

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



# **FACTORES PRONÓSTICO EN EL CARCINOMA INTRADUCTAL DE MAMA Y POSIBLES IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**



**ARCHIVO**

**TESIS DOCTORAL**

**Ma. VICENTA COLLADO GUIRAO**

**MADRID, 1998**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
MORFOLOGICAS Y CIRUGIA

D. AUGUSTO GARCIA VILLANUEVA, Profesor titular de Patología Quirúrgica del Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares y Jefe de Sección del Servicio de Cirugía General y Digestivo del Hospital "Ramón y Cajal" de Madrid.

C E R T I F I C A :

Que la memoria presentada por la licenciada en Medicina y Cirugía D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> VICENTA COLLADO GUIRAO, titulada: "Factores pronóstico en el carcinoma intraductal de mama y posibles implicaciones terapéuticas", ha sido realizada bajo mi dirección y presenta los requisitos necesarios para su defensa.

Madrid, 16 de Abril, 1998



Fdo.- Dr. García Villanueva

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MEDICAS

D. JESUS FERNANDO GONZALEZ-PALACIOS MARTINEZ, Profesor asociado del Departamento de Especialidades Médicas de la Universidad de Alcalá de Henares y Jefe de Sección del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital "Ramón y Cajal" de Madrid.

C E R T I F I C A:

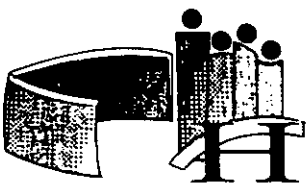
Que D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> VICENTA COLLADO GUIRAO, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo titulado "Factores pronóstico en el carcinoma intraductal de mama y posibles implicaciones terapéuticos", ha sido realizada bajo mi dirección y presenta los requisitos necesarios para su defensa.

Madrid, 16 de Abril, 1998

HOSPITAL RAMON Y CAJAL  
Servicio de Anatomía Patológica



Fdo.- Dr. González Palacios



HOSPITAL UNIVERSITARIO  
12 DE OCTUBRE  
MADRID



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE MEDICINA

D. FELIPE DE LA CRUZ VIGO, PROFESOR TITULAR DE PATOLOGÍA QUIRÚRGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, HOSPITAL UNIVERSITARIO "DOCE DE OCTUBRE" DE MADRID.

### C E R T I F I C A

Que el trabajo realizado por Da Ma VICENTA COLLADO GUIRAO con el título: "FACTORES PRONÓSTICO EN EL CARCINOMA INTRADUCTAL DE MAMA Y POSIBLES IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS", dirigido por el Prof. Dr. A. García Villanueva, y bajo mi Tutoría, reúne las condiciones necesarias para la obtención del Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a catorce de Abril de mil novecientos noventa y ocho.

Fdo.: F. De la Cruz Vigo



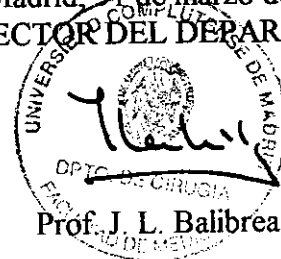


FACULTAD DE MEDICINA  
CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID

UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID  
HOSPITAL CLINICO DE SAN CARLOS  
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

La Tesis Doctoral "FACTORES PRONOSTICOS EN EL CARNINOMA INTRADUCTAL DE MAMA Y POSIBLES IMPLICACIONES TERAPEUTICAS", realizada por D<sup>a</sup> María Vicenta Collado Guirao, ha sido considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Madrid, 31 de marzo de 1998  
EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO





*A mis hijos, Dani e Irene, quiénes con su tolerancia, humor y entusiasmo han convertido ésta y otras tareas en una alegría.*

## AGRADECIMIENTOS

*La satisfacción personal que supone la realización de una Tesis Doctoral, en la que se han empeñado grandes esfuerzos y grandes ilusiones es algo digno de ser experimentado y la justifican, independientemente de otras consideraciones académicas.*

*La realización de este trabajo es fruto de numerosas personas que han colaborado, unas con su trabajo, otras con su empuje y otras con su cariño, sin las cuáles, esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a todas ellas.*

*Al Prof. Dr. Augusto García Villanueva, Director de esta Tesis Doctoral, por el tiempo y el esfuerzo que me ha dedicado, por haberme transmitido sus conocimientos en la cirugía oncológica de mama y, sobre todo, por tener el privilegio de trabajar a su lado. A su inteligencia, rigor científico y profesional quiero rendir mi más íntimo homenaje de gratitud.*

*Al Dr. Fernando González Palacios, Co-Director, su vasta experiencia en el campo de la histopatología han sido imprescindibles en la elaboración de esta Tesis, su dedicación, sencillez y eficacia, así como su afecto personal, recordaré siempre.*

*Al Prof. Dr. Felipe de la Cruz Vigo, Tutor, su colaboración y facilidades para la realización de este trabajo, sus actitudes profesionales y humanas, las cuáles ya valoré en mis años de residencia, me han servido de ejemplo en todo momento.*

*Al Dr. Roberto Rojo Blanco, Médico Adjunto del S<sup>o</sup>. de Cirugía General y Digestivo del Hospital Ramón y Cajal, "mi compañero" que, durante todo el tiempo que le he dedicado a esta Tesis ha asumido, generosa y desinteresadamente, gran parte de mi trabajo en el Hospital. Gracias por su cariño y comprensión.*

*A Alfonso Muriel García y Angel Fernández Blázquez, por su gran interés e inestimable ayuda en el análisis estadístico de nuestros resultados y su posterior procesamiento informático.*

*A mis compañeros del S<sup>o</sup>. de Cirugía General del Hospital "Doce de Octubre", donde realicé mi especialidad, ellos fueron mis "maestros" y sentaron las bases de mi formación como cirujano.*

*En Instituciones como el Hospital Ramón y Cajal, donde se entremezclan labores clínicas y de investigación y, concretamente, en el S<sup>o</sup>. de Cirugía General y Digestivo, hacen posible trabajos como el que a continuación presentamos. Sin el apoyo y el estímulo que he recibido de mis compañeros, no hubiera sido posible su realización.*

*A mi familia y amigos, que son el componente afectivo imprescindible para conseguir cualquier meta y a los que estoy profundamente agradecida.*

*No quiero terminar este Capítulo de Agradecimientos sin hacer una mención especial a Paco, por su continuo e incondicional apoyo, y por compartir mi vida.*

*Gracias. Muchas Gracias.*

# ÍNDICE

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
II.1.- Evolución Histórica .....	9
II.2.- Factores Epidemiológicos .....	12
II.2.1.- Incidencia .....	12
II.2.2.- Edad .....	14
II.3.- Historia Natural .....	14
II.4.- Presentación Clínica .....	18
II.5.- Distribución del Tumor en la Mama .....	25
II.5.1.- Multicentricidad/multifocalidad .....	25
II.5.2.- Bilateralidad .....	28
II.5.3.- Invasión Oculta .....	29
II.6.- Diagnóstico .....	32
II.6.1.- Diagnóstico Diferencial .....	36
II.7.- Clasificación Histológica del Cid. ....	41
II.8.- Factores Pronóstico .....	53
II.8.1.- Factores Pronóstico Confirmados .....	55
II.8.1.1.- Tamaño Tumoral .....	55
II.8.1.2.- Tipo Histológico .....	55
II.8.1.3.- Grado Nuclear (GN) - Grado Histológico (GH) .....	56
II.8.1.4.- Receptores Hormonales .....	60
II.8.2.- Factores Pronóstico en Estudio .....	65
II.8.2.1.- Cinética celular y contenido de ADN .....	66
II.8.2.2.- Antioncogén P53 .....	75
II.8.2.3.- Oncogén Her-2-Neu/C-erbB-2. ....	81
II.8.2.4.- Ciclinas .....	88
II.8.2.5.- Apoptosis Celular .....	95
II.9.- Tratamiento .....	104
II.9.1.- Tratamiento de la Recidiva .....	116
II.9.2.- Tratamiento Hormonal .....	118
<b>III.- OBJETIVOS</b> .....	122

<b>IV.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	125
IV.1.- Material .....	125
IV.1.1.- Pacientes .....	125
IV.1.2.- Parámetros Clínicos .....	126
IV.1.2.1.- Edad .....	126
IV.1.2.2.- Estado Menopáusico .....	126
IV.1.2.3.- Antecedentes Familiares .....	127
IV.1.2.4.- Presentación Clínica .....	127
IV.1.2.5.- Recurrencia .....	128
IV.1.3.- Parámetros de Técnica Quirúrgica .....	128
IV.2.- Métodos .....	129
IV.2.1.- Estudio Histológico .....	129
IV.2.1.1.- Clasificación Histológica .....	129
IV.2.1.2.- Gradación Nuclear .....	131
IV.2.2.- Estudio Inmunohistoquímico .....	132
IV.2.2.1.- Técnica Inmunohistoquímica .....	132
IV.2.2.2.- Método Estreptoavidina -Biotina .....	133
IV.2.2.3.- Anticuerpos Monoclonales .....	134
IV.2.2.4.- Cuantificación de resultados Inmunohistoquímicos ..	135
a.- Lectura de resultados Inmunohistoquímicos .....	135
b.- Valoración de Receptores Estrogénicos .....	137
c.- Valoración del Índice de Proliferación (Ac MIB-1) .....	137
d.- Valoración de la Oncoproteína P53 .....	138
e.- Valoración del Oncogén Her-2-Neu/C-erbB-2 ...	138
f.- Valoración de las Ciclinas .....	139
IV.2.3.- Estudio Molecular .....	139
IV.2.3.1.- Método de Hibridación In Situ .....	139
IV.2.3.2.- Valoración de la Apoptosis .....	141
IV.2.4.- Análisis de los Factores Pronóstico en las Recidivas .....	142
IV.2.5.- Análisis Estadístico .....	142
 <b>V.- RESULTADOS</b> .....	 145
V.1.- Estadística descriptiva .....	145
V.1.1.- Resultados del Estudio Histológico .....	145
V.1.2.- Resultados del Estudio Inmunohistoquímico .....	150
V.1.2.1.- Receptores Hormonales .....	150
V.1.2.2.- Índice de Proliferación Celular .....	151
V.1.2.3.- Proteína P53 .....	153
V.1.2.4.- Oncogén Her-2-Neu .....	154
V.1.2.5.- Ciclina D <sub>1</sub> .....	154
V.1.3.- Resultados del Estudio Molecular .....	155

V.2.- Análisis Bivariante de los parámetros estudiados .....	157
V.2.1.- Relación entre Grado Nuclear y Receptores Hormonales .....	157
V.2.2.- Relación entre Grado Nuclear e Índice de Proliferación .....	158
V.2.3.- Relación entre Patrón Arquitectural y Receptores Hormonales ...	159
V.2.4.- Relación entre Patrón Arquitectural e Índice de Proliferación ....	160
V.2.5.- Relación entre Necrosis y Receptores Hormonales .....	160
V.2.6.- Relación entre Necrosis e Índice de Proliferación .....	161
V.2.7.- Relación entre Grado Nuclear y Apoptosis .....	162
V.2.8.- Relación entre Grado Nuclear y Oncogén Her-2-Neu .....	162
V.2.9.- Relación entre Grado Nuclear y Proteína P53 .....	163
V.2.10.- Relación entre Grado Nuclear y Ciclina D <sub>1</sub> .....	164
V.2.11.- Relación entre Apoptosis y Oncogén Her-2-neu .....	164
V.2.12.- Relación entre Apoptosis y Proteína P53 .....	165
V.2.13.- Relación entre Apoptosis y Ciclina D <sub>1</sub> .....	165
V.3.- Factores Pronóstico en las Recidivas .....	166
<b>VI.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>168</b>
VI.1.- Índice de Proliferación y Apoptosis .....	170
VI.2.- Relación entre Factores Histológicos y otros Factores Pronóstico .....	176
VI.2.1.- Factores Histológicos y Receptores Hormonales .....	176
VI.2.2.- Factores Histológicos e Índice de Proliferación .....	182
VI.3.- Grado de Diferenciación y Apoptosis .....	185
VI.3.1.- Relación con el Oncogén Her-2-neu .....	186
VI.3.2.- Relación con la Proteína P53 .....	190
VI.3.3.- Relación con la Ciclina D <sub>1</sub> .....	193
VI.4.- Clasificaciones Histológicas .....	195
VI.5.- Factores Pronóstico en relación con las Recidivas .....	197
VI.6.- Orientación Terapéutica .....	198
<b>VII.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>203</b>
<b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>206</b>



## **ABREVIATURAS**

Ac: Anticuerpo

ADN: Ácido dexosirribonucleico

Ag: Antígeno

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Cdk: Cinasas dependientes de las ciclinas

cGy: Centigrays

CID: Carcinoma intraductal

CLIS: Carcinoma lobulillar in situ

c.m.g.a.: Campos microscópicos de gran aumento

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

GH: Grado histológico

GN: Grado nuclear

Gy: Grays

ICA: Índice de células apoptoicas

IHQ: Inmunohistoquímica

HDA: Hiperplasia ductal atípica.

IP: Índice de proliferación

KD: Kilodaltons

N+: Ganglios axilares positivos

N-, N<sub>0</sub>: Ganglios axilares negativos

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación

P-53: Gen P-53

p-53: Proteína p-53

RH: Receptores hormonales

RE: Receptores estrogénicos

RL: Recidiva local

RP: Receptores de progesterona

TIT<sup>3</sup>: Timidina tritiada

TUNEL: TdT-mediated X-dUTP nick end labeling.

# **I.- INTRODUCCIÓN**

## **I.- INTRODUCCIÓN**

Se cree que el cáncer infiltrante de mama puede desarrollarse a través del epitelio normal, siguiendo una progresión sistemática que atraviesa varios estadios intermedios: hiperplasia, hiperplasia atípica, ca “in situ”, y ca invasivo (DUPONT, 1985; PAGE, 1988; KILLEEN, 1991). La detección temprana del mismo, principalmente por el uso más generalizado de la mamografía y las campañas de “screening”, ha mostrado que se puede reducir la mortalidad del cáncer de mama hasta en un 46% (LUNG 1988; LAY 1990).

Quizás la etapa más temprana y favorable para diagnosticarlo es en el estadio intraepitelial o no invasivo, en el que las posibilidades de metástasis prácticamente no van a existir y los índices de curación se aproximan al 100% (GALLAGER, 1978; ROSNER, 1980; FRIKBERG, 1990), a diferencia de este mismo diagnóstico realizado en casos de ca invasor de mama localizado, cuya supervivencia a 5 años es del 90%, en pacientes con metástasis axilares es del 68%, siendo sólo del 18% en los casos con enfermedad metastásica

a distancia (Cáncer Facts-Figures, 1990).

Hasta hace muy poco, esta variante intraepitelial del cáncer de mama no era más que una peculiaridad clínica, al ser rara vez diagnosticada, y los conocimientos sobre su biología eran muy limitados. En general, el único tratamiento proporcionado, de manera similar al carcinoma invasor, era la mastectomía.

El desarrollo e implantación de técnicas conservadoras para tratar el cáncer invasor de la mama, ha puesto de relieve una serie de interrogantes acerca de la necesidad rutinaria de efectuar mastectomías en lesiones que, en muchos casos, pudieran ser pre-invasivas.

Es por lo que, en la actualidad, necesitamos de un conocimiento más amplio sobre el comportamiento biológico de estas lesiones no invasivas, para tratar de deslindar aquellas formas que serían candidatas a una terapia agresiva de aquellas otras que podrían beneficiarse de un tratamiento conservador, menos agresivo.

En este sentido, existen en la actualidad numerosas líneas de trabajo que tratan de conocer los factores pronóstico que indicarían la propensión, sobre todo, del carcinoma ductal "in situ" (CID) a desarrollar formas invasivas, como los estudios realizados por BOBROW (1994, 1995) y ZAFRANI (1994) sobre la p53, o los llevados a cabo por WEINSTAT-SASLOW (NATURE MED, 1995), acerca de la sobreexpresión de las ciclinas D.

Hoy por hoy, el conocimiento de estos factores pronóstico es incompleto y limitado,

---

si bien los avances son importantes y comienzan a distinguirse distintos subtipos histológicos, dentro de esta variedad del cáncer de mama. No puede, pues, hablarse del CID como única entidad, sino de un grupo heterogéneo de carcinomas no invasivos que contienen entidades con características y pronósticos muy distintos.

Este trabajo intenta aportar alguna luz en este sentido, con el objeto de poder determinarse en un futuro no lejano el pronóstico de los diferentes subtipos histológicos del CID, con la intención de adaptar el tratamiento a cada uno de ellos y en una paciente determinada.

## **II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1.- EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL CARCINOMA “IN SITU” DE MAMA**

En el siglo XIX varios autores documentan en el cáncer de mama un estado intraepitelial aunque, al parecer, sus referencias hacían alusión al carcinoma lobulillar “in situ” (REMARK, 1854; SHIELD, 1898).

En el año 1907, WARREN describe un estado de transición del epitelio ductal entre formas benignas y malignas, que denominó “evolución anormal”.

Un año después, BLOODGOOD, cirujano del Hospital John Hopkins, profundiza en el comportamiento clínico y las características patológicas de las formas tempranas del cáncer ductal de mama, a las que denominó “tumores borderline”.



En este mismo año, este autor denomina **“comedocarcinoma”** a una lesión benigna con necrosis en los conductos lactíferos y que, además, presentaba un epitelio proliferativo. Más tarde, diferenció el comedocarcinoma asociado al cáncer de mama de la forma benigna, pero precancerosa a la que denominó **“comedoadenoma”**. Observó que estas lesiones no se asociaban a metástasis regionales o sistémicas, y que las mujeres que las presentaban, no fallecían como consecuencia de estos tumores mamarios.

En el año 1932, BRODERS definió el término **“carcinoma in situ”**, considerándolo como una entidad patológica diferente, tanto de sus precursores benignos, como de las formas invasivas.

FOOTE y STEWARD describieron por vez primera en 1941, el **“carcinoma lobulillar in situ”** (CLIS), originado en los lobulillos terminales. En el año 1946, estos mismos autores definen una entidad patológica distinta, a la que denominan **“carcinoma ductal no invasivo”**.

El término **“carcinoma ductal in situ”**, fue definido por GILLIS y COLS en el año 1960 como una lesión de tipo lento, comportamiento favorable, pero potencialmente maligna, para la que se requería un tratamiento agresivo, si se querían obtener buenos resultados.

Al final de la década de los años 60, se estableció el concepto de **“cáncer de mama mínimo”** (GALLAGER, 1969; HUTTER, 1971), el cual incluía el CID, CLIS, y el carcinoma minimamente invasor (menor de 0,5 cms. de tamaño). En este momento, se toma

conciencia de la importancia y de la necesidad de la detección de lesiones de la mama en un estado inicial, preinvasivo, si se quieren obtener altos índices de curación que pueden alcanzar el 90% para las tres entidades reseñadas, tras 10 años de seguimiento (WANEBO, 1974; FRAZIER, 1977; HARTMANN, 1984).

Durante las dos décadas posteriores, fue haciéndose evidente que el concepto de carcinoma mínimamente invasivo era simplista e inducía a error, al incluir tres entidades con distinto comportamiento biológico, diferente pronóstico y, por tanto, distintas implicaciones terapéuticas (FISHER, 1980; WOLMARK, 1985).

Hoy en día, entendemos y aceptamos al CLIS como un marcador histológico de riesgo para futuros carcinomas invasivos, más que un precursor del carcinoma mínimo y, por tanto, la tendencia actual es a vigilarlo de una forma periódica, y no tratarlo quirúrgicamente (WERTHEIMER, 1986; SEIDMAN, 1987; FRIKBERG, 1987, 1993).

Por el contrario, el carcinoma mínimamente invasivo es un auténtico carcinoma invasor, si bien con mejor pronóstico debido a la precocidad diagnóstica.

Sin embargo, el CID, en el que vamos a centrar nuestro trabajo, es una verdadera lesión premaligna que, si no se trata, evoluciona hacia una forma maligna invasiva en un porcentaje importante de las pacientes afectas.

## **II.2.- FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS**

### **II.2.1.- INCIDENCIA**

No es de extrañar el interés que despierta el estudio y el conocimiento del cáncer de mama, si consideramos que, en la actualidad, es el tumor más frecuente en la mujer de los países occidentales y, a nivel mundial, la principal causa de muerte por cáncer en mujeres entre 35 y 50 años.

Según datos del National Cancer Institute, en USA el cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado en la mujer, representando el 32% de todos los cánceres femeninos (BORING, 1994; MILLER, 1993). En el año 1994, en este mismo país, hubo 182.000 nuevos casos de cáncer de mama, y 46.000 muertes debidas a él.

Puede estimarse que 1 de cada 8 mujeres norteamericanas podrían padecer un cáncer de mama (riesgo 12,2%), y que 1 de cada 28 puede morir por esta causa (riesgo 3,6%) (HANKEY, 1993).

España es un país de riesgo intermedio/bajo, si bien la frecuencia va en aumento, y en el que el cáncer de mama es también el tumor maligno más frecuente en la mujer (14,2% de las neoplasias de la mujer española). Se considera que se desarrollan más de 8.600 nuevos casos de cánceres de mama al año, y que fallecerán unas 3.900 mujeres por esta neoplasia en el mismo periodo de tiempo (MONGE, 1992).

Antes de la introducción y difusión de la mamografía como elemento diagnóstico en la patología mamaria, la detección del CID se hacía, exclusivamente, en base a datos clínicos. Por esta razón, el CID en esta época representaba menos del 1% de todas las biopsias de mama, algo menos del 4% de todas las neoplasias malignas (ROSNER, 1980; SWAIN, 1988; CADY, 1993), y su proporción dentro de las formas no invasivas (CID/CLIS) suponía tan sólo la cuarta parte (ANDERSEN, 1980).

En las últimas décadas, debido al uso extendido de la mamografía, el diagnóstico de tumores no palpables ha experimentado un gran incremento y, por tanto, también el diagnóstico de los tumores "in situ".

Así, en la clínica Lahey, antes de 1986, el CID representaba el 2,6% de todas las neoplasias de mama, alcanzando el 15,2% a lo largo del periodo de tiempo posterior a dicha fecha (MACKAREM, 1994). También FRIKBERG (1993), en una recopilación de la literatura sobre 6.287 biopsias de lesiones no palpables de mama, encuentra que el CID representa el 8% de ellas y el 30% de las lesiones malignas.

No sólo asistimos a un aumento en el diagnóstico del CID, sino también a un cambio en la relación CID/CLIS debido, entre otras causas, a la mayor expresividad radiológica del CID (microcalcificaciones, distorsiones del parénquima, etc.) en comparación con el CLIS. En la actualidad esta relación puede estimarse de 3/1 (ROSEN, 1980; PAPATESTAS, 1990).

Una constante en los estudios epidemiológicos es que se trata de una neoplasia cuya frecuencia va en aumento. Este fenómeno es atribuible, entre otras razones, al aumento de

la expectativa de vida de la población y al gran avance experimentado en el diagnóstico precoz de las lesiones de la mama, gracias a las campañas masivas de "screening", a la difusión de la mamografía, y al empleo de técnicas radiológicas de alta resolución.

### **II.2.2.- EDAD**

La edad de aparición del CID suele encontrarse entre los 50-60 años, no encontrando diferencia significativa con la edad de aparición del carcinoma invasivo (WESTBROOK, 1975; ROSNER, 1980). Sin embargo, esta presentación es 10 años más tarde que la media de edad en el momento de diagnóstico, para el CLIS (LAGIOS, 1982; PAGE, 1982).

### **II.3.- HISTORIA NATURAL**

La historia natural del CID no es bien conocida, y esto se debe, en parte, a que el tratamiento tradicionalmente establecido ha sido la mastectomía total, que impide la posibilidad de seguimiento de estas lesiones. Por otro lado, antes del empleo sistemático de la mamografía, el diagnóstico del CID se realizaba basado en las formas sintomáticas (tumores palpables, telorragia, etc.), y no está claro que la evolución de estas formas de tumores intraductales sea extrapolable a las formas asintomáticas, que es el modo de presentación más frecuente en la actualidad.

Se acepta por la mayoría de los autores que el CID es la transformación maligna de

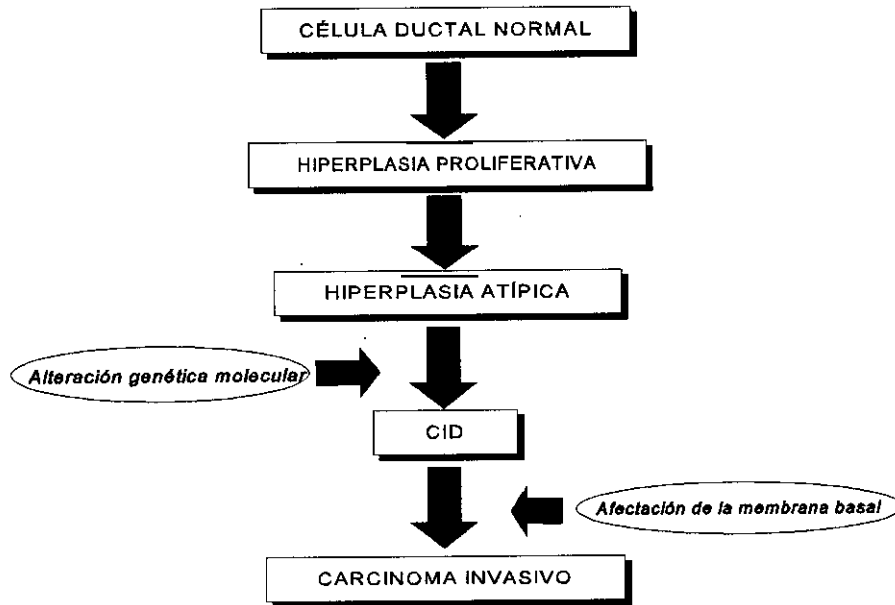
las células epiteliales del conducto mamario, permaneciendo en su posición anatómica, sin evidencia de infiltración de la membrana basal.

Algunos autores intentan definir un subtipo de CID con microinvasión, con un comportamiento biológico similar al del CID (WONG, 1990; ROSNER, 1991). Para SILVERSTEIN (1987), este subtipo vendría caracterizado por la presencia de uno o dos focos esporádicos de infiltración, mientras que para FECHNER (1990) y SWAIN (1992) vendría definido por la penetración menor de 0,1 mm. de células malignas a través de la membrana basal.

Sin embargo, la distinción entre “microinvasión e invasión focal” es simplemente un problema de grado. Cualquier lesión invasiva, aún en su fase más temprana, tiene potencial de metastatizar (FRIKBERG, 1990; ARBUTINA, 1992). Estos conceptos quedan fuera del objetivo de esta Tesis, que se limitará exclusivamente al CID “puro”.

Los vasos sanguíneos y linfáticos se sitúan en el parénquima mamario por fuera de la membrana basal. Por ello, y de acuerdo con la definición de CID, este no presentará metástasis. Este hecho nos lleva a considerar, de un modo simplista, que el CID es un “fenómeno local” y no una enfermedad sistémica (HUGHES, 1996).

La historia natural del cáncer de mama se puede ajustar a una teoría “Darwiniana” (FENTIMAN, 1990), en la que se establece una cadena secuencial de lesiones, que iría como refleja el cuadro siguiente:



El hallazgo de hiperplasia ductal atípica (HDA) en una biopsia de mama se asocia con un incremento de riesgo de 4-5 veces para desarrollar un cáncer invasivo, y este riesgo es de 8-10 veces cuando nos situamos ante un CID (SIMPSON, 1991). La incidencia de CID, después de una biopsia que ha demostrado HDA, no ha sido aún establecida.

El porcentaje de cánceres de mama que desarrollan esta progresión de un modo secuencial y ordenado es desconocido, y es claro que una de las mayores dificultades y retos actuales, radican en evaluar el riesgo de progresión del CID a cáncer invasor.

PAGE (1982), en una revisión de 11.760 biopsias etiquetadas como benignas, encuentra 25 casos de CID, de los cuales 7 evolucionan hacia formas invasivas (28%), con un periodo de seguimiento entre 3 y 10 años.

