

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



X-53-367430-0

***CUANTIFICACION DE ADN POR
CITOMETRIA DE IMAGEN EN LA
MASTOPATIA FIBROQUISTICA:
VALORACION PRONOSTICA DE LA MISMA.***



RECIBO

JAVIER AZUA ROMEO

Memoria presentada para la obtención del título de Doctor por el
licenciado:

D. JAVIER AZUA ROMEO

Dirigida por los doctores:

D. JAVIER AZUA BLANCO

Dña. PEÑA ROMEO CASABONA

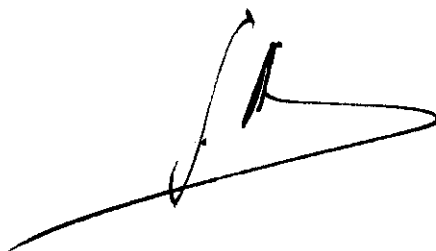
Madrid, 1998

D. JAVIER AZUA BLANCO, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que D. JAVIER AZUA ROMEO,

Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada: “CUANTIFICACION DE ADN POR CITOMETRIA DE IMAGEN EN LA MASTOPATIA FIBROQUISTICA: VALORACION PRONOSTICA DE LA MISMA”, cuya memoria reúne las condiciones necesarias para optar al título de Doctor.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Azua', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Dr. D. JAVIER AZUA BLANCO

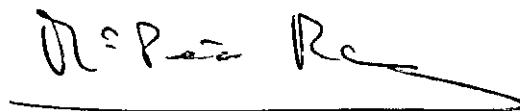
Dña. PEÑA ROMEO CASABONA , Profesora Titular de Biofísica de la
Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que D. JAVIER AZUA ROMEO,

Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección la Tesis

Doctoral titulada: “CUANTIFICACION DE ADN POR CITOMETRIA DE
IMAGEN EN LA MASTOPATIA FIBROQUISTICA: VALORACION
PRONOSTICA DE LA MISMA”, cuya memoria reúne las condiciones
necesarias para optar al título de Doctor.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Dña. Peña Romeo', followed by a long horizontal line extending to the right.

Fdo. Dra. Dña. PEÑA ROMEO CASABONA

AGRADECIMIENTOS

Cuando me embarqué en ésta “aventura” no podía imaginar lo que me esperaba, pero gracias a todas las personas que me han ayudado de un modo u otro, esta empresa está llegando a buen puerto a pesar de las muchas tormentas científicas, académicas y de toda índole que hemos tenido que pasar.

Ha sido un camino muy largo y difícil, pero sobre todo muy gratificante. A lo largo de este tiempo he podido sumergirme en el maravilloso mundo de la investigación, guiado en todo momento por mis directores el Dr. Azúa y la Dra. Romeo, que me han ayudado siempre que lo he necesitado, a cualquier hora y en cualquier situación.

Por supuesto no puedo menos que agradecer a aquellos que en un plano más personal han estado apoyándome y alentándome a continuar aun cuando en algunos momentos mi esfuerzo parecía no tener efecto.

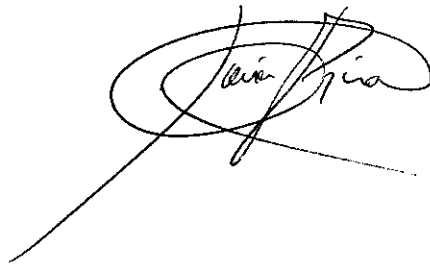
Ahora cuando el trabajo ya está acabado miro hacia atrás y veo a mis padres, a Mayte (cuantas horas de aguantar el mismo “rollo”), a mi hermano (asesorándome en el uso de esas máquinas infernales que se llaman ordenadores), a mis compañeros de facultad y amigos, y muchos otros que han creído siempre en este proyecto.

Tampoco puedo dejar de agradecer a todo el personal de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, que tan bien me han sabido

solucionar todo el “papeleo”, cosa que cada día resulta más complicado y sin su ayuda no se donde estaría ahora.

Por último un recuerdo a todos aquellos profesores de la Facultad de Medicina de Zaragoza que supieron enseñarme el verdadero valor de la Medicina y me impulsaron a seguir aprendiendo cada día más.

Gracias a todos, de verdad.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Javier Azúa Romeo', enclosed within a large, loopy oval stroke. A long, thin line extends from the bottom left of the signature.

Fdo. Javier Azúa Romeo.

A mis padres Javier y Peña,

a mi hermano Luis.

A Mayte.

A toda mi familia.

A mi abuelo Luis de Azúa

in memoriam.

INDICE

<u>I.- INTRODUCCION.....</u>	15
A.- JUSTIFICACION DEL TEMA.....	17
B.- HIPOTESIS PLANTEADAS.....	23
C.- RECUERDO HISTORICO DE LA CITOLOGIA.....	25
1.- Comienzos.....	25
2.- Citometría.....	30
3.- Citología clínica y punción aspiración con aguja fina.	32
4.- Desarrollo de la citofotometría.....	38
5.- Citometría de flujo y de imagen.....	41
D.- FUNDAMENTOS BIOLOGICOS.....	53
1.- ADN y cromatina.....	53
2.- Ciclo celular.....	56
2a.- fase G1.....	58
2b.- fase S.....	59
2c.- fase G2.....	60
2d.- Fase M.....	60
3.- Oncogenes y cáncer.....	61
4.- Comienzo y desarrollo de la neoplasia.....	63
4.a.- Inducción.....	64
4.b.- Crecimiento.....	65
4.c.- Valoración del crecimiento.....	67

5.- Ploidía.....	71
5.a.- Ploidía.....	71
5.b.- Euploidía.....	72
5.c.- Aneuploidía.....	72
5.d.- Poliploidía.....	73
6.- Tumores y ploidía.....	73
7.- Células poliploides normales y patológicas.....	75
E.- TECNICAS PARA LA VALORACION DE LA PLOIDÍA.	77
1.- Autorradiografía.....	77
2.- Cinemicroscopía.....	79
3.- Citofotometría.....	79
4.- Citometría de flujo.....	81
5.- Citometría estática o de imagen.....	83
<u>II.- MATERIAL Y METODOS</u>	85
A.- MATERIAL	87
1.- Selección de muestras citológicas	95
2.- Definición y características del material.....	97
2.a.- Software.....	98
B.- METODOS	101
1.- Procesado de las preparaciones antiguas.....	101
2.- Procedimiento para análisis de imagen.....	105

2.a.- Selección de los núcleos celulares.....	105
2.b.- Histogramas de densidad óptica integrada...	114
2.c.- Indices pronósticos.....	118
3.- Descripción de los tipos de histograma.....	121
<u>III.- RESULTADOS</u>	129
A.- PATOLOGIA PROBABLEMENTE BENIGNA.....	131
B.- PACIENTES CON PATOLOGIA ASOCIADA.....	139
C.- VALORACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS.	149
1.- Estadística descriptiva.....	149
2.- Epidemiología.....	165
<u>IV.- DISCUSION</u>	171
A.- PATOLOGIA PROBABLEMENTE BENIGNA.....	173
B.- PACIENTES CON PATOLOGIA ASOCIADA.....	179
<u>V.- CONCLUSIONES</u>	203
<u>VI.- BIBLIOGRAFIA</u>	207

INDICE DE TABLAS, FIGURAS, GRAFICAS E HISTOGRAMAS.**TABLAS:**

I.- Grupos diagnósticos.....	pág.88
II.- Casos, pacientes y cuantificaciones.....	pág.90
III.- Casos carcinoma.....	pág.92
IV.- Casos patología asociada.....	pág.93
V.- Patología probablemente benigna.....	pág.131
VI.- Características de PPB.....	pág.132
VII.- Valores de PPB.....	pág.136
VIII.- Pacientes Patología Asociada.....	pág.139
IX.- Características de Patología Asociada.....	pág.145
X.- Valoración de entropía en PA.....	pág.147
XI.- Valoración de ploidía en PA.....	pág.148
XII.- X1 Ploidía PA Apocrina.....	pág.153
XIII.- X2 Entropía PA Apocrina.....	pág.154
XIV.- X1 Ploidía PA Ductales.....	pág.155
XV.- X2 Entropía PA Ductales.....	pág.156
XVI.- X1 Ploidía PPB Ductales.....	pág.157

XVII.- X2 Entropía PPB Ductales.....	pág.158
XVIII.- X1 Ploidía PPB Apocrinas.....	pág.159
XIX.- X2 Entropía PPB Apocrinas.....	pág.160
XX.- Ploidía: PA Duct./ PA Apo.....	pág.161
XXI.- Entropía: PA Duct./ PA Apo.....	pág.162
XXII.- Ploidía: PPB Duct./ PPB Apo.....	pág.162
XXIII.- Entropía: PPB Duct./ PPB Apo.....	pág.162
XXIV.- Ploidía: Apo PPB/ PA.....	pág.163
XXV.- Entropía: Apo PPB/ PA.....	pág.163
XXVI.- Ploidía: Duct. PPB/ PA.....	pág.163
XXVII.- Entropía: Duct. PPB/ PA.....	pág.164
XXVIII.- P. Asociada homolateral previa.....	pág.169
XXIX.- P. Asociada todas localizaciones.....	pág.170
A.- Tinción hematoxilina progresiva/ Feulgen.....	pág.104
B.- Agresividad de los tipos de histograma.....	pág.127

FIGURAS:

1.- Equipo empleado en el análisis de imágenes.....	pág.98
2.- Programa TEXCAN.....	pág.99
3.- Adquisición de una imagen.....	pág.106
4.- Obtención de la imagen de densidad óptica.....	pág.107
5.- Umbralización de 25 células en pantalla.....	pág.108
6.- Adquisición de una imagen interactiva. Apocrinas.....	pág.110
7.- Adquisición de una imagen interactiva. Ductales.....	pág.110
8.- Umbralización de una imagen interactiva. Apocrinas.....	pág.111
9.- Umbralización de una imagen interactiva. Ductales.....	pág.111
10.- Selección de problemas (apocrinas) y controles.....	pág.112
11.- Selección de problemas (ductales) y controles.....	pág.112
12.- Menú de evaluación.....	pág.113
13.- Histograma de células control.....	pág.114
14.- Histograma de células apocrinas.....	pág.115
15.- Histograma de células ductales.....	pág.116
16.- Índices pronósticos obtenidos.....	pág.119

GRAFICAS:

1.- Histograma de células control.....	pág.122
2.- Histograma Tipo I.....	pág.123
3.- Histograma Tipo II.....	pág.124
4.- Histograma Tipo III.....	pág.125
5.- Histograma Tipo IV.....	pág.126
6.- Comparación de ploidías PPB.....	pág.137
7.- Valor de entropía PPB.....	pág.138
8.- Valor de entropía P.Asociada.....	pág.146
9.- Comparación de ploidía P.Asociada.....	pág.148
10.- X1 ploidía P.Asociada apocrinas.....	pág.153
11.- X2 entropía P.Asociada apocrinas.....	pág.154
12.- X1 ploidía P.Asociada ductales.....	pág.155
13.- X2 entropía P.Asociada ductales.....	pág.156
14.- X1 ploidía PPB ductales.....	pág.157
15.- X2 entropía PPB ductales.....	pág.158
16.- X1 ploidía PPB apocrinas.....	pág.159
17.- X2 entropía PPB apocrinas.....	pág.160

HISTOGRAMAS:

Caso	4.-.....	pág.175
Caso	4A.-.....	pág.175
Caso	11.-.....	pág.176
Caso	11A.-.....	pág.176
Caso	32.-.....	pág.177
Caso	41.-.....	pág.178
Caso	41A.-.....	pág.178
Caso	59A.-.....	pág.182
Caso	60A.-.....	pág.182
Caso	202.-.....	pág.183
Caso	54.-.....	pág.185
Caso	86.-.....	pág.185
Caso	171.-.....	pág.188
Caso	53.-.....	pág.189
Caso	55.-.....	pág.191
Caso	56.-.....	pág.192
Caso	163.-.....	pág.193
Caso	51.-.....	pág.194

Caso 52.-.....pág.195

Caso 18.-.....pág.196

Caso 57.-.....pág.197

Caso 58.-.....pág.198

Caso 7.-.....pág.200

ABREVIATURAS

- P.P.B.: Patología Probablemente Benigna.
- P.A.: Patología Asociada.
- Apo.: Células Apocrinas.
- Duct.: Células Ductales.
- M.F.Q.: Mastopatía Fibroquística.
- M.F.Q.R.: Mastopatía Fibroquística tipo Reclús.
- PAAF: Punción Aspiración con Aguja Fina.
- D. Estándar: Desviación Estándar.
- E. Estándar: Error Estándar.
- C. Variación: Coeficiente de Variación.
- S. Cuadrado: Suma Cuadrado.

I.- INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

A.- JUSTIFICACION DEL TEMA

En los últimos años la citología y la técnica de punción-aspiración con aguja fina han pasado a ser parte importante e imprescindible en la práctica clínica diaria. Hoy es indudable su utilidad como medio diagnóstico inofensivo para el paciente, previo a la intervención quirúrgica y al establecimiento de la pauta terapéutica.

Son ya relativamente numerosos los trabajos dirigidos a establecer un protocolo de tratamiento del cáncer en base a una valoración pronóstica previa, utilizando para ello métodos cuantitativos, bien sea por citometría de flujo o bien por imagen.¹ (*Cornelisse C. y cols. 1984 a 1991; Uytterlinde A. 1987 a 1989; Wilbur, D. C. 1990; Lee, A. K. 1991; Lee, A. K. 1992; Yuan, J. 1992; Lajoie, G. 1993; Martinez Tello, D. 1993; Luzi, P. 1994; Verdoot B. 1995; Phillips, K. L. 1995; Ottesen, G. L. 1997; Peiro, G. 1997; Spyrtos, F. 1997; Stomper, P. C. 1998; Alanen K.A. 1998*) Una vez conocido el valor de estos métodos en los

¹ Los nombres propios que luego son reflejados en la bibliografía aparecen en negrita para facilitar su búsqueda. Únicamente no constan los autores históricos como Sir James Paget.

casos de cáncer (*Aubele M. 1995; Azúa J. 1997; Azúa J. 1998; Bach B.A. 1991; Baldetorp B. 1992; Bauer T.W. 1990; Bogatyrev, V. N. 1986; Borgiani, L. 1994; Claud, R. D. 198; Cohen, C. 1996; Davey, D. 1993; Dawson, A. E. 1990; Falkmer, U. G. 1990; García Miralles, MT. y cols. 1990; Faranda, A. 1997; Friedrich, K. 1997; Haroske, G. 1997; Haroske, G. 1995; Kindermann, D. 1992; Kristen, P. 1991; Longin, A. 1992; Mariuzzi, G. M. 1989; Mink, D. 1995; Montironi, R. 1993; Montironi, R. 1992; Zuo, LF. 1992; Vicioso Palcic, B. 1993; Castro, V. y cols. 1993; Gonzalez Morales, ML. 1996; Sinn, H. P. 1997; Leonardi, E. 1998; Lavarino, C. 1998; Baldetorp B. 1998*) se nos planteó la posibilidad de dar un paso adelante y tratar de seleccionar aquellos casos de mastopatías fibroquísticas en los que fuera posible predecir una evolución hacia la benignidad o la malignidad, consiguiendo con ello un verdadero diagnóstico precoz.

En primer lugar tenemos que diferenciar entre diagnóstico primario y diagnóstico precoz.

Consideramos diagnóstico primario al obtenido por cualquier tipo de técnica allí donde las otras han fracasado. En el caso que nos ocupa consideraríamos diagnóstico primario a la afirmación definitiva de cáncer mediante la citología cuando la clínica y la radiología han sido negativas.

Este diagnóstico primario es independiente del estadio del tumor, y así

nos encontramos que podemos haber hecho un diagnóstico citológico de cáncer tanto en un tumor de pequeñas como de grandes dimensiones. Pero en cualquier caso la enfermedad ya está establecida.

El diagnóstico precoz es el que se refiere al reconocimiento de las displasias, es decir a las lesiones potencialmente malignas. Este término y este concepto es sobradamente conocido por otros especialistas que han visto disminuir los casos de cáncer al aplicar la terapéutica adecuada sobre las displasias. Esta actuación nos ha sido útil hasta ahora, pero una vez que aplicamos conocimientos de biología molecular, como podemos considerar a la cuantificación de ADN, encontramos que nos falta “algo”. Empezamos a considerar la posibilidad de diagnosticar un posible cáncer cuando todavía no lo es, queremos decir, *¿es posible detectar una alteración celular del ADN aun cuando morfológicamente no hay alteraciones? ¿cuando todavía no hay displasia?*. En principio y a la vista de los conocimientos ya adquiridos en este campo creemos poder afirmarlo. (Seigneurin D.1994; Goud T.M. 1995; Visscher D.W. 1995; Palmer J.O. 1998; Guski H. 1988; Guski H. 1989; Seckinger D. 1989; Bogatyrev V.N. 1986; Prechtel K. 1991; Prechtel K. 1993; Prechtel K. 1994;Prechtel K. 1997; Borzenko, B. G. 1990; Borzenko, B. G. 1997; Crissman, J. D. 1990; Pallis, L. 1992; Siitonen, S. M.1993) Entonces, podríamos detectar clones aneuploides en lesiones aparentemente benignas y predecir por tanto su

evolución hacia la malignidad. *¿Esto es así de simple?: ¿Que proporción de casos morfológicamente benignos lo son en realidad?. ¿La mastopatía fibroquística es realmente un precursor encubierto del cáncer?. ¿Podemos tener una valoración pronóstica en todos los casos?.. etc ...*²(Guski H. 1986; Guski H., Simon H. 1986;⁵¹Kwon C.S. 1988; Schauer K. 1989; Vasiu R. 1990; Borzenko B.G. 1990; Teplitz, R. 1990; Contesso G. 1991; Theissig, F. 1991; Raju U. 1993; Fabian C.J. 1994; Brower ST. 1995; Borzenko B.G. 1997; Boone C. W. 1997)

Estas cuestiones, que no habíamos conseguido resolver con las consultas de la bibliografía existente, (Visscher DW. 1993; Mattfeldt T. 1993) nos decidieron a abordar el tema tratando de obtener nuestras propias respuestas, con el convencimiento de que podríamos aportar nuestra pequeña contribución en la solución, o al menos en el mejor conocimiento de algunos de los problemas planteados.

Así pues, habría que referirse a los términos más actuales de *prevención primaria* y *prevención secundaria* (Piédrola Gil. G y cols., 1994), para establecer claramente cual es nuestra meta con éste trabajo.

- *Prevención primaria*: consiste en evitar la aparición de una determinada enfermedad (en nuestro caso el CANCER) cuando ésta, efectivamente, todavía

² En algunos casos en que podría resultar difícil encontrar la referencia, hacemos mención expresa a su número de orden para facilitar su búsqueda.

no ha aparecido, actuando sobre los factores determinantes (preneoplásicos). Es pues el conjunto de actuaciones encaminadas a reducir la incidencia de una enfermedad en una población y disminuyendo el riesgo de aparición de nuevos casos. Se trata de actuar sobre los sujetos susceptibles.

- *Prevención Secundaria*: sería descubrir la enfermedad ya presente, pero asintomática en un estadio tan precoz que nos permita frenar su evolución. Es decir, la batería de actuaciones destinadas a disminuir la prevalencia de una enfermedad, reduciendo su duración y evolución. En éste aspecto la actuación por excelencia es el “screening”.

Por lo tanto queda claro que hasta ahora nos centrábamos en el segundo escalón de prevención (*Azúa y cols. 1995; Azúa y cols. 1997*), mientras que con éste trabajo damos un paso más en el verdadero diagnóstico precoz del cáncer de mama, estando sobradamente demostrado que la prevención primaria reduce amplísimamente la mortalidad por esa causa, así como que se acompaña de un aumento considerable de la supervivencia (*Piédrola Gil y cols., 1994*).

B.- HIPOTESIS PLANTEADAS

1.- La cuantificación del ADN en las células de la mastopatía fibroquística nos permite una valoración pronóstica en cuanto a su evolución o no hacia un cáncer.

2.- La mastopatía fibroquística no es un precursor del cáncer de mama.

3.- La cuantificación de ADN tiene valor no sólo como marcador pronóstico, sino también como factor discriminativo en el diagnóstico.

C.- RECUERDO HISTORICO DE LA CITOLOGIA

1) COMIENZOS DE LA CITOLOGIA:

Etimológicamente “citología” significa “ciencia que estudia la célula”, en la actualidad, en un sentido más amplio, entendemos por citología “el estudio de las células aisladas, a través de cuyas modificaciones deducimos las alteraciones del tejido correspondiente” (*Azúa*).

Con la invención del microscopio en el siglo XVII, el holandés *Jansen* abre el camino para el estudio de la morfología celular. El término “célula” es empleado por primera vez en 1665 por el botánico inglés *Robert Hooke* para denominar la estructura alveolar, similar a un panal de colmena, observada al microscopio en un corte de corcho.

En 1838, *Schwann* (*Schwann T. 1839*), basándose en las ideas del botánico *Schleiden MJ. 1838*, presenta el concepto de la célula como la unidad básica estructural de un tejido animal. Ese mismo año *Müller* (*Müller J. 1833*) describe, por primera vez, el aspecto microscópico de los tumores malignos humanos. Ya entonces piensa que la microscopía necesita el suplemento de estudios químicos para tener un valor diagnóstico completo.

Entre los primeros en aplicar el microscopio al estudio de las células humanas destaca el francés *Alfred Donné*, quien en 1845 publicó un atlas de imágenes a base de microfotografías utilizando la técnica fotográfica recién desarrollada por *Daguerre* (*Donné A. 1845*). Sugirió la posibilidad de usar una fuente de luz eléctrica para el microscopio unos 35 años antes de que *Edison* desarrollara la bombilla. Otra importante contribución de *Donné* fue el uso de un micrómetro para medir los objetos que observaba. De esta forma podría ser considerado como el origen de la citología analítica y cuantitativa.

