast.

Am. J Surg. Pathol. **14**: p. 939-947. (1990)

Raju, U., Zarbo, R.J., Schultz, D.S. and Kubus, J.,

The spectrum of apocrine proliferations of the breast: a comparative study of histology and content by image.

Lab. Invest. **64-1**. (1991)

Raju, U.B.L., M.W., Zarbo, R.J. and Crissman, J.D.,

Papillary neoplasia of the breast: Immunohistochemically defined myoepithelial cells in the differential diagnosis of benign and malignant papillary breast neoplasms.

Mod. Pathol. **2**: p. 569-576. (1989)

Redkar, A.A., Balsara, B.R., Bhisey, A.N., Sampat, M.B. and Mitra, I.,

DNA analysis of breast cancer by flow cytometry and correlation with other prognostic parameters.

Indian J. Med. Res. **96**: p. 223-229. (1992)

Rickert, R.R., Kallsher, L. and Huter, R.U.P.,

Indurative mastopathy: A benign sclerosing lesion of breast with elastosis which may simulate carcinoma.

Cancer. **47**: p. 561-571. (1981)

Rickert, R.R., Kallsher, L. and Hutter, R.V.P.,

Indurative mastopathy: A benign sclerosing lesion of breast with elastosis which may simulate carcinoma.

Cancer. **47**: p. 561-571. (1981)

Rijken, A., Dekker, A., Taylor, S., Hoffman, P., Blank, M. and Krause, J.R.,

Diagnostic value of DNA analysis in effusions by flow cytometry and imagen analysis. A prospective study on 102 patients as compared with cytologic examination.

Am. J. Clin. Pathol. **95**: p. 6-12. (1991)

Romppanen, T.,

Morphometry in morphological diagnosis. ed. Y Collan, T.R.(. 47-63 :
(Kuopio Univ ersity Press, Kuopio) (1982)

Rondez, R., Yoshizaki, C. and Pirozynski, W.,

Determination of nuclear DNA content and hormone receptors in breast cancer by the CAS 100 cell analysis system as related to morphologic grade and biochemical results.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **13**(4): p. 233-245. (1991)

Rosal, J.,

Ackerman's Surgical Pathology. Sixth Edition ed. ed. Company, T.C.M. :
(St. Louis) (1981)

Rosal, J.,

Ackerman's Surgical Pathology. Seventh Edition. ed. Company, T.C.V.M. :
(St. Louis. Toronto. Washington) (1989)

Rosal, J.,

Borderline epithelial lesions of the breast.

Am. J. Surg. Pathol. **15**(3): p. 209-221. (1991)

Rosen, P., Lieberman, P.H., Braun, D.W., Kosloff, C. and Adair, F.,

Lobular carcinoma in situ of the breast: detailed analysis of 99 patients with average follow-up of 24 years.

Am. J. Surg. Pathol. **2**: p. 225-251. (1978)

Rosen, P.P.,

Microglandular adenosis. A benign lesion simulating invasive mammary carcinoma.
Am. J. Surg. Pathol. **7**: p. 137-144. (1983)

Rosen, P.P., Braun, D.W. and Kinne, D.E.,

The clinical significance of pre-invasive breast carcinoma.
Cancer. **46**: p. 919-925. (1980)

Rosen, P.P., Senle, R., Schottenfeld, D. and Ashikari, R.,

Non invasive breast carcinoma. Frequency of unsuspected invasion and implications for treatment.
Ann. Surg. **189**: p. 377-382. (1979)

Rosenblum, M.K., Purrazzella, R. and Rosen, P.P.,

Is microglandular adenosis a precancerous disease?. A study of carcinoma arising therein.
Am. J. Surg. Pathol. **10**: p. 237-245. (1986)

Sandwritter, W.,

Methods and results in quantitative cytochemistry., in Introduction to quantitative cytochemistry.,p.: 181.
Ed. Wied. G.L. (New York and London) (1966)

Scott, N.A.,

Flow cytometric DNA patherns from colorectal cancers. How reproducible are they?
Mayo Clin. Proc. **62**: p. 331-337. (1987)