ROSEN (1980) publica una serie de 30 mujeres con CID no tratado, en 15 de las

cuáles se pudo efectuar un seguimiento completo. De estas 15 mujeres, 7 desarrollan un cáncer infiltrante con un seguimiento medio de 9,7 años desde el diagnóstico, por lo que representa una incidencia del 27% si incluimos todos los casos, y del 53% si consideramos sólo las pacientes seguidas de modo completo.

En ambos trabajos, el cáncer invasor aparece en la misma mama en que se alojaba el tumor no infiltrante y en una zona cercana al lugar de la biopsia.

Según el Third National Cancer Survey, el riesgo relativo del CID de poder desarrollar una forma infiltrante puede estimarse en 11 (MORROW, 1996).

Parece existir una cierta correlación entre el subtipo histológico del CID y la capacidad de progresión hacia formas infiltrantes. Así, en la serie de 80 casos de CID estudiada por EUSEBI (1994), casi en su totalidad de bajo grado histológico, tan sólo el 13,7% desarrolló un carcinoma infiltrante, tras un seguimiento medio de 17,5 años.

La frecuencia del CID basada en trabajos realizados sobre autopsias de mujeres sin patología mamaria, oscila entre el 6% (ALPERS y WELLINGS, 1985) y el 16% (ANDERSEN, 1985; NIELSEN, 1987).

Hoy en día, el CID se concibe como una **lesión premaligna** sin que exista, pues, progresión a carcinoma invasivo en todos los casos (FRIKBERG, 1993; FISHER, 1986). Del conjunto de estudios revisados, la proporción de ellos que evolucionarían a formas infiltrantes, varía entre 28%-34% (ROSEN, 1980; PAGE, 1982; SILVERSTEIN, 1990), y



el tiempo medio considerado para esta transformación oscilaría entre 1-10 años (PAGE, 1982; FRIKBERG, 1991, 1993).

#### II.4.- PRESENTACIÓN CLÍNICA

La manera de manifestarse el CID ha sufrido una inversión en su frecuencia en los últimos años. En efecto, hoy día es más frecuente su detección en fase asintomática (microcalcificaciones, distorsiones del parénquima mamario, etc.), en comparación con las formas sintomáticas, que era el modo de presentación habitual hace algo más de una década. Este cambio queda bien evidente en el gráfico 1 tomado de la experiencia de la clínica Lahey.

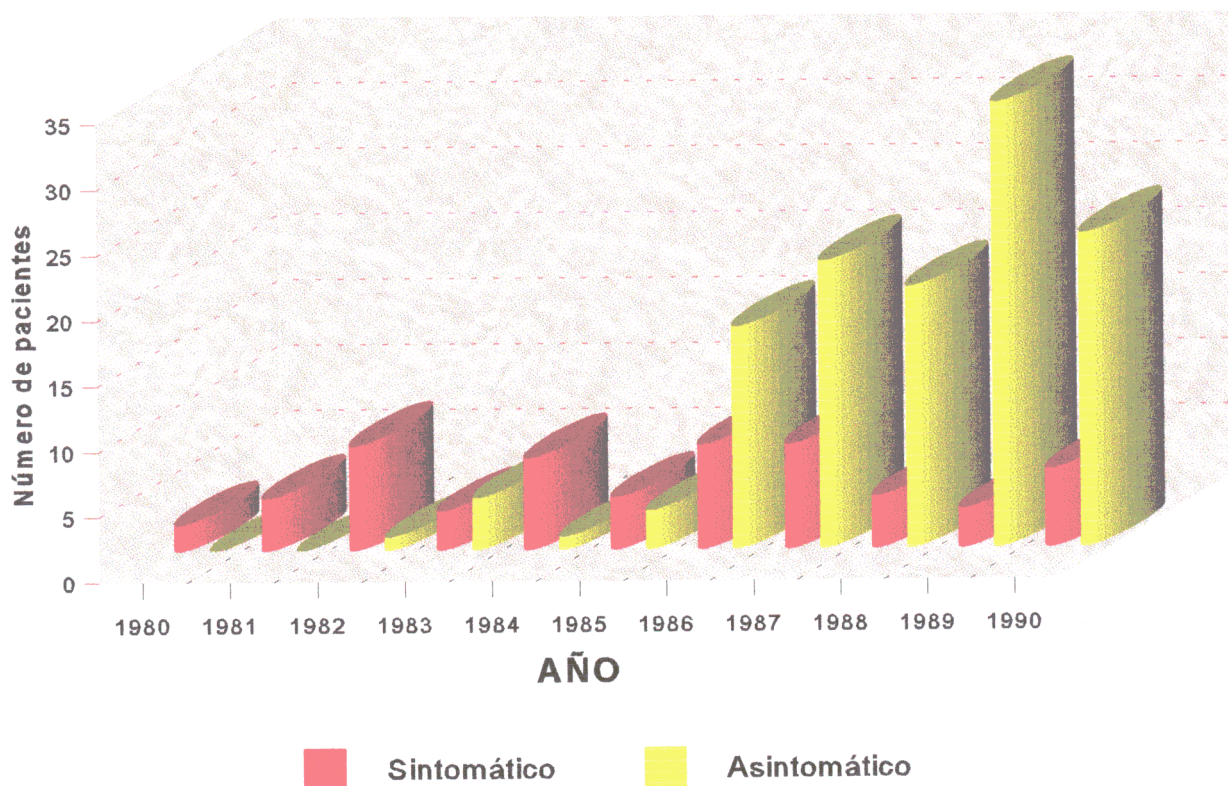


Gráfico 1: *Número de pacientes con distintas formas de presentación del CID (Clínica Lahey)*

A) Las formas sintomáticas de presentación del CID más frecuentes son:

- ① Masa, tumoración palpable.
- ② Secreción por el pezón.
- ③ Enfermedad de Paget del pezón.

1.- El CID puede detectarse como un tumor, con características clínicas indistinguibles de las de los cánceres infiltrantes, con excepción de aquellas directamente relacionadas con un tumor invasor (infiltración cutánea, retracción de piel, etc.).

Hasta la última década, el porcentaje de CID palpables alcanzaba el 60-70% de los casos (ZAFRANI, 1986; FENTIMAN, 1990) mientras que en la actualidad, oscila entre un 20-30% (SILVERSTEIN, 1990; FISHER, 1993). Sin duda, este hecho se justifica en parte, al menos, por el menor tamaño medio de los CID diagnosticados en la actualidad, que entre el 65-85% no superan los 2 cms. de diámetro y, sin embargo, no hace muchos años, un porcentaje similar alcanzaba los 3-3,5 cms. de diámetro (LAGIOS, 1989; SILVERSTEIN, 1990; FISHER, 1993).

2.- La secreción patológica por el pezón, generalmente como telorragia, está presente en el 10-20% de los casos (ZAFRANI, 1986; FENTIMAN, 1990).

HOLLAND relaciona la telorragia con el tamaño tumoral, siendo aquella más frecuente cuanto mayor sea la lesión, y FENTIMAN considera que la telorragia, bien sea macro o microscópica, está presente hasta en el 75% de los casos de CID.

3.- La enfermedad de Paget se presenta con frecuencia como manifestación de un CID subyacente que puede estar limitado a los conductos galactóforos del pezón, o puede ser más extenso en su distribución en el tejido mamario.

La enfermedad de Paget asociada al CID, normalmente no presenta un tumor palpable en la mama, sino los cambios característicos de la enfermedad a nivel del pezón (eritema, induración, eccema, erosión, etc.). La existencia de una tumoración palpable asociada nos debería hacer sospechar la posibilidad de un cáncer invasivo (LAGIOS, 1984; OSTHER, 1990; ACEBO, 1992).

CONTESSO (1988) encuentra afectación del pezón en el 49% de 117 mastectomías realizadas en CID diagnosticados clínicamente. Sin embargo, LAGIOS (1982) en un estudio de 40 mastectomías por CID detectados mamográficamente, tan sólo encuentra afectación del pezón en el 20% de los casos. Podría pensarse que los CID diagnosticados clínicamente, que suelen tener un mayor tamaño, se acompañan con mayor frecuencia de afectación del pezón, en relación con los diagnosticados en etapa presintomática por mamografía.

B) Las **formas asintomáticas** del CID antes de 1985, como podemos ver en el gráfico 2.a, representaban el 0,6% de todos los cánceres de mama vistos en la clínica Lahey, mientras que en la última década suponen el 12,3% (gráfico 2.b). Llama la atención, sin embargo, que el diagnóstico de las formas sintomáticas ha permanecido prácticamente estable, siendo del 2% antes de 1985, y del 2,9% en la etapa posterior.

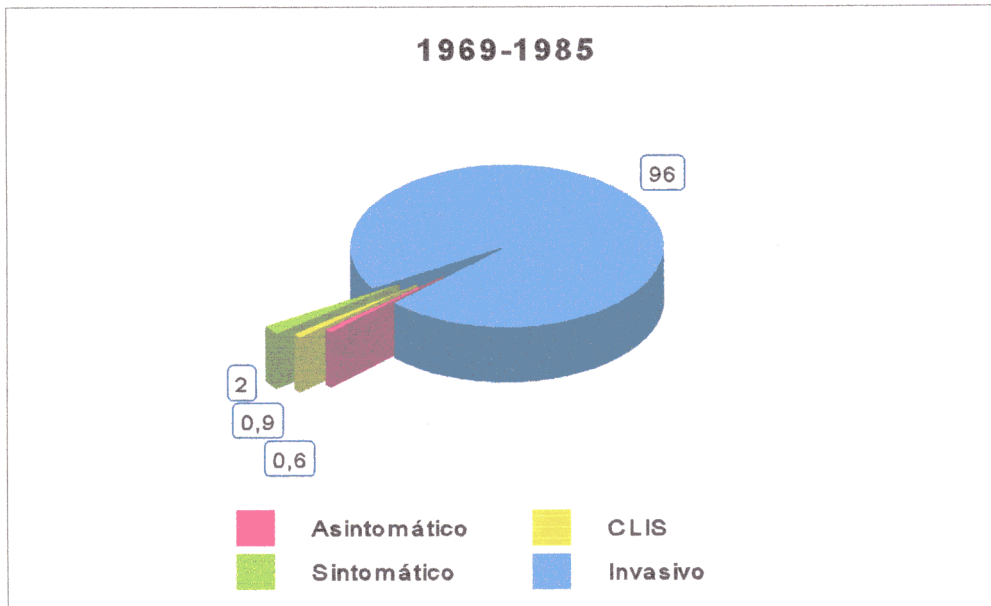


Gráfico 2.a: *Cambios en la distribución del CID en la etapa premamográfica (Clínica Lahey)*

Este hecho nos hace pensar que no todas las formas asintomáticas evolucionarán a formas sintomáticas y, posteriormente, éstas hacia neoplasias invasivas y, además, refleja el criterio de la heterogeneidad del CID de mama. Según HUGHES (1996), los CID diagnosticados en base a un estudio mamográfico representarían lesiones preinvasivas de

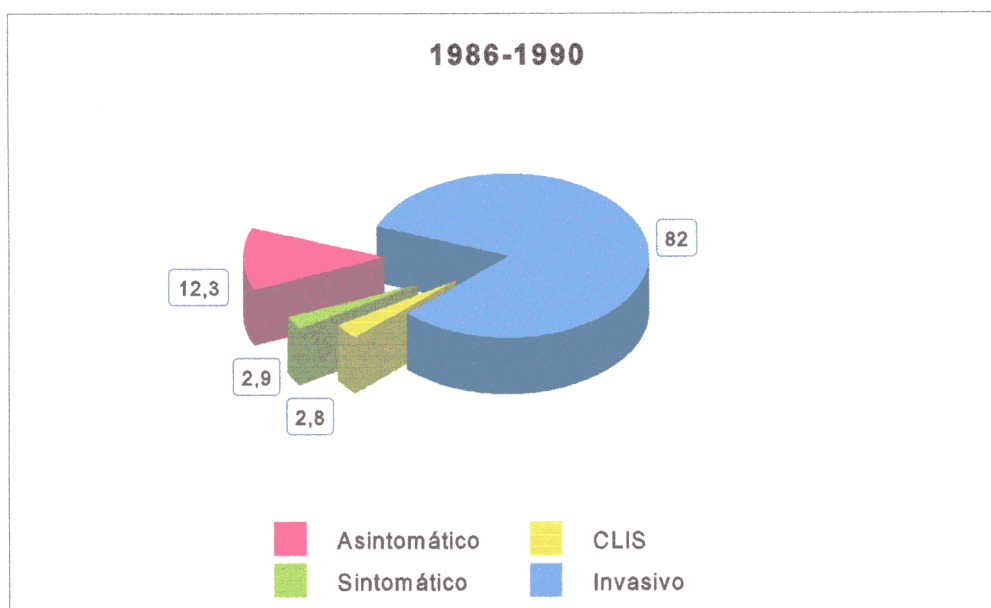


Gráfico 2.b: *Cambios en la distribución del CID en la etapa de screening mamográfico (Clínica Lahey)*



más alto riesgo que las formas sintomáticas. Este concepto vendría reforzado por el hallazgo de como el grado histológico de las neoplasias detectadas mediante mamografía, es más alto que aquéllas que se presentan como masa palpable (gráfico 3). Por otro lado, y como analizaremos con posterioridad, el tamaño del tumor tiene un valor pronóstico evidente, por lo que nuestros esfuerzos irán encaminados al diagnóstico de estas lesiones en la fase más temprana posible.

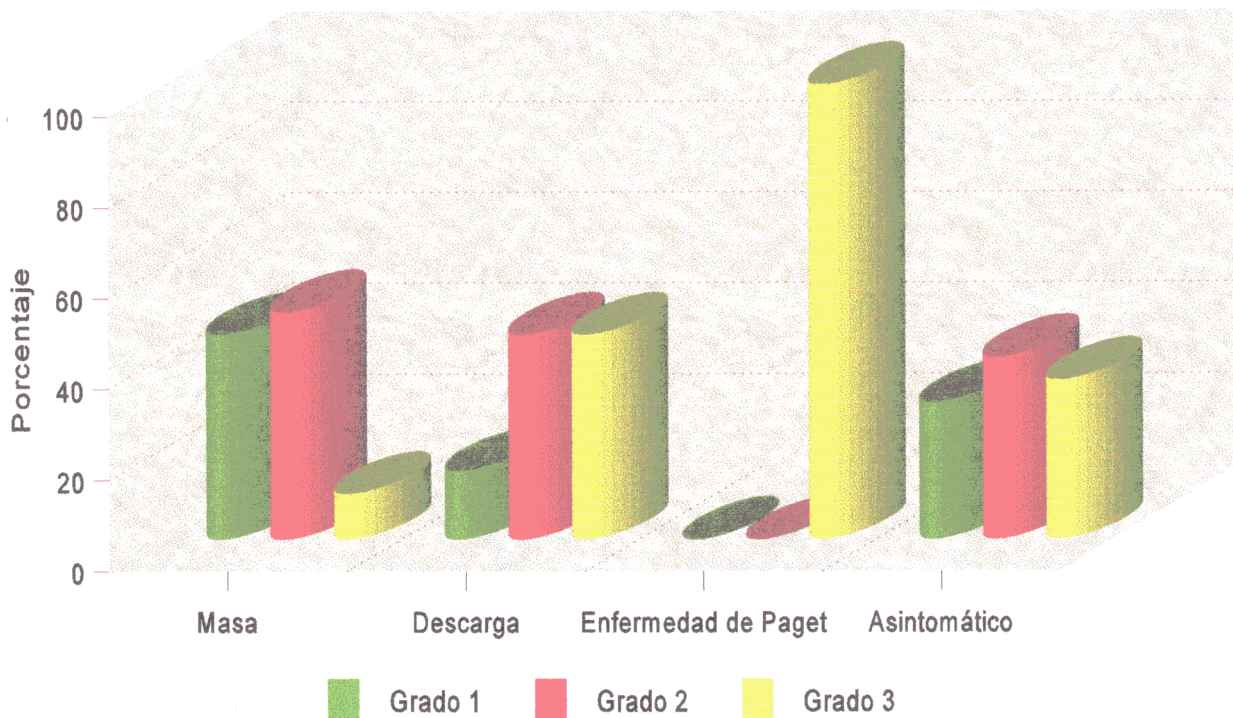


Gráfico 3: *Modos de presentación en relación con el Grado del CID.*

Las microcalcificaciones mamarias pueden constituir la única alteración morfológica objetivable de un CID. Alrededor del 95% de los casos de CID, son detectados en la actualidad en una fase preclínica, asintomática, debido a microcalcificaciones detectadas en una mamografía rutinaria de control o incluidas en un programa de “screening” (PEETERS, 1986; VAN DONGEN, 1989).

No obstante, las microcalcificaciones no son patognomónicas de malignidad, y existen algunas características (número, tamaño, contorno, disposición, etc.) que les confieren especial riesgo de estar relacionadas con un carcinoma.

LAFONTAN (1994) estudia 400 casos de microcalcificaciones agrupadas, en las cuáles existía un mínimo de 5 calcificaciones, y evaluó ocho características de ellas que incluían: número de microcalcificaciones por  $\text{cm}^2$ , el número total de ellas, la irregularidad en su densidad, la regularidad del tamaño, y la existencia de formas vermiculares, lineales o ramificadas.

Cinco de estas características eran estadísticamente significativas de sospecha de malignidad e incluían: formas vermiculares, lineales o ramificadas, tamaño irregular, número de microcalcificaciones, y número de éstas por  $\text{cm}^2$ . Analizando el valor de la combinación de los tres criterios más específicos: forma vermicular, forma lineal o ramificada y tamaño irregular encuentra que si no está presente ninguno de ellos, el valor predictivo de malignidad es del 7%, mientras que si los tres criterios están presentes, se acerca al 88%.

En la serie de POWEL (1983) sobre 282 biopsias realizadas ante la presencia de microcalcificaciones patológicas como único dato mamográfico, encuentra un 16,7% (47 casos) de cánceres, de los cuáles 36 (76,5%) eran carcinomas "in situ" y el 72% de éstos eran CID. De los 11 carcinomas invasivos, sólo uno presentaba ganglios axilares positivos. Hay que destacar que el 83% de las biopsias fueron benignas.

En 100 casos de CID detectados por "screening" mamográfico, STOMPER (1989)

además, asimetrías del parénquima mamario. En esta misma serie, el 35% de las microcalcificaciones agrupadas tenían formas lineales o ramificadas, 52% eran granulares, y en el 13% se observaban ambas formas.

En 1990, HOLLAND y HENDRIKS intentan correlacionar la apariencia radiológica de las microcalcificaciones con los diferentes tipos histológicos de CID. Así, las asociadas a CID pobremente diferenciado, suelen aparecer en las mamografías con una distribución lineal, ramificadas, o en forma de gránulos groseros. Por el contrario, las asociadas con CID bien diferenciado suelen ser microcalcificaciones finas, agrupadas, o laminadas. Podrían darse las dos manifestaciones en casos de CID medianamente diferenciado. No obstante, no todos los autores están de acuerdo; así STOMPER, en la serie mencionada anteriormente, no encuentra relación entre el subtipo histológico del CID y la morfología de las microcalcificaciones.

Estos mismos autores intentan también valorar la relación entre el tamaño del tumor determinado por el patólogo, y la ocupación del área de microcalcificaciones en la mamografía. Usando dos proyecciones radiológicas (craneocaudal y oblicua), la precisión en la estimación es mayor en los CID pobremente diferenciados, en los que tan sólo existe una discrepancia de más de 20 mm. en el 16% de los casos y, sin embargo, ésta alcanza el 47% en las formas bien diferenciadas. Si a las dos proyecciones referidas añadimos una radiografía con ampliación de la zona, las diferencias entre el tamaño estimado basado en las mamografías y el histológico, se reducen al 14% en las formas bien diferenciadas.

No obstante, cabe reseñar que la calidad mamográfica y la experiencia del radiólogo son

dos variables fundamentales a la hora de correlacionar de una manera tan preciosa los diagnósticos anatomopatológicos con los mamográficos (OLSON, 1988).

Así pues, las microcalcificaciones pueden ser la única alteración mamográfica indicadora de la existencia de un carcinoma. La mayoría de las neoplasias detectadas de este modo corresponden a lesiones “in situ”, sobre todo CID, y el resto a formas infiltrantes, con frecuencia microinvasivas, y que rara vez van a presentar metástasis ganglionares. En la actualidad, el diagnóstico del CID se efectúa fundamentalmente mediante la identificación de estas microcalcificaciones “patológicas” en mamografías realizadas a mujeres asintomáticas y por motivos diferentes (screening, control de pacientes de alto riesgo, etc.).

La cooperación entre los radiólogos, patólogos y cirujanos es esencial, si se quiere valorar correctamente las microcalcificaciones para llegar a un diagnóstico exacto.

## **II.5.- DISTRIBUCIÓN DEL TUMOR EN LA MAMA**

La distribución del tumor en la mama, así como la posible afectación de los ganglios axilares, son dos aspectos importantes que van a incidir en la elección del tratamiento adecuado del CID.

### **II.5.1.- MULTICENTRICIDAD/MULTIFOCALIDAD**

La incidencia de multicentricidad estudiada en piezas de mastectomías realizadas por



CID, oscila del 9-47% (FOWBLE, 1991). Esta disparidad en los porcentajes puede ser debida bien a diferentes métodos de estudio de las piezas, o a los distintos criterios de interpretación de los conceptos de multicentricidad y multifocalidad.

Entendemos como multicentricidad aquellas zonas del CID existente en un cuadrante distinto al que asienta el tumor primario, y como multifocalidad la presencia de distintos focos de CID en el mismo cuadrante del tumor primario.

Sin embargo, no todos los autores tienen los mismos conceptos, y así FOWBLE (1991) considera multicentricidad a la presencia de focos de CID separados del tumor primario por una distancia determinada (5 cms.), sin importar el cuadrante en el que estén situados, mientras que para HOLLAND y HENDRIKS (1994) esta distancia es de 4 cms.

Existen numerosos estudios en los que el tamaño del tumor se relaciona con la presencia de multicentricidad. Así LAGIOS (1982) publica los resultados de un estudio multicéntrico, destacando que para tumores mayores de 2,5 cms., la frecuencia de multicentricidad era del 52%, y para lesiones menores de dicho tamaño ésta representaba el 14%. SCHWARTZ; en un trabajo publicado en el año 1989, añade que la multicentricidad no sólo está relacionada con el tamaño del tumor, sino también con el número de conductos afectados por el CID.

FAVERLY (1992) realizó un estudio en 60 piezas de mastectomía con CID, encontrando que la mitad de ellos mostraban un crecimiento continuo, y el resto discontinuo, pero en todos los casos estaba comprendido dentro del mismo cuadrante. En aquellos casos de crecimiento discontinuo, entre los focos de CID existían áreas de tejido mamario normal. A

esta distribución la denomina “gaps”, siendo habitual en ellos su pequeño tamaño (menos de 5 mm. en el 82%).

Este mismo autor encuentra que la posibilidad de encontrar un patrón de crecimiento continuo o no (presencia de gaps o no) estaba en relación con el subtipo histológico del CID. Así, las formas pobremente diferenciadas en el 90% presentaban un crecimiento continuo; las medianamente diferenciadas en el 55%, y en las bien diferenciadas, la presencia de gaps alcanzaba el 70%, siempre observadas en el mismo cuadrante (Tabla I).

TABLA I: *Clasificación histológica del CID. Relación con el patrón de crecimiento*

TIPO de CID	TOTAL (%)	DISCONTINUO (%)	CONTINUO (%)
Bien Diferenciado	27 (45)	19 (70)	8 (30)
Medianamente Diferenciado	9 (15)	5 (56)	4 (44)
Pobremente Diferenciado	19 (32)	2 (10)	17 (90)
Mixto	5 (8)	4 (80)	1 (20)
TOTAL	60	30	30

BELLAMY (1993) y PATCHEFISKY (1989) comunican la frecuente asociación entre el subtipo micropapilar del CID y la existencia de multicentricidad. Este último autor presenta cifras de multicentricidad del 80% para las formas micropapilares, frente al 36% para el resto de los subtipos.

FRIKBERG (1994) recopila la experiencia de diferentes autores sobre la multicentricidad en el CID, y considera que está presente en, aproximadamente, la tercera parte de los casos, como vemos en la Tabla II.

TABLA II: *Incidencia de multicentricidad, en pacientes con CID*

AUTOR	AÑOS	Nº de Pacientes	Multicentricidad
CUTULI	1992	34	12 (35)
LAGIOS	1982	53	17 (32)
NIELSEN	1984	11	4 (36)
SCHWARTZ	1984	11	4 (36)
SCHWARTZ	1989	50	18 (36)
SILVERSTEIN	1992	98	15 (15)
SIMPSON	1992	36	28 (78)
TOTAL		293	98 (33,4)

A pesar de los criterios diferentes entre los distintos autores mencionados, podemos considerar que el CID puede presentar un patrón de crecimiento continuo o discontinuo, habitualmente en el mismo cuadrante, y que la verdadera multicentricidad es menos frecuente. El patrón de distribución en el cuadrante, nos sugiere que la obtención de un margen amplio libre de lesión, debería ser un objetivo importante en aquellas pacientes en las que se contemple la conservación de la mama.

### II.5.2.- BILATERALIDAD

Las cifras de incidencia de bilateralidad en pacientes con CID son estimativas, dado que

sería necesario realizar una mastectomía bilateral con un estudio patológico meticuloso para establecer su verdadera incidencia.

La aparente incidencia de bilateralidad se sitúa entre el 5-15% (VON RUEDEN, 1984; SILVERSTEIN, 1990; FRIKBERG, 1993), y la mayoría de estas lesiones suelen ser también “in situ” (SENOFSKY, 1986).

Para FISHER, la existencia de un CID bilateral clínicamente evidente es excepcional en el momento del diagnóstico (0,1%), sin embargo, en estudios de autopsias, los índices de CID bilateral oculto son mayores, situándose alrededor del 30% (NIELSEN, 1987).

La incidencia del CID bilateral asincrónico es similar a la presentación sincrónica ya comentada, manifestándose a los 4-6 años del diagnóstico del tumor primario (SILVERSTEIN, 1990).

Por tanto, la incidencia de bilateralidad del CID parece escasa, similar a la del carcinoma infiltrante, y sin que ella signifique una modificación en la supervivencia (FISHER, 1984).

### **II.5.3.- INVASIÓN OCULTA**

Conceptualmente, la consideración del CID excluye la posibilidad de infiltración, sin embargo, la incidencia de metástasis ganglionares asociadas al CID oscila entre el 1-2 % (SILVERSTEIN, 1991). Es evidente que la presencia de metástasis ganglionares en un CID traduce una invasión oculta no detectada en el estudio histopatológico del tumor.

Sin embargo, este concepto no es tan categórico para algunos autores, para los que el termino invasión oculta, hace referencia a un carcinoma infiltrante, que sólo muestra una pequeña zona de microinvasión en una lesión predominantemente intraductal. La trascendencia de uno u otro diagnóstico es evidente, desde el punto de vista terapéutico y pronóstico.

Las diferencias porcentuales encontradas en la literatura, sobre la posibilidad de detección de esta invasión oculta, son amplias y, en parte, pueden ser explicadas por la dificultad de aunar criterios sobre la forma de realizar la biopsia y la metodología del estudio anatomopatológico de la pieza.

El modo de realizar la biopsia (incisional o escisional), el momento de efectuar el estudio anatomopatológico (intraoperatorio o diferido), y la minuciosidad de este estudio (número de cortes histológicos), van a influir de modo decisivo en los porcentajes de microinvasión detectados. Evidentemente, un diagnóstico basado en una biopsia incisional, y realizado intraoperatoriamente, va a conllevar una mayor posibilidad de error y, de hecho, no es infrecuente que un diagnóstico de CID realizado en estas condiciones, se rectifique al detectarse invasión oculta en el estudio diferido en parafina.

No obstante, sin lugar a ninguna duda y, por encima de estas consideraciones, un patólogo experto en patología mamaria es esencial para no pasar por alto una invasión oculta.

Parece existir una relación directa entre el tamaño del CID y la posibilidad de invasión oculta, y LAGIOS la confirma como vemos en la Tabla III, de modo que, para un tamaño

superior a 56 mm., alcanza casi el 50%.