En los años 1850 la microscopía se benefició inmensamente de la introducción de colorantes como el rojo carmín y la hematoxilina.

La utilización de fijadores como el ácido pícrico, y la técnica de embeber los tejidos en parafina, introducida por *Klebs* en 1867 (*Luecke A., Klebs E. 1867*) extendió el estudio de los tejidos con fines diagnósticos, empezando con *Müller* y *Virchow* (*Virchow H. 1858*) y durante casi un siglo después. En ese periodo disminuyó el interés por la observación morfológica de las células aisladas. De tal forma que, durante el siglo XIX y la primera mitad del XX, sólo hubo observadores aislados que estudiaron células de distintos orígenes con interés diagnóstico o de investigación.

Pouchet en 1847 empezó a estudiar las células vaginales descamadas en la mujer. En 1853 *Sir James Paget* describe las células cancerosas

provenientes de la aspiración de lesiones mamarias.

Poco a poco el uso de la **citología exfoliativa**, es decir, el estudio de las células obtenidas mediante descamación, se va imponiendo y es en el terreno de la ginecología donde, al principio, encuentra un mayor campo de aplicación utilizándose para el diagnóstico de procesos malignos.

Casi al mismo tiempo se piensa en aplicar estas técnicas al estudio de distintas sustancias corporales en las que pudiese haber células descamadas del interior del organismo. *Betschardt* en 1895 (*Betschardt E. 1895*) publica su trabajo sobre el estudio de células malignas en el esputo. Se suceden los estudios sobre distintos tipos de muestras obtenidas del aparato respiratorio, para diagnóstico, no sólo del cáncer de pulmón, sino de otros procesos respiratorios.

En esa misma década, *Miescher* en 1890 logró la identificación química de los ácidos nucleicos, lejos todavía de que se intuyera la importancia del papel que desempeñan en el ciclo celular. *Hansemann D. 1890* plantea la hipótesis de que los cánceres están caracterizados por una división celular asimétrica, la cual presupone cambios cromosómicos cuantitativos en el cáncer. En aquel momento hubo discrepancias en estudios similares realizados por *Stroebe* en 1892, al encontrar mitosis asimétricas en tejidos regenerativos y tumores benignos.

Paralelamente a la evolución de la citología exfoliativa se desarrolla la **citología por punción aspiración**.

La punción con fines diagnósticos se inicia en 1882, cuando *Gunter* utiliza la punción transtorácica con el fin de obtener microorganismos para su identificación en pacientes afectados de neumonía. En 1884 *Kroning* logra el primer diagnóstico de cáncer de pulmón utilizando la técnica de punción.

En realidad el concepto de “Citodiagnóstico” aparece con *Koeniger* en 1908.

En 1914, mediante el estudio microscópico de la secreción obtenida a través del pezón, *Natham* realiza la primera descripción citológica del carcinoma de mama. Este mismo año, *Boveri* (*Boveri T. 1904*) en contraste con *Hansemann*, presenta su hipótesis sobre la aparición de cambios cualitativos en los cromosomas de las células cancerosas.

Es de gran importancia la figura de *George N. Papanicolaou* quien, en 1917 comienza sus estudios sobre el ciclo vaginal (*Papanicolau GN., Stockard GR. 1917*) da a conocer su técnica y populariza el uso sistemático de la citología con la tinción que hoy lleva su nombre.

Feulgen R., Rossenbeck H. 1924, desarrollan una tinción específica para el “ácido timonucleico”, como entonces se denominaba al ADN.

El reconocimiento de que podían medirse las anomalías morfológicas de

células observadas microscópicamente en varias enfermedades, pero principalmente en el cáncer, ha conducido a la **citología analítica**. El investigador alemán *Jacobj* en 1925 estudió el tamaño nuclear y celular en varios tejidos, observando que el volumen de las células normales se duplica antes de la mitosis. En tiempos más recientes se ha visto que los eventos descritos por *Jacobj* corresponden a la replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular.

Debemos recordar que en 1925 el ADN todavía era conocido como "ácido timonucleico" y que los investigadores de la época no sabían nada sobre la estructura o función de esta materia en el ciclo celular. Se suponía que los ácidos nucleicos eran productos de deshecho del metabolismo de las purinas.

En 1925, según los estudios de *Greenhough*, el recuento de mitosis - un análisis morfométrico - se descubría como un poderoso factor pronóstico en el cáncer de mama.

Young en 1930 comienza a practicar biopsias por punción de la mama, con estudio histológico del material obtenido.

Heiberg KA. y Kemp T. 1929, probablemente fueron los primeros en sostener la impresión subjetiva de que el núcleo canceroso era más grande que el de las células normales. Los intentos para documentar objetivamente las diferencias medibles entre los tejidos benignos y los cánceres que asientan en

ellos fueron llevados a cabo por el patólogo alemán *Haumeder* en 1934 (¹⁸²*McCarthy WL., Haumeder E. 1934*), *Schairer* en 1935 y *Ehrich* en 1936.

Midieron los núcleos y nucléolos en lesiones benignas y malignas de mama, concluyendo que en el cáncer había un aumento en el volumen nuclear y nucleolar que, sin embargo, se solapaba con el normal.

2) CITOMETRIA:

Los esfuerzos para desarrollar los procedimientos microcitométricos en los años 30, surgieron en el grupo de trabajo del químico alemán *Einar Hammarsten*, donde se encontraba *Caspersson*, en el instituto Karolinska de Estocolmo. *Hammarsten* trabajaba con una solución de “ácido timonucleico” muy pura, desarrollada unos años antes por el químico danés *Ivar Bang*.

Generalmente se acepta que los trabajos de *Caspersson y cols. 1936*, en los años 30 marcan el comienzo de la citometría moderna. Interesado en la microscopía de polarización de tejidos animales observó que las soluciones de ADN producían claramente una doble refracción muy elevada que implicaría propiedades moleculares muy peculiares. *Rudof Signer* trabajaba con un modelo cuantitativo estudiando la forma y el peso de los derivados de celulosa; las mediciones de la muestra de ADN en su dispositivo mostraron que la

molécula de ADN era peculiar debido a su elevado peso molecular y su forma filamentosa. *A. Tiselius* desde 1937 usando ultracentrifugación y *W.T. Astbury* con cristalografía por rayos X aportaron datos más precisos sobre el tamaño y la forma molecular.

Siendo evidente que el ADN era un componente realmente curioso se suscitó un gran interés en estudiar su posible función. Empezando por obtener información sobre su localización en la célula y su comportamiento durante las diferentes fases del crecimiento celular.

Tanto el ADN como el ARN tienen una banda de absorción muy elevada en el rango medio de luz ultravioleta (UV). *Caspersson TO. y cols. 1936*, utilizando la engorrosa microfotografía UV - que tenía un gran poder de resolución - sospecharon que la elevada absorción de la cromatina estaría causada por un ácido nucleico, como demostraron en 1935 en un cromosoma en metafase.

Durante la segunda guerra mundial hasta 1947 el grupo de *Caspersson* trabajó en Suecia, prácticamente aislado de otras comunidades científicas en diferentes países. El resultado de los numerosos estudios de ese periodo fue aclarar la importancia del ADN y ARN en el metabolismo celular, especialmente en los procesos de síntesis (*Caspersson TO. 1950*). La citofotometría permitió demostrar que los ácidos nucleicos eran necesarios

para la síntesis proteica (*Caspersson TO., Santesson. 1942*). Simultáneamente *Jean Brachet* en Bélgica alcanzó conclusiones similares que publicó al terminar la guerra (*Brachet J. 1950*).

En 1942 *Caspersson TO., Santesson* demostraron que las proteínas y ácidos nucleicos en tumores epiteliales malignos eran diferentes de los de células normales. Hallazgos confirmados por varios autores, entre ellos *Mellors y cols.* (¹⁸⁶*Mellors RC. 1956*).

3) CITOLOGIA CLINICA Y PUNCION ASPIRACION CON AGUJA FINA:

El resurgimiento del interés en las células como medio para el diagnóstico es relativamente reciente, ocurrió tras finalizar la Segunda Guerra Mundial.

Una fecha fundamental en la historia de la citología es el año 1942 cuando *Papanicolau* publica sus artículos sobre el valor diagnóstico de los frotis vaginales en el carcinoma de útero (*Papanicolau GN. 1942*).

Desde entonces hasta nuestros días, la lista de autores que han aplicado las técnicas de la citología al diagnóstico de los distintos procesos que afectan a diferentes órganos, así como su evolución, no ha dejado de crecer. Y por citar sólo unos pocos ejemplos, tenemos los trabajos sobre el aparato

digestivo, en concreto sobre el carcinoma gástrico, de *Panico FG.*, *Papanicolaou GN.* y *Cooper WA.* 1950, a partir de la aspiración del contenido del estómago; sobre muestras de esófago por *Anderson HA.* y cols. 1949; de colon y recto por *Ayre JE.* 1950 ; páncreas y vías biliares por *Lemon HM.* 1949.

Simultáneamente, aparecen también los primeros trabajos en los que se da a conocer la experiencia de distintos autores en la aplicación de la citología al estudio de las células que aparecen en el sedimento urinario, y así tenemos los trabajos de *Chute R.* y cols. 1948; *McDonald JR.* 1954 o los estudios de las secreciones prostáticas realizados por *Jönsson J.*, *Fajers CM.* 1950 ; *Albers DD.* y cols. 1949; *Herbut PA.*, *Lubin EN.* 1947, a la búsqueda de células que puedan indicar la presencia de carcinomas que asienten en esta glándula.

En 1946 *Jackson D.*, *Severance AO.*, habían descrito los criterios citológicos de malignidad. *Greenhough* sobre la evaluación histológica diferenció los tumores en tres grupos según su grado de malignidad y mostró una clara correlación entre el grado histológico de diferenciación y la curación de la enfermedad. Similares resultados habían obtenido diversos autores como *White* en 1927 y *Haagensen CD.* 1933.

Uno de los mayores avances para la anatomía patológica en las últimas tres décadas ha sido el desarrollo y la aplicación de la aspiración citológica mediante punción con aguja fina. Técnica que se caracteriza por su alta

precisión de diagnóstico, inocuidad y bajo coste, pudiendo utilizarse en cualquier órgano o tumor.

La punción con aguja fina la inicia *Fagher* en 1945 obteniendo frotis sobre los que efectúa estudio citológico. A partir de este momento comienzan a aparecer trabajos sobre la aplicación de esta nueva técnica al estudio de las lesiones mamarias.

Quienes realmente le dan el impulso definitivo son *Sixten Franzen, Josef Zajicek 1960*. En la década de 1950-60 introducen la práctica de la punción-aspiración como prueba de rutina, de forma sistemática y con directa aplicación clínica, en el Hospital Karolinska de Estocolmo. Caracterizan los cuadros citológicos llamando la atención sobre esta nueva forma de diagnóstico y desarrollan la técnica de la punción-aspiración con aguja fina, creando los instrumentos adecuados y sistematizando el estudio del material obtenido. Esta técnica se había manifestado ya como una gran ayuda en el diagnóstico morfológico previo al acto quirúrgico.

En España la punción citológica se introduce en la década de los sesenta, pero no es hasta 1970 cuando comienzan a aparecer los primeros trabajos. Merecen ser mencionados, entre otros, *Vilaplana E., García Ferrer JC. 1970;*
^{261, 262} *Vilaplana E., Jimenez Ayala M. 1972; Fernandez Cid A. y cols. 1976;*
Gonzalez Merlo J. 1977; Azúa Blanco J. 1976, todos ellos sobre patología

benigna y maligna de mama; *De Agustín P. 1982; Pérez Barrios A. 1983; García Riego A. 1984*, utilizando la punción transtorácica con aguja fina; *Vilaplana E. 1980; Azúa J., Gómez Aracil V. 1981;* ²⁰⁷*Pérez Barrios A., De Agustín P. 1983;* ⁹⁶*Lostalé F. y cols. 1987*, estudiando la punción-aspiración en diferentes órganos como el riñón y glándulas suprarrenales.

El inconveniente de la clasificación histológica estaba en que es una valoración subjetiva de las imágenes microscópicas, lo que dificulta su reproductibilidad. Para subsanar esta contrariedad numerosos trabajos han evaluado diversas variables "medibles" considerando su importancia pronóstica: variabilidad nuclear *Black* en 1955 y *Bloom W. 1957*, grado histológico *Bloom W. 1957*, índice mitótico *Bloom W., Richardson WW. 1957*, tamaño del tumor primario *Alderson MR. y cols. 1971*; y ²⁶⁸*Wallgren A. y cols. 1976*, número y extensión de las metástasis nodulares axilares *Alderson MR. y cols. 1971*, tamaño nuclear ^{269, 270}*Wallgren A. y cols. 1976* y contenido de receptores de estrógeno tumoral *Hahnel R. y cols. 1979*.

Sommers en 1969 (*Sommers SC. 1969; Goldenbreg VE. , Sommers SC. 1969*) observó que los carcinomas intraductales de mama presentaban, generalmente, núcleos de menor tamaño que los hallados en los cánceres invasivos. Como ya comprobaron *Kallenberger A. y cols. 1967* y confirmó el estudio de *Fossa SD. y cols. 1982*, los carcinomas mamarios de grandes núcleos

presentan con mayor frecuencia poblaciones celulares no diploides. Desde entonces la correlación entre el valor del área nuclear media y el índice de supervivencia del paciente ha sido muy estudiada: *Baak J. y cols. 1985; Azúa Blanco J. 1988*. En un trabajo comunicado en el XIII Congreso Nacional de Citología (1994), ²⁹*Azúa Blanco J. y cols.*, estudiaron la correlación entre el área nuclear media y el grado de malignidad ADN (Patología 1995).

Para *Van der Linden JC. y cols. 1989* el tratamiento auxiliar en base tan sólo a la presencia de metástasis en los nódulos linfoides puede dar lugar a un porcentaje relativamente alto de sobretratamientos. La identificación de este subgrupo de “bajo riesgo” podría ser una ventaja obvia en el cuidado del paciente. Llegó a la conclusión de que tan solo el número de nódulos positivos, el porcentaje del área de los nódulos linfoides ocupada por el tumor, el estado de receptores de estrógenos del tumor primario, el índice medio de actividad mitótica y la desviación estándar de la relación de los ejes nucleares se correlacionaban, de forma significativa, con el índice de recurrencia tumoral.

Desde el informe inicial de *Jensen EV. y cols. 1971*, la cantidad de receptores de estrógenos en el tejido canceroso mamario se ha identificado como un índice importante, no sólo a la hora de predecir la respuesta a la terapia endocrina, sino como valor pronóstico. Esto ha sido demostrado por autores como *Knight WA y cols. 1977; Hahnel R. y cols. 1979*. La carencia de

receptores de hormona constata a menudo una manifestación de diferenciación celular representada también por el aumento del contenido del ADN nuclear *Sachs H., Winzer J. 1976 ; Fossa SD. y cols. 1982*. Por otra parte *Rosen PP. y cols. 1975 y ^{196, 197}1981; Maynard PV. y cols. 1978*, hallaron que el contenido de receptores de estrógenos de los tumores mamarios humanos se correlaciona de forma clara con el grado histológico tumoral. Similares resultados fueron obtenidos por *King RJ. 1980; Wurz H. y cols. 1980* y por,²⁷⁷ *Fisher B. y cols. 1981 y García Castro C. y cols. 1991*.

La idea de que el grado de anormalidad de los núcleos celulares tumorales ha influido en el pronóstico del cáncer puede encontrarse en las revistas médicas desde el comienzo del estudio citológico del cáncer. En los últimos 24 años se ha sugerido una clasificación de malignidad basada fundamentalmente en el pleomorfismo nuclear. En un principio, estos sistemas de gradación se basaron en observaciones visuales subjetivas realizadas mediante el microscopio de luz, sin embargo, hoy en día, es posible la creación de un sistema de clasificación del cáncer mamario mediante técnicas analíticas citométricas.

El descubrimiento por *Caspersson TO. 1936*, de la posibilidad de medir el ADN del núcleo celular y la demostración por su discípulo *Sandritter* en 1952 de que también es factible cuantificar las diferencias en el contenido de

ADN, son el principio básico de los intentos actuales para medir, mejor que visualizar, los diferentes tipos de anormalidades tumorales (*Stenkvist y cols. 1986*).

4) DESARROLLO DE LA CITOFOTOMETRIA :

Poco después de terminar la segunda guerra mundial, varios grupos comenzaron con trabajos citofotométricos. Entre los pioneros del análisis celular cuantitativo debemos mencionar, entre otros, a *Pollister* que midieron proteínas que reaccionaban con Millon y Feulgen. *Mirsky (Davidson EH, Allerey VG, Mirsky AE, 1963)*, *Leuchtemberger (Leuchtemberger C. 1950)* y *Lison (Lison L. 1960)* trabajaron y perfeccionaron los citofotómetros.

Mellors fue el primero que concibió la idea de un microscopio automático; en una serie de trabajos publicados entre 1951 y 1956 , él y sus colaboradores, incluido *Papanicolaou*, describieron los principios del análisis cuantitativo celular en frotis cervicales y fluidos pleurales, basado en métodos de tinción convencionales o en tinciones de fluorescencia. (*Mellors RC. 1953; Mellors RC. y cols. 1952*)

Mellors confirmó los datos proporcionados por *Pollister AW. 1952*, *Leuchtemberger C. y cols. 1954* y *Caspersson TO., Santesson. 1942* de que la

cantidad de cromatina nuclear en células escamosas cancerosas exfoliadas de la cervix uterina era significativamente diferente de la de un epitelio normal homólogo (*Mellors RC., Kupfer A. 1953*). Esto condujo a la publicación en 1956 de “los principios citológicos, citoquímicos y ópticoelectrónicos fundamentales del desarrollo de un microscopio automático para el citodiagnóstico preliminar” (*Mellors RC. 1956*). Las ideas de *Mellors* llevaron al desarrollo del primer aparato semiautomático para la detección de células cancerosas en frotis cervicales: el Citoanalizador de *Tolles* (²⁴⁸*Tolles WE., Bostrom RC., Sawyer HS. 1956*), entre 1953 y 1956.

El aparato fue diseñado para medir, sobre frotis teñidos, el diámetro de las células y sus núcleos y los coeficientes de extinción (densidad óptica) del núcleo, el cual refleja la cantidad de colorante retenido. Disponía de un circuito control para eliminar las señales generadas por agrupamientos de células. En artículos publicados en 1961,^{249, 250} *Tolles WE. y cols. 1961*, describieron los resultados de mediciones sobre portas vaginales y cervicales. El estudio documentó que las tres mediciones efectuadas, es decir, diámetro celular, diámetro nuclear y densidad óptica nuclear, fueron suficientes para identificar poblaciones anormales de células.

En general, el uso de la citofotometría de absorción aumentó rápidamente después de 1950. *Sandritter* y su grupo en Alemania, realizaron el primer

estudio realmente amplio sobre tumores, cuantificando las diferencias en el contenido de ADN.

A principios de los 50 se desarrollaron métodos citofotométricos diferentes. Entre ellos la microinterferometría, un sistema de medir la interferencia óptica construido por *Dyson BC. y cols. 1963* en Inglaterra y mejorado por *Davies HG. y cols. 1954*. Proporciona información sobre el peso seco de un objeto biológico de dimensiones microscópicas. Hoy en día suplementa la citofotometría de absorción. El microscopio electrónico cuantitativo desarrollado por *Bahr, Carlson y Zeitler* en 1961 proporciona una resolución mucho mayor. La fluorometría es un tercer método muy potente que no queremos dejar sin mencionar.

Caspersson estaba interesado en conocer la cantidad total de distintas sustancias, como el ADN o el ARN, en cada célula o núcleo íntegros, pero necesitaba recoger esta información de un gran número de células. Los instrumentos existentes hasta el momento eran demasiado lentos y empezaron a diseñar una serie de instrumentos rápidos para los tres métodos de medición que acabamos de citar.

En los años 50 al 70 las diferentes técnicas citofotométricas estuvieron en un proceso continuo de desarrollo, y aún lo están. Algunos de los avances posteriores son impresionantes desde el punto de vista técnico, consisten en la

combinación de los sistemas básicos de medición con sofisticadas formas de análisis de datos e informatización.

Debido a la llegada de equipos electrónicos mejorados y ordenadores digitales en los años 50 y 60, el análisis de ADN celular (estático y flujo), la clasificación celular (*Kamentsky LA. y cols. 1965; Atkin NB. 1965; Bohm N., Sandritter W. 1975*) y el análisis del modelo de cromatina cuantitativo (*Wied GL. y cols. 1968*) empezaron a ser aplicados en mucha mayor escala que antes de la segunda guerra mundial. Desde el comienzo de los 60, *Caspersson TO.* y más tarde también *Auer* en Suecia; *Bartels PH., Bahr GF., Wied GL. 1969; Koss LG.;*^{148, 189} *Frost;*⁴⁷⁻⁵⁰ *Bibbo M.* y^{100-102, 216, 251} otros en USA;^{6-8, 218} *Atkin NB.* en Inglaterra; *Sugar J. 1962*, en Hungría; *Bohm N., Sandritter W. 1975; Grundmann E. 1961* y otros en Alemania y otros investigadores de varios países midieron el contenido de ADN celular.

La introducción de los ordenadores, primero por *Prewitt JM., Mendelsohn ML. 1966*, y luego por *Wied GL. y cols. 1979*, dio un nuevo rumbo al análisis celular.