Schnltt, S.J., Connolly, J.L., Tavassoli, F.A., Fechner, R.E., Kempson, R.L., Gelman, R. and Page, D.L.,

Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria.
Am. J. Surg. Pathol. **16**: p. 1133-1143. (1992)

Schnltt, S.J., Silen, W., Sadowsky, N.L., Connolly, J.L. and Harris, J.R.,

Ductal carcinoma in situ (intraductal carcinoma of the breast).
N. Engl. J. Med. **318**(893-903). (1988)

Shapiro, H.M.,

Technical developments in flow cytometry.
Human Pathology. **17**: p. 649-651. (1986)

Shapiro, H.M.,

Practical Flow cytometry.

Ed. Alan R. Liss., Inc. New York. : p. 10-21. (1988)

Sharkey, F.E.,

Morphometric analysis of differentiation in human breast carcinoma. Tumor heterogeneity.

Arch. Pathol. Lab. Med. **107**(8): p. 411-414. (1983)

Sharkey, F.E., Paulak, R.J. and Greiner, A.S.,

Morphometric analysis of differentiation in human breast carcinoma. Tumor grading.

Arch. Pathol. Lab. Med. **107**(8): p. 406-410. (1983)

Sigurdsson, H., Baldetorp, B., Borg, A., Dalberg, M., Ferno, M., Killander, D. and Olsson, H.,

Flow cytometry in primary breast cancer: improving the prognostic value of the fraction of cells in the S-phase by optimal categorisation of cut-off levels.

Br. J. Cancer. **62**: p. 786-790. (1990)

Silvestrini, R., Daidone, M.G. and Gasparini, G.,

Cell Kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer.

Cancer. **56**: p. 1982-1987. (1985)

Simpson, H.W., Mutch, F., Halberg, F., Griffiths, K. and Wilson, D.,

Bimodal age-frequency distribution of epitheliosis in cancer mastectomies. Relevance to neoplasia.

Cancer. **50**: p. 2417-22. (1982)

Springer, E., Ulrich, H. and Schondorf, H.,

The diagnostic value of cell-nuclear DNA determination in aspiration cytology of benign and malignant lesions of the breast.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **1**: p. 29-33. (1979)

Spyratos, F., Brifford, M., Gentile, A., Brunet, M., Brault, C. and Desplaces, A.

Flow cytometric study of DNA distribution in cytopunctures of benign and malignant breast lesions.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **9**: p. 485-494. (1987)

Steinhoff, N.G. and Black, W.C.,

Flord cystic disease preceding mammary cancer.

Ann. Surg. **171**: p. 501-508. (1970)

Steinkamp, J.A.,

Flow Cytometry. Review Article.

Rev. Sci. Instrum. **55**: p. 1375-1400. (1984)

Stenkulst, B., Westman-Naeser, S., Holmquist, J., Nordin, B., Bengtsson, E.,

Vagellus, J., Eriksson, O. and Fox, C.H.,

Computerized nuclear morphometry as an objective method for characterizing human cancer cell populations.

Cancer Research. **38**: p. 4688-4697. (1978)

Swift, H.,

Analytical microscopy of biological materials., in Introduction to quantitative cytochemistry., Ed.

Wied, G.L., Ed. Wied, G.L.: Academic Press. (New York and London) (1966)

Tavassoli, F.A. and Norris, H.J.,

Microglandular adenosis of the breast. A clinicopathologic study of 11 cases with ultrastructural observations.

Am. J. Surg. Pathol. **7**: p. 731-737. (1983)

Tavassoli, F.A. and Norris, H.J.,

A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast.

Cancer. **65**: p. 518-529. (1990)

Teich, J.M., Young, I.T., Sher, S.C. and Lee, J.S.,

Transformation of nuclear morphology during cellular maturation.