TABLA III: *Relación entre tamaño del CID e invasión oculta*

Tamaño del CID	Nº con invasión oculta	Nº total
0-25mm*	0	59
26-35mm*	0	12
36-45mm*	0	9
46-55mm*	1	6
>56mm*	12	25
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>111</b>

\* *Las piezas estaban confirmadas con márgenes quirúrgicos libres*

SILVERSTEIN corrobora esta relación, (19% de microinvasión para tumores mayores de 1 cm. y del 5% para menores de este tamaño), y comunica que el tamaño medio de los tumores de su serie con microinvasión fue de 3,8 cms.

El tipo histológico del CID también parece tener conexión con la existencia de invasión oculta. El propio SILVERSTEIN (1990) encuentra en su serie que el 75% de los tumores con microinvasión eran del tipo comedo, y PATCHEFISKY (1989) detecta en su estudio que el 63% de estos tumores (12 de 19) la presentaban, y tan sólo mostraron invasión oculta el 11% del tipo no comedo (4 de 36).

Para otros autores, como FENTIMAN (1986) y GUMP (1987), la invasión oculta la relacionan con la forma de presentación del CID, bien sea de manera sintomática o no. Para el primer autor los índices de invasión oculta serían del 11% y del 5,5%, respectivamente,

mientras que para el segundo son del 15% y 5%.

Es clásico en la literatura, y ha sido referido en distintas ocasiones en este trabajo, el reconocimiento de metástasis axilares (1%) sin evidencia de invasión del estroma mamario, aún en estudios realizados con microscopio electrónico (FOWBLE, 1991). Sin duda, esto traduce un error en el muestreo de la pieza, o una limitación metodológica, ya que la existencia de microinvasión es obligada ante la presencia de metástasis, pero es una realidad clínica que conviene no olvidar.

Parece pues que la posibilidad de invasión oculta en el CID se relaciona con el tamaño de la lesión en el momento del diagnóstico, el subtipo histológico, y con el modo de detección, bien sea clínico o radiológico.

La manera en que se realice la biopsia, el modo en que se haga el diagnóstico histológico, y la presencia de un patólogo experto que lo efectúe, son factores importantes que disminuirán la posibilidad de error en el diagnóstico de microinvasión. La infrecuencia de metástasis ganglionares justifica no realizar linfadenectomía en 100 mujeres en el momento de tratar el tumor primario intraductal, sino tan sólo en una, de modo diferido, y ante el diagnóstico cierto de microinvasión.

## **II.6.- DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico definitivo del CID se establece por el estudio histopatológico. En relación al diagnóstico y a su metodología podríamos considerar dos situaciones diferentes:

A) Lesiones que tienen una presentación clínica como nódulo palpable, telorragia o alteraciones a nivel del pezón, y que no reúnen características clínicas específicas que las diferencien de las formas infiltrantes.

En lo que hace referencia a la metodología diagnóstica en este grupo tampoco hay diferencias sensibles y, en esencia está basada en :

- ① Mamografías
- ② PAAF/Citología
- ③ Biopsia convencional

1.- En relación a la mamografía, el CID con expresión clínica no presenta características radiológicas propias que permitan diferenciarlo de una neoplasia infiltrante.

2.- El papel desempeñado por la PAAF en el diagnóstico de las lesiones malignas de la mama es bien conocido. En una revisión de 31.340 PAAF realizada por HERMANN (1992), encuentra una sensibilidad entre 65%-98% y una especificidad de 34%-100% dependiendo de los grupos consultados. Prácticamente no existen falsos positivos, 0-0,4%, (LEE, 1987; FELDMAN, 1985), y los falsos negativos se sitúan entre el 0-4% (O'MALLEY, 1993), siendo estos casos más frecuentes en tumores bien diferenciados.

Sin embargo, la mayor limitación de la PAAF radica en no poder distinguir



entre formas “in situ” e infiltrantes por razones obvias (FRIKBERG, 1993). En aquellas formas de CID “sintomáticas”, el diagnóstico de malignidad de la PAAF nos exige la realización de una biopsia, para la confirmación histológica definitiva.

- 3.- La confirmación diagnóstica nos la va a dar la biopsia aunque, en el tipo de tumores que estamos tratando, va a tener más dificultades y errores de los habituales.

Como hemos dicho, el CID con traducción clínica es indistinguible de las formas invasivas y, en estas situaciones, la biopsia suele realizarse intraoperatoriamente, ante la sospecha de un carcinoma infiltrante. El diagnóstico anatomopatológico por congelación de CID hay que aceptarlo con cierta reserva, ya que el diagnóstico diferido puede mostrar áreas de microinvasión no identificadas en el primer momento. La trascendencia de uno u otro diagnóstico es importante, entre otras razones, por el diferente tratamiento quirúrgico a realizar (FRIKBERG, 1993).

Por tanto, el CID con manifestación clínica no presenta ningún carácter distintivo con las formas infiltrantes, tanto en la exploración clínica, como en el estudio mamográfico, y la PAAF. La biopsia establece el diagnóstico, pero está sujeta a algunas limitaciones en caso de realizarse por congelación intraoperatoriamente, como acabamos de comentar.

B) El diagnóstico del CID en los últimos años se viene realizando en mujeres asintomáticas en base a hallazgos mamográficos. Estos hallazgos o alteraciones mamográficas consisten en: microcalcificaciones, distorsiones del parénquima y en pequeños nódulos, normalmente menores de 1 cm. Evidentemente, en estos casos también realizaremos una biopsia para su confirmación histológica.

De este modo, el 8% de las biopsias efectuadas en lesiones no palpables y el 30% de los cánceres de mama no palpables son carcinomas “in situ” (FRIKBERG, 1993).

El objetivo de la biopsia de las lesiones no palpables es incluir en ella toda la zona de sospecha, intentando causar el menor daño tisular y el menor defecto estético posible.

Debemos tener en cuenta que la mayoría de las microcalcificaciones que se biopsian serán lesiones benignas, 65-80%, (COLBASSANI, 1982; ROSES, 1991), por lo que es importante alcanzar un equilibrio entre la extensión suficiente de la biopsia, para comprender la lesión mamográfica sospechosa con margen adecuado y el resultado estético, dada la benignidad en la mayoría de los casos, como acabamos de comentar.

En el año 1974 THREATT describió, por primera vez, el método para biopsiar este tipo de lesiones no palpables, mediante la colocación de una aguja guiada por mamografía que trataba de localizar con precisión la zona de sospecha que debía abordarse de modo selectivo.

En la actualidad, el método más habitual consiste en colocar en la mama un dispositivo metálico, anzuelo o arpón y, posteriormente, con anestesia local o general, realizar la biopsia de la zona marcada. El dispositivo HAWKINS III sea, posiblemente, el más empleado.

Es importante hacer un control radiográfico de la pieza extraída, para confirmar en ella la existencia de las microcalcificaciones o de la zona sospechosa y, a continuación, remitirla al patólogo para su estudio histológico definitivo.

Para una correcta evaluación patológica se requiere que la pieza extraída sea “monobloc”, para asegurar márgenes continuos, así como una orientación adecuada de la misma, para lo que es necesario marcar el tejido biopsiado. Esta maniobra facilita el reconocimiento microscópico de los bordes quirúrgicos, y orienta sobre la ampliación de márgenes en el caso de no encontrar la lesión sospechosa, o bien porque el diagnóstico corresponda a un carcinoma.

### **II.6.1.- DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

El diagnóstico anatomopatológico del CID normalmente no es complejo, pero en algunas ocasiones, presenta dificultades en cuanto al reconocimiento de la propia lesión y, también, en cuanto al diagnóstico diferencial con otras lesiones mamarias.

La distinción entre CID y CLIS normalmente es sencilla, pero cuando coexisten en una misma área, esta diferenciación puede complicarse, dado que tiene unas características

histológicas y citológicas en alguna medida similares (ROSEN, 1984; PATCHEFSKY, 1989).

Aunque, en general, el CID afecta predominantemente al conducto mamario (FECHNER, 1971; KERNER, 1986), y el CLIS a los lóbulos (FECHNER, 1972), en algunas ocasiones, el CID se propaga a través del lóbulo mamario, denominándose a este hecho “cancerización de los lóbulos”. De igual modo, el CLIS puede afectar a los conductos (FECHNER, 1972; ANDERSEN, 1974) y, en ocasiones, ambas neoplasias pueden aparecer juntas en la misma unidad anatómica conducto-lóbulo (ROSEN, 1980).

Por todo ello, el diagnóstico diferencial no debería hacerse basado en la localización de la lesión dentro del epitelio mamario, sino por su arquitectura y características citológicas diferentes (FRIKBERG, 1987; LAGIOS, 1990). Bien es cierto que, en algunos casos, existen lesiones con características citológicas intermedias entre los dos tipos de neoplasia (PAGE, 1987; ROSEN, 1993), lo cual representa una dificultad adicional para la diferenciación.

A un lado del espectro del diagnóstico diferencial del CID estarían sus precursores benignos, especialmente la **Hiperplasia Ductal Atípica** y, en el otro extremo, su distinción con el **Carcinoma Ductal Microinvasivo**.

A) **La Hiperplasia Ductal Atípica** es una lesión proliferativa de la mama que posee algunas de las características arquitecturales y citológicas del CID, en algunos de los espacios afectados. Las pacientes con HDA tienen un mayor riesgo de desarrollar un CID, que puede estimarse en unas 4,4 veces superior al de la población en

general (DUPONT y PAGE, 1985).

La estimación de riesgo está matizada por una serie de factores, entre los que destacan la *historia familiar de cáncer de mama* (DUPONT y PAGE, 1985) y el *estado hormonal* de la paciente, menstruante o menopáusica (LONDON, 1992; DUPONT, 1993). De igual modo, muestra variabilidad en relación con el tiempo de seguimiento de la lesión, de manera que el riesgo es mayor en los primeros diez años, disminuyendo a más de la mitad una vez pasado este tiempo (DUPONT, 1989).

Aunque la HDA es aceptada clásicamente como una lesión premaligna, hoy en día es considerada más bien un marcador de riesgo, dado que la posibilidad de que aparezca una neoplasia es idéntica para ambas mamas (PALLI, 1991; CONNOLLY, 1992).

La importancia del diagnóstico diferencial entre HDA y CID es evidente, pero hay que considerar que, en muchas ocasiones, es realmente difícil.

ROSAI (1991) realizó un trabajo en el que cinco patólogos experimentados estudiaron una serie de lesiones proliferativas de la mama. En ningún caso hubo acuerdo entre los cinco y, tan sólo en el 18 % de los casos, estuvieron cuatro de ellos de acuerdo. Este trabajo nos resalta la gran subjetividad existente en el diagnóstico de la HDA, aún con el uso de criterios homologables en una clasificación previamente aceptada (SCHNITT, 1992).

Algunos autores han sugerido criterios cuantitativos para ayudar a diferenciar estas lesiones “borderline”. En 1985, PAGE y DUPONT afirman que, para realizar el diagnóstico de CID, deben estar presentes todas las características histológicas y citológicas que la definen y, al menos, estar presentes en dos zonas con una separación mayor de 2 mm. Estas características serán comentadas con mayor amplitud en el capítulo correspondiente.

TAVASOLI y NORRIS (1990) demuestran que el riesgo de desarrollar un carcinoma infiltrante es similar para la HDA, y un pequeño foco de CID no comedo menor de 2 mms. y, por consiguiente, estas lesiones debían clasificarse como HDA.

La aplicación de la citometría de flujo y el uso de anticuerpos monoclonales es un camino prometedor que deberá ayudar en la diferenciación del CID y las lesiones proliferativas de la mama (CRISSMAN, 1990). No disponemos en la actualidad de marcadores fiables, y su identificación se realiza por la evaluación histológica.

B) El diagnóstico de carcinoma invasivo habitualmente no es complejo, pero la distinción entre lesiones microinvasivas y CID puede plantear problemas.

Estas dificultades pueden ser debidas a la existencia de fibrosis o inflamación en los espacios afectados, lo que ocasiona distorsiones en el parénquima, o bien al fenómeno de “cancerización de lobulillos”, ó a error en el muestreo, etc.,

No existe un criterio histológico unánimemente aceptado sobre el concepto de

microinvasión. Para FISHER (1986), la invasión existe cuando hay un foco incuestionable, bien reconocido de carcinoma invasivo; sin embargo, PAGE (1987) sólo afirma el diagnóstico de invasión cuando las células tumorales están presentes en el estroma mamario, fuera de la región periductal o perilobular.

Esta dificultad en diferenciar el CID de formas con microinvasión, tiene un reflejo en la clínica. Al carcinoma microinvasor habría que aceptarle un cierto potencial metastásico, por lo que debería realizarse linfadenectomía axilar y, sin embargo, no sería necesario asociarla en caso de CID. Es cierto que en numerosas series se considera que el CID puede presentar metástasis ganglionares, entre el 1-2 % de los casos pero, evidentemente, en este hecho subyace un error diagnóstico y, sin duda, los casos con afectación ganglionar serían carcinomas microinvasivos no diagnosticados.

Se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas para marcar la membrana basal del conducto e identificar la zona de microinvasión (colágeno tipo IV), pero el valor real de estas técnicas no está claramente establecido (BARSKY, 1983; SAKR, 1988).

El diagnóstico diferencial con el carcinoma invasivo no presenta dificultades en la mayoría de los casos, pudiendo encontrar células tumorales en los espacios linfáticos o vasculares, lo que nos lleva al diagnóstico de cáncer infiltrante.

## **II.7.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CID.**

EL CID está formado por un grupo heterogéneo de lesiones que se manifiestan, clínica y radiológicamente, de modos distintos, tienen diferente apariencia histológica, distinta expresión de marcadores y, lo que es más importante, distinto comportamiento biológico y potencial de malignización.

No es fácil llegar a un consenso sobre la clasificación histopatológica en este tipo de lesiones, pero es importante realizarlo, entre otras razones, como ayuda para progresar en el conocimiento de estos tumores y facilitar el manejo terapéutico de dichas neoplasias.

La clasificación ideal debería reunir una serie de características, entre las que destacarían:

- Tener cierta correlación con la recurrencia local y con el desarrollo de formas invasivas.
- Poder ser aplicada a cualquier tipo de CID, en cualquiera de sus manifestaciones.
- Ser simple y rápida de aplicar, aunque sea pequeño el número de conductos afectados por el CID.
- Tener el mayor acuerdo posible, entre los distintos patólogos.

DOUGLAS-JONES (1996), recoge las seis clasificaciones del CID que, en mayor o menor medida, son usadas en la actualidad (Tabla IV).



TABLA IV: Clasificación histológica (Douglas-Jones, 1996)

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CID MAMARIO		
ARQUITECTURAL	Comedo	
	Cribiforme	
	Micropapilar	
	Papilar	
	Sólido	
CITONUCLEAR	Grado nuclear	Bajo
		Intermedio
"DE VAN NUYS"	Bajo Grado	Sin necrosis
		Con necrosis
"DE HOLLAND"	Alto Grado	
	Bien diferenciado	
	Moderadamente diferenciado	
"DE NOTTINGHAM"	Pobrementemente diferenciado	
	CID sin necrosis	
	CID con necrosis	
POR EXTENSIÓN DE LA NECROSIS	Comedo Puro	
	Sin necrosis (<10%)	
	Necrosis (10-90%)	
		Necrosis extensa(>90%)

A) Dependiendo de las características arquitecturales y de la existencia o no de necrosis de los distintos tipos histológicos, se pueden distinguir los siguientes subtipos (PAGE, 1987; ROSEN, 1993):

- ① Comedo.
- ② Cribiforme.
- ③ Micropapilar.
- ④ Papilar.
- ⑤ Sólido.

- 1.- COMEDO: Tiene dos características principales, como son: necrosis central y marcada atipia citológica.

Se encuentra material necrótico ocupando la luz de los conductos, adoptando forma de “comedo”. Este material necrótico central acompañado de depósitos cálcicos favorece la detección mamográfica, apareciendo las típicas microcalcificaciones lineales, ramificadas o, a veces, dispuestas en gránulos agrupados.

En el año 1975, AHMED sugirió que las calcificaciones asociadas con la enfermedad neoplásica eran expresión de un proceso de secreción activa de las células epiteliales ductales o acinares, más que de procesos de mineralización de células degeneradas y de detritus celulares. Esta teoría también es sostenida por otros autores (PRICE y GIBBS, 1978; EGA, 1980) aunque, posiblemente, coexistan las dos posibilidades.

Desde el punto de vista microscópico, la forma comedo está constituida por células grandes, con gran pleomorfismo nuclear, mitosis frecuentes y anormales y marcada atipia nuclear.

No es infrecuente encontrar marcada fibrosis del estroma e inflamación crónica, que pueden simular una invasión precoz y plantear problemas de diferenciación con formas microinvasivas.

- 2.- CRIBIFORME: Las células de esta variante de CID son de tamaño pequeño o mediano, núcleos hipercromáticos, escasas atipias, y necrosis aislada. El patrón de crecimiento es similar al de una criba, de ahí su nombre.
- 3.- MICROPAPILAR: Posee unas células características de pequeño o mediano tamaño que forman a modo de crestas orientadas perpendicularmente a la membrana basal, proyectándose hacia la luz del conducto. Las figuras mitóticas son infrecuentes, y el núcleo muestra un hipercromatismo difuso. En su forma pura tiende a afectar a un gran número de conductos.
- 4.- PAPILAR: Tiene un crecimiento típico en papilas que crecen hacia la luz del conducto, pudiéndose encontrar como lesión única que afecta a un conducto central, o bien como múltiples focos periféricos.

La proliferación de células epiteliales, en las que no encontramos habitualmente atipias ni células mioepiteliales, es soportada por un eje fibro-vascular.

Es importante la diferenciación de este tipo de CID con los papilomas y ello no siempre es fácil. Algunos CID de la variante papilar pueden mostrar áreas de hiperplasia atípica, que pueden complicar el diagnóstico diferencial.

- 5.- SÓLIDO: Las células neoplásicas que lo constituyen son de tamaños variado, y ocupan y distienden los espacios afectados. Pueden presentar pequeñas zonas

de necrosis.

Existen algunas variantes poco frecuentes del CID como el “clinging”, CID con células en anillo de sello, y el carcinoma quístico hipersecretor.

Esta clasificación del CID está llena de subjetividad para el patólogo que la realiza, aun siguiendo criterios homogéneos. Ello explicaría los distintos porcentajes de estos subtipos de CID, en relación con los trabajos consultados, de modo que el tipo comedo puede representar desde el 0% al 50% (PAGE, 1982; SILVERSTEIN, 1990)

Por otro lado, resulta difícil observar un patrón histológico puro sino que, por el contrario, predominan las formas mixtas, sobre todo, en lesiones grandes (PATCHESKY, 1989). Así, en un estudio de 100 casos de CID, el 30% de las formas no comedo mostraban un patrón histológico mixto, destacando las formas cribiforme y micropapilar, y el 42% de las formas comedo contenían en su seno otras variantes histológicas (LENNINGTON, 1994).

B) Clasificación basada en características citonucleares de las células neoplásicas (LAGIOS, 1982). Dividen al CID en tres categorías:

- 1.- Grado nuclear bajo: muestra núcleos monomórficos redondos u ovals con una membrana nuclear lisa, cromatina fina, y ausencia de nucleolos. Existen pocas mitosis y la necrosis está ausente.

- 2.- Grado nuclear intermedio: con moderado pleomorfismo, con tamaño nuclear mayor al grupo anterior, y con aumento en el número de mitosis. A veces, presenta pequeños focos de necrosis.
- 3.- Grado nuclear alto: gran pleomorfismo, núcleos grandes con acúmulos de cromatina en forma de gránulos, múltiples nucléolos, y mitosis frecuentes con patrón alterado de división. Es frecuente encontrar necrosis.

Esta clasificación presenta importantes problemas a la hora de ser valorada por distintos patólogos. Se comunican un 62,2% de discordancia en la diferenciación entre grado bajo e intermedio, siendo del 33,9% en los casos de grado alto o intermedio (DOUGLAS-JONES, 1996).

- C) Clasificación de "Van Nuys": Divide al CID en alto grado y bajo grado, subdividiendo este último grupo en formas con necrosis o sin necrosis (SILVERSTEIN, 1995).

El primer problema que surge en esta clasificación es el reconocimiento de la necrosis. Algunos conductos presentan secreciones proteicas eosinofílicas, pero no detritus celulares o microcalcificaciones. La presencia de detritus celulares debería ser un signo patognomónico, a partir del cual hablaríamos de necrosis (SILVERSTEIN, 1995), pero no todos los autores están de acuerdo, siendo para algunos suficiente la existencia de detritus eosinofílicos conteniendo cinco o más núcleos picnóticos (DOUGLAS-JONES, 1996). Este concepto es el utilizado en la

clasificación de “Van Nuys”.

El segundo problema es definir la cantidad del conducto afectado con material celular degenerado, para ser incluido en uno u otro grupo. Es necesaria para algunos autores, la existencia de más del 50% del conducto con necrosis, mientras que para otros es suficiente el mínimo hallazgo de ésta, a nivel intraductal.

El tercer problema es determinar la extensión de la necrosis, es decir, cuántos o qué porcentaje de conductos deben estar afectados, para hablar de uno u otro grupo. En la mayoría de las clasificaciones, como la de Van Nuys o la de Nottingham, como veremos más adelante, se acepta que con un sólo conducto afectado es suficiente para distinguir entre la categoría “con necrosis” o “sin necrosis”.

D) Clasificación de “Holland”, también propuesta por la “European Organization for Research and Treatment of Cancer” (EORTC), en la que la morfología nuclear como manifestación de la diferenciación citonuclear, emerge en todos los casos como una de las características más importantes. También es valorada en esta clasificación la polaridad de las células (disposición arquitectural) que, en muchos casos, ayuda a definir aquellas situaciones de difícil diagnóstico, en especial las del grupo intermedio, como veremos más adelante. Basándonos en estos dos criterios, el CID se divide:

- ① Bien diferenciado
- ② Pobremente diferenciado
- ③ Medianamente diferenciado

- 1.- Bien diferenciado: Está constituido por células pequeñas de forma cuboidea o columnar con grado nuclear bajo. No presenta habitualmente fenómenos de necrosis ni autofagocitosis. Con frecuencia aparecen calcificaciones laminares denominadas “cuerpos de psamoma”.

La disposición arquitectural de esta variante de CID suele ser la forma micropapilar o cribiforme, siendo prácticamente inexistente en la forma sólida.

La diferenciación de estos patrones de crecimiento se basa en la polarización celular, es decir, la orientación del apex de la célula hacia el conducto o hacia el espacio intracelular. Así, en la forma micropapilar, el apex celular se orienta hacia la luz, y en el tipo cribiforme hacia el espacio intercelular.

- 2.- Pobrementemente diferenciado: Está formado por células grandes con grado nuclear alto. Es fácil encontrar células necróticas y autofagocitosis; asimismo, son frecuentes las calcificaciones groseras.

La disposición arquitectural de las células en esta variante suele ser la de tipo sólido, con distensión de los conductos afectados y fibrosis periductal considerable.

No existe o es mínima la polarización celular. El rasgo diferencial indiscutible del CID pobrementemente diferenciado es el gran pleomorfismo celular existente. La enfermedad de Paget del pezón está unida a este tipo de lesión.

- 3.- Medianamente diferenciado: Presenta células de mediano tamaño, con grado nuclear intermedio. La necrosis y autofagocitosis pueden estar presentes, pero rara vez son destacadas.

Los tumores de este grupo suelen mantener cierta diferenciación arquitectural, y este hecho los diferencia de las formas pobremente diferenciadas. De igual modo, el menor grado de polarización nuclear y sus características citonucleares, permiten distinguirlo del CID bien diferenciado.

Evidentemente, las características reseñadas de este grupo intermedio parecen ambiguas e inespecíficas, pero algunos autores como BOBROW y ZAFRANI (1994) defienden su existencia al encontrar diferencias significativas con los grupos anteriores. En efecto, los valores de receptores hormonales (RH), P53, Her-2-neu y fracción "S" detectadas por estos autores, les hacen considerar a este grupo con características diferentes al resto.

En esta clasificación, aunque son valoradas tanto las características citonucleares como la polaridad celular, en la práctica vemos que el segundo concepto es escasamente utilizado. En un estudio de 180 casos de CID, sólo en 3 casos (1,6%), el criterio de polaridad celular sirvió para distinguir entre uno u otro grupo (DOUGLAS-JONES, 1996).

La correlación de estos subtipos de CID con sus características biológicas parece comprobado por BOBROW y ZAFRANI (1994), presentando las



lesiones pobremente diferenciadas normalmente Her-2-neu y P53 positivos, alto nivel de proliferación y, rara vez, RH positivos. Todo lo dicho anteriormente, hace considerar a este tipo de lesiones de peor pronóstico en relación al subtipo bien diferenciado, que se suele asociar con bajo índice de proliferación, raramente expresa el Her-2-neu, y la P53 suele ser negativa. Las características biológicas del tipo intermedio están situadas entre ambos grupos.

HOLLAND (1994) especula acerca de la evolución de los diferentes tipos de CID. El CID bien diferenciado se desarrollaría a partir de etapas de hiperplasia atípica, progresando alguna de ellas a patrón micropapilar o cribiforme. En el CID pobremente diferenciado no se reconocería etapa precursora, y podría deberse a una amplificación del oncogén Her-2-neu en etapas tempranas. El CID intermedio puede desarrollarse como una pérdida de diferenciación en lesiones bien diferenciadas.

No obstante, tenemos que asumir que existen numerosos interrogantes sin una respuesta clara, entre otros ¿Quién marca el pronóstico en las formas mixtas?, ¿Es el componente histológico más numeroso?, o ¿Es el componente pobremente diferenciado?

E. Clasificación de **Nottingham** (POLLER, 1994): Está basada en la presencia o ausencia de necrosis, características citológicas y arquitectura, estableciendo tres categorías:

- ① CID sin necrosis
- ② CID con necrosis
- ③ CID comedo puro

- 1.- Formaría parte de este primer grupo lesiones con patrón cribiforme, papilar, micropapilar o sólido, que no presentaran necrosis.
- 2.- También llamadas estas lesiones formas “comedo no puro”. Este grupo está compuesto por patrones cribiforme o micropapilar, junto con la presencia de necrosis en las células tumorales.
- 3.- Compuesto por lesiones comedo con necrosis extensa.

La dificultad en la valoración de la necrosis ya ha sido expuesta anteriormente, no obstante, esta clasificación maneja conceptos muy claros para tipificar los distintos tipos de CID dentro de estos tres grupos.

F) Clasificación por extensión de la necrosis: Ha sido propuesta por DOUGLAS y JONES (1996) y definen tres categorías:

- ① Sin necrosis, <10%
- ② Con necrosis, 10-90%
- ③ Necrosis extensa, >90%

En el primer grupo estarían lesiones en las cuáles, menos del 10% de los conductos, presentaban algún tipo de necrosis. Corresponderían al tercer grupo las lesiones que presentaran más del 90% de los conductos con algún grado de necrosis.

Todas las clasificaciones expuestas anteriormente muestran una alta relación entre la diferenciación del CID y el grado del carcinoma invasivo; sin embargo, todas ellas presentan deficiencias, ambigüedades, y problemas de interpretación, como ha quedado referido.

Actualmente, la clasificación de Van Nuys está siendo recomendada por las siguientes razones:

- 1.- Muestra un acuerdo importante entre distintos patólogos, dado que evita la distinción entre el grado nuclear intermedio y bajo, que es fuente de importantes discordancias diagnósticas.
- 2.- Presenta reglas muy definidas y puede ser aplicada a un pequeño número de ductos afectados, permitiendo clasificar de modo adecuado lesiones muy pequeñas (PAGE, 1987).
- 3.- El grado de CID clasificado por Van Nuys presenta una relación significativa con el grado de carcinoma infiltrante asociado.
- 4.- Las primeras experiencias con esta clasificación sugieren que existe relación con la supervivencia libre de enfermedad, y con el desarrollo de formas infiltrantes

(SILVERSTEIN, 1995).

Estudios posteriores permitirán confirmar las ventajas de la clasificación de Van Nuys sobre los otros sistemas. En el momento actual, representa un método prometedor que permitirá predecir el comportamiento biológico del CID.