5) CITOMETRIA DE FLUJO Y DE IMAGEN :

La idea fue desarrollada conjuntamente por el patólogo *Herbert Derman*

y *John J. Hofler* que entonces -1960- trabajaba en IBM. Ellos sugirieron que el sistema de *Caspersson* de análisis celular podría ser modificado y transformado en un sistema rápido y clínicamente útil usando técnicas de reconocimiento del patrón basadas en ordenador, aplicadas a ópticas de cuarzo con una fuente de luz UV de adecuada longitud de onda. La propuesta incluyó la idea de acelerar la prueba usando una suspensión celular que se analizaría por registro de niveles de absorción ultravioleta. La idea de *Derman* fue rápidamente aceptada por IBM y el desarrollo del prototipo fue asignado al físico *Louis A. Kametsky*. El soporte biológico lo aportó el patólogo *Myron R. Melamed*, entonces colaborador de *Koss*, en una serie de publicaciones científicas en 1963, 1965 y 1967 (¹⁵⁴*Kametsky LA., Melamed MR., Derman H., 1965*) donde establecieron las bases científicas de la citometría de flujo y para la clasificación celular. Es de particular interés el primero de estos artículos, publicado en 1963 (¹⁵⁵*Kametsky LA., Derman H., Melamed MR., 1963*), que describió las normas fundamentales para la diferenciación entre células benignas y malignas de los frotis de cervix en un sistema estático. Son evidentes las raíces comunes de estas dos aproximaciones principales a la citología analítica: análisis de imagen de alta resolución y citometría de flujo. En consecuencia estas normas de diferenciación fueron aplicadas a la citometría de flujo.

En 1980, *Auer G., Caspersson TO., Wallgren A.*, estudiaron los modelos de distribución de las cantidades de ADN mediante técnicas de citofotometría, sobre citologías extraídas por PAAF. El resultado de su trabajo fué la agrupación de los modelos de histograma en cuatro tipos con diferente significado pronóstico, demostrando que existía correlación con el tiempo de supervivencia. Por tanto establecen que pueden identificarse los tumores de bajo y alto grado de malignidad en función de la distribución de ADN que presenten. La conclusión es que las determinaciones de ADN pueden dar información pronóstica y orientación a la terapia, en cada caso individual, además de la proporcionada por el estadio clínico y los criterios morfológicos. Posteriormente, en 1991, *Auer, Falkmer y Zetterberg* modifican su anterior definición de los histogramas de distribución de ADN.

Seguidamente numerosos investigadores han confirmado el valor pronóstico de los modelos de distribución de ADN utilizando las técnicas de citofotometría, citometría de flujo y citometría de imagen (*Charpin 1990*) (*R. Mir 1992*).

Los tumores de pacientes de supervivencia corta son considerablemente aneuploides, por esto gran parte de los estudios se orientan a la obtención de cálculos o métodos que miden la aneuploidía. Varios investigadores buscaron el nivel de contenido de ADN a partir del cual se considera aneuploide una

célula concreta. La mayoría de los autores lo sitúan en el valor 5c (*Erhardt, Auer, Fallenius 1986*) (*Auer, Falkmer 1991*) (*Longin A., Fontaniere B. 1992*). En cambio, *Stenkvist y Johansson-Browen (1991)* consideran los porcentajes de células que exceden 2,25c y 4,5c.

Un parámetro muy poco estudiado, del que últimamente comienzan a aparecer algunas referencias en la bibliografía, es el valor de la entropía. Es la medida matemática del grado de dispersión del contenido nuclear de ADN. Fue estudiado primero por *Stenkvist B., Strande G. 1990* quienes encontraron que es útil para la separación de distribuciones obtenidas de tumores malignos cuando se comparan con lesiones no malignas o controles normales. Un año después *Stenkvist y Johansson-Browen, 1991* correlacionaron la entropía con el porcentaje de células Ki-67 positivas, indicando que proporciona información sobre el grado de proliferación tumoral (⁹⁰*Bengtsson , Erikksson, Jarkrans, 1986*; ⁴⁵*Bengtsson, E. 1987*). Considerando el índice de ADN y la entropía conjuntamente separaron el 97% de las muestras de carcinoma de las muestras de individuos sanos, evidenciando la utilidad de este parámetro para confirmar el diagnóstico de cáncer.

La fracción de células en fase S y el porcentaje de células con alto contenido de ADN se han confirmado como dos factores pronósticos determinados por la medición del ADN nuclear total y el análisis del ciclo

celular (*Wagner T., Adler A., Kubista E. 1993*).

Con el propósito de realizar estudios retrospectivos con un seguimiento clínico más largo se ha trabajado mucho la cuantificación de ADN sobre secciones de tejido parafinado. Los resultados obtenidos son significativos para predecir recaídas y la supervivencia, tanto si se utiliza la citometría de flujo como el análisis de imagen. Sin embargo, ésta última parece carecer de la especificidad del flujo en correlación con el seguimiento clínico cuando se utilizan cortes histológicos (*Yuan J., 1992*). Cuando el grosor supera 5 micras aparecen problemas, como son un coeficiente de variación muy elevado y desviación a la izquierda del índice de ADN (*Cope C., 1991*).

Una alternativa mejor que permite el estudio retrospectivo es el uso de las citologías obtenidas por PAAF antes de la cirugía. Teñidas con Papanicolaou o May Grundwald-Giemsa para la visión rutinaria pueden ser decoloradas y reteñidas con Feulgen para la cuantificación mediante análisis de imagen. Tanto el índice de ADN como la fracción en fase S fueron constantes cuando se comparan con los resultados obtenidos de muestras tomadas tras la extirpación quirúrgica del mismo tumor (*Taylor S., Zachariah S. y Chakraborty S. en 1993*).

Los estudios que comparan los parámetros citométricos obtenidos de la cuantificación de ADN y los factores pronósticos clásicos del carcinoma de

mama son muy numerosos en los últimos años. La correlación existente entre la ploidía y el grado histológico es uno de los más estudiados (*Charpin, 1990*) (*Lee A., 1992*) (*Yuan J., 1992*) (*Davey, 1993*). La medición de ploidía de ADN usando los tipos de histogramas según *Auer (1980)* permite distinguir los casos de pronóstico favorable y desfavorable, con referencia a los periodos de supervivencia, con mejor reproductibilidad que el grado histológico según *Bloom y Richardson (1957)*, *F. Theissig y cols. (1991)*. El grado nuclear también presenta fuerte correlación con las características citométricas de ADN que parecen estar mutuamente asociadas: aneuploidía, fracción de proliferación y multiploidía en carcinoma mama (*Charpin, 1990*) (*Theissig, 1991*) (*Lee A., 1992*) (*Smith F. y Zappi M. en 1993*) (*Yuan J., 1992*) (*Davey, 1993*).

Auer, Caspersson y Gustafsson 1980, demostraron la utilidad de la medición de ADN para predecir la sensibilidad del carcinoma de mama a la terapia endocrina, al encontrar que existía correlación entre los modelos de distribución del ADN y los niveles de receptores estrogénicos en el carcinoma primario de mama. Como han corroborado los estudios de ³⁶*Baak y cols. (1991)*; *Longin A., Fontaniere B. y Pinzani V. (1992)*.

En otros trabajos se demuestra la correlación entre la aneuploidía y otros criterios de mal pronóstico como mayor tamaño del tumor (*Longin, 1992*; *Yuan J., 1992*), alta proporción mitótica, invasión linfática y vascular, incremento de

células ki-67 positivas y sobreexpresión de la proteína neu-oncogen (³⁶*Baak, 1991*), (*Charpin, 1990*) (*Lee A., 1992*).

Otros investigadores buscan la correlación no sólo del tipo de histograma, sino también del índice de ADN, número de células con contenido de ADN superior al límite 5c y del grado de malignidad ADN (según *Böcking*) con relación a los factores pronósticos tradicionalmente establecidos en carcinoma de mama: tamaño del tumor, estado de ganglios linfáticos, grado histológico y contenido en receptores hormonales (*Longin A., Fontaniere B. y Pinzani V., 1992*). Más recientemente se ha correlacionado directamente la presencia de células en 5c con otros parámetros pronósticos reconocidos y directamente con la evolución de tumores clasificados de baja malignidad (*Siitonen 1993*).

El índice de ADN no parece guardar correlación con ninguno de los parámetros clásicos y el estado ganglionar es independiente de los parámetros de ADN (*Longin A., Fontaniere B. y Pinzani V., 1992*) (*Longin, 1992*) (*R. Mir, 1992*).

Cualquiera de las características del contenido de ADN presenta mejor correlación con la muerte precoz que cuando se comparan los parámetros clásicos. Así lo muestran *Gilchrist K., Gray R. y van Driel Kulker (1993)* en un estudio en el que comparan la ploidía, porcentaje y número de núcleos con ADN superior a 5c frente al estado de receptores estrogénicos, número de

ganglios con metástasis y tamaño del tumor, sobre dos grupos de pacientes de Carcinoma de mama con ganglios linfáticos positivos, separados por las diferencias en el tiempo de supervivencia.

Pronto empezó a notarse que el contenido total de ADN generalmente no diferencia absolutamente entre lesiones benignas, displásicas o malignas. La ploidía de ADN no ofrece información diagnóstica adicional a la microscopía de luz para diferenciar entre determinadas lesiones benignas apocrinas o la hiperplasia ductal atípica y el carcinoma ductal de bajo grado, dado que estas proliferaciones muestran un contenido de ADN diploide (*Fisher E., 1992; Raju U., 1993*). Sin embargo, *Crissman (1990)* observó que algunas hiperplasias atípicas muestran un contenido anormal de ADN compatible con la transformación neoplásica, lo que podría tener significación para el diagnóstico precoz del cáncer. Aunque el índice de ADN y el porcentaje de las fases G1-S-G2 muestran diferencias entre lesiones benignas y malignas, para separar correctamente el 100% de las lesiones *Molnar (1992)* necesitó utilizar a la vez varios parámetros morfométricos y densitométricos.

En general, al revisar los estudios comparativos encontramos que ambos métodos de cuantificación de ADN, la citometría de imagen y la de flujo, muestran buena correlación entre sí, ofrecen resultados similares, pero tienen ventajas individuales y se consideran técnicas complementarias en el análisis

de la ploidía de ADN y la proliferación (*McFadden 1990; Dawson A. 1990; Cohen 1991; Cope 1992; Lee A. 1992; Yuan J. 1992; Baak 1993; Lajoie G. 1993*).

Entre las ventajas del análisis de imagen destaca la pequeña muestra tisular que requiere en relación al citómetro de flujo. La discriminación visual directa de las células anormales conlleva mayor sensibilidad para identificar poblaciones aneuploides pequeñas (*Wilbur, 1990; Bauer, 1990; Lajoie G., 1993*) y especialmente en la detección de poblaciones celulares tetraploides y altamente aneuploides (*Bauer, 1990*). Generalmente los casos discordantes se deben a picos cerca de la región diploide que no han sido detectados por imagen pero si por flujo (*Lee A., Dugan J., 1991; Lee A., Wiley B. 1992*). Permite la medición automática del ADN de cientos de células con un coeficiente de variación muy bajo y la medición de características de textura sobre las mismas células (*Baak, 1993*).

En casos diploides, el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular, obtenido por ambas técnicas, fué concordante y bien correlacionado. En casos aneuploides, el análisis de imagen es más sensible que el flujo para detectar la fracción aneuploide y el porcentaje de células en fase G2M, mientras que el flujo fue más sensible para detectar la fracción en fase S. (*Luzi P., 1994*)

Yuan J. (1992) atribuye la mayor sensibilidad de la imagen para detectar la aneuploidía a las diferencias en los controles internos aplicados en cada método, por imagen utiliza células normales (linfocitos) en la misma sección que las células tumorales.

El análisis de imagen confirmó la presencia de poblaciones aneuploides escondidas en distribuciones de flujo con amplio coeficiente de variación (CV) del pico G0-G1. Es especialmente difícil la diferenciación de poblaciones normales con ADN diploide de poblaciones anormales peridiploides o aneuploides mediante citometría de flujo, ya que estas muestras tienden a presentar una distribución de ADN dispersa con amplio coeficiente de variación del pico G0-G1 (*McFadden P., 1990*)

La proliferación se evalúa mediante cuantificación por imagen de la tinción inmunocitoquímica usando anticuerpos monoclonales Ki-67 y medición de la fracción en fase S por citometría de flujo (*Lee A., Dugan J. y cols., 1991 y 1992*). Los estudios demuestran que el análisis de imagen es un método válido para evaluar la proliferación tumoral y ofrece ciertas ventajas, ya mencionadas, sobre la citometría de flujo (*Dawson A., 1990*)

Por otra parte, la citometría de flujo analiza grandes muestras celulares y produce histogramas de mejor resolución (*Lajoie G., 1993*). Se considera con frecuencia como más reproducible que el análisis de imagen debido a la alta

velocidad de la evaluación, el gran número de elementos medidos por muestra y la falta de interacción del observador. Realmente la ploidía de ADN por flujo es muy reproducible aunque la fracción de fase S es mucho más variable (*Baak, 1993*). Detecta más fácilmente múltiples picos aneuploides (tumores multiploides) y picos aneuploides cerca del rango diploide. Los casos erróneos se producen por error en la evaluación del histograma cerca de la región tetraploide (*Lee A., Dugan J, 1991; Lee A., Wiley B. 1992*).

Zbieranowski (1993) identificó falsa multiploidía en un estudio con citometría de flujo sobre lesiones benignas y malignas de mama, tiroides, pulmón, sarcoma, linfoma y tejido uterino; en ningún caso hubo evidencia histológica de necrosis que pudiera ser la causante. El estudio comparativo paralelo con citometría de imagen apoyó la presencia de falsa aneuploidía de ADN. Se ha descrito la aparición de falsos picos aneuploides de ADN en tejido normal mediante citometría de flujo, aunque no se han establecido los criterios para distinguirlos de los verdaderos picos aneuploides cerca de la región diploide. Debería realizarse un control de calidad rutinario para identificar las posibles causas de falsa multiploidía de ADN cuando se mide el contenido de ADN usando citometría de flujo.

Los casos que presentan resultados discordantes entre ambos métodos de cuantificación de ADN pueden deberse a error en la muestra, heterogeneidad

tumoral y pérdida selectiva de poblaciones celulares durante el proceso (*Bauer, 1990; Cohen, 1991*). Los dos métodos pueden no detectar poblaciones aneuploides escasas, presumiblemente por errores en la preparación de la muestra (*Bauer, 1990*).

D.- FUNDAMENTOS BIOLOGICOS

1) ADN Y CROMATINA :

La doble hélice de ADN constituye el símbolo más familiar de la revolución biológica que se inició en 1940.

El modelo de la molécula de ADN, propuesto por *James Watson y Francis Crick en 1953*, provocó un impacto particularmente intenso al presentar su propia estructura indicios de cómo podría el ADN desempeñar sus funciones de almacenamiento y transmisión de la información genética.

Varios descubrimientos recientes en esta área de investigación han revelado que, aun pareciendo el ADN en su habitual forma bihelicoidal sensiblemente inerte e inflexible, constituye en realidad, tanto química como estructuralmente, una de las moléculas más versátiles.

El exterior de la doble hélice del ADN está dominado por los armazones de las dos hebras entrelazadas. Cada hebra, un largo polímero de subunidades llamadas nucleótidos, posee un esqueleto donde alternan grupos fosfato con un azúcar, la desoxirribosa, formando una cadena unida por enlaces covalentes: una estructura de gran cohesión, merced a que sus átomos

comparten pares de electrones.

Las cadenas exhiben polaridad, o dirección: presentan paralelismo en el dúplex, aunque con sentidos opuestos, y con paso de rosca dextrógiro.

Al anillo de azúcar de cada nucleótido se une una base: adenina (A), guanina (G), timina (T) o citosina (C).

La adenina y la guanina se denominan purinas; la timina y citosina son pirimidinas.

La ordenación de las bases nucleótidas a lo largo de las cadenas determina la información que especifica la composición de todas las moléculas proteicas de un organismo.

Las bases sobresalen del armazón azúcar fosfato proyectándose hacia el centro de la estructura.

Cada base se halla unida a otra base de la hebra opuesta mediante dos o tres enlaces de hidrógeno. Dada la estructura y tamaño de las bases, tal distribución exige que una A de una hebra se aparee con una T de la otra, y que la G se aparee con la C..

De esta forma, la secuencia nucleotídica de una hebra determina la de la otra.

Al contemplar el modelo de *Watson y Crick*, se hace difícil imaginarse la estructura del ADN como una molécula capaz de reacción alguna. La mutua

superposición de los pares de bases confiere cierta rigidez a la doble hélice.

La disposición de las bases (los elementos variables) hacia el interior sugiere una estructura destinada a proteger el código genético más que a participar en reacciones bioquímicas.

Tal apariencia es ilusoria: la doble hélice es capaz de adoptar muchas formas y de reaccionar de manera diversa con otras moléculas de la célula.

Estas características las aprovechan las células para controlar la expresión de la información genética contenida en el ADN.

Se ha descrito al genoma eucariota como si se tratara de ADN desnudo, presto a experimentar transiciones conformacionales o a interactuar con proteínas reguladoras que consiguen penetrar en el núcleo.

Las cantidades considerables de ADN nuclear aparecen íntimamente asociadas, casi sin excepción, con proteínas denominadas histonas. Estas últimas envuelven el ADN confiriéndole una forma compacta y ordenada conocida por cromatina.

La subunidad fundamental de la estructura cromatínica es el nucleosoma.

Cada nucleosoma posee una parte central, el centrosoma, en el cual se enrollan en superhélice, alrededor de un octámero de histonas, dos vueltas de

ADN bicatenario, cada una de unos 83 pares de bases de longitud.

El nucleosoma representa sólo el nivel inferior de la estructura cromatínica. El siguiente nivel se caracteriza por el enrollamiento de rosarios de nucleosomas que adoptan la forma de solenoides y constituyen fibras de alrededor de 30 nanómetros de grosor.

La cromatina en interfase aparece en su mayor parte no condensada; es la denominada eucromatina. Y la cromatina condensada se denomina heterocromatina.

2) CICLO CELULAR :

En su proceso de reproducción la célula atraviesa una serie de etapas que en su conjunto constituyen el ciclo celular. Clasificadas en una fase de división o mitosis y una fase de reposo o interfase. En realidad, denominar periodo de reposo a la interfase no es adecuado, puesto que es el periodo del ciclo en que la célula es más activa metabólicamente.

La existencia de un ciclo celular fue sugerida por vez primera por *Howard y Pelc (1953)* al demostrar mediante autorradiografía que el ADN se sintetizaba durante un tiempo limitado de la interfase. Esta etapa clave se denominó fase de síntesis o fase S.

Las dos fases mejor definidas, síntesis de ADN y mitosis, van precedidas por otros dos periodos: G1 previo a S y G2 previo a M. Durante estos dos periodos G además de duplicarse el contenido molecular de la célula con vistas a la división, funcionan importantes mecanismos de control que condicionan el progreso de la célula a la siguiente fase del ciclo.

En las células de los mamíferos, tanto en cultivo como en el organismo, las duraciones de las fases S, G2 y M tienden a ser constantes en todas las células. El ciclo se completa entre ocho horas y cuatro días. La fase S dura alrededor de ocho horas; G2 de cuatro a cinco horas; y M aproximadamente dos horas. La duración de la fase G1 puede variar mucho con las fluctuaciones ambientales como las del suministro de nutrientes, que determinan las distintas duraciones del ciclo celular en diferentes poblaciones celulares o en una misma estirpe sometida a diferentes condiciones ambientales.

Para el desarrollo ordenado de esta serie de etapas se requiere la expresión ordenada de una serie de genes denominados genes de ciclo de división celular, que se traducen en la producción y activación de una serie de moléculas reguladoras de la progresión a través del ciclo celular. Actualmente se conoce que en la compleja regulación del ciclo celular intervienen directamente dos y posiblemente tres o cuatro genes cuyos productos forman un complejo regulador, que es controlado a su vez por la acción de otros genes

(Nurse P. 1990)

2a) FASE G1:

La fase G1 marca el comienzo del ciclo celular para cada una de las dos células hijas procedentes de una división anterior. En esta fase la célula crece continuamente y se prepara para la replicación del ADN.

Una característica de la fase G1 es la variabilidad en su duración. Las células que se reproducen rápidamente tienen periodos G1 cortos. Cuando los ritmos de reproducción son más lentos, las células permanecen en G1 durante más tiempo.

En el cuerpo humano las células somáticas detienen su crecimiento cuando el órgano ha alcanzado la madurez. El ciclo se para al final de G1, es decir, antes de que comience la replicación del ADN. Este punto se denomina "punto de restricción". A este nivel se regula la reproducción celular (*Pardee A.B. 1974*).

Si la célula debe volver a su ciclo es necesario que comience en este mismo punto. Una hipotética proteína actuaría como señal para iniciar la reactivación. El mejor ejemplo de reactivación lo constituyen las células hepáticas cuando se ha perdido una porción de este órgano. Comienza una rápida división celular, demostrando que las células de algunos órganos se

dividen solamente cuando se necesitan y se detienen cuando el órgano está regenerado.

Cuando las condiciones ambientales lo indican, como el contacto con su propio tejido o tejidos vecinos, las células pasan de G1 a una fase estacionaria o fase G0 en la cual el metabolismo celular esencial se limita a un modelo de sostén.

2b) FASE S :

Se inicia con la aparición de un “activador de la fase S” en el citoplasma. El comienzo está señalado por la activación de la transcripción de un cierto número de genes. Algunos codifican enzimas relacionados con la replicación del ADN. Otros son genes codificadores de histonas, proteínas que se unen al ADN recién sintetizado.

La replicación del ADN se realiza de forma ordenada en las llamadas unidades de replicación. El mecanismo que controla la sucesiva activación de unidades de replicación asegura que todas las unidades se repliquen y que cada una no lo haga más de una sola vez en condiciones normales.