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. **27**(1): p. 193-198. (1979)

Tepiltz, R.L., Butler, B.B., Tesluk, H., Min, B.H., Russell, L.A., Jensen, H.M.

and Hill, L.R.,

Quantitative DNA patterns in human preneoplastic breast lesions.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **12**(2): p. 98-102. (1990)

Tetu, B., Roberge, N., Brisson, J. and Potvin, D.,

Prognostic significance of tumor DNA content and S Phase fraction by flow cytometry in node-positive breast carcinomas.,

in Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology. New Orleans, March 13-19. p. 100. (1993).

Thorud, E., Fossa, S.D., Vaage, S., Kaalhus, O., Knudsen, O.S., Borner, O. and Shoalb, M.,

Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics.

Cancer. **57:** p. 808-811. (1986)

Tiersch, T.R., Chandler, R.W., Wachtel, S.S. and Elias, S.,

Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content.

Cytometry. **10:** p. 706-719. (1989)

Tosi, P., Luzi, P., Sforza, V., Miracco, C. and Santo Pietro, R.,

Morphometrical assessment of mean nuclear area in breast cancer in comparison with that of lymph node metastases.

Path. Res. Pract. **180:** p. 498-501. (1985)

Troncoso, P., Dytch, H.E., Bibbo, M., Wied, G.L. and Dawson, P.J.,

The significance of DNA measurements in a histologically defined subset of infiltrating ductal carcinomas of the breast with long-term follow-up.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **11:** p. 166-172. (1989)

Tulusan, A.H., Egger, H., Schnelder, M.L. and Willgeroth, F.,

A contribution to the natural history of breast cancer. IV. Lobular carcinoma in situ and its relation to breast cancer.

Arch. Gynecol. **231:** p. 219-226. (1982)

Uyterlinde, A.M., Schipper, N.W. and Baak, J.P.,

Comparison of extent of disease and morphometric and DNA flow cytometric prognostic factors in invasive ductal breast cancer.

J.Clin. Pathol. **40:** p. 1432-1436. (1987)

Uyterlinde, A.M., Schipper, N.W., Baak, J.P.A., Peterse, H. and Matze, E.,

Limited prognostic value of cellular DNA content to classical and morphometrical parameters in invasive ductal breast cancer.

Am. J. Clin. Pathol. **89:** p. 301-307. (1987)

Van Bogaert, L.J.,

Dysplasie fibrokistieke du sein: état précancéreux?

Gynecologie. **31**: p. 105-109. (1980)

Van Bogaert, L.J. and De Muylder, C.,

Nuclear diameters of breast cancer cells in tissue sections.

Anal. Quant. Cytol. Histol. **2**: p. 55-58. (1980)

Van Bogaert, L.J., De Muylder, C., Maldague, P. and Maisin, H.,

Prognostic implications of mean nuclear diameter in breast cancer.

Br. J. Cancer. **42**: p. 537-541. (1980)

Van Dam, P.A., Bockstaele, D.R., Keersmaeckers, G.H. and Uyttenbroeck, F.L.,

Flow cytometric detection of multifocal DNA aneuploid cell populations in mastectomy specimens containing a primary breast carcinoma.

Cytometry. **11**: p. 300-307. (1989)

Van der Linden, H.C., Baak, J.P., Smeulders, A.W.M., Lindeman, J. and Meyer, C.J.L.M.,

Morphometry of breast cancer. I. Comparison of the primary tumours and the axillary lymph node metastase.

Path. Res. Pract. **181**: p. 236-242. (1986)

Van der Linden, H.C., Baak, J.P.A., Lindeman, J., Hermans, J. and Meyer, C.J.L.M.,

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. **39**: p. 603-609. (1986)

Van der Linden, J.C., Baak, J.P.A., Lindeman, J., Hermans, J. and Meyer, C.J.L.M.,

Prospective evaluation of prognostic value of morphometry in patients with primary breast cancer.

J. Clin. Pathol. **40**: p. 302-306. (1987)

Van der Linden, J.C., Lindeman, J., Baak, J.P.A., Meljer, C.J.L.M. and Herman, C.J.,

The multivariate prognostic index and nuclear DNA content are independent prognostic factors in primary breast cancer patients.