## **II.8.- FACTORES PRONÓSTICO**

Aunque se han hecho muchos intentos para tratar de definir criterios en el CID, la predicción a largo plazo de su evolución parece un cometido difícil, aunque no imposible (KOMITOWSKI, 1989).

Parece evidente que la supervivencia global de este tumor sólo vendrá condicionada por la aparición de una enfermedad metastásica, y esto ocurrirá:

- ① Si existe una invasión oculta, no detectada, lo cual puede suceder hasta en el 11% de los casos (VON RUEDEN, 1984; FENTIMAN, 1990).
- ② Si aparece una recidiva local (RL) del CID en forma de carcinoma infiltrante.

Según TUBIANA-HULIN (1993), los factores pronóstico clínicamente aceptados y que afectan a la supervivencia global del CID, serían:

- ① Tamaño tumoral

- ② Tipo histológico
- ③ Grado histológico
- ④ Receptores hormonales

Excluimos el estado de los ganglios linfáticos dado que, conceptualmente, el CID nunca tendrá afectación de los mismos.

A estos criterios clásicos se han añadido otros más recientes, debido al mejor conocimiento del comportamiento biológico de los tumores y del cáncer de mama en particular, así como al gran desarrollo que están teniendo las técnicas inmunohistoquímicas, poniendo de relieve la posibilidad de relacionar marcadores de expresión con riesgo de recidiva y, lo que es más importante, con la posibilidad de desarrollar enfermedad invasiva.

Algunos de estos factores pronóstico en estudio serían:

- ① Cinética celular y contenido de ADN
- ② P53
- ③ Oncogén Her-2-Neu/C-erb-B-2.
- ④ Ciclinas
- ⑤ Apoptosis celular

El valor pronóstico de estos factores está por determinar, y algunos de ellos, como las ciclinas o los estudios sobre la apoptosis, son de introducción muy reciente en este campo.

## **II.8.1.- FACTORES PRONÓSTICO CONFIRMADOS**

### **II.8.1.1.- TAMAÑO TUMORAL**

Es admitido por numerosos autores la correlación entre tamaño tumoral y la existencia de microinvasión. Se estima que esta última es rara en tumores menores de 1 cm. (2-6%), y la posibilidad es superior al 20% cuando el tumor es mayor de 4,5 cms. (LAGIOS, 1989; SILVERSTEIN, 1991).

No obstante, el 65-85 % de los CID diagnosticados actualmente no superan los 2 cms., y tan sólo el 1% tiene un tamaño superior a 5 cms. (SOLIN, 1991). Aún así, sorprende encontrar casuísticas aisladas, como la de HOLLAND (1990), que refieren hasta el 51% de CID mayores de 5 cms., lo cual indica la disparidad existente sobre los criterios de medición del tamaño tumoral.

Sin embargo, no parece existir relación entre el tamaño del tumor y la RL y parece, más bien, que ésta tenga que ver con el grado histológico, la presencia de necrosis, el tipo histológico comedo, y la existencia de márgenes quirúrgicos libres, como analizaremos posteriormente (HUGHES, 1996).

### **II.8.1.2.- TIPO HISTOLÓGICO**

En relación con el pronóstico, parece existir unanimidad en aceptar la mayor agresividad del subtipo comedo (LAGIOS, 1989; BAIRD, 1990; KUSKE, 1993), que conlleva el mayor

número de RL, en general, y de recidivas invasivas en particular.

El tipo comedo, desde el punto de vista citológico, suele asociarse con un grado nuclear alto (PAGE, 1987), y la incidencia de invasión oculta es mas frecuente en él, así como en los subtipos de CID con necrosis (PATCHESKY, 1989; SILVERSTEIN, 1990).

En un trabajo realizado por SCHWARTZ en 1992, de 70 casos de CID diagnosticados en forma asintomática, el 32 % del tipo comedo desarrolló una RL, frente a tan sólo el 3% de los no comedo.

LAGIOS (1989), SILVERSTEIN (1995) y FISHER (1995) comunican en distintos estudios la importancia de la necrosis como factor pronóstico en cuanto a la aparición de RL y a la supervivencia, y PATCHESKY (1989) y SILVERSTEIN (1990) comprueban mayor incidencia de invasión oculta en las formas histológicas con presencia de necrosis.

Debe pues aceptarse que el subtipo comedo y la presencia de necrosis con llevan un peor pronóstico, traducido por un mayor número de RL, sobre todo, de formas infiltrantes.

### **II.8.1.3.- GRADO NUCLEAR (GN) - GRADO HISTOLÓGICO (GH)**

Es el de mayor valor pronóstico dentro de los factores histológicos (CONTESO, 1989; ELSTON, 1981; BROWN, 1993), aún cuando los datos provengan de diferentes centros y

diferentes patólogos (DAVIS, 1986), o se empleen diferentes sistemas de gradación (HENSON, 1991).

Hace mas de setenta años que se realizó el primer intento formal de gradación histológica del carcinoma infiltrante de mama (GREENHOUGH, 1925), destacándose entonces tan sólo tres rasgos de importancia:

- a.- Formación de túbulos
- b.- Pleomorfismo nuclear
- c.- Hiper Cromatismo

De este modo, se establecieron las bases para posteriores sistemas de gradación, demostrándose en todos ellos una asociación significativa entre el grado histológico y la supervivencia, lo que indica la poderosa información pronóstica que aporta. Sin embargo, la introducción del GH en la rutina diagnóstica ha sido lenta, muy posiblemente por la falta de unos criterios estrictos y homogéneos que limitaran la subjetividad del patólogo a la hora de establecerlo.

Existe, como hemos dicho, una correlación altamente significativa entre el GH y la supervivencia de los cánceres de mama invasivos, configurándolo como buen marcador pronóstico y apoyando el concepto de que el GH (asociación entre grado nuclear y formación de túbulos) es también un indicador de la diferenciación neoplásica.

Numerosos trabajos demuestran repetidamente que las pacientes con cáncer infiltrante



de mama de alto grado o pobremente diferenciado, presentan mayor incidencia de afectación ganglionar, de recidivas y muchas de ellas fallecen a causa de las metástasis. Por el contrario, en aquellas con un cáncer de bajo grado y/o bien diferenciado, ocurre lo contrario, y se obtienen unos índices de supervivencia notablemente mejores (ROSEN, 1981, FISHER, 1988).

También se confirma, por éstos y otros autores, que tanto el GN como el GH son factores pronóstico en todos los estadios de la enfermedad, pero lo son, especialmente, en pacientes en los que no existen metástasis ganglionares en la axila, es decir, el estadio I.

Si consideramos al CID, existen trabajos importantes que encuentran relación entre el GN y el desarrollo posterior de un cáncer invasor, así como con la posibilidad de RL.

EUSEBI (1994) estudia 80 casos de CID con un seguimiento medio de 17,5 años, y el 14% desarrolló en este periodo un cáncer infiltrante. De los 80 casos, 14 eran de alto grado y evolucionaron hacia una forma invasiva 6 (43%), mientras que de los 66 de bajo grado, sólo lo hicieron 5 (7,5%). Todas las formas invasivas surgidas de las formas de alto grado fallecen tras un periodo de tiempo entre 1 y 12 años, mientras que sólo lo hace una de las derivadas de CID bien diferenciados después de un seguimiento comprendido entre 12 y 20 años. Así pues, podría deducirse de este trabajo que los CID pobremente diferenciados evolucionan con más frecuencia hacia formas infiltrantes (fallece un mayor porcentaje de pacientes, con un intervalo menor de tiempo).

En la Tabla V adaptada de EUSEBI, se resume la relación entre el grado de

diferenciación y, por tanto, GN y GH, con la posibilidad de desarrollo de un cáncer infiltrante y con la supervivencia. Las diferencias en cuanto a esta última son estadísticamente significativas.

TABLA V. *Relación entre GH del CID / Ca invasivo / Supervivencia.*

CID	Nº Casos	CA Invasivo	Muerte por Enfermedad	No Enfermedad	Tiempo de Seguimiento
Pobremente diferenciado	14	6	6	0	1-12
Bien diferenciado	66	5	1	4	12-20

LAGIOS (1989) examinó 79 casos de CID en pacientes asintomáticos, y encuentra igualmente una estrecha relación entre GN y RL. En 36 lesiones de alto grado, 9 (25%) presentaron RL, en 10 grado intermedio lo hizo el 10%, y en 33 de bajo grado, ninguna paciente la desarrolló.

Podemos deducir, en relación tanto con la recurrencia como con el intervalo libre de enfermedad, que hay dos entidades distintas de CID, dependiendo del GN y GH (alto o bajo grado), que presentan diferente potencial de malignidad (LAGIOS, 1989).

Los CID de alto grado, comedo, y pobremente diferenciados desarrollan cáncer invasivo más frecuentemente y en un periodo más corto de tiempo que otras formas de CID. Parece pues, que los carcinomas invasivos que surgen a partir de un CID pobremente diferenciado, son más precoces y más letales que los ocasionados de formas bien diferenciadas, si bien es

necesaria la confirmación de esta hipótesis (EUSEBI, 1994).

Posiblemente, el grado de diferenciación de los cánceres infiltrantes surgidos de CID, esté en estrecha relación con el grado histológico de éstos. Así, LAMPEJO (1994) estudia 215 casos de cánceres infiltrantes, todos ellos con componente intraductal, y observa que el peor pronóstico corresponde a los tumores asociados con CID pobremente diferenciados, y que el componente intraductal bien diferenciado sólo está asociado en el 7% de los tumores infiltrantes estudiados.

Una explicación posible y lógica es que las formas de CID bien diferenciadas sólo progresan, ocasionalmente, a carcinoma invasivo y éstos se asocian a un mejor pronóstico.

#### **II.8.1.4.- RECEPTORES HORMONALES**

Desde que JENSEN y COLS, en 1968 señalaron la actividad de receptores estrogénicos (RE) en algunos carcinomas infiltrantes de mama, numerosos autores han realizado estudios clínicos y morfológicos.

Es en el año 1975, cuando HOROWITZ y McGUIRE demuestran la posible relación de los receptores hormonales con el pronóstico de estas pacientes.

KNIGHT en 1977, evalúa el papel de los RE en el cáncer infiltrante de mama, llegando a dos conclusiones importantes:

- ① La ausencia de RE lleva consigo una recidiva temprana y peor supervivencia de pacientes con cáncer de mama.
- ② La presencia de RE predice la posibilidad de obtener mayor beneficio con el tratamiento hormonal del cáncer de mama.

Las cifras publicadas por “National Surgical Adjuvant Breast Project” (NSABP) indican que la supervivencia libre de enfermedad, a 5 años, es el 10% mayor en cáncer infiltrante con RE+, que los que son RE-.

Estos resultados, entre otros muchos, sugieren el considerar a los RE como un marcador pronóstico importante de recidiva, en el cáncer invasivo de mama.

En la actualidad, está comprobado que el 50-60% de los cánceres infiltrantes de mama tienen en su citosol cantidades medibles de RE, y entre el 35-58% de receptores de progesterona (RP). En el 70% de los casos el RE va a ser funcional, lo cual va a tener implicaciones, no sólo pronósticas como ya hemos visto, sino desde el punto de vista del tratamiento a seguir (BENNER, 1988).

Los RP están directamente modulados por la transcripción de la proteína del RE, por consiguiente, la expresión del RP va a ser un fiel reflejo del RE.

Para los pacientes sin afectación ganglionar, el estado del RE asume un papel superior al del RP como factor pronóstico (CROWE, 1982; CLARK, 1984; MAKI y HOENH, 1989).

Estudios recientes (PUJOL, 1994), describen un aumento aparente en la frecuencia de cánceres con RE+ en los últimos 20 años. La explicación estaría en las modificaciones experimentadas en diversos factores hormonales, sin duda, implicadas en la etiología del cáncer mamario.

Los RH se pueden considerar (FISHER, 1988; McGUIRE, 1990) marcadores bioquímicos de diferenciación, equivalentes al grado histológico, y como éste, refleja los cambios biológicos y funcionales que acontecen en la célula neoplásica. Parece establecida la relación inversa entre RE+ y GH (BOBROW, 1994).

Los valores de RE y RP en el cáncer infiltrante de mama fueron inicialmente determinados mediante métodos bioquímicos. En los años 80, GREENE y COLS desarrollaron anticuerpos monoclonales altamente específicos para RE, detectando dichos receptores mediante una técnica inmunocitoquímica en cortes congelados. Se ha desarrollado, además, una técnica inmunohistoquímica para la demostración de RH en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, utilizando también anticuerpos monoclonales.

En la última década, muchos autores han comparado los resultados obtenidos mediante métodos bioquímicos y las técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, encontrando una excelente relación entre los valores obtenidos (BORG, 1989; CUNDAHY, 1988; MASOOD, 1989) aunque, en la actualidad, existe una preferencia generalizada hacia las últimas, ya que el uso de anticuerpos monoclonales demuestra una mayor sensibilidad (93%) y especificidad (89%) que los métodos bioquímicos clásicos (71 y 78%, respectivamente) (McCARTY, 1985).

Así como los RH, en el cáncer de mama invasivo, son un factor pronóstico contrastado, sin embargo, no podríamos afirmar lo mismo dentro del CID, dado los pocos estudios realizados acerca del valor y significado de los RH en este tipo de neoplasia.

La detección por técnicas inmunohistoquímicas de los RE en el CID, se sitúa entre el 30-80% de los casos, como vemos en la Tabla VI:

TABLA VI. *Relación entre RE+ y distintos tipos de CID.*

AUTOR	Nº CASOS CID	RE (%)	COMEDO ALTO GRADO (%)	NO COMEDO BAJO GRADO (%)
GIRI	48	45%	<20	>50
BUR	95	80%	57	91
WILBUR- BARROWS	26	73%	50	67
PALLIS	51	54%	25	66
POLLER	150	32%	16	43
ZAFRANI	95	77%	74	83

Este amplio rango en la positividad de los receptores se debe, en parte, a la inclusión de diferentes subtipos histológicos de CID en las series y a que, además, en algunos casos, aparecen mezclados CID con CLIS, siendo estos últimos normalmente RE+. Por último, hay estudios que tienen pocos casos para sacar resultados concluyentes.

No obstante, parece irse confirmando que los RE+ son encontrados, en una alta

proporción, en el patrón histológico cribiforme y micropapilar, pero menos frecuentemente aparece en las formas comedo (GIRI, 1989; BUR, 1992; BARNES, 1990; WILBUR, 1993; POLLER, 1993).

También se ha encontrado que la alta expresión de RE y de RP está asociada con tamaño nuclear pequeño y buen grado de diferenciación nuclear, y que una alta proporción de lesiones con tamaño nuclear grande, núcleo pobremente diferenciado y, a veces acompañado de necrosis extensa, son RH- (POLLER, 1993; BOBROW, 1995). Estos mismos autores encuentran una relación significativa entre la expresión de ambos RH, con la ausencia de proteína c-erb-B-2, siendo los resultados contradictorios en cuanto a la asociación con el IP.

ZAFRANI (1994) resalta la relación inversa entre la expresión de RE y RP con la presencia de necrosis tumoral en el CID.

Aún existiendo discrepancias evidentes en los estudios comentados, debidas a los diferentes tipos de CID evaluados, diferente metodología empleada, así como los distintos criterios utilizados para la evaluación (positividad o negatividad) de los RH, de la revisión de la literatura, podemos concluir:

- La presencia de RH es frecuente en el CID (32-80%).
- La expresión, tanto de RE como de RP, se relaciona con:
  - a) Buena diferenciación tumoral.
  - b) Patrón histológico no comedo.
  - c) Grado histológico/nuclear bajos.

- d) Ausencia de expresión del gen Her-2-neu
- e) Ausencia de necrosis.

No disponemos de datos sólidos que nos permitan afirmar que la presencia de RH en el CID, al igual que en el carcinoma infiltrante, se traduzca en buen pronóstico, aunque todo parece apuntar en ese sentido.

### **II.8.2.- FACTORES PRONÓSTICO EN ESTUDIO**

Dentro de los distintos tipos histológicos del CID existen conductas variables y respuestas impredecibles al tratamiento. Ello sugiere que pueden existir subgrupos peculiares por su biología, incluso en el seno de entidades histológicamente indistinguibles.

Aunque actualmente se desconoce la manera de controlar con eficacia los mecanismos mediadores de la conducta heterogénea de los tumores, los avances recientes en genética celular sugieren la existencia de diversos marcadores, a través de los cuáles podrían establecerse sistemas de clasificación que pusieran de manifiesto sus distintas características biológicas.

Con las técnicas que hoy disponemos nos situamos ante un reto importante: encontrar aquellos marcadores de expresión que nos ayudarían a entender mejor el comportamiento biológico de este grupo de tumores, de cara a valorar aquéllos que van a tener más riesgo de recurrencia y, lo que es más importante, aquéllos que van a desarrollar una enfermedad



invasiva.

Por tanto, de su conocimiento podrían deducirse implicaciones pronósticas y terapéuticas, al poder adaptar el tratamiento a cada caso concreto. Bajo este prisma, hemos considerado una serie de marcadores biológicos estudiados en el cáncer invasor, cuyo valor es poco conocido y, en algunos casos, escasamente estudiados en el CID y que vamos a desarrollar a continuación:

- ① Cinética celular y contenido de ADN
- ② P53
- ③ Oncogén Her / Neu / C-erb-B-2
- ④ Ciclinas
- ⑤ Apoptosis celular

### **II.8.2.1.- CINÉTICA CELULAR Y CONTENIDO DE ADN**

Quizás, una de las características determinantes de la enfermedad neoplásica, sea la capacidad proliferativa de las células tumorales. El establecimiento de diferentes poblaciones celulares según sus propiedades cinéticas, así como la proporción de las mismas es, pues, de especial importancia.

El estudio de contenido de ADN nuclear aporta información sobre dos importantes aspectos de la célula neoplásica: por un lado, valora la alteración en el contenido del ADN (ploidía) respecto a las células normales y, por otro lado, permite observar la distribución de

la población celular en diferentes fases del ciclo celular.

El ciclo celular es el intervalo de tiempo en el que ocurre el conjunto de acontecimientos bioquímicos y morfológicos que conlleva la mitosis, y que conduce a la división de una célula progenitora en dos células hijas.

La teoría actualmente aceptada del ciclo celular (BASERGA, 1981), comprende dos fases centrales (Fig. 1):

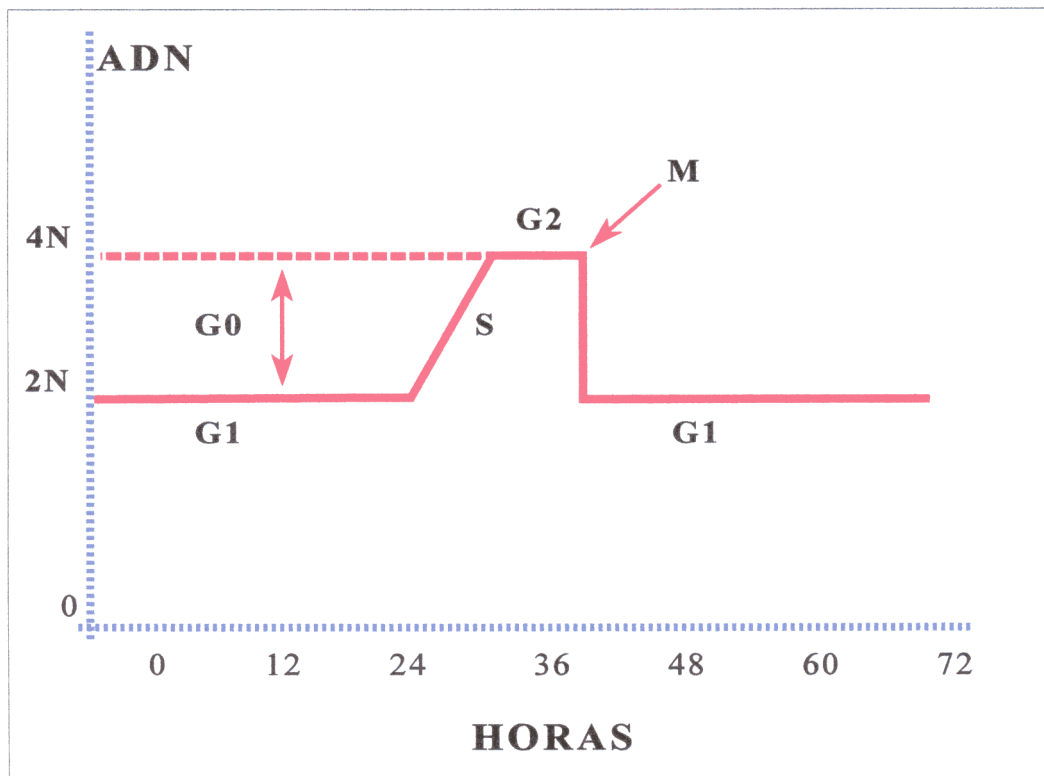


Figura 1: *Fases del ciclo celular*

FASE “S”- Síntesis de ADN y replicación de cromosomas, que dura 6 horas.

FASE “M”- Mitosis, que dura 30 minutos.

Entre ambas, habría dos fases de enlace:

G<sub>1</sub> - Se sintetiza ARN y proteínas, dura 12 horas.

G<sub>2</sub> - Se sintetiza ARN y proteínas también y dura 6 horas.

En los últimos cinco años, gracias a las nuevas técnicas de ingeniería genética, se ha producido abundante información sobre los elementos claves en la regulación del ciclo celular, así como de las lesiones moleculares en la misma y su papel en el proceso neoplásico (CORDÓN, 1995; KARP, 1995; HIRAMA, 1995; HUNTER, 1994).

Dentro de los métodos de análisis celular que se utilizan, caben destacar:

#### 1.- MORFOLÓGICOS: Contaje de mitosis

Es el método más tradicional y simple para medir la actividad proliferativa. Consiste en el recuento de figuras mitóticas en el corte histológico. Tiene muchos aspectos cuestionable, tal vez el mayor radica en la variación de la superficie observada por campo microscópico en los diferentes tipos de microscopio. Quedaría obviado, si nos referimos a un número concreto de células identificadas (ej. n° de mitosis/1.000 células identificadas), pero es un método difícil y obsoleto (SIMPSON, 1992).

#### 2.- INCORPORACIÓN DE PRECURSORES DEL ADN: Timidina tritiada

Con el radiotrazador H<sup>3</sup>-Timidina se “marcan” las células portadoras de ADN que se encuentran en fase “S”, y se determina su número mediante autoanálisis, obteniendo el índice de proliferación:

$$\text{Índice de proliferación (IP)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células incorporadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}}$$

Este índice representa la tasa de proliferación celular y parece relacionarse bien con el pronóstico, pero es un procedimiento difícil para la práctica diaria, dado que es necesario usar tejido fresco; el marcaje con Timidina- $H^3$  necesita de dos a tres semanas para ser efectivo, y se precisa para su identificación personal altamente cualificado (WOOSLEY, 1991; LINDEN, 1992).

### 3.- CITOMÉTRICOS: Citometría de flujo

Permite calcular el porcentaje de células en fase "S", así como la cantidad de ADN existente en el núcleo de las células tumorales (diploide/aneuploide), pudiéndose estudiar tanto en tejido fresco como conservado en parafina. Es un método muy extendido, demostrándose una importante asociación entre la presencia de una alta fracción celular en fase "S" y un peor pronóstico, independiente de la situación ganglionar (HEDLEY, 1993).

No obstante, la citometría de flujo requiere una instrumentación costosa, la técnica es compleja, así como la interpretación de los resultados, y estos dependen de la proporción de células tumorales existentes en la muestra. Además, en presencia de una población aneuploide, es difícil el cálculo de la fracción "S" (HALA, 1990; WOOSLY, 1991).

### 4.- INMUNOCITOQUÍMICA: PCNA/Ag Ki-67

La detección de antígenos (Ag) nucleares asociados a la proliferación mediante

técnicas inmunohistoquímicas constituye un método sencillo que se puede realizar marcando únicamente las células neoplásicas.

A) El PCNA es una proteína nuclear, no histona, que interviene en la síntesis del ADN como cofactor de la enzima ADN-& Polimerasa (LINDEN, 1992). Este Ag se incrementa en la fase G<sub>1</sub>, alcanza el máximo en la fase S, y decrece en G<sub>2</sub>/M (BRAVO, 1987). Su nivel se correlaciona con el índice de Timidina marcada y con la fracción de células en fase "S" (BATTERSBY, 1990; SIITONEN, 1993), pero su relación con el recuento de mitosis se discute (FRIERSON, 1993; TAHAN, 1993; LEONARDI, 1992).

Para su detección, habitualmente se dispone de diversos anticuerpos (PC-10, 19A<sub>2</sub>, 19F<sub>4</sub>), que reaccionan contra el Ag nuclear que se encuentra en el nucléolo de las células tumorales. El Ac PC-10 ofrece claras ventajas sobre los demás Ac, por su afinidad en tejidos parafinados.

Aunque hasta hace dos años, el PCNA a través del Ac monoclonal PC-10 ha sido considerado el marcador más fiable de proliferación, estudios más recientes han indicado que su determinación mediante el anticuerpo PC-10 no es tan eficaz como se pensaba, ya que aunque muy sensible, es sin embargo, poco específico, puesto que detecta el epítipo simple y reconoce no sólo otras proteínas similares nucleares, sino también formas de PCNA no nucleosómicas y, por tanto, no asociados a la síntesis activa de ADN. Además, se ha comprobado que el tanto por ciento de positividad de este anticuerpo es

proporcional al tiempo de fijación del tejido.

De lo expuesto anteriormente, podemos deducir como los valores determinados de PCNA son, generalmente, superiores al real (CAÑADAS, 1995).

No obstante, parece existir correlación entre PCNA elevado y otros parámetros de mal pronóstico, como en tumores muy indiferenciados (grado histológico III), tumores aneuploides, y con ausencia de RE. Sin embargo, existe menos relación con el tipo histológico, con el tamaño tumoral, y con la edad de las pacientes (SIITONEN, 1993; BIANCHI, 1993).

Igualmente proporciona una información útil en relación con la supervivencia a corto plazo (5 años), siendo menos fiable a los 10 años. En este sentido, una alta tasa de células teñidas con PCNA representaría una menor supervivencia a 5 años, independientemente del anticuerpo utilizado (LEONARDI, 1992; KREIPE, 1993, BIANCHI, 1993).

FERNÁNDEZ-CEBRIAN (1994) define el PCNA como el factor pronóstico con mayor potencia estadística para el análisis de la recidiva local y sistémica, en el carcinoma invasivo sin metástasis ganglionar. En su serie de 70 casos, en ausencia de expresión del Ag, la tasa de recurrencia fue nula, elevándose ésta al 46,87% cuando el PCNA es positivo. Sus cifras son ligeramente superiores a las obtenidas por otros autores (BIANCHI, 1993).

En estos momentos, la técnica inmunohistoquímica más utilizada, ya que parece ser la más fiable, es la detección del Ag Ki-67 mediante diferentes Ac monoclonales.

- B) El Ki-67 es un Ag nuclear humano de naturaleza proteica, no histona, de composición aún desconocida, y que se encuentra en todas las células que están proliferando. Su síntesis se inicia en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, aumenta en la fase "S" alcanzando su máxima expresión al final de la misma, y no existe en la fase G<sub>0</sub> (GERDES, 1991, LINDEN, 1992).

En 1983, GERDES y COLS elaboran un Ac monoclonal (Ki-67) para la detección de este Ag en tejido congelado. Pero, en la actualidad, se utiliza un nuevo Ac monoclonal, el MIB-1, que permite la detección del Ag en tejidos fijados en formol y parafinados, y reacciona con el mismo epítipo antigénico que el Ac Ki-67 (KEY, 1993; CATTORETTI, 1992).

La detección de MIB-1 se correlaciona de forma estrecha con el recuento de mitosis (WEIDNER, 1994) y con la positividad para el Ac Ki-67 (BARBARESCHI, 1994), aunque su asociación con la fracción celular "S" es baja (ANDERSON, 1993).

Además de su utilidad como marcador de proliferación celular se tiende, cada vez más, a considerarlo como marcador general de pronóstico. Su índice de expresión oscila entre 0-80%, y una positividad mayor del 20% es indicativa de

mal pronóstico (SAHIN, 1991; GASPARINI, 1992). Se encuentra, además, correlación con la actividad mitótica y grado histológico elevados (GASPARINI, 1989; MARCHETTI, 1990), negatividad de los RE (VERONESE, 1991), y tendencia a la invasión (CAÑADAS, 1995).

