

G. Zornoza,  
J. Solá\*,  
A. Díez-Caballero,  
J. Torramadé,  
F. M. Regueira,  
F. Pardo,  
J. L. Hernández

# Citometría de flujo en el cáncer de mama: Análisis de la ploidía y fase S en relación con otros factores pronóstico

## Flux cytometry in the breast carcinoma: Analysis of the ploidy and S-phase in relation to other prognostic factors

### SUMMARY

**Introduction.** Many studies have shown correlations between cellular DNA contents, as measured by cytometry and other factors.

**Material and methods.** 211 tumours of patients with breast cancer were selected for DNA flow cytometry.

**Results.** The proportion of diploid tumours in our study (39.8%) is comparable with that reported by others. The median SPF of aneuploid tumours (13.7%) was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than of diploid tumours (7.7%). High SPF and aneuploidy were associated with histologically poorly differentiated tumours. There was no association between DNA content and age, menopausal status, axillary nodes or tumour size.

**Conclusion.** This study shows the relationship between DNA nuclear content and well-known prognostic indicators (histological grade and histology tipe).

Unidad de Patología  
Mamaria (G. Zornoza).  
Departamento de Cirugía General  
y \*Anatomía Patológica.  
Clínica Universitaria  
de Navarra. Pamplona.

### Palabras clave

Cáncer de mama, Citometría de flujo, Índice de DNA, Fase S.

### Key words

Breast cancer, Flow cytometry, DNA index, S-phase.

### INTRODUCCION

En la práctica clínica habitual se utilizan factores clinicopatológicos (edad, estado menstrual, tamaño tumoral, estado ganglionar, niveles de receptores hormonales, grado histológico, etc.) en un intento de valoración del pronóstico en cada caso de cáncer de mama. Sin duda estos factores mencionados son de gran interés en la valoración del pronóstico en los primeros años de seguimiento de estas pacientes, alguno de ellos incluso con implicaciones terapéuticas.

En la bibliografía existe controversia respecto al valor pronóstico de la citometría de flujo (CF) en el

cáncer de mama, siendo mayoría las referencias que confirman este valor predictor.<sup>1,3</sup>

### MATERIAL

Se estudian 211 cánceres de mama a los que se practicó CF. En ellos se analizó de forma sistemática, entre otros parámetros, edad, estado menstrual, pT, pN, tipo histológico, RH y GH como factores de interés pronóstico conocido y para ser relacionados con los resultados del estudio de CF realizado sobre los mismos tumores. Estos parámetros se resumen en la tabla I.

TABLA I  
RESUMEN DE ALGUNOS CARACTERES CLINICOS,  
ANATOMOPATOLOGICOS BIOLÓGICOS DE LA SERIE

	Casos	%
<b>Edad</b>		
— 20-39 años .....	29	
— 40-60 años .....	115	
— > 60 años .....	67	
<b>Estado menstrual</b>		
— Premenopáusicas .....	99	46,9
— Postmenopáusicas .....	112	53,1
<b>Tamaño</b>		
— < 2 cm .....	52	24,5
— 2-5 cm .....	133	63,0
— > 5 cm .....	26	12,5
<b>Estado ganglionar</b>		
— pN (-) .....	105	49,7
— pN (+) .....	106	50,3
<b>Estadio</b>		
— Tis .....	4	1,9
— E-I .....	41	19,4
— E-II .....	140	66,3
— E-III .....	24	11,4
— E-IV .....	2	0,9
<b>Tipo histológico</b>		
— Duc. infil. ....	145	68,7
— Lob. infil. ....	43	20,4
— Inflamator. ....	4	1,9
— Otros .....	15	7,1
— CID .....	4	1,9
<b>Receptores hormonales</b>		
— RE (+) .....		56,4
— RE (-) .....		43,6
— RPg (+) .....		58,8
— RPg (-) .....		41,2

TABLA II  
CLASIFICACION DE LA PLOIDIA EN LA SERIE

	Casos	%
Diploides .....	84	39,8
Aneuploides .....	87	41,2
Tetraploides .....	35	16,5
Otros .....	5	2,3

día en función de la edad de presentación del cáncer al comparar tumores diploides/aneuploides, pero sí cuando dentro de estos últimos se seleccionaron los tetraploides, que aparecieron en mujeres con edad significativamente mayor ( $p < 0,01$ ).

*Ploidía/estado menstrual.* Como se resume en la tabla III, no se apreciaron diferencias significativas estadísticamente. No obstante, si en lugar de la ploidía se utiliza el IDNA, este parámetro muestra diferencias entre menopáusicas y no menopáusicas ( $p < 0,01$ ), siendo más alto para las menopáusicas.