2c) FASE G2 :

La fase G2 va desde el final de la replicación del ADN hasta el comienzo de la mitosis. Durante esta fase aparecen ciertas proteínas como el “factor promotor de la maduración” (FPM) que produce la condensación de los cromosomas en las células interfásicas.

2d) FASE M :

La mitosis se inicia con la profase, periodo de condensación cromosómica inducido por el FPM. Es la parte más larga de la mitosis al final de la cual la lámina y envoltura nuclear desaparecen. Se denomina prometafase al periodo de transición entre la profase y la metafase, se caracteriza por el movimiento de los cromosomas hacia un plano situado en el centro de la célula llamado placa metafisaria. Este desplazamiento requiere la integridad del huso mitótico. La consecución de este alineamiento viene seguido por la metafase que en las células somáticas dura sólo unos minutos. El comienzo de la anafase es brusco y viene marcado por la separación de las dos cromátidas simultáneamente en todos los cromosomas. Los dos grupos de cromosomas hijos se desplazan a polos opuestos. La telofase comienza con la llegada de los dos grupos de cromosomas hijos a los polos celulares. Los cromosomas se descondensan y se vuelven a formar la envoltura y la lámina nucleares en torno

a ellos. Simultáneamente el resto de los cambios de la profase revierten. Reaparece el nucleolo, se reanuda la síntesis de ARN y se acumulan proteínas nucleares. El huso mitótico se disgrega y las moléculas de tubulina liberadas se reagrupan en el citoesqueleto de la célula interfásica. Seguidamente la célula entra en la fase G1 del siguiente ciclo.

La citocinesis es la división del cuerpo celular en dos células hijas. Comienza al final de la anafase o inicio de la telofase, siendo el plano de división perpendicular al eje longitudinal del huso. La citocinesis es un proceso contráctil cuyo mecanismo se localiza en el anillo de contracción formado por microfilamentos de actina y miosina. El anillo de contracción reduce la conexión entre las dos células hijas a un estrecho puente que contiene un comprimido haz de microtúbulos interdigitantes del huso mitótico, el cual desaparece cuando las dos células hijas se independizan.

3) ONCOGENES Y CÁNCER :

La palabra cáncer es una palabra genérica. En realidad no hay un cáncer, sino que una de las características más importantes es la enorme variabilidad morfológica y pronóstica existente, con más de 200 tipos de neoplasias descritas y multitud de subtipos histopatológicos.

Cada una de las enfermedades cancerosas difiere en su origen, localización y manifestaciones.

No obstante, hay algo común en todas ellas que permite englobarlas bajo el término cáncer. Llamamos cáncer a todo proceso que evoluciona con cuatro características:

- 1) un aumento del número de células sobre el que es normal para el funcionamiento del organismo, a lo que se llama hiperplasia.
- 2) un acumulo en forma de masa o bulto, conocido como neoplasia; como excepción, gran parte de la masa se dispersa en la sangre en las leucemias.
- 3) una serie de anomalías en la forma y función de las células, designadas como heterotipia.
- 4) un metabolismo incompatible con la vida del organismo portador, es decir, que es intrínsecamente deletéreo.

El cáncer se debe a la transformación neoplásica de una célula somática producida por una alteración de las regiones del ADN que regulan la proliferación celular, entre las cuales se encuentran las que contienen los oncogenes y los genes promotores de los oncogenes, que estimulan su actividad.

Recientemente, más de 40 oncogenes han sido descritos con mecanismos biológicos muy diferentes. La alteración de los oncogenes y otros genes en la

célula cancerosa puede deberse a una mutación, que es un cambio químico en el orden de sucesión de las bases purínicas y pirimidínicas del ADN que codifican la síntesis de proteínas y enzimas, o a una ampliación génica, como consecuencia de la cual los oncogenes y otros genes producen un exceso de proteínas o enzimas.

Las proteínas de los oncogenes, que a su vez son enzimas de gran importancia funcional, actúan como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y factores de diferenciación celular.

Conjuntamente con los oncogenes, se han descrito diversos genes, con características supresoras, de enorme importancia en el desarrollo del cáncer.

4) COMIENZO Y DESARROLLO DE LA NEOPLASIA:

El conjunto de acontecimientos que suceden desde el comienzo de las modificaciones celulares iniciales de las que surge el crecimiento neoplásico, hasta el final de la evolución clínico patológica del paciente afectado se conoce como historia natural del cáncer.

Aun cuando *Willis RA. 1960*, definió el cáncer como una “ masa anómala de tejido cuyo crecimiento excede y no está coordinado con el de los tejidos normales y persiste, de un modo igualmente excesivo, después del cese de los

estímulos que provocaron el cambio”.

Diferentes observaciones en humanos y en animales de experimentación indican que la etiología del cáncer es multifactorial y que la neoplasia es el resultado de un proceso de etapas consecutivas, entre las cuales las primeras corresponden a los períodos de iniciación y de promoción, que irán seguidas de la progresión de la enfermedad, con crecimiento de la masa y eventual infiltración de las estructuras donde asienta el tumor y diseminación metatásica del mismo. La duración de estas etapas es variable.

4.a) Fase de inducción (iniciación y promoción) :

La iniciación del proceso de transformación neoplásica puede producirse por distintos agentes causales (radiaciones, sustancias químicas, virus...) que producen una alteración permanente e irreversible en cierto número de células del organismo.

La promoción es el fenómeno reversible que ocurre consecuentemente a la iniciación y por lo general, precisa la exposición crónica a diferentes factores promotores.

Es muy probable que la iniciación sea el resultado de un acontecimiento mutacional al nivel de células “diana”, mientras que la promoción parece ser consecuencia de la alteración de la expresión genética.

El cáncer, como la mayoría de las enfermedades, es el resultado de la

interacción entre el huésped y su ambiente; las tres categorías que determinan el riesgo a padecer una enfermedad cancerosa corresponden a:

- Carcinógenos,
- Cocarcinógenos
- Factores predisponentes.

La transformación neoplásica es facilitada por la duplicidad celular activa durante la cual las células son más susceptibles de sufrir alteraciones bioquímico/genéticas sutiles.

Estas lesiones de proliferación regenerativa, hiperplásica o displásica, en las que frecuentemente surgen poblaciones (clones) celulares con fenotipo neoplásico, se conocen con el calificativo de lesiones o estados precancerosos; no obstante esta denominación es ciertamente inadecuada, puesto que no siempre se puede tener la certeza - al aplicarlo en un caso individual - de que estas lesiones progresaran hacia una neoplasia.

4.b) Fase de crecimiento y propagación (progresión neoplásica) : -

Las neoplasias malignas se caracterizan por una evolución polifásica que, iniciada en la transformación neoplásica de una célula o de un grupo celular, concluye con la curación o muerte del paciente.

El tiempo transcurrido entre la aparición de la primera célula cancerosa

y las manifestaciones clínicas perceptibles del tumor se conoce como vida oculta del cáncer o fase invisible, su duración depende de la precocidad de los signos clínicos de alarma, de la velocidad de proliferación de las células neoplásicas y de la capacidad defensiva del organismo.

La diferenciación tumoral se refiere al grupo de semejanza (morfológica y funcional) de las células neoplásicas con las correspondientes normales.

Cuanto mayor sea el parecido al tejido de origen, tanto mejor será la diferenciación, estableciéndose gradaciones de diferenciación que suelen relacionarse con el mejor o peor comportamiento biológico de los tumores.

La anaplasia significa una reversión desde un alto nivel de diferenciación hasta otro muy bajo. Hay, sin embargo, pruebas evidentes de que los cánceres surgen de células de reserva (primitivas o células madre) presentes en todos los tejidos especializados.

El cáncer bien diferenciado evoluciona a partir de la maduración o especialización de células proliferantes no diferenciadas, mientras que el tumor maligno indiferenciado deriva de una proliferación sin maduración de las células llamadas células de reserva.

La falta de diferenciación no es, por tanto, una consecuencia de la dediferenciación.

La implicación de este concepto es algo más que una pura disquisición

académica, pues aun cuando muchas células pierden su capacidad de replicación al irse especializando, en la neoplasia puede conservarse la capacidad de replicación junto con la especialización.

La falta de diferenciación o anaplasia se traduce en una serie de cambios funcionales y morfológicos: variación de forma y tamaño de células y núcleos; aumento del número de mitosis, a veces con mitosis atípicas, formación de células tumorales gigantes.

El grado de atipia nuclear suele también relacionarse, en proporción directa, con la capacidad agresiva del tumor; no obstante existen excepciones.

4.c) Indices de crecimiento de la proliferación neoplásica :

En un intento de evaluar los índices de crecimiento de tumores, *Collins* desarrolló la hipótesis del tiempo de **duplicación o doblamiento**; es decir, el tiempo que emplea el tumor para duplicar su volumen inmediatamente anterior.

Si se extrapolan retrospectivamente las curvas de crecimiento de las fases perceptibles del crecimiento neoplásico se deduce que el cáncer, al menos en los animales de experimentación, se origina en una sola célula.

El diagnóstico de cáncer suele hacerse cuando la masa tumoral alcanza cierto tamaño y, de forma aproximada, el crecimiento progresivo del tumor

puede interpretarse del siguiente modo; la célula cancerosa tiene un tamaño aproximado de 10 micras, por lo que deben transcurrir unas 20 duplicaciones para que se llegue a un nódulo tumoral de 1 mm. de diámetro, a través de sucesivas divisiones.

Este nódulo es indetectable clínicamente y generalmente no origina síntomas.

A los 30 doblamientos el nódulo mediría 1 cm. de diámetro y sería susceptible de diagnóstico precoz. Con 40 duplicaciones la masa tumoral alcanzaría, aproximadamente 1 Kg., que, aun siendo compatible con la vida estaría en equilibrio inestable, pues otros 5 doblamientos producirían unos 35 Kgs. de tumor y con otros 5 más se llegaría a la hipotética masa de 1.000 Kg.

En consecuencia, la duración máxima de un cáncer sería el tiempo necesario para que se efectúen unas 40 duplicaciones, y la mitad de todo el proceso (es decir, unos 20 doblamientos) sucede en una fase indetectable clínicamente.

No obstante, esta hipótesis de curva de crecimiento tumoral basada en dos parámetros (número de células y duplicaciones) lleva implícito el asumir que el índice de crecimiento es constante y que las células originales pueden dividirse en dos, las dos en cuatro, etc.; es decir, con arreglo a un crecimiento geométrico o exponencial, sin embargo, hay numerosas pruebas de que

siempre no sucede así; experimentalmente ha podido demostrarse que el índice de crecimiento tumoral descende con el tiempo.

Numerosas y complejas estimaciones matemáticas han tratado de confirmar una posible relación y así, se ha observado que estas curvas de crecimiento (incluso de los tumores más malignos y de mayor rapidez de crecimiento) pueden eventualmente alcanzar mesetas de poco crecimiento (modelo Gompertz) si los animales viven el tiempo suficiente desgraciadamente la muerte suele sobrevenir mientras los tumores están aún en los períodos puramente exponenciales de sus curvas de crecimiento.

Por el contrario, en los tumores más benignos a menudo se alcanza una meseta dentro de la vida habitual o media del animal y, a menos que suceda una progresión neoplásica posterior, la lesión puede permanecer virtualmente estacionada en cuanto a su tamaño.

El conocimiento de la cinética celular ha proporcionado datos muy valiosos sobre la velocidad de crecimiento de los tumores.

En un sistema de células en crecimiento no todas las células se encuentran ciclando, sino que existen distintas poblaciones celulares, a modo de compartimientos proliferativo o fracción de crecimiento (respecto al total de células neoplásicas), no proliferativo (quiescente o de células en reposo) y estéril (células muertas, maduras o diferenciadas).

En los dos primeros existen células madre que pueden mantener su número indefinidamente y que tienen la capacidad de proporcionar células diferenciadas y maduras.

Las células que componen la fracción de crecimiento tumoral son las que, eventualmente, pueden emigrar y producir metástasis; en realidad, las células de la fracción de crecimiento (especialmente si se encuentran en fase S) son muy sensibles a los citostáticos, mientras que las del compartimiento no proliferativo son parciales o totalmente insensibles a ellos.

Por el contrario, las células del compartimiento estéril han perdido su capacidad proliferativa, y constituyen la fracción de pérdida celular del tumor.

Finalmente, los altos índices de muerte celular, en tumores sólidos, reflejan un proceso de crecimiento ineficaz; sin embargo, parece que las células necróticas en el seno del tumor pueden estimular la proliferación activa y continuada de las células cancerosas, aumentando la fracción de crecimiento de las células tumorales viables.

Los tumores malignos se componen de una población celular en incremento constante que, aunque puede no ser regular, rápida o eficiente, está presente hasta la muerte del enfermo; en cambio, la población celular de los tejidos normales prolifera sólo hasta obtener y mantener un tamaño fisiológicamente útil; es decir, en los tumores no se respeta el equilibrio

habitual entre nacimiento y muerte celular, terminando por sobrepasar las tasas de generación celular a las de muerte celular.

Esta diferencia biológica podría radicar, en gran medida, en función de la duración del ciclo celular (o sea, del tiempo transcurrido desde que una célula nace hasta que se divide o muere).

5) PLOIDIA, EUPLOIDÍA, ANEUPLOIDÍA Y POLIPLOIDÍA :

5.a) PLOIDÍA :

Se denomina ploidía al contenido de ADN celular. *Swift en 1953* demostró que todos los núcleos de un individuo tienen una cantidad constante de ADN. Apoyó la teoría de que el ADN contenía la información genética y que durante la diferenciación de los tejidos somáticos no hay pérdida de información.

La técnica empleada fue la tinción del ADN por el método de Feulgen con cuantificación de ADN mediante citofotometría.

Todas las células de un organismo contienen una cantidad $2c$ de ADN, es decir, son diploides a excepción de los gametos que tienen la mitad, es decir, $1c$.

Algunos tejidos como el hígado contienen células poliploides con núcleos

4c y 8c. La citofotometría combinada con la tinción del ADN por el método de Feulgen reafirmó los resultados de la autorradiografía en el sentido de que la replicación del ADN tenía lugar en un período concreto de la interfase, la fase S, finalizada la cual, los núcleos contenían una cantidad de ADN tetraploide (4c), valor que se mantiene en la fase G2 y primera fase mitótica.

Este mismo autor en 1953 utilizando la misma técnica demostró que la cantidad de ADN nuclear o ploidía era característica de la especie.

5.b) EUPLOIDÍA :

Se refiere al contenido de ADN que es múltiplo exacto del complemento haploide. Es frecuente hacer sinónimos entre euploidía y ploidía normal.

5.c) ANEUPLOIDÍA :

Indica un contenido cromosómico que no es múltiplo exacto del haploide. Se produce por ganancia o pérdida de uno o más cromosomas.

La aneuploidía en las células tumorales por defectos de la mitosis constituye un parámetro muy significativo en el diagnóstico y pronóstico de neoplasias.

La aneuploidía suele producirse por fallo en la disyunción de los

cromosomas durante la meiosis o la mitosis, con ganancia o pérdida de uno o más cromosomas o fragmentos cromosómicos.

5.d) POLIPLOIDÍA :

Se define como el contenido cromosómico o de ADN que es múltiplo exacto del complemento haploide, pero supera el contenido diploide.

Se encuentra en condiciones normales en diferentes tejidos como el hígado, y los megacariocitos de la médula ósea.

En muchos casos la población poliploide se convierte en dominante y, además, en los tumores las células con elevado contenido en ADN presentan valores que no son múltiplos exactos del complemento haploide, por lo que sería más preciso hablar de hiperploidía o aneuploidía.

6) TUMORES Y PLOIDÍA :

Cuando una lesión tumoral es clínicamente detectable suele presentar un contenido de ADN anormal. Ni la causa de la acumulación de ADN en los núcleos de las células malignas, ni las consecuencias de este fenómeno son del todo conocidas.

El contenido elevado de ADN celular, comenzó a estudiarse en los años

50, coincidiendo con las primeras investigaciones citofotométricas de ADN (Swift, 1953).

Sin embargo, en los últimos 20 años un importante número de autores ha demostrado un contenido anormal de ADN en la población celular de tumores de diversas localizaciones y estirpes histológicas: *Sandritter W. en 1966; Atkin N.B. en 1972; Cassperson T., Auer G.U., Fallenius A. en 1986; Auer G.U., Backdahl M., Forsslund G.M., Askensten U.G. en 1985; Bauer K.D., Lincoln S.T., Vera Roman J.M. y cols., en 1987; Aufferman W. 1984; Kallioniemi, OP. 1987-8;* ^{57, 58, 59} *Böcking A. en 1989 y 1990, García Bonafé M. y cols. 1991;* ⁹⁷ *Albe X. y cols. 1995; Albe 1996;* ^{32, 33} *Azúa y cols. en 1996.*

Casperson y cols. en 1983 realizaron este tipo de estudios en la mucosa bronquial de perros a nivel experimental y en carcinomas mamarios humanos tratando de descifrar las primeras alteraciones del contenido en ADN en la transformación neoplásica nuclear. Encontraron un incremento del contenido de ADN paralelo a la malignidad de la lesión.

A nivel clínico la utilidad del contenido de ADN como marcador en las displasias y otras lesiones premalignas radica en la posibilidad de indicar precozmente una evolución hacia carcinoma, como se ha visto en la colitis ulcerosa (*Hammarberg y cols. 1984, Lofberg y cols. 1989*).

7) CELULAS POLIPLOIDES NORMALES Y PATOLOGICAS :

La poliploidización es una consecuencia del bloqueo en el ciclo celular normal, bien después de la síntesis de ADN con inhibición del proceso mitótico, o bien a nivel de alguno de los estadios de la mitosis. En el caso del bloqueo del ciclo celular se produce a nivel de alguna de las fases de la división celular, los cromosomas hijos no migran a los polos celulares o, si lo hacen, el citoplasma no se divide. Respecto al bloqueo a nivel mitótico son previos a la citocinesis.

Otra forma de poliploidización consiste en la ausencia total de proceso mitótico. El bloqueo del ciclo celular inmediatamente antes de la mitosis es un medio de regulación fisiológica de la proliferación celular.

Las células detenidas en G2 constituyen una población celular de reserva en ciertos tejidos como la piel.

Un trastorno de los mecanismos que operan en las fases precoces de la mitosis hace que las células omitan este paso del ciclo celular, pasen a la fase G1 y sinteticen de nuevo ADN. Este proceso se denomina endoreduplicación.

En tejidos de mamíferos el principal mecanismo de poliploidización es un bloqueo a nivel de la fase M, en especial de fases tardías.

E.- TECNICAS PARA LA VALORACION DE LA PLOIDÍA

1) AUTORADIOGRAFIA :

Se basa en la demostración de que un precursor radiactivo del ADN es incorporado por un cierto número de células de una población (*Howard y Pelc. 1951*).

Este resultado indica que la síntesis de ADN ocurre durante un período de tiempo limitado de la interfase.

Inicialmente se usó el P32 como precursor del ADN, actualmente es la timidina-H3 .

La autorradiografía se utiliza para detectar timidina radiactiva en el ADN celular. Tras un tiempo de incubación del isótopo incorporado con una emulsión de sales de plata y posterior revelado, la visualización y recuento de las células marcadas con respecto a la población global es una medida de la actividad proliferativa.

El porcentaje de núcleos celulares marcados con respecto a la población global después de un breve tiempo de incorporación de timidina-H3 se denomina "labeling index" (índice de marcado) y es una medida de la actividad

proliferativa.

Conocido el tiempo de generación o duración total del ciclo celular y el índice de marcado, puede estimarse la duración de la fase de síntesis, ya que el número de células presentes en una fase del ciclo celular en un momento dado es proporcional a la duración de dicha fase. La autorradiografía nos permite marcar selectivamente las células en fase S y estimar su duración.

Para detectar las diferencias individuales del ciclo celular se realiza la incubación del isótopo durante 24 horas, en este tiempo se obtiene la “fracción de crecimiento” que es una medida de las células que están en ciclo dentro de la población, pero si tras realizar la incubación prolongada en presencia de un precursor nuclear marcado se retira el isótopo y se sigue la evolución de las células durante varios días, el tiempo de desaparición de las marcas celulares será inversamente proporcional a la velocidad de proliferación celular.

Por consiguiente, la autorradiografía permite marcar selectivamente las células en fase S y estimar la duración de esta fase; conocer la fracción de crecimiento, lo que tiene especial importancia a la hora de instaurar tratamientos quimioterápicos.

2) CINEMICROSCOPIA :

La evolución de los cultivos celulares de células neoplásicas se puede seguir a lo largo de un tiempo mediante su filmación con una cámara de cine o video.

La filmación se realiza acoplando una cámara de cine o vídeo a un microscopio invertido.

Los cultivos celulares se mantienen en condiciones de temperatura, humedad y ambiente de CO₂ adecuados dentro de una incubadora acoplada al microscopio.

Un ordenador controla las operaciones necesarias para mantener las condiciones del cultivo y de filmación.

3) CITOFOTOMETRÍA :

Introducida en los años 50 por *Cassperson*, supuso un notable avance para la comprensión de la estructura y función de la cromatina.

En combinación con la tinción nuclear específica descrita por *Feulgen* y *Rossenbeck en 1924* permitió la cuantificación del ADN nuclear.

Se descubrieron hechos biológicos de importancia trascendental como la

constancia del valor $2c$ para todas las células de un organismo a excepción de los gametos y para todos los organismos de una misma especie.

También la citomorfometría se aplicó al estudio de los tumores, se descubrió que las células tumorales no siguen la ley biológica de constancia del valor $2c$ sino que con frecuencia presenta aneuploidías o cantidades anormales de ADN.

Esto ha hecho que desde hace unos años se defienda el interés de la cuantificación de este parámetro en el diagnóstico morfológico, especialmente en el terreno de las displasias.

Al realizarse un control visual que permite una selección rigurosa de las células a medir, se evita incluir en la muestra detritus o acúmulos celulares que interfieren en la cuantificación.