No obstante, un problema que presentan los métodos inmunohistoquímicos, en general, para la evaluación de los marcadores biológicos, es que es sencillo reconocer la actividad proliferativa alta o baja, pero es difícil definir ésta en los grupos intermedios.

El índice mitótico es uno de los tres criterios usados para determinar el grado tumoral e histológico, y ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en el cáncer infiltrante de mama (MEYER, 1979, ELSTON, 1982; BAAK, 1985).

Sin embargo, aparte de un trabajo realizado por MEYER en 1986 es, en los últimos 4-5 años, cuando se realizan algunos estudios sobre la actividad proliferativa en el CID. En el trabajo que acabamos de mencionar se estudia con  $H^3$ -Timidina el IP en cáncer invasivo de mama con gran componente de CID, encontrando éste francamente elevado en las formas comedo.

LOCKER (1990) estudia 46 casos de CID usando citometría de flujo, encontrando que el IP es mucho más bajo en las formas cribiformes que en otros tipos.

Con el desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas y el uso de los Ac monoclonales para identificación de Ag nucleares, BOBROW Y ZAFRANI, en 1994, realizan unos



estudios muy interesantes, encontrando ambos autores una relación directa entre el alto IP con la forma histológica comedo, con lesiones pobremente diferenciadas y con la presencia de necrosis.

En concreto, ZAFRANI estudia 94 casos de CID utilizando Ac monoclonal Ki-67, y encuentra que este marcador se expresa en el 28% de los casos en que no existe necrosis, siendo éste cercano al 100%, cuando la necrosis está presente de forma masiva. Asimismo, en las formas no comedo y en los casos bien diferenciados, el IP se sitúa en torno al 22% comparándolo con el 72% en las formas comedo, o el 94% en los casos pobremente diferenciados, con presencia de necrosis.

TABLA VII: *Actividad proliferativa en el CID (Resumen de series)*

AUTOR	Método	Nº de casos de CID	Comedo Alto Grado	No Comedo Bajo Grado
MEYER	Timidina*	51	4,5%	1,5%
LOCKER	Citometría de flujo	46	12,5%	5%
BOBROW	IHQ/ KiS1 (Ind. Prolif*)	105	89%	0
ZAFRANI	IHQ/Ki67 (Ind. Prolif*)	94	72%	22%

\* Corte al 10% de células marcadas.

Luego, parece que estamos situados ante un marcador cuya expresión seleccionaría un grupo tumoral, dentro de la heterogeneidad del CID, cuyo comportamiento clínico va a ser más agresivo que aquellos en los que no se encuentre dicho marcador.

### **II.8.2.2.- PROTEÍNA P53. ANTIONCOGÉN.**

El crecimiento de todas las células del organismo está sometido a la existencia de diferentes controles en la multiplicación, diferenciación y muerte celular. La pérdida de éstos constituye el hecho fundamental y dramático del cambio neoplásico y de su progresión (BISHOP, 1987).

La base genética de la carcinogénesis fue propuesta por BOVERI en 1914, en su teoría de “la mutación somática”, que sería confirmada con el descubrimiento posterior de alteraciones moleculares en algunos genes (ROUS, 1966; BARBACID, 1987; BISHOP, 1987; STANBRIDGE, 1990).

Los oncogenes y sus homólogos, los protooncogenes (genes normales que potencialmente pueden ser activados a genes formadores de neoplasias), se derivan de genes altamente conservados a través de la evolución celular (DOOLITTLE, 1983).

Los protooncogenes están probablemente involucrados, en las células normales, en el control, proliferación y/o diferenciación celular (BARBACID, 1989). Serían, por tanto, componentes del genoma celular, cuya expresividad se reprime o acelera por mutaciones debidas a la acción de carcinógenos de diferentes tipos.

Una vez activado el protooncogén, que ya pasa a ser denominado oncogén, codifica una proteína anómala, capaz de hacer que la célula transformada escape a los mecanismos que, en condiciones fisiológicas, controlan y regulan la proliferación celular. Ocasionalmente, las

proteínas oncogénicas pueden alterar los programas de diferenciación celular y otros sistemas de control involucrados en la prevención de la destrucción de las células normales. Esto supone que los productos anómalos codificados por los oncogenes, se hacen responsables del crecimiento indisciplinado de las células cancerosas (KLEIN, 1985; NICHOLSON, 1989).

Se han descubierto muchos genes relacionados con el cáncer que se encuentran mutados en tumores humanos, y el “gen supresor” P53 es el ejemplo más característico, pues se encuentra mutado en casi la mitad de todos los tipos de cáncer de un amplio espectro de tejidos (THOMPSON, 1990).

Este gen fue descubierto por LANE y CRAWFORD en 1979, y se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, siendo por sí mismo un “gen supresor tumoral” (FINLAY, 1989).

El gen P53 codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos, y de peso molecular 53 Kilodaltons (KD). Esta proteína tiene un dominio de localización nuclear (SHAULSKY, 1990), sin el que no puede ejercer su función, puesto que su efecto supresor lo desarrolla en el núcleo (MARTÍNEZ, 1991).

En condiciones normales, la proteína p53 se mantiene en niveles bajos de expresión, dado que es rápidamente degradada (vida media de 5-20 minutos); sin embargo, la oncoproteína p53, ya mutada, pasa a tener una vida media de 24-72 horas, por lo que es fácilmente identificable por diferentes métodos.

La función exacta del gen P53 se desconoce, aunque el resultado de varias

investigaciones sugiere que regula el “punto de control” del ciclo en el que se asegura la integridad del genoma. Es decir, sería como un “editor de lectura” del ADN, de modo que si identifica daño en él, pararía el ciclo en fase  $G_1$  (KASTAN, 1991), y así evitaría que los errores se reproduzcan durante la fase “S” o síntesis del ADN (Fig. 2). Por otra parte el P53 actúa también como factor de transcripción, activando otros genes envueltos en procesos de proliferación celular y apoptosis.

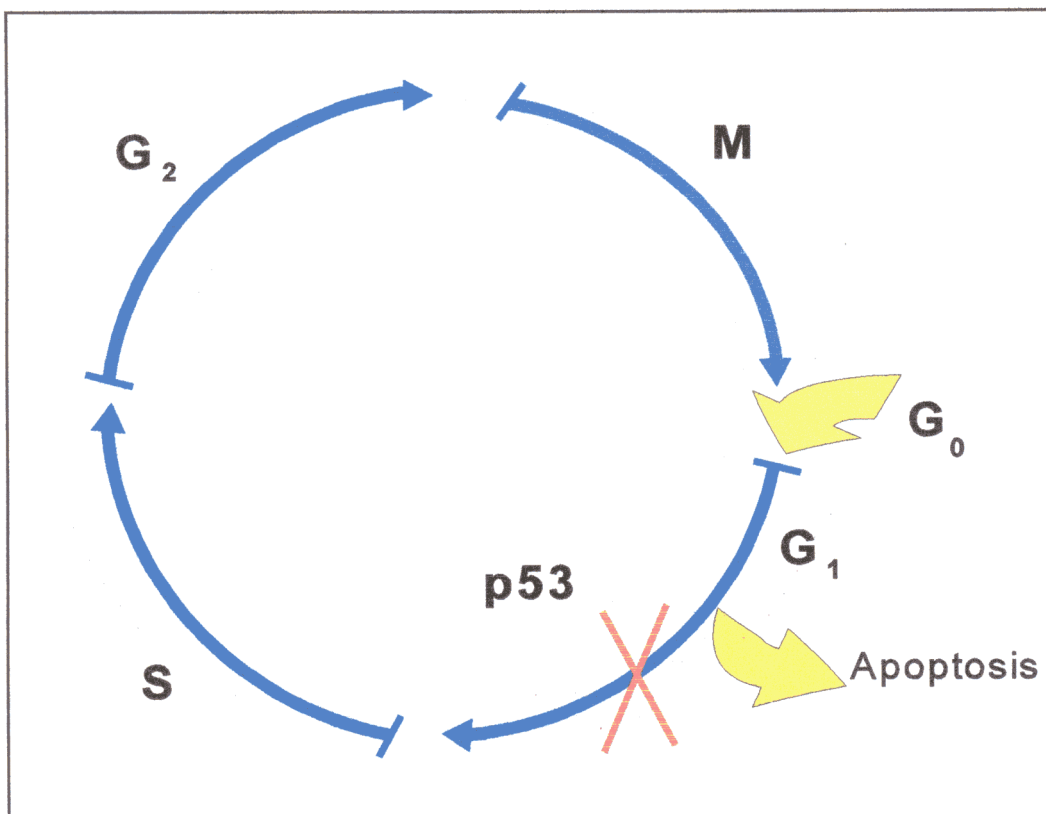


Figura 2: Efecto del gen p53 en el ciclo celular.

Para que el gen P53 actúe con capacidad transformante oncogénica tiene que ser mutado. Se cree que el brazo corto del cromosoma 17, donde asienta el locus del gen P53, pierde un alelo (Fig. 3), y también existe la posibilidad de que su proteína normal, con actividad supresora, pierda su función por neutralización con otras proteínas celulares o

virales. A este fenómeno se le conoce como “secuestro o estabilización” de la proteína (BISHOP, 1991; HARRIS, 1991) y, en cualquiera de los casos, perdería su acción represora.

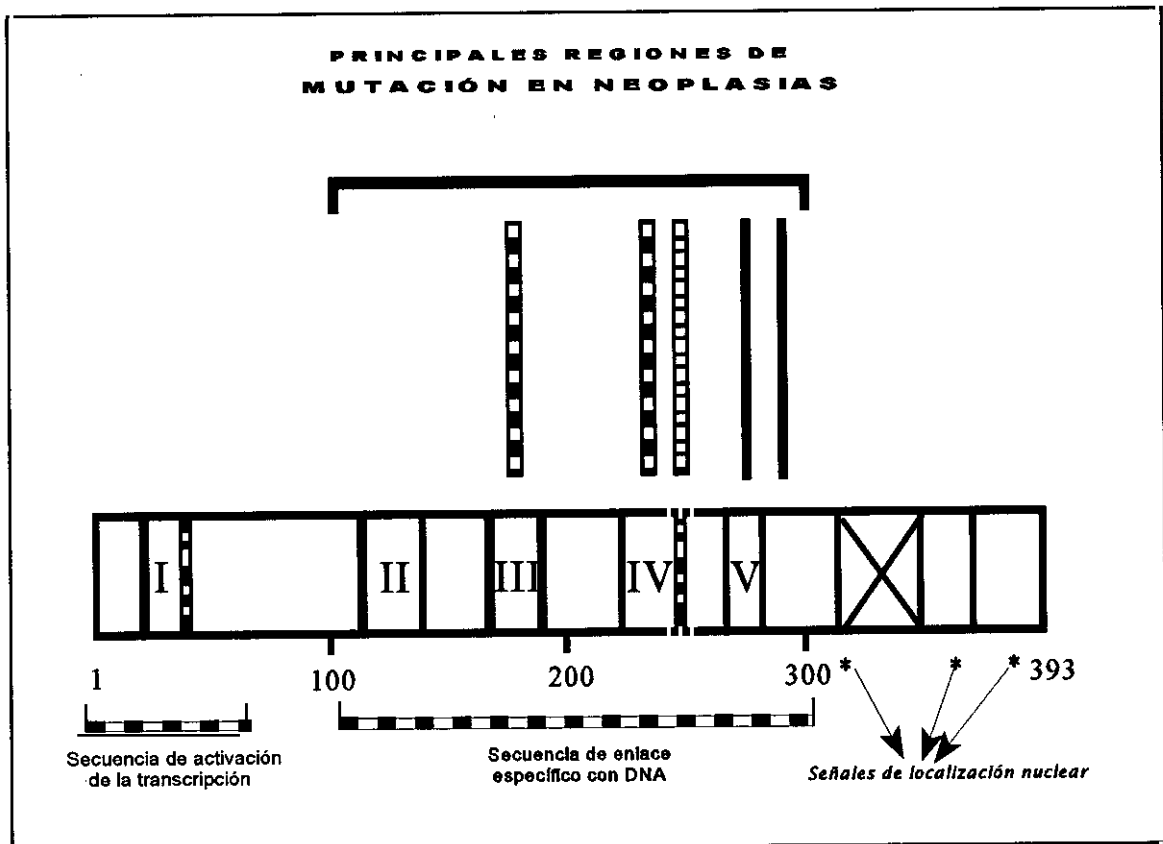


Figura 3: Estructura funcional y mutaciones del gen p53.

Aparte de la función descrita anteriormente para el P53, como gen supresor, SCOTT LOWE (1994), en el Instituto de Tecnología de Massachusetts (EE.UU.) muestra una segunda función, en relación con la respuesta de las células tumorales a la quimioterapia. Este autor demuestra que el P53 protege al organismo, permitiendo que las células atacadas por la quimioterapia escojan una vía de suicidio, antes que el daño muy grave a su ADN provoque un crecimiento incontrolado.

Múltiples estudios están intentando demostrar las muchas formas en que el gen P53

puede provocar o suprimir la resistencia a la quimioterapia. El último estudio realizado por el oncólogo noruego PER LONNING, de Bergen, demostró que de 63 pacientes con cáncer invasivo de mama tratados con Doxorubicina, la tasa de recidivas después de la terapia en pacientes con el gen P53 mutado era del 69%, en comparación con el 8% en enfermas cuyo gen P53 permanecía intacto.

Por tanto, parecería que el conocimiento de la situación del gen P53 en las células tumorales sería importante, de cara a reconocer aquel grupo de tumores que tienen posibilidades de responder al tratamiento quimioterápico.

La asociación del gen P53 con neoplasias mamarias humanas, fue demostrada por vez primera en 1982, al observarse que el 9% de las pacientes con cáncer mamario, especialmente si tenían metástasis viscerales, presentaban Ac circulantes para la proteína p53 humana (CRAWFORD, 1982).

Se han observado mutaciones heredadas del gen en la línea germinal de familias con el síndrome de Li Fraumeni, con alta incidencia de cáncer mamario (MALKIN, 1990; EYFJÖRD, 1995), y en otros cánceres de mama familiares, especialmente los descritos en relación con el gen BRCA.1, asociados a cáncer ovárico (WEBER, 1994; FORD, 1995).

La presencia de mutaciones del gen P53 en células del cáncer mamario se estima entre un 13-18% de los casos (PROSER, 1990; CHEN, 1991).

En relación al cáncer invasivo de mama, la sobreexpresión de la proteína p53 ha sido detectada entre el 27% y el 54% de dichas neoplasias (BARTEK, 1990; CATORETTI, 1988;

DAVIDOFF, 1991; WALKER, 1991; ISOLA, 1992). Esta sobreexpresión se puede asociar con otros factores de mal pronóstico del cáncer infiltrante de mama, como el oncogén HER-2-neu, la existencia de RE-, EGFR+, GH alto, y elevación de la fracción "S" (CATORETTI, 1988; ISOLA, 1992; FRIDRICH, 1993).

Desde el punto de vista clínico, la proteína p53 se considera un marcador de agresividad y de capacidad metastatizante. En general, pues, su activación se asocia a un curso clínico desfavorable del carcinoma invasor de mama (DAVIDOFF, 1991).

Existen pocos estudios acerca de la expresión de la proteína p53 en el CID. Se ha observado que las alteraciones del gen y la sobreexpresión de su proteína aparecen en todas las fases de progresión del cáncer mamario. En la hiperplasia sin atipia no se han encontrado alteraciones, son excepcionales en las lesiones con atipia epitelial e incrementa su frecuencia en el CID, situándose su sobreexpresión en torno al 25-40% (DAVIDOFF, 1991; WALKER, 1991; POLLER, 1993; UMEKITA, 1994).

Los valores de la sobreexpresión de la p53 varían en relación con el subtipo histológico del CID que consideremos. De hecho, es infrecuente encontrarla en neoplasias bien diferenciadas, y su presencia se limita, prácticamente, a formas pobremente diferenciadas y al patrón comedo.

WALKER (1991), encuentra positividad de la p53 en 5 de 10 casos de CID, de los que 4 fueron del tipo comedo. POLLER (1993), la detecta en el 25% de sus 143 casos de CID, limitándose esta sobreexpresión sólo a lesiones con un gran tamaño nuclear y grado elevado de necrosis.

En la amplia serie de 105 CID de BOBROW (1994, 1995), se aprecia aumento de la expresión en el 35% de los casos, asociada a los casos pobremente diferenciados casi exclusivamente. ZAFRANI, en su casuística de 94 pacientes confirma los mismos hallazgos.

Estos mismos autores establecen, también, relación entre la sobreexpresión de la p53 y la existencia de necrosis tumoral, de manera que un alto grado de la misma se acompaña de un aumento en la expresión de hasta el 99%, si se compara con los casos sin necrosis (BOBROW, 1994, 1995; ZAFRANI, 1994).

En resumen, parece que la sobreexpresión de la p53 se asocia con factores pronóstico que confieren mayor agresividad al CID como: patrón histológico comedo, grado bajo de diferenciación y presencia de necrosis; luego el aumento de expresión de la p53 se va a asociar con aquellos casos de CID que van a tener en principio un pronóstico desfavorable.

### **II.8.2.3.- ONCOGÉN HER-2/NEU/c-erbB-2.**

Los cambios que ocurren en la estructura y en la expresión de los oncogenes parecen ser uno de los responsables de la transformación neoplásica y de su progresión.

El HER2/NEU/cerbB-2 es el oncogén más estudiado hasta ahora, no sólo en el cáncer de mama, sino también en otras neoplasias.

Se trata de un protooncogén identificado por SHIH en 1981, al que denominó NEU. COUSSENS en 1985, y SEMBA en el mismo año, dan nombre a dos grupos de genes



independientes, a los que llaman HER-2 y Cerb-B-2. Posteriormente, realizando estudios de mapeo cromosómico y análisis de secuencias de aminoácidos, se dan cuenta que los tres genes (*neu*; *cerb-B-2*; *her-2*) son el mismo gen (COUSSENS, 1985, FUKUSHIGE, 1985; SCHECHTER, 1985), al que se denomina HER-2 NEU.

El Her-2 neu forma parte de la familia de genes activadores de la tirosina-kinasa y codifica una proteína de membrana de 185 KD, que es parecida al EGFR. Se cree que esta proteína representa un receptor transmembrana cuyo ligando aún no ha sido determinado (COUSSENS, 1985, STERN, 1986). Se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 y posee tres lugares de actuación, extracelular, transmembrana, e intracelular (Fig. 4).

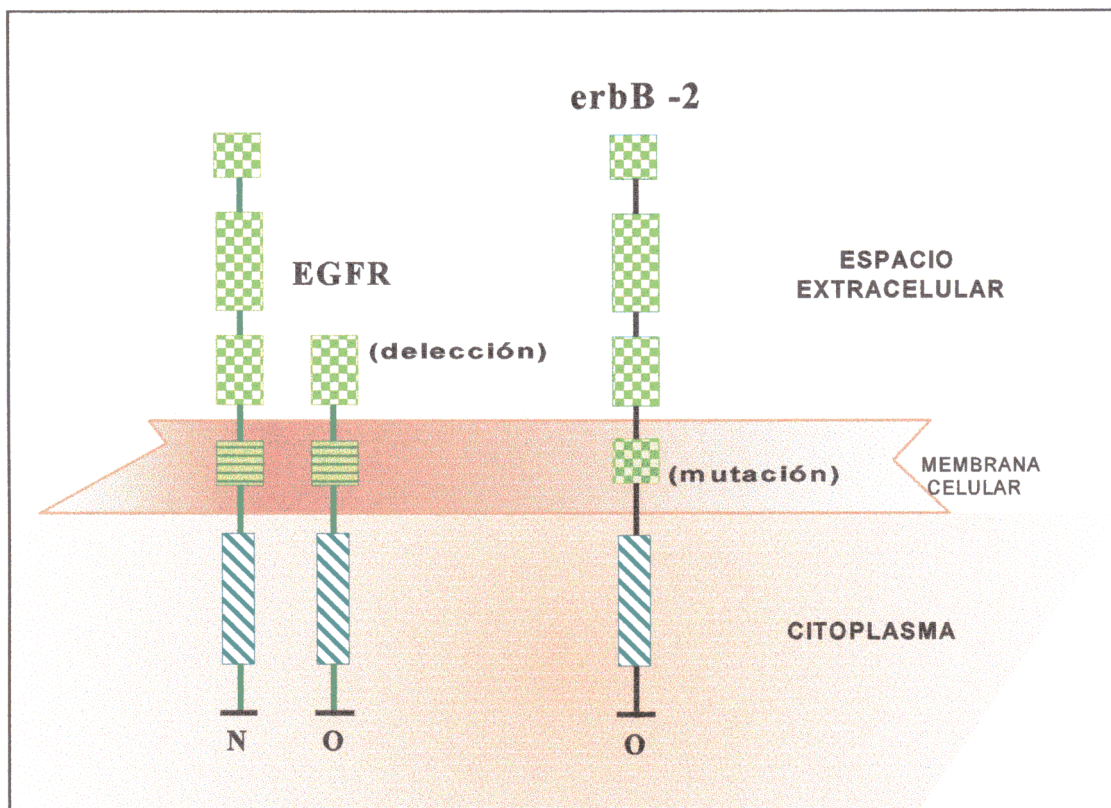


Figura 4: Esquema de las diferencias entre el oncogén *neu* y el EGFR, tanto en la estructura normal (N) como en la oncogénica (O)

La activación de este gen para la transformación neoplásica en un modelo tumoral de rata parece ser debido a la mutación de un aminoácido por otro (adenina-timidina), en un sólo punto (BARGMAN, 1986). Sin embargo, en tejido humano, la activación de este receptor parece debida a la sobreexpresión de la proteína, lo cual se debe a la amplificación o alteración en la regulación del oncogén Her-2 neu (LEMOINE, 1986; SLAMON, 1987).

El gen Her-2 neu puede determinarse mediante el número de copias de ADN que traduce la amplificación, o por la identificación de la proteína que codifica o expresa, pudiendo ser detectado entre el 10 y el 30% de los carcinomas de mama (SLAMON, 1987; LOVEKIN, 1991). Esta variabilidad se debe a los distintos métodos de determinación del oncogén, bien por hibridación del ADN, bien por métodos inmunohistoquímicos, en los que podemos utilizar un amplio arsenal de anticuerpos monoclonales (CB11, CBE1, 21N, DAKO, etc), teniendo éstos distinta sensibilidad, a la hora de evaluar la expresión de la proteína Her-2 neu (BORROW, 1994). No obstante, cualquiera que sea el método empleado, es válido para evaluar el oncogén, como lo demuestran numerosos autores (BERGER, 1988; SLAMON, 1989; MOLINA 1990).

Existe una cierta relación entre la expresión del gen y el tipo histológico del cáncer de mama, encontrándose mayor expresión en el carcinoma mínimamente invasivo que en carcinomas ductales o lobulillares claramente infiltrantes (VAN DER VIJVER, 1988; BARTKOVA, 1990; ALLRED, 1992), así como es prácticamente inexistente en CLIS (RAMACHANDRA, 1990; LODATO, 1990; SOMERVILLE, 1992).

La expresión de la oncoproteína Her-2 neu se encuentra entre el 45 y el 60% de los CID

(VAN DER VIJVER, 1988; BARTKOVA, 1990), valores superiores a los comunicados en los cánceres invasivos. Esto sugiere para algunos autores que dicha sobreexpresión ocurre en fases tempranas de la carcinogénesis, lo que podría determinar aquellas lesiones benignas o premalignas, con riesgo de desarrollar un carcinoma invasivo. Es decir, el oncogén Her-2-neu jugaría un papel importante en el inicio de la neoplasia, pero no en el progreso de la misma (GUSTERSON, 1988; ALLRED, 1992).

Sin embargo, IGLEHART (1990) difiere de lo anteriormente expuesto, observando que el Her-2 neu se encuentra en todos los estadios de la enfermedad, manteniéndose durante la fase metastásica.

La relación del Her-2 neu con otros factores pronóstico en el cáncer invasivo está bien estudiado, evidenciándose en numerosos trabajos la relación directa de sobreexpresión del Her-2 neu con el GH y GN elevados. Sin embargo, la relación con el tamaño tumoral, RH y afectación ganglionar no está clara, existiendo gran variabilidad en los resultados (BERGER, 1988; TANDON, 1989; RO, 1989; SLAMON, 1989; TSUDA, 1989; MARK, 1990; PAIK, 1990; MOLINA, 1990). No obstante, parece que la expresión del oncogén se asocia en mayor medida con los tumores con RE negativos (WRIGHT, 1990; HEINZT, 1990).

Aunque algunos estudios no encuentran relación entre la expresión del oncogén Her-2 neu y la afectación ganglionar de estos tumores (GARCÍA, 1989; GUERÍN, 1989), otros autores como CLARK y McGUIRE (1991) comunican unas cifras de expresión entre el 17 y el 41% para los pacientes con afectación ganglionar, en comparación con el 11 al 33% de

sobreexpresión de dicho oncogén para las pacientes N<sub>o</sub>.

También se ha correlacionado con la tasa de proliferación, determinada por el índice de incorporación de timidina y mediante el anticuerpo Ki-67, encontrando mayor expresión del oncogén cuanto mayor es el índice de proliferación (MARX, 1990).

No se ha encontrado una relación significativa con la P53, existiendo datos contradictorios (DAVIDOFF, 1991; OSTROWSKY, 1991; WALKER, 1991), aunque algún autor si la demuestra (CHANG, 1991).

Existen numerosos estudios sobre la relación entre la expresión del Her-2 neu y el pronóstico de cáncer invasivo de mama. SLAMON (1987) fue el primero en demostrar la asociación entre la amplificación del gen Her-2 neu, y un peor pronóstico de estas neoplasias. Más tarde, otros autores corroboraron estos hallazgos (WRIGHT, 1990; MOLINA, 1990; DYKINS, 1991); aunque otros estudios no llegan a encontrar esta relación (ZHOU, 1989; THOR, 1989; KURY, 1990; HEINZT, 1990; GRAMLICH, 1994).

Lo que si parece claro es que el oncogén neu es un factor ligado a un pronóstico desfavorable en pacientes con afectación ganglionar. Sin embargo, en pacientes sin afectación axilar, su utilidad es controvertida, de modo que algunos autores no encuentran relación con la evolución de la enfermedad a efectos de supervivencia y tiempo libre de enfermedad (SLAMON, 1989; TSUDA, 1989; TANDON, 1989), mientras que otros, como RO (1989), PAIK (1990), WRIGHT (1989) y PATTERSON (1988), si la encuentran. Este último, sólo encuentra correlación con la supervivencia global, pero no con el periodo libre

de la enfermedad.

PAIK (1990) y ALLRED (1992), en un grupo de pacientes N<sub>0</sub> con buen pronóstico inicial (T menores de 3 cms. y RE+), comunican como la sobreexpresión del Her-2 neu conllevó un peor pronóstico que aquéllos del mismo grupo en los que no se manifestó dicha expresión.

En el trabajo realizado por DOMÍNGUEZ-IGLESIAS (1994), las pacientes N<sub>0</sub> o con ganglios positivos en número inferior a tres y sobreexpresión del oncogén, llevaban consigo menor supervivencia que aquellas que no lo expresaban.

La expresión del Her-2 neu en el CID está siendo estudiada en la actualidad por numerosos grupos (BARTKOVA, 1990; LODATO, 1990; POLLER, 1991; BOBROW, 1994; ZAFRANI, 1994).

La relación entre la expresión del Her-2 neu y determinados patrones histológicos del CID es señalada por numerosos autores (Tabla VIII). Los valores de expresión en los CID de alto grado, habitualmente del tipo comedo, oscilan desde el 55% (SOMERVILLE, 1992) al 100% de los casos (LODATO, 1990). Por el contrario, para los CID de bajo grado, que suelen acompañarse de formas no comedo, suele encontrarse ausencia de expresión del gen (POLLER, 1991; BOBROW, 1994), o valores muy bajos que no alcanzan en el mejor de los casos el 30% (RAMACHANDRA, 1990; BARTKOVA, 1990; ZAFRANI, 1994).