Cytometry. **10**: p. 56-61. (1989)

Van Dieet, P.J., Baak, J.P., Matze-Cok, P. and Bacus, S.S.,

Prediction of response to adjuvant chemotherapy in premenopausal lymph node positive breast cancer patients with morphometry, DNA flow cytometry and HER-2/neu oncoprotein expression. Preliminary results.

Pathol. Res. Pract. **188**(3): p. 344-349. (1992)

Vera Roman, J.M.,

Uso de la citometria de flujo en la oncologia actual.

Med. Clin. **88**: p. 544-546. (1987)

Vindelov, L.L. and Christensen, I.J.,

A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis.

Cytometry. **11**: p. 753-770. (1990)

Von Rosen, A., Fallenius, A. and Sundelln, B.,

Nuclear DNA content in mammary carcinomas in women aged 35 or younger.

Am. J. Clin. Oncol. **9**(5): p. 382-386. (1986)

Wallgrem, A., Silverswant, C. and Zajick, J.,

Evaluation of needle aspirates and tissue sections as prognostic factors in mammary carcinoma.

Acta Cytol. **20**: p. 213-218. (1976)

Weaver, D.L., Bagwell, C.B., Hitchcox, S.A., Whetstone, S.D., Baker, D.R. and Herbert, D.J.,

Improved flow cytometric determination of proliferative activity (S-phase fraction) from paraffin-embedded tissue.

Am. J. Clin. Pathol. **94**: p. 576-584. (1990)

Welbel, E.R.,

Stereological Methods.,

in Practical methods for biological morphometry., Press, A.: (London) (1979)

Welbel, E.R.,

Stereological methods in cell biology: Where are we-whereas are we going?

The Journal of histochemistry and cytochemistry. **29(9):** p. 1043-1052. (1981)

Welbel, E.R., Kistler, G.S. and Scherle, W.F.,

Practical stereological methods for morphometric cytology.

The Journal of cell biology. **30:** p. 23-38. (1966)

Wellings, S.R. and W., M.,

Benign proliferative lesions of the breast; workshop report.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **19:** p. 1721-1723. (1985)

Witzig, T.E., Gonchoroff, N.J., Therneau, T., Grande, J., Katzmann, J.A., Ahmann, D.L. and Ingle, J.N.,

DNA content flow cytometry as prognostic factor for node-positive breast cancer. The role of multiparameter ploidy analysis and specimen sonication.

Cancer. **68:** p. 1781-1788. (1991)

Yuan, J., Hennessy, C., Givan, A.L., Corbett, I.P., Henry, J.A., Sherbet, G.V. and Lennard, T.W.,

Predicting outcome for patients with node negative breast cancer: a comparative study of the value of flow cytometry and cell imagen analysis for determination of DNA ploidy.

Br. J. Cancer. **65(3):** p. 461-465. (1992)

Zajdela, A., Asselaln, B. and Ghossein, N.A.,

Comparison between the nuclear diameter of primary and metastatic breast cancer cells obtained by cytologic aspiration.

Cancer. **56:** p. 1605-1610. (1985)

Zajdela, A., Saravla de la Riva, L. and Ghossein, N.A.,

The relation prognosis to the nuclear diameter of breast cancer cells obtained by cytologic aspiration.

Acta Cytol. **23:** p. 75-80. (1979)

Zajicek, J., Casperson, T., Jakobsson, P., Kudynowski, J., Linsk, J. and Us-Krasovec, M.,

Cytologic diagnosis of mammary tumors from aspiration bipsy smears. Comparison of cytologic and histologic findings in 2.111 lesions and diagnostic use of cytophotometry.

Acta Cytol. **14(7):** p. 370-376. (1986)

Bibliografia

Zarbo, R.J.,

Flow cytometric DNA analysis of effusions. A new test seeking validation.

Am. J. Clin. Pathol. **95**(1): p. 2-4. (1987)

Zimmer, H.G.,

Microphotometry, in Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics., Ed. V. Neuheft, Ed. V.

Neuheft: .,p.: 297-328.

Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York) (1973)