Sin embargo, el estudio del contenido de ADN mediante citofotometría es muy laborioso y de difícil realización. Por ello, es un método empleado a nivel experimental.

Se basa en la tinción de Feulgen sobre frotis citológicos para posteriormente fotografiar los núcleos celulares teñidos.

Según la intensidad del colorante captado por el núcleo y fotografiado, se comparan las células problema con las células control de la misma preparación pudiendo averiguar la ploidía con histogramas similares a la

citometría de flujo. El estudio del contenido de ADN mediante citofotometría es muy laborioso y de difícil realización

4) CITOMETRÍA DE FLUJO :

Introducida en la última década, es la técnica más ampliamente utilizada para la evaluación de la ploidía.

Se basa en la detección del fluorocromo unido a un determinado compuesto celular basándose en la fluorescencia emitida al pasar las células por un capilar que es excitado por láser, mercurio, xenón..

Su utilización para la cuantificación de ADN requiere una preparación previa de la muestra, que varía según provenga de una suspensión celular o de un tejido.

Si la muestra proviene de un tejido se realiza un raspado del mismo y recogida de las células mediante una digestión enzimática. Una vez obtenida la suspensión celular se efectúa la tinción mediante técnicas de fluorescencia específicas para los pares de bases púricas o pirimidínicas, antes de realizar la tinción se añade al "pellet" unos 0.5 mls de RNAasa para evitar la tinción del ARN.

Con la tinción se habrán teñido todas las células existentes; células

neoplásicas, parenquimatosas benignas, inflamatorias, estromales y todos los detritus celulares.

Dado que todas las células al pasar por el mismo capilar van a ser medidas, cuantificadas y representadas en un histograma, podemos cometer errores de interpretación. Es necesario por tanto el estudio previo de estas células y el conocimiento de las medidas de superficie o volumen con el fin de diferenciar unas de otras, por lo menos las benignas de las malignas.

Actualmente utilizando simultáneamente el parámetro de luz dispersada frontalmente, y dispersión lateral, el citómetro de flujo puede programarse para separar aquellas células que satisfacen los requisitos exigidos de tamaño y fluorescencia.

También empleando anticuerpos monoclonales podemos separar las células neoplásicas del resto de las células.

Una vez realizada la separación de subpoblaciones que no nos interesan, se lleva a cabo la cuantificación con controles internos de buena calidad. Si no se ha procedido a la separación se utilizan controles externos menos precisos y diferentes en contenido de ADN con respecto a la muestra en estudio.

El resultado de la cuantificación se presenta como un análisis de las distribuciones del contenido de ADN mostrando los valores en un histograma.

Sobre el contenido total de ADN pueden distinguirse tres

compartimientos:

1. - Células en fase G0 y G1, con contenido de ADN 2c.
2. - Células en fase G y M, con contenido de ADN 4c.
3. - Células en fase S con un contenido de ADN con valores entre 2c y 4c.

En la citometría de flujo, al faltar el control visual de las células medidas, la desventaja respecto al citometría mediante análisis de imagen es que pueden incluirse artefactos, y como ventaja la rapidez con que se realiza la cuantificación de un elevado número de células.

5) CITOMETRÍA MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN :

Se analiza una imagen estática, para ello se utiliza un microscopio óptico con objetivos de alta resolución, una cámara de video en blanco y negro, un monitor donde visualizar la imagen y un ordenador personal con un programa.

Ofrece la ventaja de poder seleccionar únicamente las células tumorales, no entrando en el cálculo células normales.

La necesidad de estandarizar los procedimientos y tinciones lleva a que la mayoría de los investigadores utilicen la tinción de Feulgen y Rosenbeck,

que tiñe exclusivamente el ADN, esta tinción se considera estequiométrica, es decir, tiñe proporcionalmente al sustrato, es decir, al ADN de la célula.

Se miden un mínimo de 100 células problemas, la muestra óptima son las obtenidas por punción aspiración con aguja fina, ya que obtenemos directamente células enteras, también pueden estudiarse extensiones obtenidas a partir de la impronta del tumor en fresco, está reconocido que las determinaciones de ADN obtenidas de secciones de tejidos no son tan precisas (*Auer, Askensten, Erhardt, 1987; ¹⁵¹ Kallioniemi, OP 1988*).

Para definir el valor de la ploidía normal 2c se miden como mínimo 25 células control, se pueden usar linfocitos, células benignas del estroma o del parénquima presentes en la misma preparación.

Su ventaja con respecto a la citofotometría estriba en la mayor facilidad y rapidez de manejo.

Los modernos sistemas de imágenes abarcan morfometría, densitometría, redes neurales y sistemas expertos.

La aplicación actual más común de la citometría de imagen es para el análisis del ADN, seguido de la coloración inmunohistoquímica.

Los fundamentos de esta técnica serán descritos en el apartado de Material y Métodos.

II.- MATERIAL Y METODOS

II.- MATERIAL Y METODOS

A.- MATERIAL

Se han revisado un total de 3.724 casos con citología por Punción Aspiración con Aguja Fina, PAAF, de mama, entre las que se han seleccionado aquellos casos con diagnóstico de mastopatía fibroquística. Dentro de éste diagnóstico genérico separamos los casos según la riqueza y la actividad celular, así como dentro de estos mismos grupos, los casos en los que existe metaplasia apocrina o hidrosadenoide. En la tabla I vienen expresados los porcentajes de cada grupo diagnóstico: referidos a su propio grupo - *Porcentaje A* -, o al total de patología mamaria (3724 casos) - *Porcentaje B* -, y además se han separando los dos grupos celulares principales (1 y 2).

La denominación de estos grupos es la siguiente:

MAFIES: Mastopatía Fibroquística (M.F.) con escaso número de células.

MAFIMO: M.F. con moderado número de células.

MAFIAB: M.F. con abundante número de células.

MAFMOD: M.F. con moderada actividad celular.

MAFMAR: M.F. con marcada actividad celular.

MAFIRE: M.F. de tipo Reclús (apocrinas) con escaso número de células.

MAFIRM: M.F. de tipo Reclús con moderado número de células.

MAFIRA: M.F. de tipo Reclús abundante número de células.

MAREMO: M.F. de tipo Reclús con moderada actividad celular.

MAREMA: M.F. de tipo Reclús con marcada actividad celular.

La relación de los mismos viene expresada en la tabla I:

P.A.A.F. DE MAMA	
TOTAL: 3724 CASOS	

CASOS MASTOPATIA FIBROQUISTICA (I)			
CODIGO:	Nº CASOS:	PORCENTAJE:	
		A (I)	B (I)
MAFIES	44	14,37%	1.18%
MAFIMO	138	45,09%	3.71%
MAFIAB	59	19,28%	1.58%
MAFMOD	43	14,05%	1.15%
MAFMAR	22	7,18%	0.59%
TOTAL (I):	306	100%	8.21%

CASOS M.F.Q. RECLUS (2)			
CODIGO:	Nº CASOS:	PORCENTAJE:	
		A(2)	B(2)
MAFIRE	32	11,07%	0.86%
MAFIRM	172	59,51%	4.62%
MAFIRA	55	19,03%	1.48%
MAREMO	16	5,53%	0.43%
MAREMA	14	4,84%	0.38%
TOTAL (2):	289	100%	7.77%

TOTAL (1+2)	595	15,98%
--------------------	------------	---------------

Tabla I: Grupos diagnósticos.

De estos 595 casos se han seleccionado 62 para el estudio. Estos casos se encuentran repartidos entre 55 pacientes y se han efectuado un total de 97 cuantificaciones de ADN. El reparto por diagnósticos viene expresado en la tabla II.

		CASOS		TOTALES	
		MFQR	MFQ	ADENOFIB	TOTAL
PACIENTES	A (PPB)	31	14	2	47 = 85,45%
	B (ASO)	1	4	3	8 = 14,55%
	A+B	32 = 58,18%	18 = 32,72%	5 = 9,09%	55
CASOS	A (PPB)	32	14	2	48 = 77,42%
	B (ASO)	3	5	6	14 = 22,58%
	A+B	35 = 56,46%	19 = 30,64%	8 = 12,9%	62
CUANTIF.	A (PPB)	64	14	2	80 = 82,47%
	B (ASO)	6	5	6	17 = 17,53%
	A+B	70 = 72,16%	19 = 19,58%	8 = 8,26%	97

Tabla II: Casos, pacientes, cuantificaciones.

A = PATOLOGIA PROBABLEMENTE BENIGNA. (PPB)

B = PATOLOGIA ASOCIADA. (ASO)

Esta muestra total la dividimos en dos grupos: Los que consideramos “probablemente benignos” y que corresponden a los casos de mastopatía fibroquística más dos casos de adenofibroma , uno con moderada y otro con marcada actividad, que hemos querido utilizar a modo de pequeña incursión en lo que podría ser una muestra comparativa entre las células ductales del adenofibroma y de la mastopatía fibroquística. Al segundo grupo lo

denominamos “**pacientes con patología benigna asociada**” y corresponde a una selección de pacientes que habiendo tenido un cáncer de mama han presentado otra patología mamaria benigna en algún momento de su vida. En la tabla II se han desglosado todos los parámetros posibles en tantos por cien, siempre referido a su total, es decir las columnas y filas de pacientes, casos y cuantificaciones confluyen en sus correspondientes totales y en base a ellos se han obtenido los porcentajes. para explicar más cláramente cómo se distribuyen.

En las 97 cuantificaciones se han seleccionado 11.917 células problema con una media de 122.8 células por caso y 2779 células de control, con una media de 28.65. El total de células estudiadas ha sido de 14.696.

Para el estudio de los casos con patología asociada se han analizado las historias de 245 casos de cáncer de mama, diagnosticados por PAAF y que correspondían a 236 pacientes.

92 casos, correspondientes a 89 pacientes, tenían diagnóstico citológico de carcinoma con escasas atipias celulares (CADUPO), en 98 casos, de 94 pacientes, se encontraron graves alteraciones celulares (CADUMI) y en 55 casos, de 53 pacientes, el diagnóstico fue sugestivo de carcinoma (SUGCAR).

Estos resultados vienen expresados en la tabla III:

CASOS DE CARCINOMA		
Nº CASOS	Nº PACIENTES	DIAGNOSTICO
92 = 36,22%	89 = 37,72%	CADUPO
98 = 38,58%	94 = 39,83%	CADUMI
55 = 25,2%	53 = 22,45%	SUGCAR
TOTAL CASOS: 254	TOTAL PACIENTES: 236	

Tabla III: Casos de carcinoma.

Encontramos un total de 14 pacientes con patología benigna asociada que separamos en 6 grupos en dependencia de su aparición con respecto al cáncer:

Patología previa homolateral y contralateral, patología concomitante homo y contralateral y patología posterior homo y contralateral. De estos, sólo en 8 pacientes hemos podido efectuar cuantificaciones.

Los resultados vienen expresados en la tabla IV:

CASOS PATOLOGIA ASOCIADA			
LOCALIZACION	PACIENTES	CASOS	CUANTIFICACION
	Estudiados (PE) y Aptos (PA)	Estudiados (CE) y Aptos (CA)	(ADN)
PREVIA	8 (PE)	11 (CE)	4 ADN
HOMOLATERAL	4 (PA)	4 (CA)	
PREVIA	5 (PE)	11 (CE)	10 ADN
CONTRALATERAL	4 (PA)	7 (CA)	
CONCOMITANTE	-----NO-----	-----NO-----	-----NO-----
HOMO			
CONCOMITANTE	4 (PE)	4 (CE)	1 ADN
CONTRA	1 (PA)	1 (CA)	
POSTERIOR	1 (PE)	1 (CE)	0 ADN
HOMO	0 (PA)	0 (CA)	
POSTERIOR	2 (PE)	4 (CE)	2 ADN
CONTRA	2 (PA)	2 (CA)	
TOTALES:	14 (PE)	31 (CE)	17 ADN
	8 (PA)	14 (CA)	

Tabla IV: Casos patología asociada.

En total se han estudiado 14 pacientes (PE) de las cuales solo en 8 (PA) se han podido efectuar cuantificaciones. De estas 14 pacientes se han estudiado 31 casos (CE), de los cuales 14 (CA) han sido aptos y en ellos se han efectuado 17 cuantificaciones (ADN).

Para una mejor comprensión de las cifras desarrollamos a continuación la explicación real del estudio de una paciente, que ha generado distintos casos y de estos se han cuantificado solo una parte de ellos.

En el caso de A.S.C. (Tabla VIII) en realidad es una paciente estudiada (1 PE), que ha sido apta (1 PA.) para nuestra investigación (1 PE. = 1 PA.), presentando patología de tres categorías diferentes:

- *PREVIA HOMO: 3 casos estudiados (3 CE.), pero ninguno apto (0 CA.), es decir $3\text{ CE} = 0\text{ CA}$.*
- *PREVIA CONTRA: 4 casos estudiados (4 CE) de los cuales 4 fueron aptos (4 CA) y de ellos se hicieron 7 cuantificaciones (ADN), resulta entonces: $4\text{ CE.} = 4\text{ CA.} = 7\text{ ADN}$.*
- *CONCO CONTRA: 1 caso estudiado (1 CE.) que fue apto (1 CA.) Y se cuantificó, siendo por tanto $1\text{ CE.} = 1\text{ CA.} = 1\text{ ADN}$.*

Podemos resumir diciendo que ésta paciente al estar incluida en tres categorías diferentes figura entonces como PE y PA dentro de esos diagnósticos, apareciendo así como $3\text{ PE}=2\text{ PA}$ en la tabla IV y para el total representa simplemente una paciente ($1\text{ PE}=1\text{ PA}$). Además se han analizado 8 casos (8 CE.) que fueros aptos 5 (5 CA.) de ellos y se llevaron a cabo un total de 8 cuantificaciones (8 ADN).

La diferencia entre los casos existentes y las cuantificaciones radica en la imposibilidad de realizar una cuantificación sobre un material celular escaso o mal conservado. El porcentaje de casos útiles para cuantificar, 53.12%, es similar al que hemos encontrado en otros estudios con el mismo método de recogida de material sobre citologías antiguas. Hay que tener en cuenta que sobre un frotis podemos llegar a un diagnóstico definitivo cuando, sin embargo, el número de células o su disposición no permiten su cuantificación.

1) SELECCION DE LAS MUESTRAS CITOLOGICAS :

Una vez seleccionadas las pacientes con diagnóstico de mastopatía fibroquística en cualquiera de sus variedades se revisaron las muestras citológicas de archivo de cada uno de los casos. Seleccionamos exclusivamente las preparaciones que habían sido teñidas con la técnica de Papanicolaou. El material obtenido por PAAF es teñido rutinariamente con los métodos de Papanicolaou y May Grünwald Giemsa. Entre ambas técnicas la diferencia crucial se encuentra en el método de fijación: para teñir con Papanicolaou la fijación ha sido húmeda en alcohol de 96°; para May Grünwald Giemsa ha sido secada al aire. Esta diferencia determina una variación ostensible del tamaño celular, siendo más grandes las células secadas

al aire. Esta desigual característica física condiciona unas valoraciones muy distintas en la cuantificación por lo que nunca deben procesarse de forma simultánea. Hemos optado por utilizar aquellas que habían sido fijadas en alcohol.

Antes de pasar las preparaciones al laboratorio revisamos cada una con el fin de procesar solamente aquellas que por la disposición, cantidad y calidad de sus células permiten el estudio de cuantificación. Uno de los factores que ha determinado el rechazo de muchos casos ha sido la excesiva agrupación celular. Debemos considerar que en la cuantificación las células deben estar aisladas, nunca superpuestas, no sólo por otra célula sino por otro elemento, celular o no, que pueda de alguna forma alterar su densidad óptica y darnos resultados erróneos.

Se valoró la posibilidad de utilizar cortes histológicos de bloques de parafina pertenecientes a los mismos casos, pero las referencias de otros autores (*Auer, Askensten, Erhardt, 1987*) nos decidieron por el estudio de las muestras citológicas. Es cierto que se pueden procesar los cortes procedentes de parafina, pero están sometidos a mayores factores de error. Por una parte han sufrido agresivos procesos físicos y químicos que alteran la estructura celular. Por otra parte, la propia naturaleza de tratarse de cortes de tejido determina que la valoración no sea sobre células íntegras, sino sobre secciones

de las mismas, con las consiguientes diferencias de unas células a otras. Este hecho afecta no sólo a la distribución de ADN célula a célula, sino también y de forma inevitable a la morfometría de las mismas, no pudiendo valorar en caso de desecharlo los parámetros de morfometría clásica. De todas formas, ya hemos comentado en la introducción, que el objetivo primordial de este trabajo es el de obtener datos analíticos previos a un acto quirúrgico.

2) DEFINICION Y CARACTERISTICAS DEL MATERIAL USADO EN LA CUANTIFICACION DEL ADN :

Para el estudio citológico utilizamos un microscopio Olympus BH-2. Los núcleos celulares se captan, bien a través de un objetivo de 60x húmedo y de alta resolución, en cuyo caso la adquisición es núcleo a núcleo, o bien mediante un objetivo de 40x, lo que nos permite captar un número mayor de células en cada pantalla. La cámara de vídeo es una CCD Sony en blanco y negro, ya que vamos a comparar escalas de grises. El ordenador es un PC con 32 megabits de memoria RAM, procesador *pentium* y disco duro de 1 giga. Placa digitalizadora de imágenes, mostrándolas en un monitor estándar de video (Fig. 1).

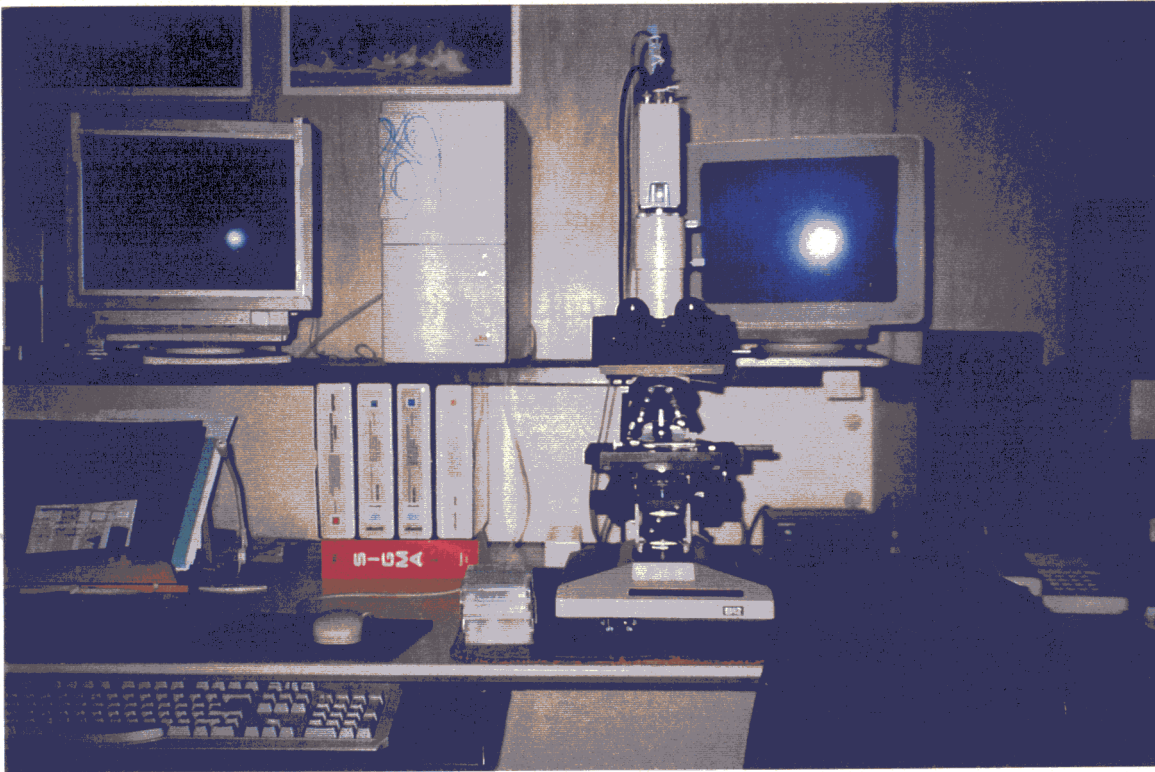


Fig. 1: Equipo empleado para el análisis de imágenes.

2a) SOFTWARE :

El software utilizado para la cuantificación del ADN, el programa TEXCAN, ha sido diseñado por *Ferrer Roca O. 1989* y su grupo de colaboradores en la Universidad de la Laguna (Fig. 2).



Fig. 2: Programa TEXCAN

Este programa permite realizar de forma interactiva la cuantificación de la ploidía del ADN y el estudio paralelo del ciclo celular, sobre citologías teñidas con Hematoxilina progresiva. La medición se lleva a cabo mediante filtros interferenciales de paso de banda lo más selectivo posible en el pico de absorvancia máxima de cada colorante. El filtro adecuado para tinciones con Hematoxilina es de 600 nm.

Cuando escogemos una imagen y su fondo se procesan pixel a pixel para

generar una imagen de densidad óptica que incluye la corrección de sombras y errores de iluminación. Indicamos cuáles son células problema o control. En el segundo caso especificando si son células parenquimatosas, estromales o linfocitos. Con esta información el programa establece el factor de corrección considerando el tipo de tinción empleada. Las imágenes de densidad óptica quedan archivadas permanentemente para evaluaciones posteriores.

B.- METODOS

1) PROCESADO DE LAS PREPARACIONES ANTIGUAS :

Revisados y escogidos los frotis adecuados originalmente teñidos por el método de Papanicolaou, son desprendidos del cubreobjetos mediante su inmersión en xilol y posteriormente desteñidos en solución alcohólica de CIH al 5%. Finalmente son teñidos de nuevo con Hematoxilina progresiva (*Gill W., Frost J.K., Miller K.A. 1974,*) durante 30 segundos.