BOBROW y ZAFRANI encuentran una relación proporcional significativa en el CID, entre el aumento de expresión del Her-2 neu y el grado de necrosis.

TABLA VIII: *Incidencia de Her-2 neu, en relación al subtipo histológico.*

Autor	Anticuerpo	Nº de CID	(%) de positividad	Comedo Alto Grado(%)	No Comedo Bajo Grado
Van der Vijver	3B5	45	42	66	0
Ramachandra	21N	74	59	62	29
Bartkova	21N	72	61	100	17
Lodato	DBW-2	33	55	100	7
Somerville	ICR-12	48	45	55	0
Schimelpenning	OA-11-854	100	48	86	9
Poller	21N	65	51	81	0
Bobrow	21N	105	45	74	0
Zafrani	Dako	95	54	88	9

POLLER (1991) encuentra positividad en la proteína Her-2 neu en los casos de CID con alto índice de proliferación, y este mismo autor, 2 años más tarde, publica la relación inversa que existe entre la expresión del Her-2 neu y la presencia de receptores hormonales en este tipo de carcinomas, datos que más tarde corrobora BORROW (1994).

SCHIMMELPENING (1992) evidencia una relación directa entre el perfil de ADN y la expresión de Her-2 neu. Sólo el 26% de tumores diploides tienen aumento de la proteína Her-2 neu, en comparación con el 57% de las neoplasias que presentan ADN aneuploide.

Luego, a pesar de los escasos trabajos en relación con el Her-2 neu y el CID, parece deducirse una relación directa entre la expresión de la proteína y algunos factores que pueden ligarse a un peor pronóstico, dentro de estas formas no invasivas (presencia de necrosis, GH alto, aumento del IP, etc.,).

#### II.8.2.4.- CICLINAS.

Como ya hemos visto, la proliferación celular sigue una progresión ordenada a través del ciclo celular. Esta progresión tiene unos sistemas de control extremadamente rigurosos, y cuyo nivel de complejidad vamos descubriendo progresivamente.

Los elementos que verifican las condiciones idóneas (la presencia de factores de crecimiento, la integridad del ADN, etc.,) para que el ciclo celular vaya cumpliendo todas sus fases, son unas enzimas que modifican la actividad de las proteínas añadiendo grupos fosfatos (reacción de fosforilización). Estas enzimas se llaman CDK (cyclin-dependant-kinasas), ya que su actividad es estimulada por unas proteínas reguladoras llamadas ciclinas, con las que se asocian formando complejos moleculares (Fig. 5).



Figura 5: CDK, *Modelo molecular*. (Mundo Científico nº 160)



Los trabajos últimamente realizados (WEINSTAT-SASLOW, 1995; BETTICHER, 1996), han llegado a la conclusión de que las ciclinas y las CDK, junto con sus inhibidores, constituyen una red compleja de regulación positiva y negativa dentro del ciclo celular.

Estos mecanismos reguladores básicos son comunes a todas las células de los mamíferos, y actúan en puntos concretos durante el ciclo celular. Se han aislado cinco clases de ciclinas (A, B<sub>1-2</sub>, C, D<sub>1-3</sub>, E), y se ha diseñado un mapa temporal de su actividad (Fig. 6).

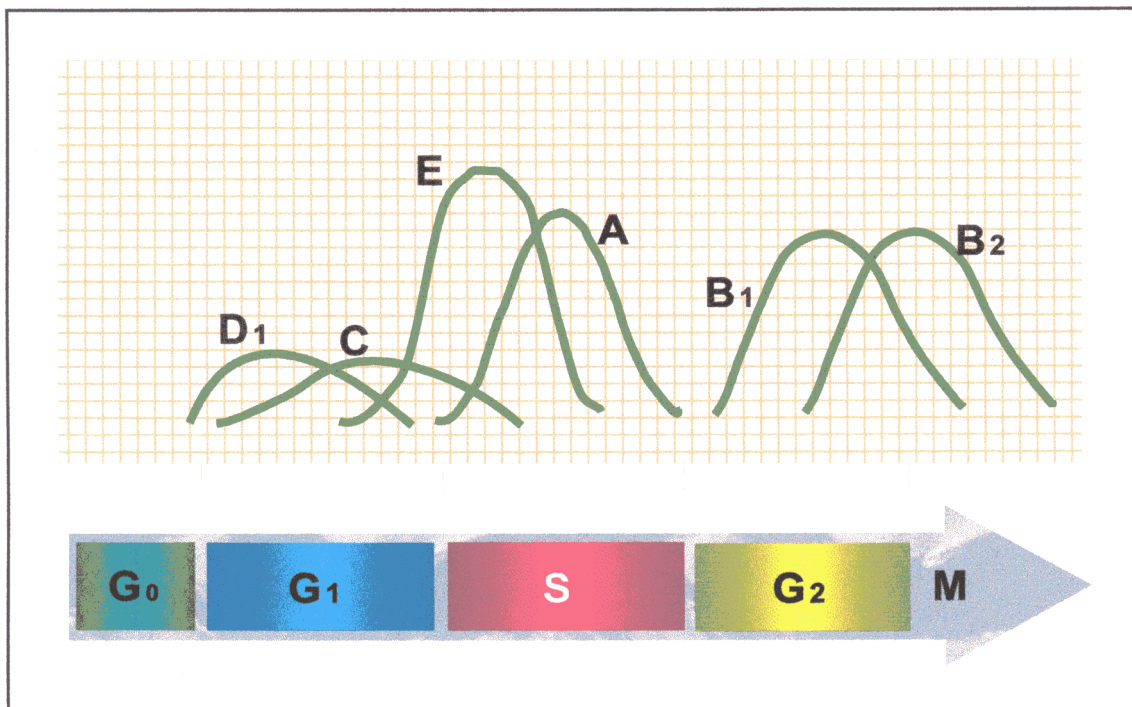


Figura 6: Mapa temporal de las ciclinas durante la progresión del ciclo celular.

Se han establecido dos “puntos de control” principales durante la progresión del ciclo celular, que estarían en la mitad de la fase G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, respectivamente. En el paso de G<sub>1</sub> a la fase S, una molécula fosforilada por las CDK tiene un papel clave: es la proteína RB (se llama así porque su ausencia o la mutación del gen que dirige su síntesis da lugar al Retinoblastoma). Cuando no se fosforiliza la proteína RB, frena la multiplicación de las



células normales, y la célula queda bloqueada en la fase  $G_1$ , por no poder sintetizar proteínas necesarias para la duplicación del ADN. Al contrario, cuando se fosforiliza, desencadena inmediatamente la duplicación del ADN.

Hasta hace muy poco tiempo, se pensaba que las CDK estaban reguladas únicamente por las ciclinas, pero recientemente se han descubierto en el hombre y otros organismos unas moléculas distintas capaces de inhibirlas (MORGAN, 1995). Estos inhibidores son los CKI (inhibidores de las proteínas quinasas dependientes de las ciclinas).

Es decir, las CDK, enzimas claves en el paso a la fase S del ciclo celular, son activadas por las ciclinas e inhibidas por las CKI.

En 1994, equipos de investigadores de Houston y de Baltimore descubrieron, utilizando procedimientos experimentales diferentes (ELLEGE, 1994), un primer inhibidor de las CDK en las células humanas: la proteína p21. Ésta actúa, no solamente inhibiendo las CDK (XIONG, 1993; HARPER, 1993), sino también neutralizando el PCNA, que es una proteína necesaria para la síntesis del ADN, durante la fase S del ciclo celular (STILLMAN, 1994).

Un hecho intrigante es que aún no se han identificado mutaciones del gen P21 en las células tumorales humanas. Pero el cuadro de acciones en cascada que vemos en la Figura 7 explica, en parte, la acción de los genes supresores tumorales o antioncogenes, cuyas mutaciones intervienen en un gran número de cánceres. DULIC (1994) demuestra que, cuando el ADN de una célula está dañado, la síntesis de la p21 se ve estimulada por el producto de un antioncogén, la proteína p53. Gracias a este mecanismo, la célula no puede

pasar a la fase S y dividirse, más que cuando los daños de su genoma han sido reparados.

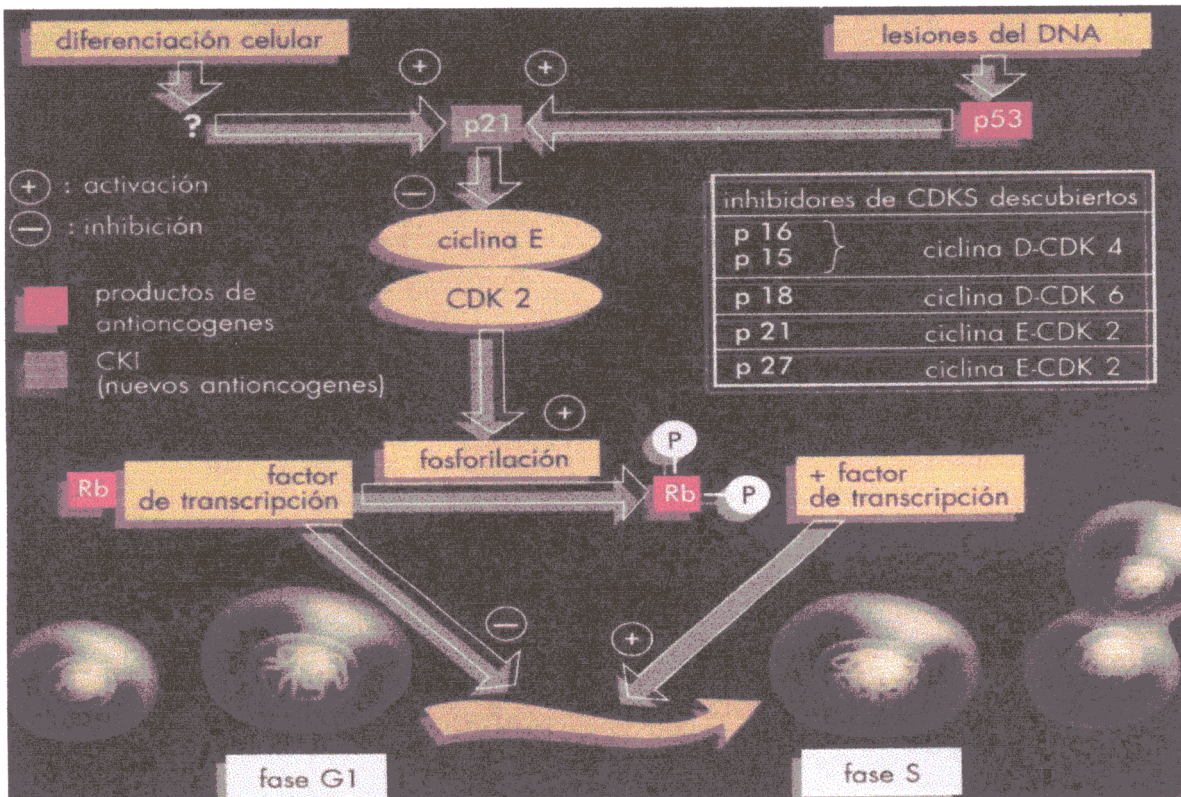


Figura 7: Acciones “en cascada” que ocurren en la transición de la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular. (Mundo Científico nº 160)

En el último año, se han descubierto en el hombre otros inhibidores de las CDK, como la p16, que impide la formación del complejo entre la CDK y su ciclina. Varios trabajos (HARTWELL, 1994; KAMB, 1995) han demostrado que existen modificaciones del gen de la P-16 (mutaciones o supresiones) en muchas células tumorales humanas, siendo hasta el momento del único inhibidor que se conoce. También se ha identificado otro CKI, la P15, muy emparentada con la P16, pudiendo ambos ser auténticos oncogenes, aunque todavía están en pleno proceso de investigación.

La ciclina D<sub>1</sub>, junto con las quinasas específicas (CDK<sub>4</sub> y CDK<sub>6</sub>) y una quinasas inhibidora particular (p-16), parece jugar un papel importante en la regulación del estado de

proliferación. Los componentes genéticos de esta vía de control específica se encuentran comprometidos, con frecuencia, en las células tumorales (HUNTER, 1994; SHERR, 1995; HIRAMA, 1995).

FANTL (1990) y LAMMIE (1991) comunican un papel esencial a la ciclina  $D_1$  para la progresión de la fase  $G_1$ , así como en la patogénesis de numerosos tumores humanos, incluyendo el cáncer de mama.

MUSGROVE (1994) estudia en roedores las células mamarias en fase  $G_1$  de reposo y observa que la inducción mediante esta ciclina  $D_1$  es suficiente para completar el ciclo celular y acortar la fase de  $G_1$ -S, lo cual estimula la proliferación.

En ese mismo año, WANG, utilizando ratones transgénicos para la ciclina  $D_1$  activada, logra desarrollar hiperplasia y adenocarcinoma de mama.

QUELLE (1993) y ZHOU (1995) han demostrado in vitro, que el bloqueo con anticuerpos de la acción de la ciclina  $D_1$  previene el crecimiento de muchas líneas de células tumorales.

No obstante, estos estudios experimentales parecen contrastar con los resultados de otros trabajos clínicos realizados por distintos autores.

MOTOKURA (1993) y BUCKEY (1993) presentan la ciclina  $D_1$  como un oncogén, cuya amplificación se encuentra en cerca del 20% de los cánceres de mama humano. Sin embargo, aunque en éste y en otros estudios se correlaciona la amplificación del oncogén

CCND<sub>1</sub> (situado en el cromosoma 11) con la expresión de la ciclina D<sub>1</sub>, parece que podrían existir otros mecanismos inductores de dicha expresión, dado que la amplificación del gen se encuentra en el 15% de los cánceres invasivos de mama (ALI IU, 1989; LAMMIE, 1991), frente al 50% de sobreexpresión de la ciclina D<sub>1</sub> en este grupo de tumores (GILLET, 1994).

SIMPSON (1997) realiza un estudio en 88 casos de CID sobre la amplificación del oncogén CCND<sub>1</sub>, y su relación con la expresión de la ciclina D<sub>1</sub>, encontrando que el 18% de los CID presenta amplificación de dicho oncogén, que esta expresión es más frecuente en los CID de alto grado, 32% frente al 8% de bajo grado, y que estaba asociada con la expresión de la ciclina D<sub>1</sub>. Sin embargo, la ciclina D<sub>1</sub>, que se sobreexpresaba en el 50% de los casos de este grupo de tumores, no siempre se acompañaba de amplificación del gen. Autores como GILLET (1994) y ZHANG (1994), corroboran estos resultados.

WEINSTAT-SASLOW (1995) ha demostrado sobreexpresión de la ciclina D<sub>1</sub> en estadios precoces del desarrollo tumoral, en particular del cáncer de mama "in situ". En el estudio que realiza sobre 94 biopsias de mama, encuentra sobreexpresión de la ciclina D<sub>1</sub> en el 18% de lesiones benignas y también en el 18% de las hiperplasias ductales atípicas. Sin embargo, la transición a carcinoma es acompañada, frecuentemente, de un aumento en la expresión de la ciclina D<sub>1</sub>, que es del 76% en los casos de CID de bajo grado y llega al 87% en las formas más agresivas como es el subtipo comedo, de alto grado. En el cáncer ductal infiltrante la expresión de dicha proteína se sitúa en torno al 83%.

También estudian en este trabajo la expresión de la ciclina A, sin encontrar sobreexpresión con significación estadística en ninguna de las fases de progresión hacia el

carcinoma invasivo.

Con estos resultados, los autores llegan a tres conclusiones:

- ① Existe alta frecuencia de sobreexpresión de la ciclina  $D_1$ , en todas las formas de cáncer de mama, estando entre el 43-81% en las formas invasivas (ZHANG, 1994; GILLET, 1994; BARTKOVA, 1994).
- ② La sobreexpresión de la ciclina  $D_1$ , podría ser el punto límite entre la HDA y algunas formas de carcinoma mamario.
- ③ La falta de expresión de la ciclina  $D_1$  en formas proliferativas, sin riesgo de cáncer, y su aumento progresivo a medida que aparecen lesiones con riesgo de enfermedad neoplásica.

Estas hipótesis sugerirían que el papel de la ciclina  $D_1$  no estaría en funciones proliferativas, sino en un papel de diferenciación celular o de reparación del ADN, y las alteraciones moleculares ocasionadas nos ayudarían a distinguir las formas benignas y premalignas de las neoplasias invasivas de la mama humana. La ciclina  $D_1$  tendría un papel complejo, en puntos muy definidos de la progresión hacia formas invasivas. Por otro lado, existirían diferentes mecanismos a la amplificación del gen  $CCND_1$ , responsables de la sobreexpresión de la ciclina  $D_1$ . La identificación de estos mecanismos implicados en la progresión del ciclo celular, nos ayudará a entender cada vez mejor el comportamiento biológico del CID (SIMPSON, 1997).

### II.8.2.5.- APOPTOSIS CELULAR

La palabra griega apoptosis significa “caída de la hoja”, y hace referencia al hecho de que, a través de este mecanismo, disminuye el número de células de una población, en contraposición con el mecanismo de mitosis, que conduce al incremento celular.

Ante diferentes alteraciones fenotípicas (diferenciación aberrante, proliferación aumentada, etc.) o agresiones por agentes químicos, físicos (radioterapia, quimioterapia), o infecciones virales, etc., la célula puede responder con un programa genético, fisiológico, de muerte celular llamada apoptosis.

La célula adopta, por tanto, unos rasgos definitorios y característicos de este proceso, distintos a los de la célula necrótica. Entre ambos procesos, existen varias diferencias citomorfológicas, ultraestructurales y de respuesta tisular, como podemos ver en la Tabla IX.

TABLA IX: *Diferencias entre apoptosis y necrosis*

<b>APOPTOSIS</b>	<b>NECROSIS</b>
Sin reacción inflamatoria	Con reacción inflamatoria
Fragmentación celular: fagocitados por macrófagos	Ruptura celular: vertido del contenido celular
Disminución del volumen celular	Aumento del volumen celular
Organelas intactas	Organelas alteradas
Hidrólisis del ADN: fragmentos nucleosómicos	Hidrólisis del ADN: fragmentos heterogéneos
Masas heterocromáticas perinucleares	Pequeños agregados de cromatina
Programada genéticamente	Accidental
Afectación celular selectiva	Destrucción masiva del tejido

El término de apoptosis se emplea como sinónimo de “muerte celular programada” (STELLER, 1995). Otros autores describen la apoptosis como “muerte celular por suicidio” (MAJNO y JORIS, 1995).

Los rasgos morfológicos de la apoptosis son reconocibles mediante el microscopio óptico y electrónico (Fig. 8), siendo muy similares para todos los tipos celulares y todas las especies animales (KERR, 1972)

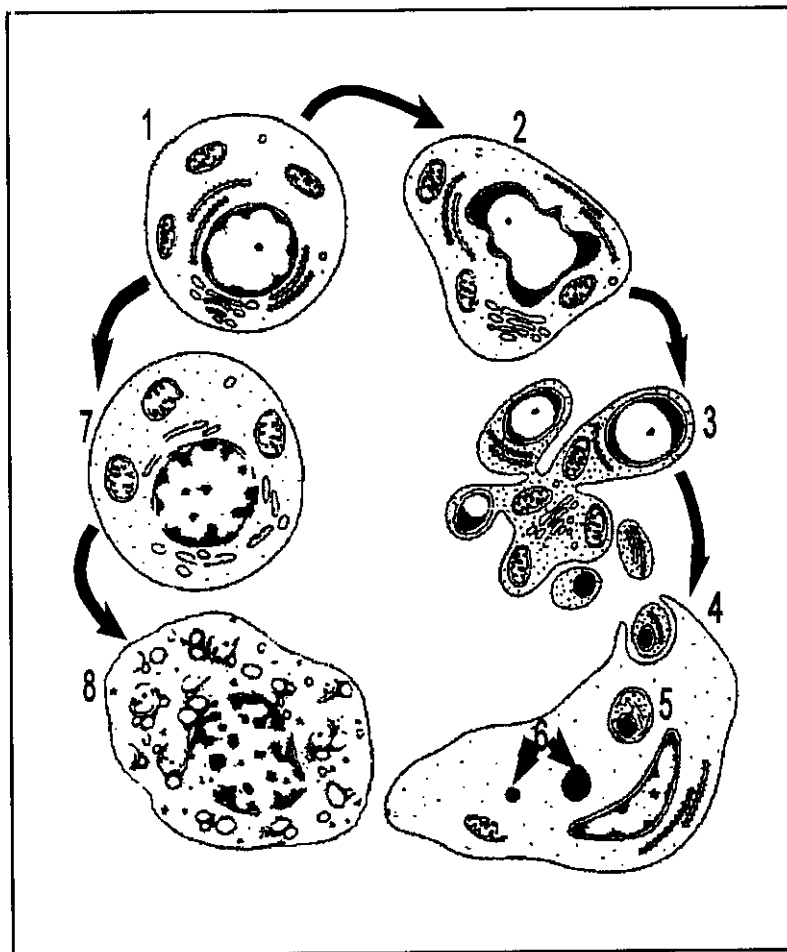


Figura 8: *Secuencia de los cambios estructurales en la apoptosis (2-6) y necrosis (7 y 8). En la apoptosis se produce precozmente compactación y marginación de la cromatina, condensación del citoplasma e irregularidades de las membranas nuclear y celular. Posteriormente, el núcleo se fragmenta y las invaginaciones formadas en la superficie celular se separan para producir cuerpos apoptóticos (3), que son fagocitados (4) y degradados dentro de los lisosomas (5-6). En la necrosis hay agrupamiento irregular de la cromatina (7), intenso hinchamiento de organelas y ruptura de membranas (8), conservándose la forma celular hasta la intervención de células inflamatorias.*

La retracción celular, la condensación cromática, el estrangulamiento, y la fragmentación de la célula, que es rápidamente fagocitada por macrófagos o células adyacentes, son los sucesos típicos de la apoptosis que ocurren en una secuencia fija y muy rápida, ya que sólo transcurren escasos minutos entre el comienzo del suceso y la formación de un acúmulo de cuerpos apoptóticos (KERR, 1994).

A la apoptosis puede atribuírsele una función homeostática (WYLLIE, 1980), presente tanto en tejidos normales como en patológicos, mientras que la necrosis siempre tiene un significado patológico.

En los tejidos normales hay un balance mitosis-apoptosis regulado por factores de crecimiento y hormonas tróficas (MANGAN, 1991; RODRÍGUEZ TARDUCHY, 1992) y, prácticamente, en todos los tejidos tumorales malignos no tratados puede demostrarse apoptosis (SEARLE, 1973; WYLLIE, 1985). La pérdida de este balance entre la tasa de proliferación y la tasa de muerte celular genera la enfermedad tumoral, bien por acúmulo de células (inhibición de apoptosis), bien por pérdida de las mismas (incremento de apoptosis), con la consiguiente inhibición o estimulación de la mitosis.

Los factores desencadenantes de la apoptosis tumoral espontánea son diversos y no muy bien conocidos, aunque entre ellos se encontrarían: la isquemia tumoral, algunas citoquinas, y la actividad de algunos linfocitos T. Asimismo, se relacionaría también con procesos intrínsecos de las células tumorales; de hecho, células similares pueden mostrar diferentes cifras de apoptosis, según expresen distintos oncogenes (WYLLIE, 1987; BELLOMO, 1992).



Actualmente, se conoce la existencia de diversos genes supresores y oncogenes que codifican proteínas, cuya función será inducir o inhibir la apoptosis (MEZQUITA, 1995). Dentro de las proteínas inductoras, las más importantes son las FASr, RAS, BAX (proteínas de membrana), MYC, JUN, FOS (proteínas nucleares), y la proteína nuclear supresora, p53. Entre las proteínas supresoras estarían, entre otras, la BCL-2, la BCL-XL o la ACH-1s)

La relación entre la apoptosis y la proteína P53 es aceptada por numerosos autores (CLARKE, 1993; SYMONDS, 1994; HALDAR, 1994; HARN, 1997). Es plenamente sabido el papel vigilante del gen P53 sobre la integridad del genoma (LANE, 1992). Cuando las células sufren diferentes tipos de agresiones que alteran el ADN, aumenta considerablemente la cantidad de proteína p53. La consecuencia inmediata es la detención del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>. Este momento particular es clave, ya que constituye un punto de restricción controlado por la p53. Mientras el ciclo está detenido, operan mecanismos de reparación del ADN, pudiendo devolver a la molécula su integridad original, pero si las alteraciones del ADN son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína p53 inducirá entonces el programa de muerte celular (SYMONDS, 1994).

Así, muchos de los agentes inductores de apoptosis son P53 dependientes. Pero, aunque éste sea el mecanismo mejor conocido, hay otros independientes de la proteína p53, que pueden actuar parando el ciclo celular (MIKRRANTZ, 1995). Hay datos que indican que la p53 tiene una participación significativa en la iniciación de la apoptosis cuando está inducida por agentes que causan daño en la estructura del ADN (CLARKE, 1993), pero pueden existir otras vías de inducción de la apoptosis desencadenadas por otras causas.

Conceptualmente, podríamos decir que la transformación neoplásica de una célula

normal puede ser debida, bien a una proliferación incontrolada, y/o a una deficiente inducción de apoptosis. En el primer caso, el tratamiento estaría basado en drogas antiproliferativas, y en el segundo, habría que desarrollar agentes terapéuticos que aumenten la susceptibilidad de determinadas células a la apoptosis: drogas inductoras de apoptosis, como el ET-18-OCH<sub>3</sub>, que fue sintetizado en 1968 como análogo de la 2 lisofosfatidil-colina, y aún está en proceso de investigación; otro tratamiento posible sería la inhibición del bcl-2, la sobreexpresión de p53, etc., aunque en este momento sólo representa un futuro prometedor.

La apoptosis presenta además una vertiente pronóstica. El conocimiento de la capacidad del tumor a sufrir apoptosis puede ser de gran utilidad, ya que permitiría un tratamiento más específico (CASTEJÓN, 1997).

Existen varios métodos de valoración de la apoptosis. El primero empleado fué la valoración con microscopio óptico de los rasgos morfológicos de las células apoptoicas, pero es un procedimiento tedioso, que puede aportar unos datos fácilmente influenciados por el tipo de fijador empleado, por el daño isquémico que presente el tejido y, también, por los cambios inducidos por tratamientos previos con radioterapia, quimioterapia, o terapia hormonal (STAUNTON, 1995). Además, los cuerpos apoptoicos no son fáciles de reconocer y duran pocas horas antes de que sean fagocitados (MOTYKA, 1991), por lo que esta técnica no es actualmente muy utilizada.

Los restantes métodos empleados para estudiar la apoptosis, los podemos subdividir en dos grupos:

A) Métodos que estudian poblaciones celulares.

B) Métodos que estudian células aisladas.

A) En general, se basan en las alteraciones producidas en la permeabilidad de la membrana celular, y la subsiguiente liberación de enzimas citoplasmáticas o de marcadores introducidos artificialmente. Sin embargo, presentan algún inconveniente, debido a que el daño principal de los agentes citotóxicos es intracelular, pudiendo permanecer intacta la membrana aún con daño celular importante.

Otros procedimientos que estudian poblaciones celulares detectan la fragmentación del ADN empleando marcadores radioactivos o no radioactivos, y se basan en la detección del ADN de bajo peso molecular, que está incrementado en las células apoptóicas o de ADN de alto peso molecular que, por el contrario, está reducido (WYLLIE, 1980). La necesidad de utilizar isótopos radioactivos o de precisar un marcado previo in vitro, son inconvenientes importantes de estos métodos.

B) De mayor interés son los métodos que estudian la apoptosis en células aisladas. La detección del ADN fragmentado se puede realizar mediante técnicas citométricas, aunque éstas no llegan a discriminar entre apoptosis y necrosis, o mediante fluorocromos, que detectan fundamentalmente los cambios más tardíos de la apoptosis. Por esta razón, hoy en día la técnica más aceptada y empleada por la mayoría de los autores, es la que se realiza con marcado enzimático, que detecta estadios muy tempranos de la apoptosis, y puede identificar cambios a nivel

molecular. Se puede realizar en tejidos previamente fijados en formol y procesados rutinariamente. De ellos, el método "END LABELING" o "TUNEL" (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling), es el que consigue una mayor sensibilidad con la máxima intensidad de señal para las células apoptóicas, y en él, la incorporación del nucleótido es muy rápida, permitiendo así que el tiempo de reacción sea corto, estimándose en treinta minutos (GABRIELI, 1992).