*Ploidía/tamaño tumoral.* No se encontraron diferencias significativas.

*Ploidía/estado ganglionar.* No se observaron diferencias significativas de la ploidía en su relación con la afectación ganglionar (considerada como  $\pm$ ). Tampoco se apreció al ser analizado este parámetro con el IDNA.

*Ploidía/estado tumoral.* No se observaron diferencias significativas.

*Ploidía/tipo histológico.* El análisis de la ploidía con las distintas formas histológicas de cáncer de mama mostró diferencias próximas a la significación estadística ( $p = 0,08$ ) en el total de la serie, con los resultados que se expresan en la tabla IV. No obstante, estas diferencias sí fueron significativas cuando se compararon de forma individualizada, tanto el Ca. inflamatorio como el Ca. duct. inf., con el grupo de «otros»

## RESULTADOS

### Ploidía (análisis del contenido de DNA)

A partir de los 211 tumores estudiados por CF se obtuvieron los histogramas que se resumen en la tabla II. Si consideramos como «aneuploide» a todo tumor correspondiente a un histograma anormal (no diploide), la serie pudo clasificarse en diploides, 84 casos (39,8%), y aneuploides, 127 (60,2%).

En el análisis de la ploidía respecto de otros parámetros, conocidos factores pronósticos, los resultados más señalados fueron:

*Ploidía/edad.* No se apreciaron diferencias de ploi-

TABLA III  
DISTRIBUCION DE LA PLOIDIA EN FUNCION  
DEL ESTADO MENSTRUAL DE PACIENTES

	Menopáusicas	
	Sí (%)	No (%)
Aneuploides .....	55,1	44,9
Diploides .....	50	50
Total .....	53,1	46,9

TABLA IV  
RELACION DE LA PLOIDIA RESPECTO DEL TIPO HISTOLOGICO EN CANCERES DE MAMA ESTUDIADOS

Tipo hist.	N.º	Aneuploide (%)	Diploide (%)
Inflamatorio .....	4	75	25
Ductal .....	143	65	35
Lobul. ....	43	51,2	48,8
Otros .....	18	39	61

en el que están incluidas las formas histológicas consideradas como de mejor pronóstico (Ca. tubular, Ca. coloide, Ca. medular). En tanto fueron aneuploides el 75% de las formas inflamatorias, de conocido mal pronóstico, y el 65% de los Ca. duct. inf., sólo lo fueron el 39% de los «otros». Señalar, no obstante, el bajo número, 4 casos, de carcinoma inflamatorio incluido en el estudio.

*Ploidía/receptores hormonales.* Tanto en lo que respecta a los RE como los RPg se apreciaron valores más altos y un índice de positividad mayor en el grupo de tumores diploides, si bien estas diferencias, respecto a los restantes subgrupos, no llegaron a ser significativas ( $p = 0,2$ ).

*Ploidía/grado histológico.* Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en el GH, que fue más bajo en los tumores diploides, especialmente respecto de los aneuploides.

*Ploidía/tiempo de seguimiento.* Con un tiempo de seguimiento medio de 54,2 meses, se apreció una supervivencia mayor en el grupo de los tumores diploides (tabla V), aun cuando estas diferencias no llegaron a ser significativas ( $p < 0,08$ ).

También aquí el estudio intergrupos mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando se comparó la supervivencia de los tumores tetraploides respecto de los diploides.

TABLA V  
TIEMPO MEDIO DE SUPERVIVENCIA EN FUNCION DE LA PLOIDIA

Ploidía	Supervivencia media (meses)
Diploides .....	57,3
Aneuploides .....	55,4
Tetraploides .....	35,6
Otros .....	23,2

### Ciclo celular (fase S)

Se estudió el ciclo celular en todos los casos, no pudiéndose valorar la fase S en 22 tumores por distintos motivos (detritus celulares, histogramas complejos, poblaciones celulares insuficientes, etc.). Los valores medios de fase S fueron de  $\bar{x} = 11,1\%$ :

*Fase S/ploidía.* El análisis de la relación entre el porcentaje de células en fase S respecto de la ploidía evidenció aumento de aquélla en los tumores aneuploides, con diferencias significativas: los tumores diploides mostraron un 7,7% de células en fase S, mientras que en el grupo aneuploides éstas fueron del 13,7% ( $p < 0,001$ ).

*Fase S/tipo histológico.* Se encontraron valores próximos a la significación estadística ( $p = 0,09$ ) al ser relacionados estos 2 factores. Las formas histológicas más graves cursaron con valores más altos de células en fase S (tabla VI).