Como mencionamos en la introducción, para la citometría de imagen la tinción más extendida es el Feulgen, cuyo valor radica en que tiñe exclusivamente el ADN. Se considera estequiométrica, es decir, tiñe proporcionalmente al sustrato. En este caso lo podemos interpretar como que tiñe específicamente el ADN de una forma proporcional a la existencia del mismo, a mayor cantidad de ADN mayor intensidad de tinción y por lo tanto mayor densidad óptica.

Esta reacción se basa en que una hidrólisis ácida de duración moderada ocasiona ruptura del Nucleótido y separación de la Base, especialmente de las bases Adenina y Guanina. El resto ácido que queda se denomina ácido

apurínico y es éste el que es capaz de reaccionar con el reactivo de Schiff. De tal forma que en realidad lo que teñimos es una fracción de ADN. Por otra parte los resultados de la tinción no son siempre iguales, ya que dependen de los reactivos utilizados para la oxidación del ADN, variando el tiempo de actuación de los mismos en función de su concentración y de la temperatura en la que discurre el proceso. Además, varían también los resultados en función del fijador previamente utilizado. En conclusión, aun considerando la tinción de Feulgen como la más específica y extendida para el ADN, debemos tener en cuenta que no tiñe todo el ADN y que está sometida a variaciones individuales en cada laboratorio. *(Thunnissen, F. B. 1997)*

Teniendo en cuenta estas características del Feulgen y su relativa complejidad de preparación y uso, que dificultan su utilización en la rutina normal del trabajo de un laboratorio clínico *(Gurley, A. 1990)*, no de investigación, nosotros decidimos seguir el consejo del programa de cuantificación y utilizar una tinción de Hematoxilina progresiva, que tiene la ventaja de su rapidez en la preparación y utilización. *(Schulte, E. K. 1992)*

La Hematoxilina progresiva va tiñendo poco a poco. En un determinado punto habrá teñido sólo al ADN, pero si sigue actuando lo hará también con el ARN y acaba tiñendo el resto de la célula. Se dice que es una tinción semicuantitativa. El conseguir el "pico estequiométrico" es una opción de

práctica, no hay reglas estrictas, entre otras cosas porque cada nueva preparación de Hematoxilina progresiva es diferente de la anterior y además el tiempo de tinción necesario varía en función de la antigüedad del colorante. Es menos específica que el Feulgen y el grado de libertad que le debemos de confiar es más amplio, siendo posible que en ocasiones estemos tiñendo más cromatina que ADN pero, como en el caso anterior, todas las muestras están sometidas al mismo proceso y por lo tanto no habrá muestras sesgadas.

La razón de utilizar la Hematoxilina progresiva frente al Feulgen es de operatividad, evidente cuando se comparan los pasos que requieren ambas técnicas (tabla A). Ambas nos van a dar una tinción válida y su diferencia de longitud de onda es escasa, por lo que no precisa un cambio de filtro en el microscopio a la hora de trabajar. Todo esto hace que la tinción con hematoxilina progresiva se pueda incluir directamente en la rutina clínica lo que favorece enormemente la cuantificación.

Tabla A: Tinción hematoxilina progresiva / Tinción de Feulgen.

Notas de la tabla A:

- (a) La preparación se sumerge en Xilol para eliminar los fijadores.
- (b) El ácido sulfuroso, solución decolorante empleada en el método de Feulgen, se debe preparar inmediatamente antes de usar.
- (c) Inmersión en xilol hasta producirse el desprendimiento espontáneo del cubreobjetos. El proceso requirió entre 3 y 7 días.
- (d) Solución de CIH al 5% en alcohol de 70°.

2) PROCEDIMIENTO PARA EL ANALISIS DE IMAGENES :

2a) SELECCION DE LOS NUCLEOS CELULARES :

Para la selección de los núcleos celulares problema y control el programa TEXCAN posee dos opciones diferentes.

- **Selección mediante "Ventanas de 25 imágenes"**

El programa solicita primero la selección del fondo y a continuación se escogen las imágenes, mediante un objetivo de 60x húmedo y de alta resolución. De cada imagen seleccionada se genera una imagen de densidad óptica que incluye corrección de sombras y errores de iluminación. De la misma forma seleccionamos las células control entre células del estroma,

células parenquimatosas o linfocitos, para las que el programa establece un factor de corrección según el tipo de tinción empleada. Siempre utilizamos controles internos, células que están en la misma preparación y por tanto han sufrido los mismos procesos físicos y químicos que las problema. La pantalla de adquisición se completa cuando se acumula un grupo de 25 células que se archiva permanentemente (figs. 3 y 4).

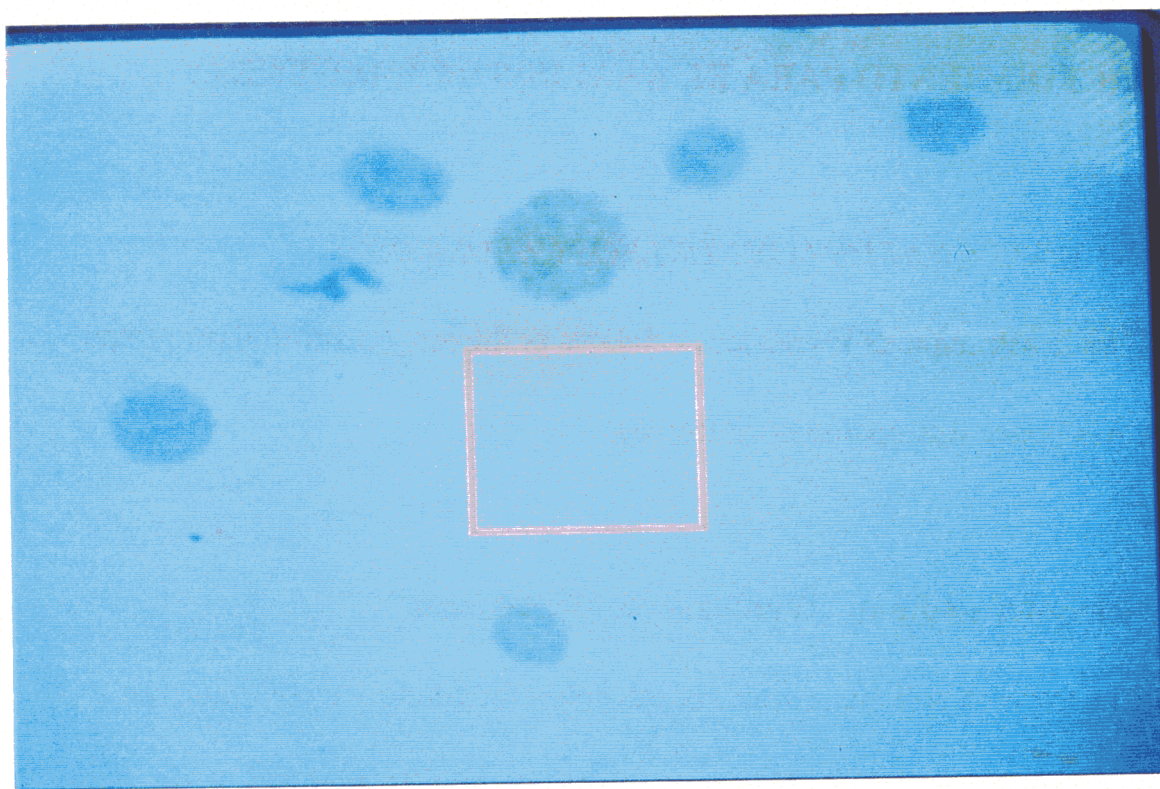


Fig. 3: Adquisición de una imagen.

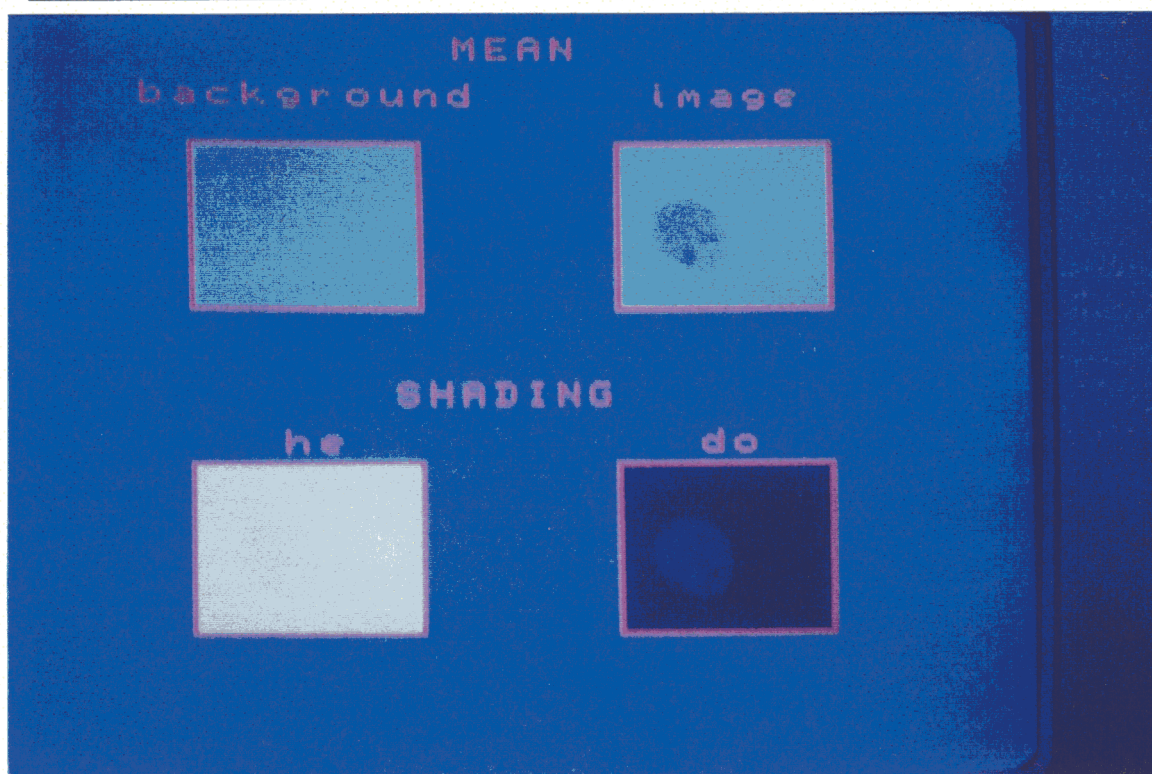


Fig. 4: Obtención de la imagen de densidad óptica.

Después de completar cada pantalla de adquisición el programa segmenta los núcleos de forma automática. El sistema fija un umbral inicial de nivel de gris, obteniendo una frontera que se sobreimpresiona en el monitor sobre la imagen original. El programa nos permite corregir de forma interactiva este nivel de umbral hasta obtener la frontera que consideramos óptima (Fig.5).

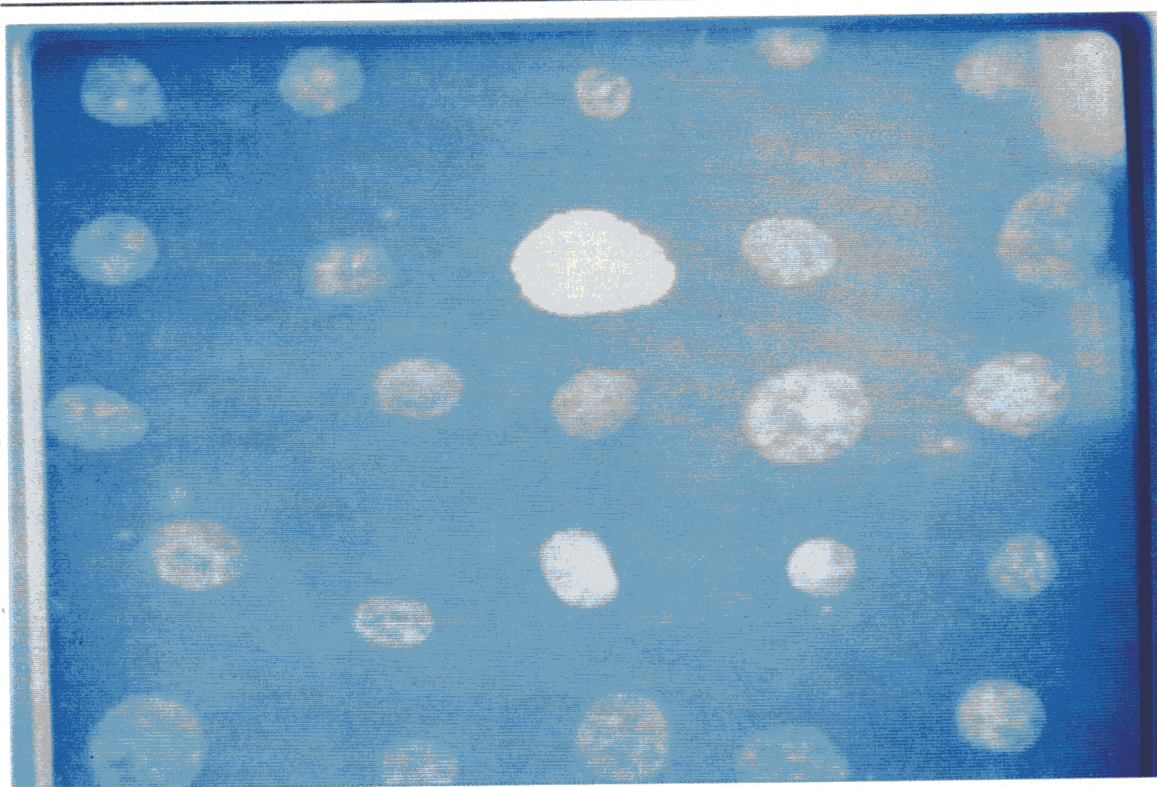


Fig. 5: Umbralización de 25 células en pantalla.

- **Selección mediante el menú "Cuantificación de ADN interactiva"**

Solicita la adquisición de un fondo y una imagen sobre una ventana activa de 320 x 320 pixels. El aumento se selecciona a 40x permitiéndonos recoger mayor número de células en cada pantalla. Seguidamente, y sin salir de esta pantalla, entra en el menú de selección del umbral necesario para segmentar las células. Una vez aceptado el umbral la Segmentación se hace sobre la imagen directa de Hematoxilina.

A continuación en el menú de validación podemos modificar el umbral, eliminar, separar o aceptar las células. En nuestro estudio debemos tener en cuenta que dependiendo del diagnóstico del caso se harán una o dos cuantificaciones, así para M.F.Q., sólo se estudiará un tipo de células, las ductales, además de seleccionar los correspondientes controles. Mientras que si nos encontramos frente a una M.F.Q.R. con células ductales y apocrinas se llevarán a cabo dos cuantificaciones diferentes, aceptando en cada una un tipo celular. Así pues en las figuras 6, 8 y 10 aparecen células apocrinas, y por otro lado en las figuras 7, 9 y 11 se muestran las ductales (en las fotos que se exponen a continuación las células apocrinas son las superiores y las ductales corresponden a las imágenes inferiores). En el momento de la selección de células, las que han sido aceptadas como problema quedan rodeadas de rojo, los controles de color verde, y las células que han sido rechazadas aparecen en negro (figs. 6, 7, 8, 9, 10 y 11).

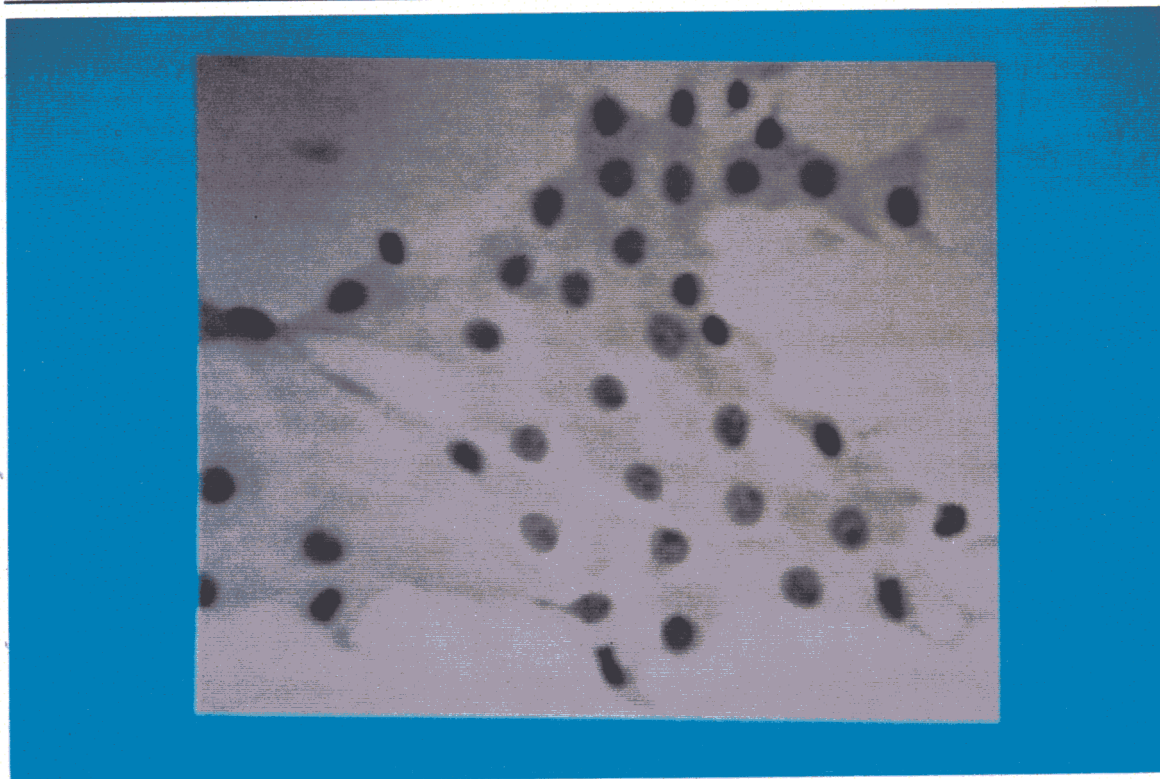


Fig. 6: Adquisición de una imagen interactiva. Apocrinas.

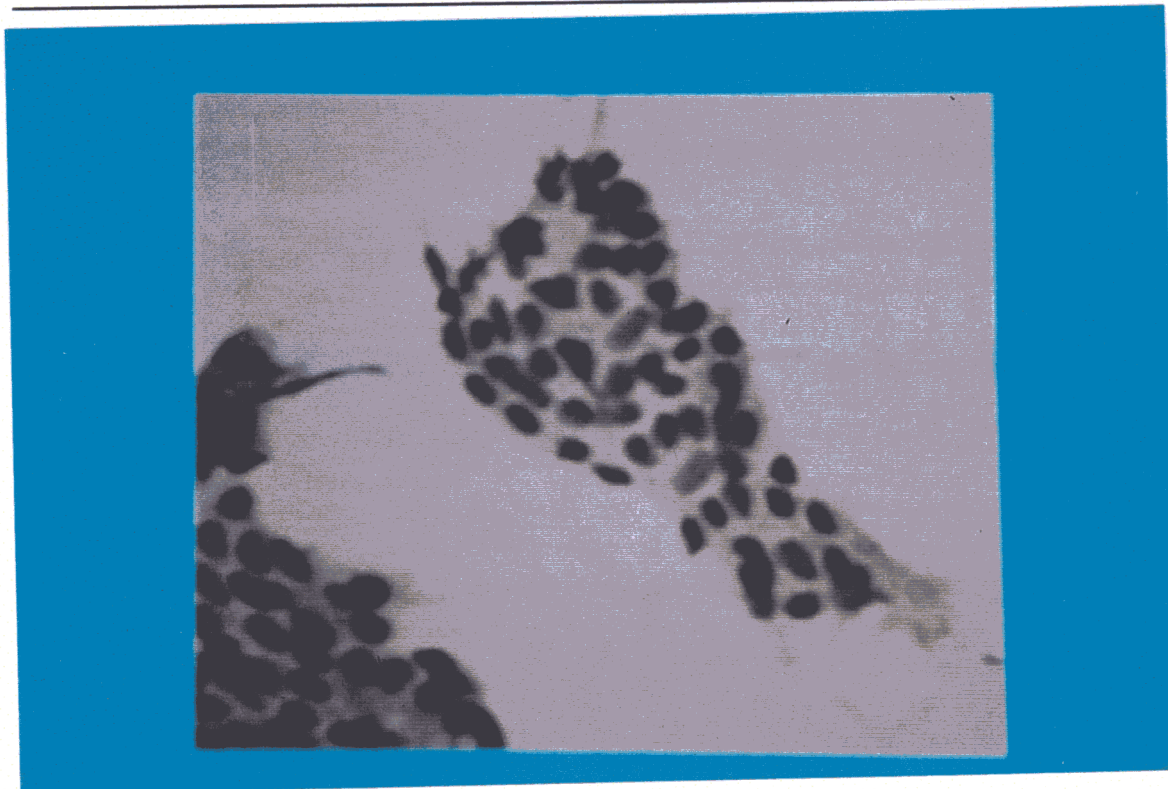


Fig. 7: Adquisición de una imagen interactiva. Ductales.