Existen pocos estudios de los índices de apoptosis, tanto en cáncer invasivo de mama como en CID y, asimismo, se sabe poco acerca de la relación de este factor con otros factores pronóstico en este tipo de neoplasia.

GONZÁLEZ-PALACIOS (1996) realiza un estudio sobre la apoptosis celular utilizando la técnica de Tunel en 105 casos de cánceres infiltrantes de mama, y establece tres niveles, en base al número de núcleos celulares teñidos en relación con el número total de células, al que denomina Índice Celular Apoptóico (ICA). No encuentra relación significativa con la sobreexpresión de la p53, ni con la presencia de RE, ni tampoco con el tipo histológico. Sin embargo, sí existía relación con el grado histológico encontrando que, en los 15 tumores de ICA alto, el 40% eran de grado III y, tan sólo el 7%, era de grado histológico I. Parecida correspondencia obtenía en los casos de ICA bajo, siendo el 50% de casos de grado I, en comparación con el 21% en los casos de grado histológico elevado.

No existía en su serie asociación significativa entre IP y apoptosis, aunque sí una tendencia a ser menor el IP cuanto menor es la apoptosis. Sin embargo, hay estudios realizados en otro tipo de tumores, como en linfomas (LEONCINI, 1993) y en neoplasias de

esófago (OHBU, 1995) que indican una estrecha relación entre apoptosis y proliferación celular.

En relación con el CID, el significado de la apoptosis ha sido estudiado escasamente. BODIS (1996) realiza un trabajo muy interesante sobre el hallazgo de apoptosis en el CID y su posible relación con el pronóstico de dicha neoplasia. En dicho estudio, encuentra una relación significativa entre la presencia de necrosis y la existencia de muerte celular por apoptosis comprobada, no sólo morfológicamente, sino también mediante técnica de TUNEL. Asimismo, encuentra relación directa entre la apoptosis y el GN, estando ésta francamente elevada en los casos de grado nuclear alto, y siendo prácticamente inexistente en los casos de grado nuclear I.

Así pues, se podría considerar la apoptosis como un potencial marcador de proliferación, aunque el escaso número de estudios impide obtener esta conclusión.

HARN (1997) realiza un estudio en cáncer invasivo de mama y en CID, sobre la apoptosis en sus células neoplásicas y la relación de ésta con otros factores pronóstico, p53 y RH, comprobando que la apoptosis es mayor en las formas intraductales que en los tumores infiltrantes, y que existe correlación en ambos casos con la p53, pero no con los RH. Sin embargo, en los trabajos mencionados anteriormente, BODIS en CID, y GONZÁLEZ-PALACIOS en cánceres invasivos, no encuentran esta relación .

Posiblemente, el gen P53 juegue un papel importante en la modulación de la apoptosis en los tumores de mama; recientemente, ha sido descrita la relación inversa entre el gen bcl-2

(inhibidor de la apoptosis) y la sobreexpresión de la p53 en algunos cánceres de mama (GORCZYCA, 1995; SIZIOPIKOU, 1996), pero también deben existir otras vías de modulación de la apoptosis inducida por factores diferentes a la p53 (LIEBERMANN, 1995), que explicarían las diferencias encontradas en este sentido.

En lesiones proliferativas benignas con apoptosis espontánea, SYMONDS (1994) en un modelo experimental, encuentra relación entre la mutación del gen P53 y la evolución de estas lesiones a formas malignas, a través del freno del mecanismo de apoptosis.

LIPPONEN (1994), estudiando el número de células apoptóicas por métodos morfológicos en 288 casos de carcinoma invasivo, encuentra que es bajo, en relación con la apoptosis vista en CID. Estos hallazgos son confirmados más tarde por HARN (1997), como hemos comentado anteriormente. Esto sugeriría la posibilidad de que la apoptosis en el CID actuaría a modo de barrera, para evitar la progresión hacia formas infiltrantes.

La apoptosis parece pues un mecanismo fisiológico fascinante, no bien conocido, implicado intensamente en la regulación celular. Su conocimiento parece importante para comprender el desarrollo y la progresión neoplásica, en la que influyen en proporciones diferentes, factores mitóticos y apoptóicos. Se intuye incluso que, del predominio de unos u otros en un tumor determinado, la terapéutica aplicable sería diferente a las drogas antiproliferativas actuales. Todas estas aproximaciones, actualmente en desarrollo, intentan conseguir que un proceso biológico, que ocurre de forma fisiológica, lo podamos inducir con fines terapéuticos.

## **II.9.- TRATAMIENTO**

Durante muchos años, se pensó que el cáncer de mama era una enfermedad que crecía localmente para invadir, posteriormente, las cadenas ganglionares regionales, que actuarían como filtro de la enfermedad, diseminándose más tarde por vía hemática, finalizando con la aparición de metástasis (TEORÍA MECANICISTA DE HALSTEAD). Sin embargo, se ha comprobado que la enfermedad no evoluciona así, sino que debe considerarse como una enfermedad sistémica desde el mismo momento del diagnóstico (TEORÍA BIOLÓGICA DE FISHER) lo que, evidentemente, ha repercutido no sólo en su enfoque diagnóstico, sino fundamentalmente, en el manejo terapéutico.

Aunque la necesidad de extirpación quirúrgica para el control loco-regional de la enfermedad se ha mantenido con los años, las técnicas de mastectomía han dejado de ser las únicas usadas y, cada vez más, se han ido empleando técnicas quirúrgicas menos agresivas (VERONESI, 1986, 1990; FISHER, 1989), a las cuáles se ha añadido tratamiento coadyuvante. Los resultados han sido semejantes en términos de control local y supervivencia.

El objetivo final del tratamiento del cáncer de mama es conseguir los mayores índices de supervivencia, y éste pasa por el control de la enfermedad loco-regional, contándose para ello con múltiples posibilidades terapéuticas.

La cirugía juega un papel importante en el control loco-regional, con o sin conservación de la mama, junto a la radioterapia. El tratamiento sistémico adyuvante es aceptado

unánimemente en el carcinoma infiltrante con metástasis ganglionares y, en la actualidad, parece aportar beneficios en mujeres con ganglios negativos, aunque el empleo en este grupo es objeto de controversia. En el grupo de pacientes con CID objeto de nuestro estudio, el tratamiento sistémico adyuvante está desestimado ya que, al menos conceptualmente, no debe existir la posibilidad de enfermedad metastásica.

Centrándonos en el CID, y en base a lo expuesto con anterioridad, los objetivos del tratamiento serían:

- ① Prevenir la RL y el desarrollo de las formas invasivas.
- ② Conseguir este primer punto con el tratamiento menor posible.
- ③ Preservar la mama, siempre que podamos, dado que las ventajas para la mujer son evidentes, desde el punto de vista estético, sexual, y psicológico.

En décadas pasadas, el tratamiento del CID seguía claramente al indicado para el cáncer infiltrante, cuya técnica estándar era la mastectomía en sus distintas modalidades, pero la polémica ha surgido cuando, en muchos casos de carcinoma invasivo, en la actualidad, tiende a ser conservador. Existe, pues, una situación paradójica entre una actitud conservadora ante carcinomas infiltrantes, frente a una tendencia mutilante en formas “in situ”.

El tratamiento del CID, hoy en día, se sitúa en un amplio rango de posibilidades, que van desde la simple enucleación (tumorectomía), hasta diversas formas de extirpación local más amplia (resección segmentaria, cuadrantectomía), todas ellas seguidas de radioterapia o no, y mastectomías con o sin reconstrucción. Como el CID es un grupo heterogéneo de lesiones,



no debería haber una única solución terapéutica para todas las formas de enfermedad. Por tanto, habrá que desarrollar métodos para determinar la forma de tratamiento más adecuada en cada paciente y para cada tipo de CID.

La linfadenectomía axilar con extensión variable, añadida a la mastectomía, formó parte del tratamiento del CID. La razón para ello fue la incidencia de metástasis ganglionares, que se estiman entre el 1-2% (SILVERSTEIN, 1991; BLAND, 1992; FRIKBERG; 1993). Como hemos referido, la existencia de un CID excluiría esta posibilidad, que sólo podría justificarse por una infravaloración diagnóstica, al no detectarse focos de microinvasión que, sin duda, estarían presentes.

Actualmente, existe bastante unanimidad (ZAFRANI, 1986; LAGIOS, 1989; SILVERSTEIN, 1990; FRIKBERG, 1993; FISHER, 1993) en considerar que no procede realizar una linfadenectomía axilar, ante el diagnóstico de CID, y reservarla de modo diferido para el pequeño número de pacientes en los que se confirme la microinvasión.

Sin embargo, hay autores como HARRIS (1991) que, frente a lesiones de alto grado con factores pronóstico desfavorables, en las que se pudiera preveer la existencia de microinvasión, prefiere realizar una linfadenectomía axilar de nivel I. SCHWARTZ (1989) recomienda esta misma técnica en todas las formas comedo de CID, por existir un mayor índice de focos de microinvasión oculta en dichas lesiones. No obstante, WONG (1990) analizó 33 CID con microinvasión y no encontró ninguna afectación axilar, confirmando un riesgo de infiltración axilar bajo, así como un comportamiento muy parecido de estas lesiones con el CID puro.

La mastectomía ha sido, y aún es, la referencia técnica con la que deben compararse las demás modalidades terapéuticas del CID. Las recidivas locales con este procedimiento son muy bajas y los índices de supervivencia se aproximan en muchas series al 100%. Frente a estas ventajas, hay que oponer el ser una técnica mutilante para una patología que en muchos casos tiene un curso muy benigno, y en la que la mastectomía sería un tratamiento excesivo.

Las razones para la conservación de la mama son evidentes, pero como hemos referido a lo largo de nuestro trabajo, las técnicas que la preservan se siguen de índices de recidiva mayores que en la mastectomía, y son formas infiltrantes en el 50% de los casos, lo cual supone que la supervivencia será menor en algunas de las pacientes así tratadas.

Es comprensible pues, que el modo idóneo del tratamiento sea una de las controversias actuales en relación al CID de mama.

En 1993, BALCH, SINGLETARY y BLAND realizan una amplia revisión y recomiendan mastectomía para todos los CID mayores de 2 cms. En una serie de 101 pacientes con CID tratados con mastectomía en el Memorial S.K.C.C., KINNE (1989) comunica una sólo muerte debida al cáncer de mama, con una media de seguimiento de 11,5 años.

Después de una mastectomía como tratamiento del CID, el índice de RL debería aproximarse al 0% y, de hecho, en la serie de FOWBLE (1989) sobre 1000 mastectomías por CID, el índice de recidivas fue menor del 1%. Pero, desgraciadamente, no siempre las cosas ocurren así, existiendo series con índices de RL de hasta el 10%. En la revisión realizada por

BALCH (1993), comunica una RL media de 3,1%, y una mortalidad de 2,3% después de la mastectomía, aunque en algunas de las series el seguimiento era limitado, lo cual sugiere que la verdadera cifra de RL pudiera ser aún más alta. QUINN (1997) publica una serie de 121 CID, el 65% de los cuáles fueron tratados con mastectomía y, de ellos, el 3,8% presentó RL, comprobando que en ninguno de los casos existía microinvasión.

VEZERIDIS y BLAND (1994) encuentran un índice de mortalidad de 0-8% en una serie importante en la que se había realizado una mastectomía como tratamiento del CID. Posiblemente, estas cifras de mortalidad reflejen casos de microinvasión no diagnosticadas, o mastectomías incompletas, que añaden por tanto un desarrollo potencial de cáncer invasivo.

Podríamos concluir que, aunque la mastectomía es curativa en el 98% de los casos, tanto en su presentación como masa palpable o en sus formas asintomáticas (SUNSHINE, 1985; SCHUH, 1986; KINNE, 1989), puede representar un procedimiento excesivo para lesiones que, en muchos casos, no progresaran hacia formas invasivas, sin aportar además garantía absoluta de curación (COOKE, 1989).

Hoy en día, está aceptado tratar el cáncer de mama sin amputar el seno, tanto en cáncer invasivo, como en CID. Globalmente, dicho tratamiento consistiría en la extirpación del tumor con un margen sano, cuya extensión puede ser variable, y que justifica las diferentes terminologías que recibe (cuadrantectomía, segmentectomía, tumorectomía, etc.). Este tratamiento suele complementarse con radioterapia o no, como veremos posteriormente.

La radioterapia empezó a utilizarse en el cáncer invasor de mama, a principios del siglo

XX, de manera esporádica y, casi siempre, en pacientes que no eran susceptibles de tratamiento quirúrgico. Posteriormente, fue utilizado en pacientes sometidos a cirugía para disminuir la incidencia de RL. BERSTOCK (1985), comunica el descenso de ésta en pacientes sometidos a tratamientos quirúrgicos de cualquier índole, cuando se añadía radioterapia.

Actualmente, la radioterapia, junto con la cirugía, se ha hecho indispensable en el tratamiento conservador del cáncer infiltrante de mama como terapia primaria, con el objetivo de destruir pequeños focos tumorales residuales subclínicos que, evidentemente, pueden quedar después de realizar cirugía conservadora, al ser el cáncer de mama multicéntrico en muchos casos. El tratamiento radioterápico se suele iniciar a las 3 o 4 semanas posteriores al tratamiento quirúrgico, con una dosis total de 50 Gy. repartidas en 25 sesiones y, en ocasiones, se añade un "boost" o sobredosis en la zona primaria del tumor, mediante un implante intersticial con agujas de Iridio-192.

El tratamiento del CID mediante lumpectomía, radioterapia o ambos, fue sugerido por BLOODGOOD cuando, en 1917, describió un caso de CID, aunque en ese momento fue totalmente desechada esa posibilidad.

El éxito de la cirugía conservadora en el tratamiento del cáncer invasivo (FISHER, 1989), crea una alternativa a la mastectomía como tratamiento del CID. No obstante, los estudios retrospectivos publicados sobre tratamientos del CID son difíciles de evaluar y comparar, dado en primer lugar el escaso número de casos que presentan y, en segundo lugar, las diferencias en la valoración de parámetros de inclusión de casos como: diagnóstico

clínico o mamográfico, presencia de microinvasión o no, subtipos histológicos muy diferentes en su comportamiento, etc.,

Considerando las limitaciones en la valoración de los distintos trabajos que comparan el tratamiento quirúrgico del CID, bien con mastectomía, bien de modo conservador (extirpación amplia más radioterapia), parece no existir diferencia en cuanto a la supervivencia, independientemente de que se traten de una u otra forma (SILVERSTEIN, 1992; BORNSTEIN, 1991; BALCH, 1993; FISHER, 1993).

ARNESSON, en 1989, realiza un estudio comparando la escisión con la mastectomía en el CID, diagnosticado tanto clínica como mamográficamente. Tras un seguimiento de cinco años encuentra RL en el 13% de las tratadas por escisión, y en ninguna de las mastectomizadas. El 40% de sus recidivas fueron infiltrantes y, de éstas, prácticamente el 60% aparecieron en el mismo sitio de los tumores primarios, y cuyos márgenes libres de tumor habían sido menores de 6 mm.

La necesidad de radioterapia o no, en el tratamiento conservador del CID, es un tema muy debatido en la actualidad. En una amplia revisión de la literatura sobre resultados del tratamiento en el CID realizando cirugía conservadora, con radioterapia o sin ella, encontramos, aproximadamente, un 18,7% de RL en las pacientes que se había realizado únicamente escisión, y esta cifra es del 9% en los casos a los que se añade radioterapia. Cerca de la mitad de las RL fueron formas invasivas en ambos tipos de tratamientos (HUGHES, 1996).

El único ensayo aleatorio, prospectivo, publicado en pacientes con CID fue realizado

por el National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) (FISHER, 1993), en el que se estudiaron más de 800 pacientes en los que se había realizado cirugía conservadora, encontrando RL en el 16,4% de los casos que no habían recibido radioterapia, disminuyendo ésta hasta en un 7% en los casos en que se añadía tratamiento radioterápico y, en ambos casos, la mitad de las recidivas eran formas invasivas. Este estudio ha recibido numerosas críticas y, posiblemente, la más importante sea la falta de valoración del subtipo histológico. También cabría plantearse, como nos recuerda HOLLAND (1994), si los efectos de la radioterapia tras la extirpación del CID, representan un efecto permanente o, simplemente, un retraso en la aparición de la recidiva, dado el corto periodo de seguimiento que estos estudios presentan.

Así pues, podemos concluir que la adición de la radioterapia al CID extirpado con márgenes libres, obtiene índices menores de RL frente a la escisión sólo, pero la evolución potencial en ambos casos hacia una forma infiltrante, no presenta diferencias en cuanto a la supervivencia.

Relacionado con la adición de la radioterapia al tratamiento del CID, cabría hacerse una serie de preguntas: ¿sería necesaria en todos los casos, o habría que aplicársela sólo a algunos subgrupos?. Por otro lado, al ser la conservación del seno un objetivo importante del tratamiento actual del cáncer de mama, ¿podría una radioterapia de dudosa utilidad invalidar o dificultar, en gran medida, un posterior tratamiento conservador, en caso de aparecer una recidiva en forma infiltrante?.

En la actualidad, está siendo valorada por SCHWARTZ (1992) y SILVERSTEIN

(1995), la existencia de un grupo de lesiones dentro del CID que no se beneficiarían de tratamiento radioterápico, y PAGE y LAGIOS (1995) se cuestionan si una detallada evaluación mamográfica y un intenso estudio histológico, nos permitiría identificar este subgrupo de pacientes.

Los factores pronóstico que han sido citados como favorecedores de RL han sido numerosos. De entre ellos destacaríamos:

- ① Grado nuclear alto
- ② Presencia y grado de necrosis
- ③ Tipo comedocarcinoma
- ④ Margen de resección escaso

La combinación de estos factores puede orientarnos sobre el comportamiento y la evolución de estos tumores.

Tanto LAGIOS (1989) como SILVERSTEIN (1995), consideran que el grado nuclear y la necrosis son las características principales de cara a la RL en tumores tratados con cirugía conservadora sin radioterapia. Así, el primer autor en 79 casos de CID tratados únicamente con escisión, no encontró ninguna RL en tumores de bajo grado, mientras que ésta supuso el 25% en lesiones de alto grado.

SCHWARTZ (1992) comunica una relación importante entre RL y el patrón histológico comedo, encontrando éste en el 99% de las recidivas de los casos estudiados. Sin embargo, en opinión de HUGHES (1996), el grado histológico es mayor productor de RL que la

presencia o no de comedocarcinoma (Fig. 9).

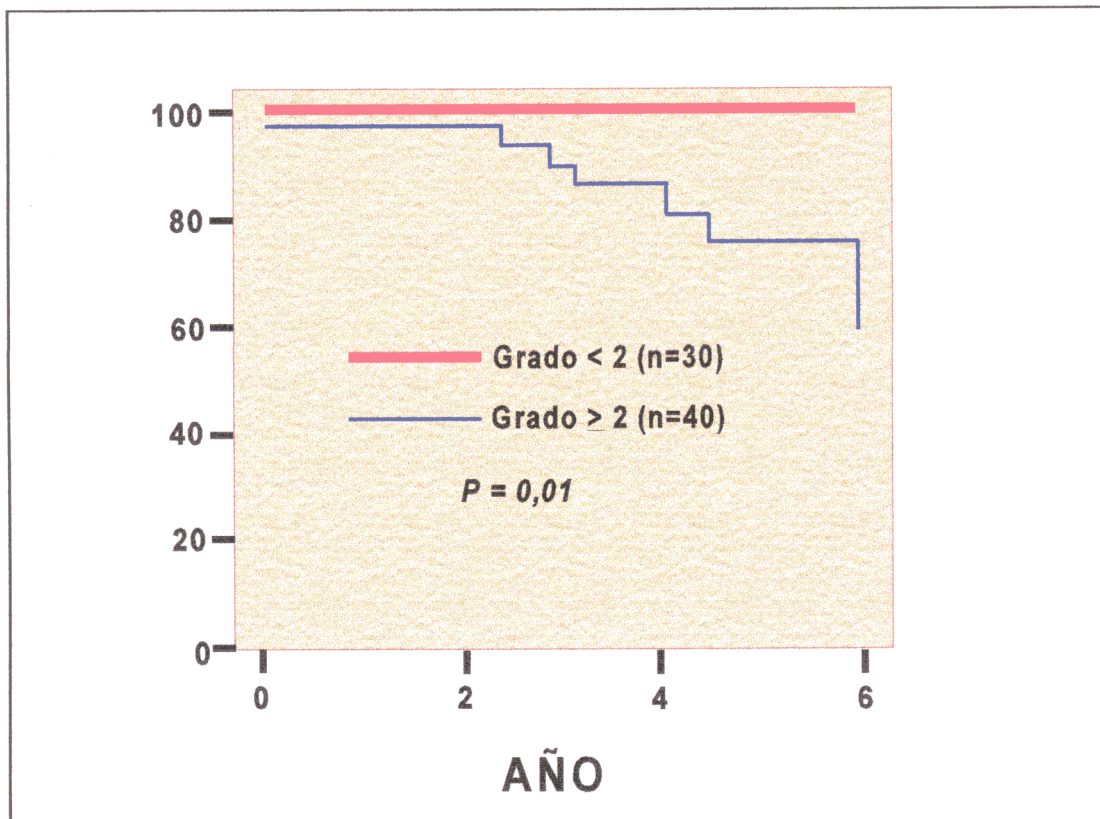


Figura 9: Relación de RL y Supervivencia, con el GH.

FISHER (1995), sugiere que la extensión del margen es fundamental, duplicándose la RL, tanto en las formas comedo como en las formas no comedo, cuando el margen está afectado o, por lo menos, es incierto. Desgraciadamente, no hay una definición clara establecida acerca de lo que entendemos como margen quirúrgico aceptable. El concepto de “margen quirúrgico negativo” debería incluir, como mínimo, la ausencia de focos de CID cercanos al borde quirúrgico y un margen de tejido mamario normal entre la lesión y el borde de la pieza. En general, un margen de 1-2 cms. desde el límite de la lesión, parece suficiente para considerar un margen correcto (HOLLAND y HENDRIKS, 1994) aunque, en muchos casos, tanto por la localización de la lesión, como por ser lesiones no palpables, es difícil precisar dicho margen en el momento de la cirugía.



Como resumen, podríamos decir que lesiones de bajo grado, de forma histológica no comedo, que no presentan necrosis, y en las que podemos realizar una exéresis del tumor con un margen correcto, podrían ser candidatas a realizar cirugía conservadora sin radioterapia. Sin embargo, no debemos olvidar, como recuerda QUINN (1997) que todos los grados de CID son potencialmente invasores, aunque varíe la proporción en que lo hacen.

En un intento de determinar las diferentes posibilidades terapéuticas para los distintos tipos de CID, surge el “índice pronóstico de Van Nuys” (VNPI) (SILVERSTEIN, LAGIOS 1996) el cual, basado en un algoritmo numérico, crea tres grupos de riesgo claramente definidos. Valora de 1 a 3 los factores que considera más importantes de cara a la RL, como vemos a continuación:

A) Tamaño tumoral:

- 1.- Tumores < 15 mm. de diámetro.
- 2.- Tumores entre 16-40 mm.
- 3.- Tumores > 41 mm.

B) Anchura del margen de resección:

- 1.- Margen > 10 mm.
- 2.- Margen entre 1-9 mm.
- 3.- Margen < 1 mm.

C) Subtipo anatomopatológico:

- 1.- Tumores de bajo grado nuclear, sin formas comedo ni necrosis.
- 2.- Tumores de bajo grado nuclear, con formas comedo y necrosis.
- 3.- Tumores de alto grado

De la valoración de estos tres factores (tamaño tumoral + margen de resección + subtipo histológico), surge el VNPI quedando establecido de la siguiente manera:

- ❑ Lesiones con bajo VNPI (3-4), tienen un índice muy bajo de RL y son candidatas a escisión simple.
- ❑ Lesiones con VNPI (5-7), con riesgo intermedio de RL a las que se realizaría escisión más radioterapia.
- ❑ Lesiones con alto VNPI (8-9), cuya posibilidad de RL es elevada, por lo que serían tratadas con mastectomía.

Aunque el cálculo de VNPI parece sencillo, no siempre se logra un acuerdo en la valoración de los distintos parámetros. En ocasiones, es difícil determinar el tipo histológico concreto, evaluar el margen quirúrgico, sobre todo si ha existido reescisión, o establecer el tamaño del tumor, si consideramos que puede ser difuso y estar presente en varias preparaciones.

No obstante, a pesar de las limitaciones que el VNPI presenta, no cabe duda que ha sido un paso importante en la búsqueda de opciones terapéuticas para los distintos tipos de CID; su utilidad, como dicen los propios autores, debe ser validada y confirmada por la experiencia de otros grupos.

La selección de las distintas posibilidades terapéuticas para el CID sigue creando dificultad. Tendremos que esperar a que estudios sobre marcadores moleculares se incorporen a la práctica diagnóstica habitual, de cara a la mejor selección del tratamiento

para cada tipo de CID y para una mujer determinada. Hasta entonces, los tratamientos aceptados serían:

- ① Lumpectomía más radioterapia.
- ② Mastectomía con reconstrucción o no.
- ③ Lumpectomía sin radioterapia (para casos altamente seleccionados, con buen pronóstico).

Los datos referidos por el "National Cancer Data Base" sobre 20.556 mujeres con CID, confirman a la mastectomía como la forma más habitual de tratamiento en el periodo de tiempo desde 1985 a 1991 y, del mismo modo, muestran la tendencia al alza de la cirugía conservadora, que pasó del 20,9% en 1985, al 35,4% en 1991, continuando esta progresión en la actualidad.

### **II.9.1.- TRATAMIENTO DE LA RECIDIVA DEL CID**

El riesgo de RL, tras el tratamiento del CID, es una realidad, como hemos podido ver con anterioridad. La mastectomía, como tratamiento primario, se muestra como el procedimiento más seguro para evitarla, aunque no conviene olvidar que, en un pequeño número de casos (2-3%), esta posibilidad existe (KINNE, 1989; BALCH, 1993).

La mitad de las recidivas son en forma infiltrante, y el tratamiento de rescate en ellas debe perseguir los mismos objetivos de control local, supervivencia y resultado estético, como si de un primario invasor se tratase. Es evidente que el modo de tratar primariamente

el CID puede influir en el logro de alguno de estos objetivos.

La aparición de las recidivas es variable en el tiempo. En un trabajo publicado por SOLIN (1994), sobre 274 CID tratados con cirugía conservadora más radioterapia, el 40% de las recidivas se detectaron entre los 5-10 años después del tratamiento, mientras que el 12% aparecieron pasados los 10 años. Parece pues que, después de esta forma de tratamiento, el riesgo de RL es mayor en los 10 primeros años, aunque éste persiste, en menor grado, pasado este tiempo.

La terapéutica más utilizada en la mama en los casos de recidiva, tanto en formas invasivas como no invasivas, es la mastectomía, y numerosos autores como FISHER (1993), KUSKE (1993) y SOLIN (1994), nos confirman sus buenos resultados.

SOLIN, en el trabajo referido, comunica 42 RL (15,3%), de las que el 55% fueron invasivas. Tanto estas formas como las no infiltrantes, se trataron mayoritariamente con mastectomía (93%). El seguimiento de las pacientes fue de 3,7 años y, en ningún caso, hubo nueva recidiva, si la tratada fue del tipo no infiltrante. Por el contrario, 5 pacientes que desarrollaron metástasis presentaban un cáncer invasivo en el momento de la RL.

Los resultados después de tratar las recidivas no son concluyentes, en cuanto a la valoración del riesgo de metástasis, dado el corto seguimiento de las pacientes (STOTTER, 1990; SOLIN, 1994).

Aunque la mastectomía es la técnica más aceptada para tratar las recidivas del CID,

algunos aconsejan la reescisión (SILVERSTEIN, 1991) en casos seleccionados, y siguiendo los mismos criterios rigurosos del tratamiento primario. Si en la primera intervención no se realizó tratamiento radioterápico, en esta segunda ocasión es obligado (HARRIS, 1991).