A destacar los valores altos de células en fase S en el caso del Ca. medular (que los hicieron significativos estadísticamente) y que es considerado de mejor pronóstico cuando se trata de esta forma histológica verdadera. Precisamente su característica riqueza en infiltrado linfocitario puede justificar estos valores elevados. De cualquier forma la cortedad de la serie, 4 casos, no permite más comentarios.

*Fase S/grado histológico.* De forma similar se ha observado un aumento de los valores de la fase S en relación con el grado histopronóstico, sin llegar tampoco a la significación estadística ( $p = 0,05$ ): en los tumores GH I se encontró un 6,6% de células en fase S; en los pertenecientes al GH II, el 8,1%, y en los encuadrados como GH III se encontraron un 8,9% de células en fase S.

*Fase S/estado actual.* Al valorar el estado de las pacientes en el momento del análisis se observó un

TABLA VI  
DISTRIBUCION DEL PORCENTAJE DE CELULAS EN FASE S EN RELACION CON EL TIPO HISTOLOGICO

Tipo histológico	% de células en fase S
Ca. inflamatorio .....	13,5
Ca. ductal inf. ....	11,9
Ca. lobul. inf. ....	8,7
Ca. coloide .....	6,5
Ca. <i>in situ</i> .....	8,8
Ca. medular .....	22,2

TABLA VII  
**ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE CELULAS EN FASE S  
 EN RELACION CON EL ESTADO DE LAS PACIENTES  
 EN EL MOMENTO DEL ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Estado	Fase S (%)
Viva sana .....	10,1
Viva enferma .....	13,8
Muerta .....	15,9

incremento en los valores de fase S según el mismo, con valores significativos entre las sanas y las muertas por diseminación de la enfermedad (tabla VII).

Se estudió asimismo el porcentaje de células en fase G2M y en su relación con otros factores pronósticos, no encontrándose diferencias significativas.

## DISCUSION

Es indiscutible el valor pronóstico que el estado ganglionar (pN) tiene en la evolución posterior de un cáncer de mama, hasta considerarlo todavía como el factor pronóstico fundamental. No obstante, debe admitirse que junto al pT, ambos factores constituyen elementos estáticos, características de un tumor en un momento dado, siendo necesario conocer la dinámica de ese tumor, su velocidad de crecimiento, la agresividad del tumor.

Entre las formas de estudio de la cinética celular está la CF, uno de cuyas aplicaciones es el análisis del contenido de DNA. La CF hace una estimación de la proliferación celular, valorando el ciclo celular sobre el histograma de DNA a través de diversos modelos matemáticos.

La distribución de la ploidía en nuestra serie, muestra un porcentaje de tumores diploides (39,8%) similares a los referidos en la bibliografía, entre 31,4% de O'Reilly<sup>10</sup> y el 48% de Kute.<sup>6</sup> La mayoría de autores no distinguen entre aneuploidía y tetraploidía, englobándose todos ellos como aneuploides,<sup>5, 6, 10</sup> si bien otros consideran los tetraploides como un grupo independiente, con comportamiento biológico diferente.<sup>2, 9</sup>

Existen múltiples estadios<sup>5, 7</sup> que señalan una estrecha relación entre la ploidía y fase S con respecto al intervalo libre de enfermedad y supervivencia, lo que podría hacer del estudio de la citometría un importante factor pronóstico en el cáncer de mama. Por

otro lado, el análisis de su correlación con otros conocidos factores pronósticos, permitirá conocer si se trata de un factor de valor independiente o por el contrario puede ser suplido por otros en uso.

En la serie que analizamos, no se encontró asociación entre la ploidía y la edad, coincidiendo con las observaciones de Keihani<sup>5</sup> y Hedley.<sup>4</sup> Por el contrario, otros autores como Taylor<sup>11</sup> refieren un aumento del contenido de DNA en el caso de pacientes de más edad, hecho observado en nuestras pacientes cuando se analiza separadamente el grupo de los tumores tetraploides.

Se ha insistido en el valor pronóstico independiente de la citometría. Nuestra serie confirma que ploidía y fase S no tienen relación con el tamaño tumoral, estado ganglionar y consecuentemente con el estadio del tumor.

Por el contrario, sí se ha encontrado correlación entre estos parámetros, ploidía y fase S, con factores de la biología tumoral, como el grado histológico (GH) y los receptores hormonales (RH). Los tumores con GH alto y los carentes de RH son preferentemente tetraploides: el GH más bajo se encontró en los tumores diploides y los valores más altos de RH (tanto de RE como de RPg), así como su índice de positividad, se asociaron a tumores diploides.