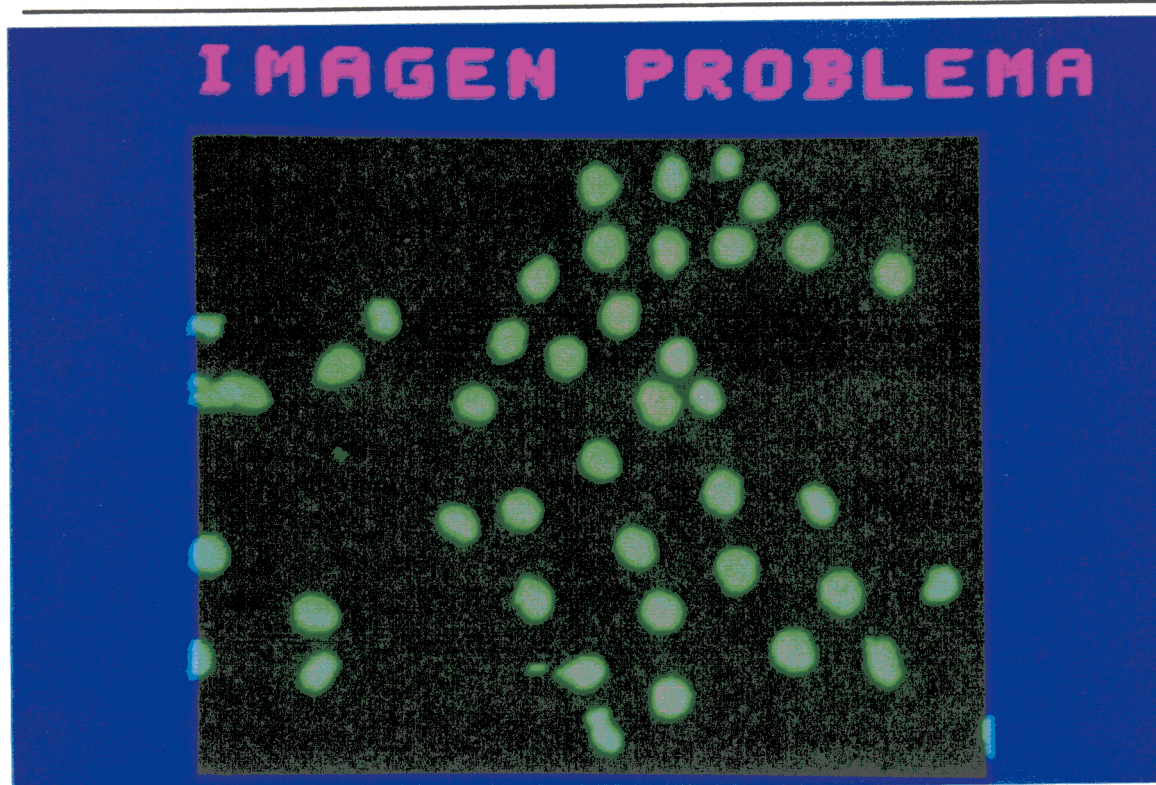


Fig.8: Umbralización de una imagen interactiva. Apocrinas.

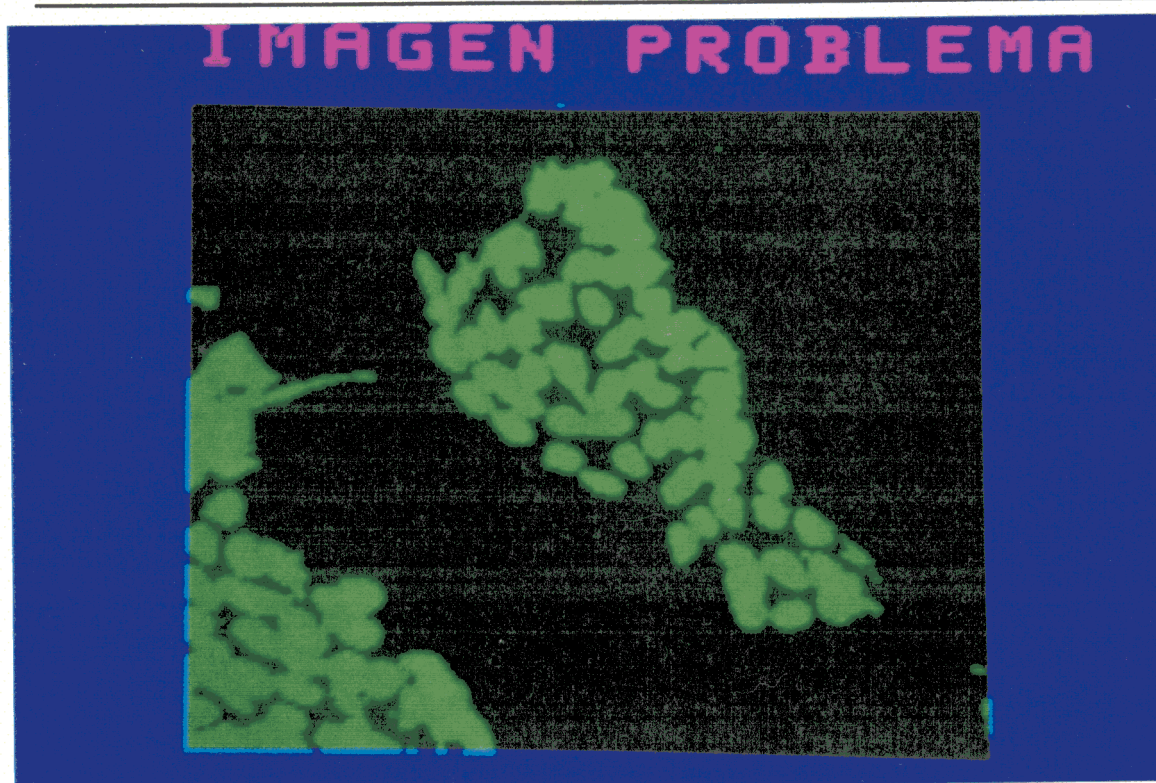


Fig. 9: Umbralización de una imagen interactiva. Ductales.

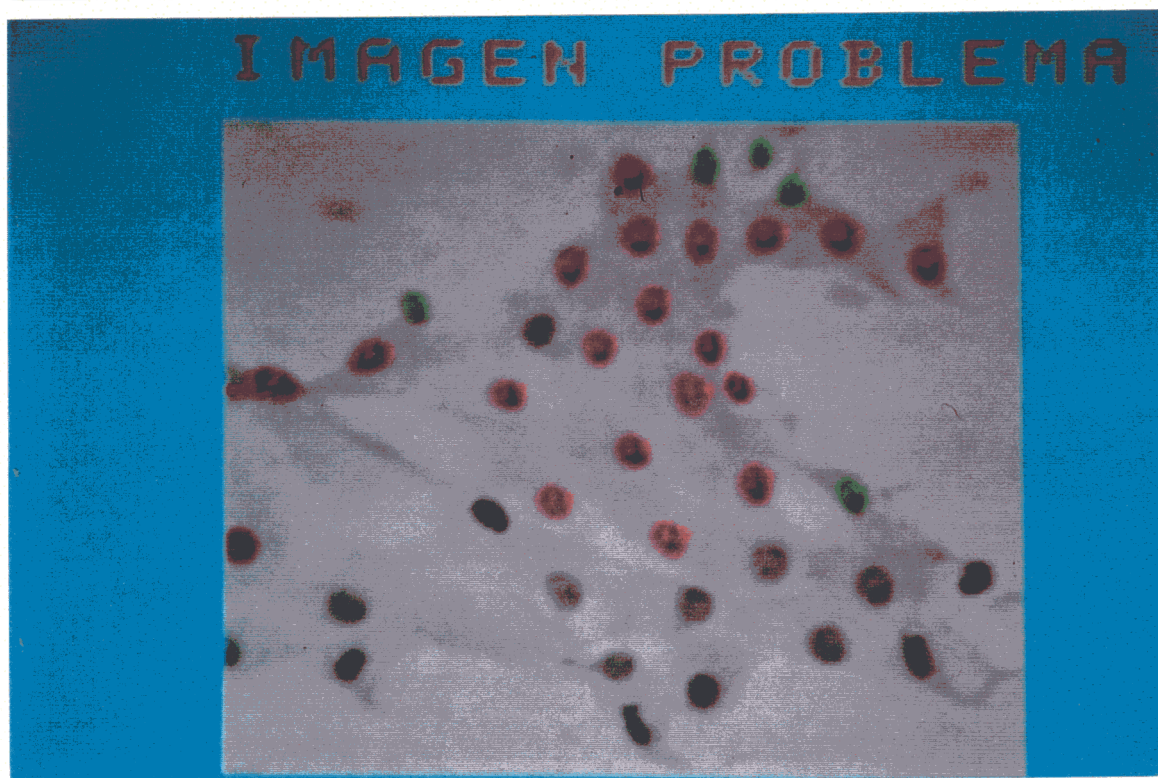


Fig. 10: Selección de problemas (apocrinas) y controles.

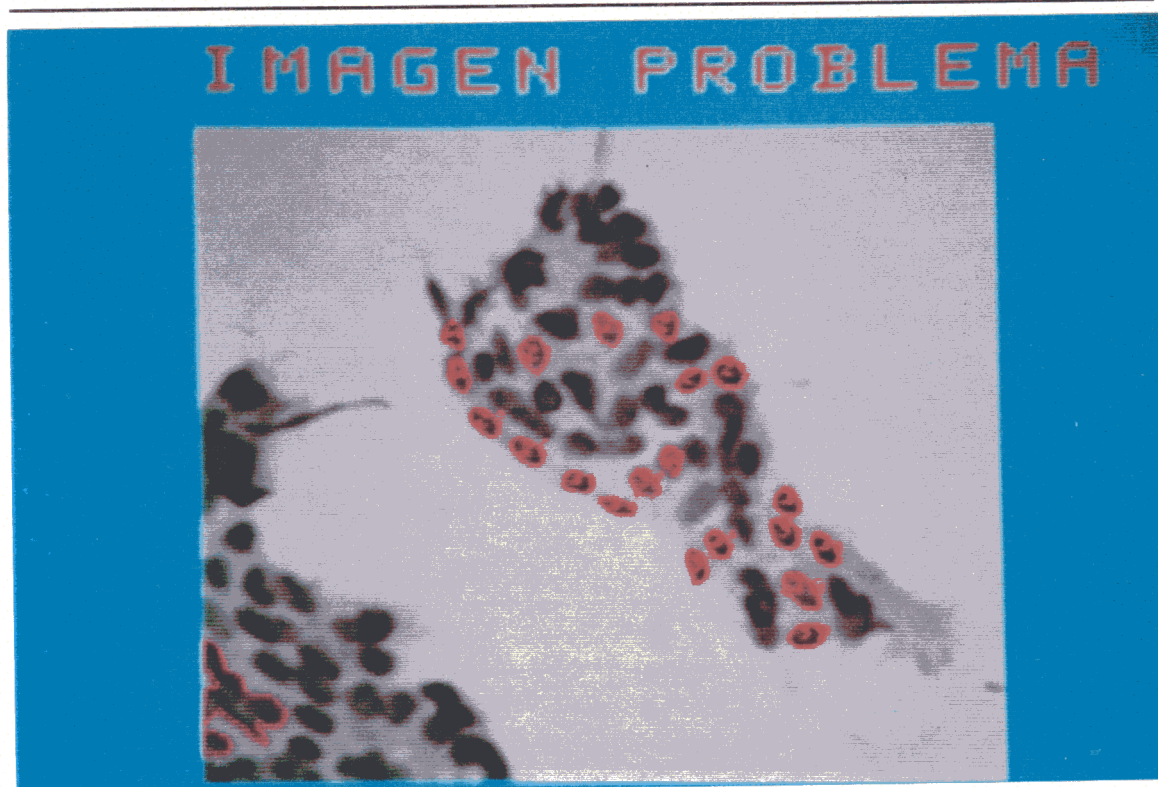


Fig. 11: Selección de problemas (ductales) y sus controles.

Una vez aceptadas entramos en el menú de evaluación en el cual podemos determinar si la célula segmentada es control o problema o bien rechazarla si hemos cometido algún error.

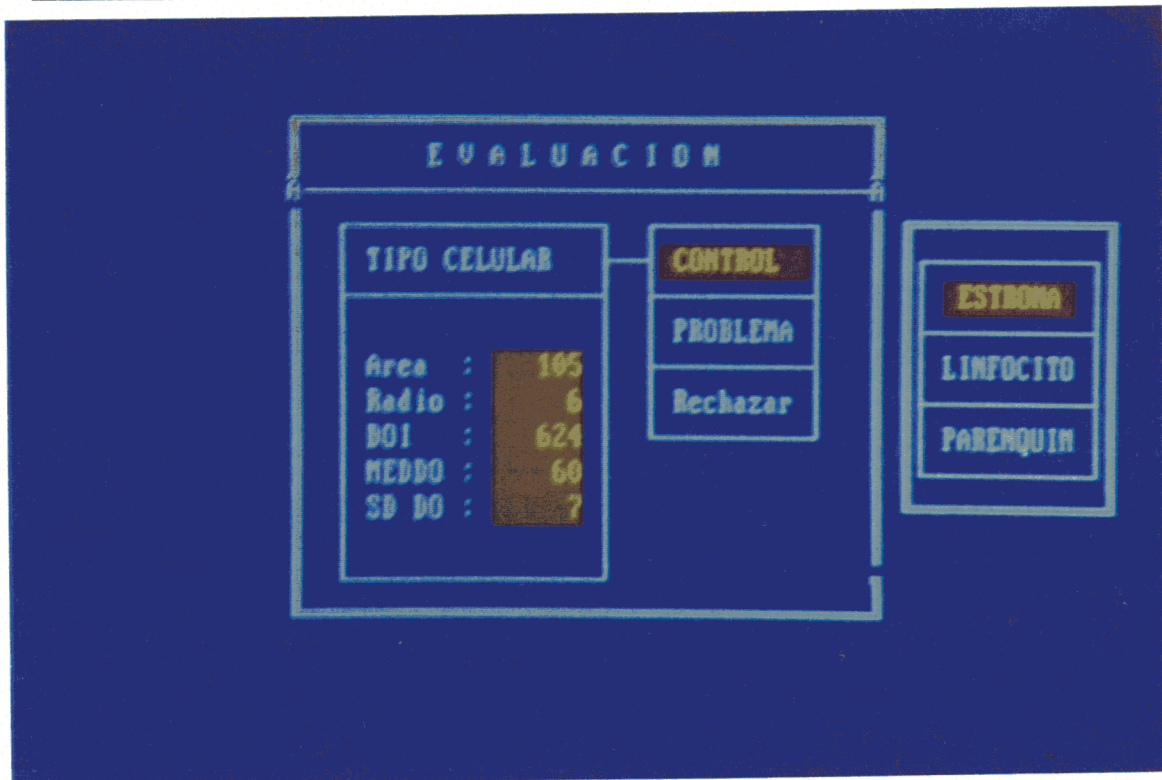


Fig. 12: Menú de evaluación.

2b) HISTOGRAMAS DE DENSIDAD OPTICA INTEGRADA (DOI):

Una vez hemos terminado la adquisición de un mínimo de 100 células problema y 25 células control por cualquiera de los dos métodos mencionados, pasamos al menú de “Análisis del ciclo celular y de la ploidía con o sin células control”. Genera los histogramas de DOI de las células procesadas expresando en abscisas la DOI en unidades arbitrarias (UA) proporcionales a la masa de ADN. Indica la media de DO correspondiente al pico modal de la fase celular G0-G1 y de la fase G2M.

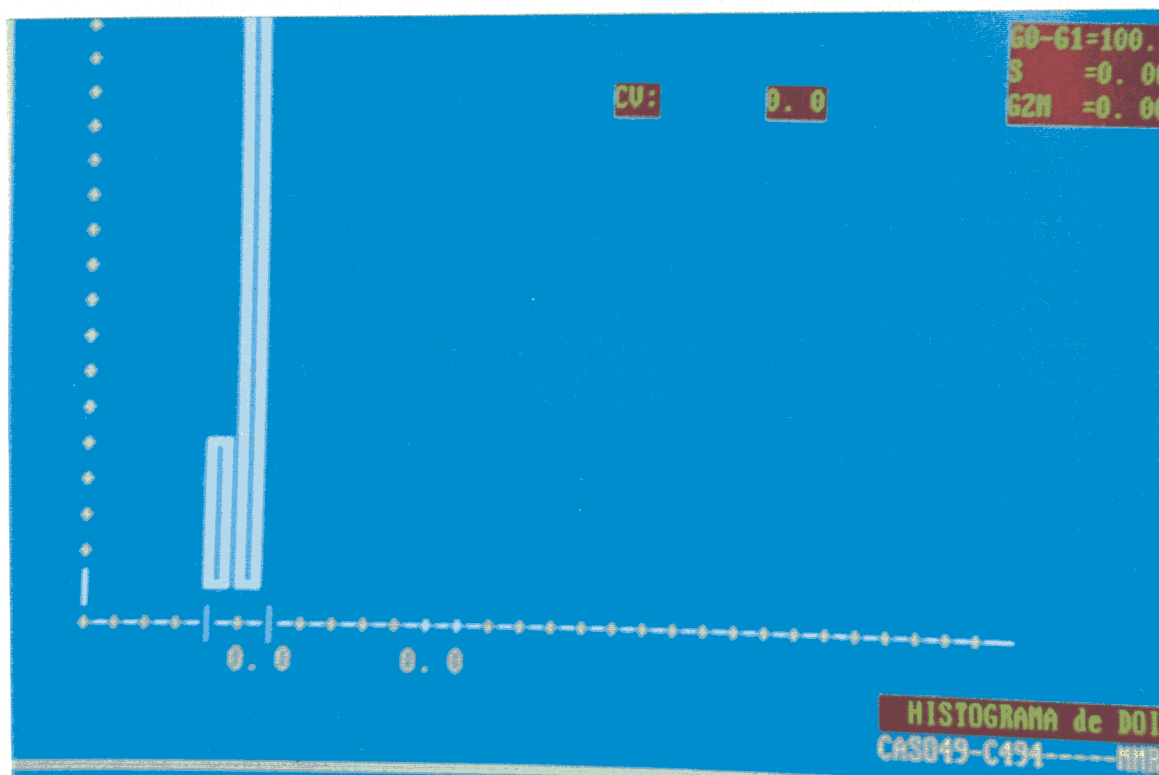


Fig. 13: Histograma de células control.

En el eje de las ordenadas aparece el porcentaje de células que tienen el valor máximo (*Ferrer Roca O. 1989*). Obtenemos los histogramas, uno de las células control (fig.13) y otros dos de las problema, células apocrinas (fig.14) y ductales (fig.15).

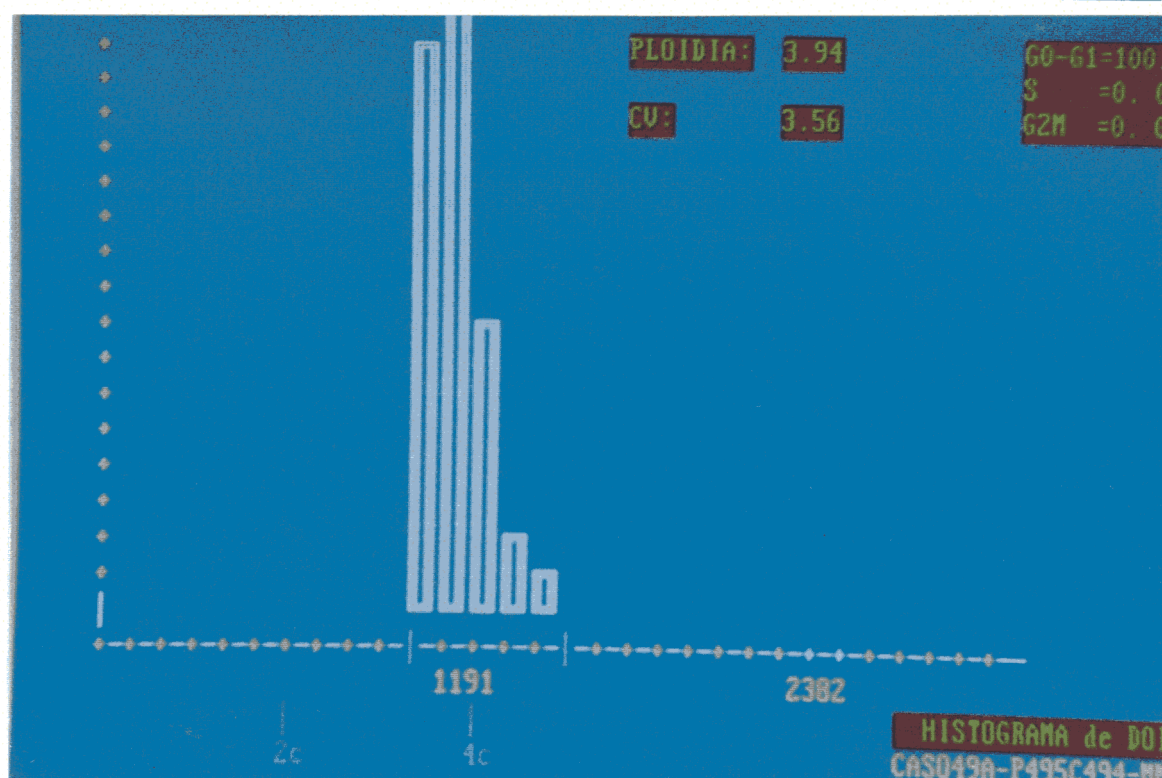


Fig. 14: Histograma de células apocrinas.

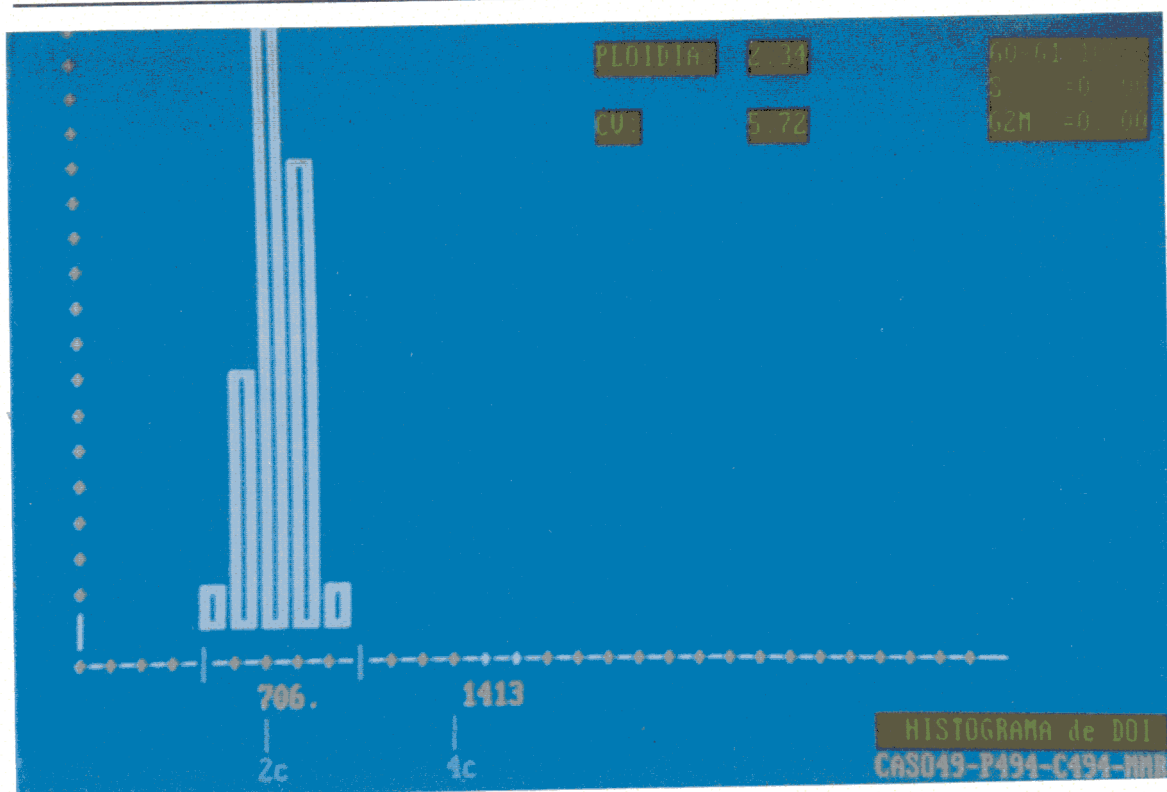


Fig. 15: Histograma de células ductales.

Sobre el histograma se evalúa el ciclo celular moviendo el cursor y marcando el inicio y fin de cada una de las fases G0-G1, S y G2M. Los valores del ciclo celular aparecen en el ángulo derecho del monitor y son:

- **CV ó Coeficiente de Variación del pico modal o fase G0-G1, según Evans y Cols. 1983.**

Está calculada como la desviación estándar del pico modal, evaluando independientemente la curva desde el centro a la periferia, hasta que esta

alcance un valor igual o menor que la media del pico modal. Este desplazamiento a ambos lados es sumado y dividido por dos, normalizándolo según la posición de la moda y corregido según *Evans y cols.*

- **Fases del ciclo celular:** con el porcentaje de elementos en cada una de las fases G0-G1, S y G2M.

Podemos movilizarnos en el eje de las abscisas para marcar el inicio y el final de cada una de las fases. El programa detecta automáticamente si los histogramas poseen más de un pico cuando éste posee una moda con un 50% como mínimo de células del primer pico. En el caso de haber varios picos tan sólo en el último podrán identificarse las tres fases, en los anteriores sólo pueden marcarse las fases G0-G1 y la G2M. Esto se debe a que la fase G0-G1 del segundo pico se superpone a la fase S del primer pico.

- ▶ Fase G0-G1: corresponde al pico modal que en las células normales, que no se dividen, debe tener forma de curva Gaussiana.
- ▶ Fase S: o fase de síntesis de ADN previa a la mitosis, aumenta notablemente en las células en proliferación.
- ▶ Fase G2M: consideramos conjuntamente células en dos fases consecutivas de su ciclo vital y que incluyen células en mitosis y células preparadas para iniciarla. Debe estar situada en el doble exacto de la fase

G0-G1 y poseer una expansión doble a la curva en la fase G0-G1.

- **Ploidía G0-G1:**

Comparamos la ploidía del pico modal con respecto a la considerada normal de las células control. La evaluación de la ploidía en la cantidad de ADN se calcula como la cuantificación del pico G0-G1 expresado en UA multiplicado por dos, dividido entre la cuantificación de la población control en UA.

Se considera diploide o poliploide cuando la moda del pico G0-G1 cae dentro del rango ± 2 desviaciones estándar del control, o sus múltiplos exactos, y aneuploide cuando se halla fuera de este rango (*Böcking 1984*).

2c) INDICES PRONOSTICOS :

El programa TEXCAN contiene los algoritmos para el cálculo de determinados índices pronósticos en su menú de Clasificación automática. Han sido particularmente diseñados para el cáncer de mama considerando el valor de los parámetros clásicos. El programa solicita los datos siguientes: tamaño del tumor en centímetros, el MAI o índice de actividad mitótica del tumor calculado como el número de mitosis sobre histología en 10 campos de 400 aumentos, y la extensión regional del tumor a los ganglios axilares separando tan sólo entre los positivos y negativos (fig. 16).

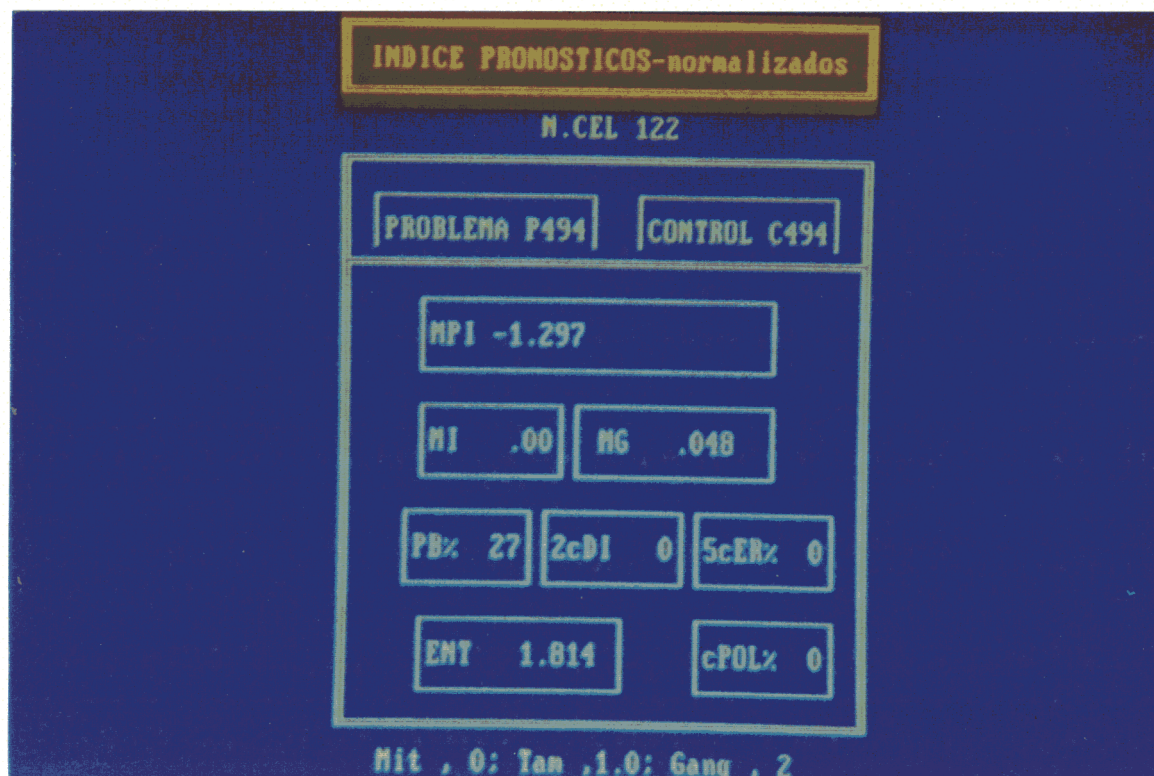


Fig. 16: Indices pronósticos obtenidos.

Considerando esta información el programa genera siete índices pronósticos de los cuales solamente dos muestran unos valores exclusivamente dependientes de la cuantificación, como son el 5cER (5c exceeding rate) y el valor de la Entropía. El 5cER es el porcentaje de células que se encuentran por encima del valor 5c de DOI del histograma. La Entropía o dispersión del histograma es indicativa de si el histograma es o no poliploide y muy expansivo, sus valores oscilan entre 0 y 5 (*Stenkivits 1990*). Este valor de Entropía ha sido comparado con los obtenidos mediante el estudio del ki67 y

aceptado como factor de proliferación (*Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O.1986*). Estos dos valores los podemos considerar objetivos, si bien siempre existe una cierta subjetividad en el momento de la captación de células. No obstante este factor está paliado por la suficiencia de la muestra.

El programa nos ofrece otros índices y grados de malignidad:

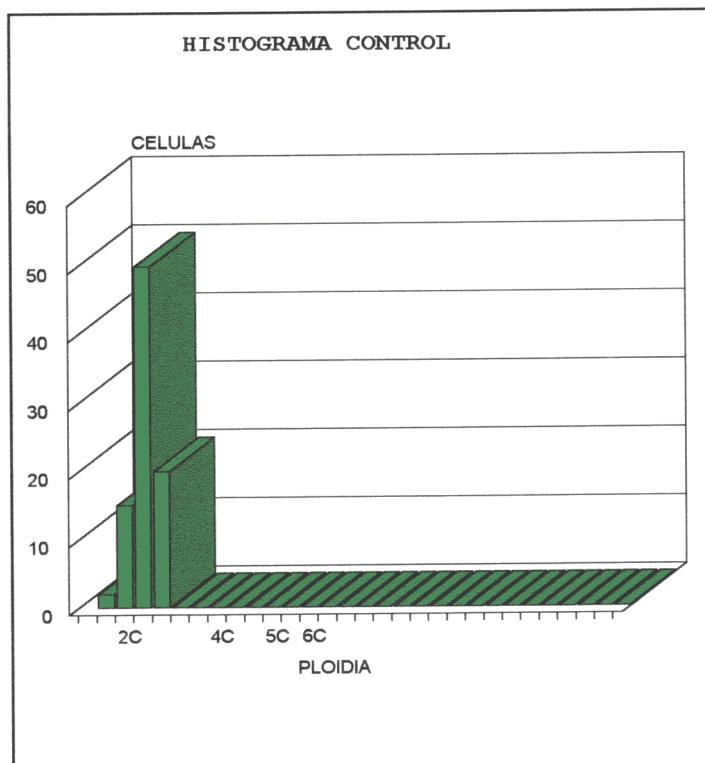
- El MPI o Índice Pronóstico Morfométrico de Baak (*Morphometric Prognostic Index*), calculado como $0'3341 \times \text{raíz cuadrada del MAI} + 0'2342 \times \text{tamaño del tumor en cm} - 0'7654 \times \text{estatus ganglionar}$ donde 1 es positivo y 2 es negativo.
- El Índice de Malignidad (MI) de (*Böcking A, Adler C, Common.1984*) (*Malignancy Index*), calculado como $2cDI \times 5cDI$ y cuyos valores están entre 0 y 4 si están normalizados. Siendo 2cDI la desviación estándar del valor 2c del histograma.
- El Grado de Malignidad (MG) de Böcking (*Böcking A, Chatelain R, Biesterfeld S.1989*) (*Malignancy Grade*), calculado como $3 \times (\text{Log. MI} + 1) / \text{Log.} 3758$ y cuya escala oscila entre 0 y 3.
- El balance de la ploidía (PB), calculado como la diferencia existente entre el porcentaje de células euploides y fuera del rango de euploide tanto si son aneuploides como poliploides.

Estos índices, están basados en parámetros histológicos, como son el tamaño del tumor, el índice de actividad mitótica (MAI) (*Mytotic Activity Index*) y la

existencia o no de ganglios afectados. Es evidente que si nuestras muestras se refieren a punciones "in vivo" de un tumor, el tamaño del mismo, apreciado por palpación, variará con respecto al corte microscópico de la pieza. La existencia o no de ganglios afectados será también distinta y no disponemos de un MAI. Por todo esto no hemos tomado en consideración estos factores.

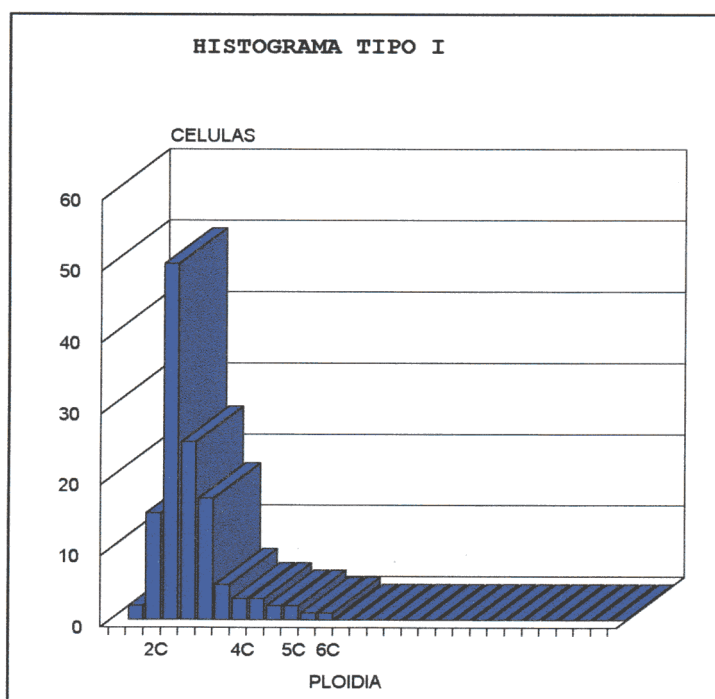
3) DESCRIPCION DE LOS TIPOS DE HISTOGRAMA :

Los histogramas de distribución de ADN adoptan determinadas formas típicas que nos permiten agruparlos en cuatro clases. Nuestra categorización de los histogramas guarda cierta similitud con las curvas descritas por Auer en 1980 (*Auer, Askensten, Erhardt, Fallenius y Zetterberg; Auer, Caspersson y Wallgren*), y fueron descritos por *Azúa Blanco J. 1993*.



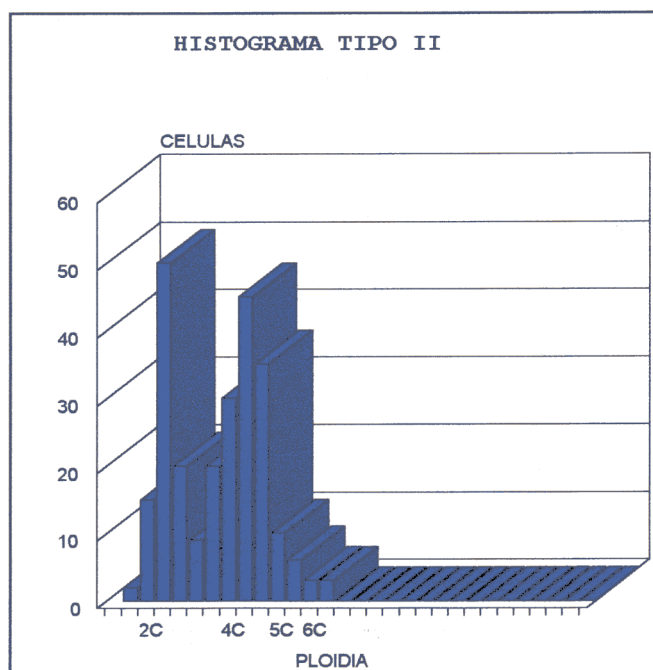
Gráfica 1: Histograma de células control.

Los histogramas de las células normales control presentan la totalidad de la población celular estudiada centrada en el valor 2c con una dispersión muy escasa. (graf.1)



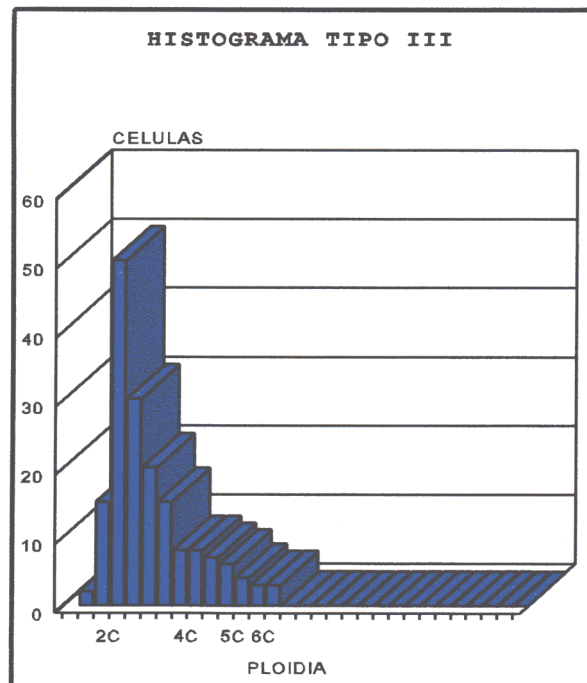
Gráfica 2: Histograma Tipo I.

Los histogramas de tipo I muestran un valor de ADN modal bien definido sobre la región 2c y adyacente indicada por las células normales. Hay un número moderado de células que presentan cantidades de ADN que se desvían del valor modal de forma que la distribución celular puede sobrepasar 5c. En este caso, el porcentaje de células por encima de 5c es muy escaso. (graf.2)



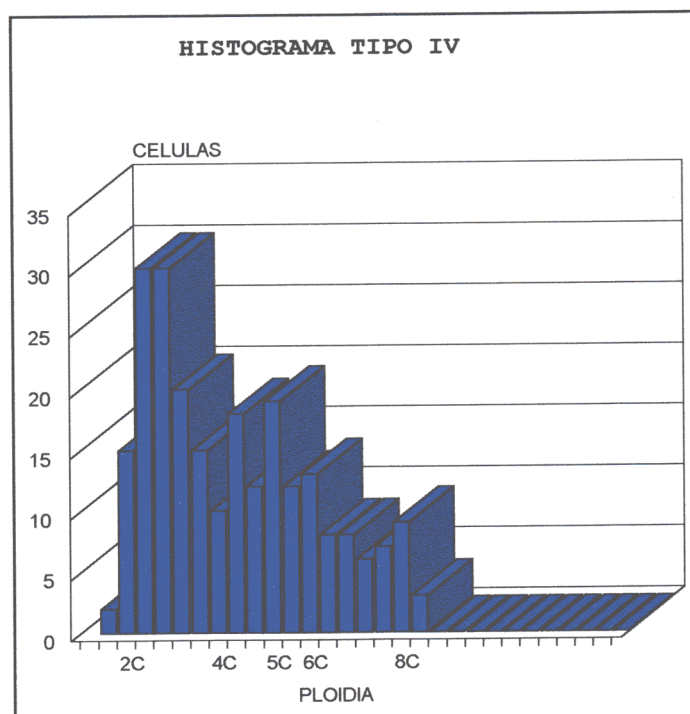
Gráfica 3: Histograma Tipo II.

Los histogramas de tipo II se caracterizan por mostrar sus múltiples picos de distribución de ADN sobre los valores 2c y 4c. Aparecen células con valores de ADN que corresponden a la fase de síntesis de las células normales. Siempre aparecen células sobre las regiones 3c y 5c. Algunas células pueden escapar del rango de ADN para una población normal y generalmente tienen valores sobre 8c. Los histogramas de tipo II representan dos poblaciones celulares solapadas entre sí y por tanto no permiten valorar correctamente las fases celulares ni la entropía. El tumor se clasificará como tetraploide si el pico mayor está situado dentro de dos desviaciones estándar del valor 4c. Si existen picos modales sobre 6c o 8c se considerará poliploide, representando duplicaciones del ADN no seguidas de división celular. (graf.3)



Gráfica 4: Histograma Tipo III.

Los histogramas de tipo III muestran un valor de ADN modal que puede o no situarse sobre la región 2c, con abundantes células que se desvían de este valor modal extendiéndose sobre la regiones 3c, 4c, 5c e incluso superiores (graf.4).



Gráfica 5: Histograma Tipo IV.

Los histogramas de tipo IV muestran una población celular de marcada aneuploidía, con cantidades de ADN para rangos celulares que van desde la región cercana a 2c hasta 6c o incluso 8c. Con mucha frecuencia no existen células con valores de ADN que correspondan a 2c. (graf.5)

En determinadas ocasiones encontramos un histograma que no se encuadra claramente en el grupo de tipo I ni en el tipo III. En los tipos I el porcentaje de células que exceden 5c es escaso mientras que los tipos III en general presentan un buen número de células por encima de 5c, pero no hemos podido delimitar numéricamente una barrera que separe los casos I en su límite

superior de los casos III en su límite inferior. En general es fácil definir cada uno de ellos, pero nosotros encontramos problemas en los casos límite si nos basamos en el porcentaje de células por encima de 5c. Existe un pequeño número de casos en los que estos dos tipos se solapan, pudiendo encuadrarse en cualquiera de los dos grupos. Los consideramos casos límite (borderline) en los cuales la diferenciación objetiva basada exclusivamente en el parámetro 5c no es válida. Sin embargo, estos casos quedan bien definidos si nos basamos en la apreciación subjetiva del tipo de histograma y en el factor numérico del valor de entropía.

Cada uno de los tipos de histograma se corresponde con un grado de agresividad tumoral como se ve en la tabla B.

Tipo I		Escasa
Tipo II		Moderada
Tipo III		Marcada
Tipo IV		Muy marcada

Tabla B: Agresividad de los tipos de histograma.

ABRIR CAPÍTULO III