Asimismo se apreciaron diferencias, próximas a la significación estadística, al relacionar la ploidía con el tipo histológico tumoral. Estas diferencias sí fueron significativas, cuando se comparó el Ca. inflamatorio o el Ca. ductal infiltrante con el subgrupo «otros», en el que se incluían las formas histológicas aceptadas como de mejor pronóstico.

Nuestros resultados muestran un porcentaje de células en fase S más elevado que los referidos en la bibliografía (7,7% para los diploides y 13,7% para los aneuploides, con una  $p < 0,001$  entre ellos) y que puede explicarse por el hecho de que los histogramas obtenidos de material incluido en parafina poseen mayor cantidad de detritus celulares. Los valores de fase S, como la ploidía, mostraron estrecha relación con el tipo histológico y el grado histopronóstico, si bien como refiere O'Reilly<sup>10</sup>, la citometría se muestra como un método más objetivo y fiable al no estar sometido a la subjetividad del observador.

Hadley<sup>4</sup> refería que la esperanza de vida del cáncer de mama, se correlaciona con la ploidía, teniendo los diploides, a partir del segundo año de seguimiento, una mayor supervivencia, siendo ésta igual

para diploides y aneuploides en los 2 primeros años. Como se refiere en la bibliografía, tanto la ploidía como la fracción S, se correlacionaron en nuestra serie con el período libre de enfermedad y la supervivencia, a pesar del corto seguimiento (54,2 meses).

Algunos autores consideran que la suma de células en fase S + G2M puede ser un indicador más fidedigno en la valoración de la actividad proliferante,<sup>8</sup> existiendo diferencias significativas entre los tumores diploides y los aneuploides.

## CONCLUSIONES

La citometría en sus parámetros ploidía y fase S, se muestran como factores pronóstico en el cáncer de mama.

Ambos son independientes de otros factores conocidos, como pT, pN y pEstadio. Muestra correlación con el tipo histológico y especialmente con el grado histopronóstico. Sobre éste tiene la ventaja de la fiabilidad, exenta de la subjetividad del observador, frente a la sencillez de valoración del GH.

## RESUMEN

*Introducción.* Múltiples estudios han puesto en evidencia la relación entre el contenido de DNA medido por citometría de flujo y otros factores pronósticos conocidos.

*Material y métodos.* Se han seleccionado 211 tumores para estudio de DNA por citometría de flujo.

*Resultados.* El porcentaje de tumores diploides en nuestra serie ha sido del 39,8%, similar al reseñado por otros autores. Los valores medios de células en fase S en los tumores aneuploides fue del 13,7%, significativamente más alta ( $p < 0,001$ ) que en los tumores diploides (7,7%). Valores altos de fase S y aneuploidía se asocian con tumores considerados

histológicamente de peor pronóstico. No se encontró relación del contenido de DNA con otros factores como edad, estado menopáusico, ganglios axilares o tamaño tumoral.

*Conclusiones.* El estudio muestra relación entre el DNA nuclear y otros indicadores pronósticos (grado histológico y tipo histológico).

## REFERENCIAS

1. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G. Prediction of relapse or survival in patients with node negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989; 320: 627-633.
2. Fallenius A, Fransez, S, Auer G. Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. *Cancer* 1988; 62: 521-530.
3. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J Clin Pathol* 1984; 37: 961-974.
4. Hadley DW, Rugg CA, Taylor IW. Influence of celular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patient. *Cancer Res* 1984; 44: 5395-5398.
5. Keyhani-Rogagha S, O'Toole RV, Farrar WB, Sickle-Santanello B, De Cenzo J, Young D. Is DNA ploidy an independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma? *Cancer* 1990; 65: 1577-1582.
6. Kute TE, Muss HB, Cooper MR, Case LD, Buss D, Stanley V, Gregory B, Booher K. The use of flow cytometry for the pronosis of stage II adjuvant treatment breast cancer patients. *Cancer* 1990; 66: 1810-1816.
7. Meyer JS. Cell kinetic analysis of human breast carcinomas. *Monogr Pathol* 1984;25: 45-58.
8. Muss H, Kute T, Smith R, Booher C, Long R, Kammire L, Gregory B, Brockschmidt J. The relation to flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer* 1989; 64: 1894-1900.
9. Nativ O, Winkler H, Raz Y, Therneau T, Farrow G, Myers R, Zoncker H. Stage C prostatic adenocarcinoma: Flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 911-919.
10. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Allen D, Rubens RD, Richards MA. DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1990; 61: 671-674.
11. Taylor IW, Musgrove EA, Friedlancer ML, Foo MS, Badley DW. The influence of age on the DNA ploidy levels of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19: 623-628.