### **II.9.2.- TRATAMIENTO HORMONAL DEL CID**

La hormonodependencia del cáncer de mama se conoce desde 1986, cuando BEATSON observó la regresión de tumores inoperables en pacientes premenopáusicas tras realizar ooforectomías bilaterales. Posteriormente, la adrenalectomía o hipofisectomía llegó a ser una forma común de privación hormonal en pacientes postmenopáusicas, con buena respuesta en algunos tumores de mama.

En la actualidad, está demostrada la influencia hormonal, sobre todo estrogénica, en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Estas hormonas, estrógenos, y progestágenos, ejercen sus efectos sobre las células tumorales uniéndose y activando a los receptores hormonales específicos (RE y RP). El reconocimiento de dichos RH ha permitido una mejor definición de los tumores hormonodependientes y, por lo tanto, una mejor selección de las pacientes susceptibles de tratamiento hormonal.

En 1967 se sintetizó el Tamoxifeno, que es un antiestrógeno no esteroideo (HARPER, 1967), y cuatro años más tarde, se utilizó en el cáncer de mama avanzado (COLE, 1971). El tamoxifeno es un agente tumoristático que no destruye las células tumorales, aunque si detiene su crecimiento; se une a los RE bloqueando, por tanto, la captación de estrógenos a nivel del tejido tumoral.

En un principio, el tamoxifeno se utilizó como tratamiento estándar en las mujeres postmenopáusicas, que tenían RE+ y afectación tumoral de los ganglios axilares. En la actualidad, se cree que el tratamiento coadyuvante con tamoxifeno es independiente del estado hormonal, de la afectación de los ganglios axilares, o de la presencia de RH (BARTLETT, 1987; FISHER, 1989; BALCH, 1993), y se ha demostrado como dicho tratamiento prolonga la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer invasivo.

La duración óptima del tratamiento con tamoxifeno es desconocida, pero se recomienda un mínimo de 2 a 5 años (LOVE, 1989).

The Early Breast Cancer Trialists collaborative Group ha demostrado la disminución de cáncer contralateral después del tratamiento de un cáncer invasivo en un 39%, y parece lógico aceptar que una cierta proporción de estos tumores podrían desarrollarse a partir de un CID. Por este concepto, podríamos considerar al tamoxifeno como tratamiento quimiopreventivo.

En este sentido, estamos a punto de conocer los resultados de tres estudios clínicos en mujeres con alto riesgo de desarrollar un cáncer invasivo de mama, realizados en Italia, U.K., E.E.U.U., usando el tamoxifeno a dosis de 20 mgrs./24h. durante 5 años, como agente quimiopreventivo. Hasta poder valorar estos resultados, la quimioprevención representa una posibilidad teórica más que una opción terapéutica real (JORDAN, 1993).

La efectividad del tamoxifeno en pacientes con CID, está siendo valorada en la actualidad en dos grupos de trabajo. The United Kingdom Coordinating Committee for

Cancer Research está haciendo un estudio aleatorio en mujeres con CID diagnosticados mamográficamente, comparando escisión sola, escisión más radioterapia y, en estos mismos casos, pero añadiendo tamoxifeno. El objetivo de este estudio es determinar la incidencia de recidiva, tanto en forma invasiva como en forma de un nuevo CID, en la mama ipsilateral o contralateral.

El NSABP es el otro estudio aleatorio realizado en pacientes con CID tratados con escisión más radioterapia, en un grupo de estas pacientes añaden tratamiento complementario con tamoxifeno, y en otro añaden un placebo. El objetivo es el mismo que en el estudio anteriormente comentado.

Ambos estudios están a punto de concluir pero, en este momento, el uso del tamoxifeno como tratamiento adyuvante en pacientes con CID está limitado al concepto de ensayo clínico. El futuro nos dirá el lugar del tamoxifeno en el manejo del CID.

### **III.- OBJETIVOS**



### **III.- OBJETIVOS**

En el CID se consideran factores decisivos en relación con el desarrollo de una situación invasiva, el grado de diferenciación citoarquitectural de las células transformadas neoplásicamente, y la cuantía de células que han adquirido esa transformación. Así, parecen adquirir trascendental importancia los fenómenos relacionados con la proliferación y la muerte celular.

Nuestro estudio se centra en determinar la implicación de estos factores, claves en el desarrollo del fenotipo invasivo, en una serie de cánceres de mama intraductales. Dentro de este marco de trabajo, los objetivos concretos de esta tesis han sido:

- 1.- Analizar la fracción de crecimiento de las células neoplásicas y el grado de apoptosis en las mismas.

- 2.- Establecer las posibles relaciones existentes entre factores histológicos de reconocido valor pronóstico en el CID (grado citológico, diferenciación arquitectural y necrosis) con factores biológicos relacionados con la diferenciación y proliferación de las células neoplásicas, como son los RH y el IP.
- 3.- Analizar la relación existente entre grado de diferenciación y de apoptosis, así como la de estos factores con otros implicados en el cambio y desarrollo neoplásicos (Her-2-neu, P53, Ciclina D<sub>1</sub>).
- 4.- En base a los resultados obtenidos del desarrollo de los objetivos anteriores, determinar la idoneidad práctica de las diversas clasificaciones histológicas existentes para el CID.
- 5.- Obtener datos (morfológico-biológicos) que pudieran ser de utilidad para la orientación terapéutica.

## **IV.- MATERIAL Y MÉTODOS**

## **IV.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **IV.1.- MATERIAL**

#### **IV.1.1.- PACIENTES**

Hemos evaluado en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, durante el periodo de tiempo comprendido entre Enero de 1978 y Diciembre de 1996, a 59 pacientes diagnosticadas de CID de mama. De ellas, han sido desestimadas 9, por no tener muestras suficientes para su estudio, o por no ser valorables los resultados del análisis inmunohistoquímico o molecular, independientemente de la causa.

De los 50 casos de CID de los que consta el estudio, 45 pertenecían al Departamento de Cirugía General y Digestiva, y 5 al Servicio de Ginecología del mismo hospital, cumpliendo todos ellos los siguientes criterios:

- 1.- Corresponder a pacientes del sexo femenino.
- 2.- Presentar un CID, histológicamente comprobado.
- 3.- Haber sido intervenidos por un grupo de cirujanos, con criterios homogéneos de tratamiento.
- 4.- Haber sido verificados todos los diagnósticos por un mismo patólogo, con el intento de evitar alteraciones en la interpretación de las muestras.
- 5.- No existir violación del protocolo de estudio en ninguna de las pacientes estudiadas.

#### **IV.1.2.- PARÁMETROS CLÍNICOS**

##### **IV.1.2.1.- EDAD**

Se ha considerado la edad en el momento de la intervención quirúrgica, expresándose en años. Las pacientes se encontraban situadas entre los 35 y los 79 años, con una edad media de 55,7 años.

##### **IV.1.2.2.- ESTADO MENOPÁUSICO**

Se han establecido 2 grupos de pacientes según su estado menstrual:

- 1.- Enfermas pre o peri-menopáusicas: el 32% de los casos (16 enfermas).
- 2.- Enfermas post-menopáusicas: el 68% de nuestra serie (34 casos).

### **IV.1.2.3.- ANTECEDENTES FAMILIARES**

Se han considerado los miembros de la familia de 1<sup>er</sup> orden (madre, hermana, hija), representando en nuestro estudio el 8% (4 casos).

### **IV.1.2.4.- PRESENTACIÓN CLÍNICA**

De los 50 casos estudiados, 10 (20%) fueron diagnosticados antes de 1990, frente al 80% diagnosticado después de esta fecha. El 36% de los casos de CID se localizaban en mama derecha; por el contrario el 84% correspondía a mama izquierda.

La presentación clínica de nuestras pacientes fue en forma:

A) Asintomáticas, en 23 casos (46%):

- 19 microcalcificaciones
- 2 nódulos no palpables
- 2 microcalcificaciones, más nódulo palpable

B) Sintomáticas, en 27 casos (54%):

- 14 nódulos palpables
- 9 Telorragias
- 4 alteraciones del conjunto areola-pezones

En tres casos, el CID se presentó asociado con un carcinoma infiltrante contralateral, dos de manera sincrónica, y uno de forma asincrónica.

#### **IV.1.2.5.- RECURRENCIA**

El tiempo de seguimiento mínimo en nuestro estudio, tras el tratamiento quirúrgico, fue de 6 meses, hasta un máximo de 195 meses (tiempo medio de 49,3 meses). Durante este periodo de tiempo, se diagnosticaron 4 recurrencias (8%), situadas todas en el mismo cuadrante del tumor primario, tres de ellas en forma nodular y una en forma difusa. Las 4 enfermas presentaron dicha recurrencia en forma de carcinoma invasivo con diseminación axilar (N+) y, tan sólo una de ellas, presentó metástasis a distancia.

Como tratamiento de rescate de estas recidivas, se realizó en 3 de ellas una mastectomía radical modificada, y en la otra enferma, dado que tenía una mastectomía previa, su tratamiento consistió en exéresis local y radioterapia. Todas ellas recibieron tratamiento quimioterápico.

#### **IV.1.3.- PARÁMETROS DE TÉCNICA QUIRÚRGICA**

Las pacientes fueron tratadas por un reducido número de cirujanos experimentados en cirugía de la mama, con criterios similares, si bien adaptados a los conocimientos de cada época sobre el CID.

Se realizaron 34 mastectomías (68% de los casos): 14 mastectomías simples y 16 mastectomías radicales modificadas (nivel I axilar). A 13 enfermas de este grupo, se les realizó reconstrucción inmediata con expansor y prótesis posterior.

En 16 enfermas (32%) se realizó tratamiento con conservación de la mama: En 4 de ellas sólo se efectuó la extirpación local y en 12 se añadió radioterapia a la mama residual. En la actualidad, la dosis administrada a la mama oscila entre 4.600 cGray y 5.000 cGy., en fracciones de 180-200 cGy por sesión de tratamiento. Se administra una sesión por día, y cinco sesiones a la semana, hasta completar la dosis total de irradiación.

## **IV.2.- MÉTODOS**

### **IV.2.1.- ESTUDIO HISTOLÓGICO**

El número de bloques tomados del tumor, para su estudio histológico, varió en cada caso. En aquéllos cuyo tamaño lo permitía, se tomaron al menos 3 bloques, incluyendo siempre, en alguno de ellos, tumor y tejido mamario vecino. Si era posible, se incorporaba también el borde de resección quirúrgica mas próximo, previamente marcado con tinta china en las resecciones de tipo conservador.

#### **IV.2.1.1.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA**

Encuadramos nuestros casos en cada una de las seis clasificaciones aceptadas para el CID, y que han sido expuestas anteriormente.



Con fines de evaluación estadística, y para una mejor valoración de las variables dependientes -Patrón arquitectural, Grado nuclear y Necrosis-, se han creado los siguientes grupos:

1.- Clasificación arquitectural. - Hemos reagrupado los cinco tipos histológicos previos, de la siguiente manera:

- Formas Comedo: Patrón comedo; para ser incluido en este grupo las células neoplásicas presentaban: alto grado nuclear, presencia de necrosis y patrón sólido (POLLER, 1994).
  
- Formas no Comedo:
  - ⇒ Cribiforme
  - ⇒ Micropapilar
  - ⇒ Papilar
  - ⇒ Sólido

Las características de este grupo han sido comentadas en el capítulo II.7. sobre clasificaciones histológicas, al estudiar cada tipo histológico de CID.

2) Clasificación citonuclear. - Se han creado dos grupos, separando las formas de alto grado nuclear del resto:

- GN bajo e intermedio
- GN alto

De esta manera, evitamos la diferencia entre GN bajo e intermedio, que ocasionaba la mayor dificultad de valoración en dicha clasificación, como hemos visto en el capítulo II.7.

3.- Clasificación de Nottingham.- Se ha tratado de diferenciar dos grupos, dependiendo de la presencia o ausencia de necrosis. Definimos ésta como la existencia de material con detritus celulares, aunque sea en cantidad mínima.

❑ Formas sin necrosis:

⇒ CID sin necrosis

❑ Formas con necrosis:

⇒ CID con necrosis

⇒ Comedo puro

Dentro de la clasificación arquitectural y de la citonuclear, hemos estudiado las formas de presentación, en relación a un patrón histológico puro o mixto, para valorar la mayor idoneidad de ambas clasificaciones.

#### **IV.2.1.2.- GRADACIÓN NUCLEAR**

La gradación nuclear se efectuó siguiendo un estricto protocolo establecido por LAGIOS en 1990, utilizando la sección histológica más representativa y mejor preservada. Se realizó para todos los subtipos histológicos tumorales, con muestras tomadas preferentemente de las

zonas periféricas sobre las centrales. El método evalúa tres componentes de la morfología nuclear del tumor: tamaño nuclear, distribución de la cromatina y número de nucleolos.

Quedan definidos tres grupos:

- ❑ GRADO NUCLEAR 1:
  - 1) Tamaño nuclear entre 1-1,5 veces el diámetro del eritrocito
  - 2) Cromatina difusa
  - 3) Ausencia de nucleolos
  
- ❑ GRADO NUCLEAR 2:
  - 1) Tamaño nuclear 1-2 veces el diámetro del eritrocito
  - 2) Cromatina en gránulos
  - 3) Nucleolos infrecuentes
  
- ❑ GRADO NUCLEAR 3:
  - 1) Tamaño nuclear mayor a 2 veces el diámetro del eritrocito
  - 2) Cromatina en vesículas
  - 3) Uno o más nucleolos

## **IV.2.2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

### **IV.2.2.1.- TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA**

Las técnicas inmunohistoquímicas son un método fiable para el “screening” y

caracterización de anticuerpos monoclonales. Utilizando estas técnicas, pueden visualizarse la reacción antígeno-anticuerpo en las células o en el intersticio, tanto con microscopio óptico como electrónico.

Como método inmunohistoquímico, se utilizó la técnica del sistema estreptoavidina-biotina (CATTORETI, 1988). Debido a que el estudio inmunohistoquímico se realizó en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina, fue necesario su tratamiento previo a la inmunotinción, para facilitar el acceso de los Acs. a los Ags. tisulares. Este se realizó mediante la utilización de un método no enzimático (SHI, 1991; McKEE, 1993); así, las preparaciones eran procesadas en un horno microondas sumergidas en un tampón 0,01M. de citrato sódico a pH 6, durante un tiempo variable que osciló entre 10 y 30 min.

#### **IV.2.2.2.- MÉTODO ESTREPTOAVIDINA -BIOTINA**

Las secciones de parafina (3-4 $\mu$ m.) se montaron sobre portas tratados con poly-L-lisina, siendo desparafinadas e hidratadas en alcohol. Para inhibir la peroxidasa endógena, se incubaron en una solución fresca de metanol al 5% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 10-15 min. en cámara húmeda. A continuación, se incubaban con el Ac primario, diluido adecuadamente en tampón tris-salino (TBS) a pH 7,4 durante 30 min. en cámara húmeda. Tras el lavado en TBS durante 5 min., se cubrían con suero de conejo anti-ratón biotilado diluido al 1/250 durante 30 min. y, después de un lavado en TBS, se incubaban con el complejo estrepto avidina-biotina, marcado con peroxidasa (Strep AB HRP) diluido al 1/250. Tras un nuevo lavado en TBS durante 5 min., se incubaba con una dilución de diaminobencidina (DAB) fresca,

durante 10 min. Finalmente, tras un lavado en TBS durante 5 min., se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 2-5 min. Posteriormente, se procedía al lavado con agua y diferenciación con alcohol, para después deshidratar, clarificar y montar.

#### **IV.2.2.3.- ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Los Acs empleados en este estudio se reseñan en la Tabla X, junto con la especificidad, reactividad, y procedencia de cada uno.

*TABLA X: Anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico.*

<b>ANTICUERPO</b>	<b>PROCEDE</b>	<b>CLON</b>	<b>REACTIVIDAD</b>
<b>Anti RE</b>	Immunotech®	ERID5	Células con receptores de estrógenos
<b>MIB 1</b>	Immunotech®	Ki 67	Células en proliferación
<b>Anti p53</b>	Novocastra®	DO 7	Céls que expresan p53 salvaje o mutada
<b>CB11</b>	Biogenex®	CB11	Oncoproteína C-erbB-2, tinción a nivel de la Mb.
<b>Anti Ciclina D<sub>1</sub></b>	Progen®	DCS6	Células con expresión de Ciclina D <sub>1</sub>

El estado de la antigenicidad del tejido se valoró mediante la inmunotinción con el Ac antivimentina.

Como controles positivos para los Acs anti-RE y anti-p53, se utilizaron secciones de

un carcinoma mamario fijado en formol e incluido en parafina con alta expresión de dicho receptor hormonal y de la proteína P53. Como control positivo del Ac MIB-1, se utilizaron secciones de parafina de amígdala hiperplásica. El control positivo del CB11 y anticiclina D<sub>1</sub> se realizó, por comparación con otras muestras de tejido mamario, con resultados contrastados de alta positividad.

Como control negativo, se realizaba sistemáticamente la omisión del Ac primario. Los controles, además, incluían una sección de tejido mamario no neoplásico

#### **IV.2.2.4.- CUANTIFICACIÓN DE RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS**

El sistema está basado en la determinación de una población de células, ya sean células simples o secciones de tejido, mediante la aplicación de técnicas de tinción inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos que reaccionan con proteínas específicas, pudiendo “cuantificar” dicha población, como veremos en los apartados siguientes.

##### **IV.2.2.4.A.- LECTURA DE RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS**

La cuantificación del estudio inmunohistoquímico se realizó utilizando un sistema computerizado de análisis de imagen. Éste consiste en un microscopio óptico, acoplado a un sistema de “Hardware” (ordenador, pantalla, teclado e impresora), diseñado para aceptar sistemas específicos de “Software” (programa de análisis celular), útil para múltiples funciones.

### A) "Hardware":

Incluye el sistema de "hardware" CAS 200® (Fig. 10), que consta de:

- Microscopio óptico modificado (CAS Custom Reichert®) con sensores XY con fiabilidad de  $\pm 12,7 \mu\text{m}$ .
- Computadora AT 80286 con memoria interna de 4 Mbytes, disco duro de 80 Mbytes, con un paquete informático de "software" IBM® de análisis celular.
- Monitor de alta resolución RGB, con reproducción de diferentes tamaños de imágenes digitalizadas.
- Impresora matricial de 9x7 pindot, con capacidad para gráficos.
- Cámara digital multicolor CAS - CCD, que permite analizar imágenes con un rango espectral entre 510 y 620 nm.



Figura 10: Sistema de "hardware" CAS200® para análisis de imagen

### B. "Software":

Se trata de un paquete de "software" CAS® de análisis celular por imagen. En el estudio han sido empleados los programas QER/PR y QPI.

#### **IV.2.2.4.B.- VALORACIÓN DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS**

Para la cuantificación de los receptores estrogénicos se utilizó el programa QER/PR. Se obtiene el porcentaje de superficie nuclear neoplásica con inmuno-reactividad, tras una medición mínima de 10 campos microscópicos (X 400) de tejido neoplásico. Aunque el programa muestra una gráfica en función de la densidad óptica, ésta no se tiene en cuenta al haberse establecido un umbral de densidad, a partir del tejido mamario normal utilizado como control. Se consideran valores positivos aquéllos que representan una positividad superior al 5% de la superficie nuclear media, cifra de corte obtenida a partir de la correlación de la determinación inmunohistoquímica con la del citosol por Radioinmunoensayo (mayor a 10 fm). Nos proporciona dos valores, positivo y negativo.

#### **IV.2.2.4.C.- VALORACIÓN DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN (Ac MIB-1)**

Para la cuantificación de la fracción de crecimiento de la neoplasia se utilizó el programa QPI. El analizador de imagen valora la actividad proliferativa en el programa “Índice de Proliferación”, registrando en las células parenquimatosas neoplásicas, el área nuclear positiva en relación con el área nuclear total, expresada en tanto por ciento. No se tiene en cuenta la densidad óptica, al haberse marcado umbrales a partir de los cortes control. El número mínimo de células examinadas es de 300 y, en su defecto, se miden al menos 10 campos distintos, con corte y borramiento automático de las zonas no útiles.

Los valores que se obtiene son:

- ① IP Bajo: Menos del 15% de células positivas



- ② IP Medio: Entre 15-25% de células positivas
- ③ IP Alto: Mas del 25% de células positivas.

Para valoración estadística, también se utilizan los valores IP Bajo: Menos de 15% de células positivas e IP Medio/Alto: A partir del 15% de células positivas.

#### **IV.2.2.4.D.- VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA p53**

La expresión de la oncoproteína p53 se valoró con el programa QPI, sin atender a la cuantía de la intensidad óptica. Se valoran, al menos, los núcleos de 1.000 células parenquimatosas neoplásicas. Cuando hay positividad en mas del 20% de las células, se consideró un resultado positivo y el resto, negativo. Los casos positivos siempre presentaban un carácter difuso, generalmente extenso. Los negativos mostraban células teñidas positivamente, de modo aislado. Así, la cuantificación podía ser simplificada, según el carácter difuso o aislado de la positividad.

#### **IV.2.2.4.E.- VALORACIÓN DEL ONCOGÉN HER-2-NEU/C-erbB-2**

Se realiza contando 500 células (o núcleos), o bien 10 o más campos microscópicos de gran aumento (c.m.g.a.). Se clasifican en: negativo, si la expresión es inferior al 5%, y positivo, si la expresión es mayor al 5%. Únicamente se considera como expresión del oncogén, la localización del mismo en la membrana citoplasmática.

#### **IV.2.2.4.F.- VALORACIÓN DE LAS CICLINAS**

Para la cuantificación de las ciclinas se utilizó el programa QPI. El analizador de imagen valora el área nuclear positiva en relación con el área nuclear total, expresada en tanto por ciento. No se tiene en cuenta la densidad óptica, al haberse marcado umbrales a partir de los cortes control. El número mínimo de células neoplásicas examinadas es de 300 y, en su defecto, se miden al menos 10 campos distintos, con corte y borramiento automático de las zonas no útiles.

Se consideran valores negativos cuando menos del 5% de los núcleos presentan tinción, y positivo cuando más del 5% de los núcleos se tiñen.

#### **IV.2.3.- ESTUDIO MOLECULAR**

Para la identificación de la muerte celular programada o APOPTOSIS se utilizó un método enzimático de hibridación in situ del ADN nuclear fragmentado, que se realiza sobre secciones de tejido procesado de forma rutinaria, denominado TUNEL ("TdT-mediated X-dUTP nick end labeling"), que nos permite relacionar la apoptosis con la localización histológica y la diferenciación celular. Dicho método, descrito por Gavrieli en 1992, se basa en la adición mediante una transferasa terminal (TdT), de un nucleótido desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcado en posición 3' terminal.

##### **IV.2.3.1.- MÉTODO DE HIBRIDACIÓN IN SITU**

Se realizó utilizando el "KIT" para hibridación in situ, reacción TUNEL, marcado con

peroxidasa (“In situ cell death detection-POD”, suministrado por Boehringer Mannheim®), sobre secciones de tejido parafinado.

Se cortaron secciones de 4  $\mu\text{m}$ . de tejido fijado en formol e incluido en parafina que se montaron sobre portas pretratados con poly-L Lisina y, posteriormente, se desparafinaron en estufa e hidrataron mediante pasos por xilol, alcoholes y agua destilada.

Debido a que el estudio se realizó en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina, la separación de las proteínas se realizó mediante la incubación de las mismas en una solución de proteinasa K (20 $\mu\text{g}$ ./ml. en Tris/HCL, pH 7,4-8,0), durante 30 min. a 37°C.

Después de lavar las secciones en tampón fosfato-salino (PBS), se incubaban en una solución fresca de metanol en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (metanol al 0,3% en  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 30 min., a temperatura ambiente, con el fin de bloquear la peroxidasa endógena. Se lavaban otra vez en PBS y se incubaban en la solución de permeabilización (0,1% de Tritón X-100 en 0,1% de citrato sódico). Se lavaban las secciones dos veces en PBS, y se procedía al marcado añadiendo 5  $\mu\text{l}$ . de la mezcla reacción TUNEL sobre cada porta, se cubrían con un cubreobjetos, y se incubaban en cámara húmeda durante 60 min. a 37° C.

Después de lavar las secciones en PBS (tres pasos), se procedía a la transformación de la señal, añadiendo a las secciones 50  $\mu\text{l}$ . de la mezcla Converter-POD y cubriéndolas con cubreobjetos, se incubaban en cámara húmeda 30 min. a 37°C. Después de tres pasos por PBS, se incubaban en una solución sustrato de DAB durante 10 min. a temperatura ambiente, se lavaban en PBS y se contrastaban con hematoxilina de Mayer durante 2-5 min. Se

procedía, posteriormente, al lavado con agua y diferenciación con alcohol, para luego clarificar, deshidratar y montar.

#### **IV.2.3.2.- VALORACIÓN DE LA APOPTOSIS**

La cuantificación de la apoptosis se realizó utilizando el Sistema de Análisis de Imagen CAS-200®, con el programa QPI. Los núcleos teñidos positivamente con la técnica TUNEL, se evalúan en relación con el número total. No se valoran densidades ópticas, al adaptarse el umbral al control. Se evitan los campos con focos de necrosis, ya que a su alrededor se acumulan numerosas células positivas. Como control se utiliza el tejido ductal mamario no patológico.

Los resultados de la evaluación se expresan en forma de un índice de células apoptóicas (ICA), que relaciona las células positivas con las totales, siendo éstas no inferiores a 1.000, expresado en tanto por ciento:

- ① Menos del 1% de células TUNEL positivas
- ② Entre 1 y 3% de células TUNEL positivas
- ③ Más del 3% de células TUNEL positivas

Con fines de evaluación estadística, también se expresan los resultados en dos grupos:

- ① Con menos del 1% de células TUNEL positivas
- ② A partir del 1% de células TUNEL positivas.

#### **IV.2.4.- ANÁLISIS DE LOS FACTORES PRONÓSTICO EN LAS RECIDIVAS**

Hemos realizado un análisis del conjunto de los factores pronóstico estudiados en los casos de la serie que presentaron recidivas, con el fin de evaluar la implicación de éstos, en mayor o menor medida, en la recurrencia de la neoplasia en sus diversas formas.

#### **IV.2.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se ha realizado sobre 50 pacientes, mediante el paquete estadístico SPSS 6.1 para Windows®, constando de los dos apartados que a continuación se detallan:

- ① Estudio estadístico descriptivo de cada variable: Consiste en tabular y ordenar los parámetros estudiados. Todos ellos son “**variables categóricas**” y se presentan en tablas de frecuencias y porcentajes.
  
- ② Análisis bivalente, (considerando las variables dependientes: Patrón arquitectural, Grado nuclear y Necrosis). Se trata de valorar la relación con el resto de las variables presentadas: RH, IP, P53, HER-2-neu, Ciclinas y Apoptosis.

Para estudiar la relación existente entre parejas de variables y valorar si existe asociación utilizamos el estadístico “ $\chi^2$ ” que nos contrasta la frecuencia esperada con la teórica, de forma que:

$$\chi^2 = \frac{\sum (E-T)^2}{T}$$

donde  $E$  = Frecuencia esperada

$T$  = Frecuencia Teórica

Este valor es contrastado con el  $\chi^2$  de un grado de libertad. El contraste es de la forma:

$H_0$  = Independencia de variables

$H_1$  = No independencia de variables

Se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) si la  $p$  es menor de **0,05**. Para este estudio, utilizaremos la " $\chi^2$ " con la corrección de Fisher, ya que se trata de un contraste 2x2 y la muestra es menor de 200 (CARRASCO, 1992).

Para contrastar la significación de las variables, se utiliza el ODDS RATIO (OR). Cuando el OR es igual a 1 (o logaritmo neperiano de OR es igual a 0), no hay asociación clínica entre las variables (ABRAIRA, 1996). Consideraremos significación clínica, cuando las variables sean estadísticamente significativas y el Intervalo de confianza del OR ( $OR \pm 2 * ASE1$ ) no contenga al 1. En una tabla 2x2, el OR equivale a  $A * D / B * C$ . Un valor del OR superior a 1 indica que el factor  $x$  incrementa la respuesta ( $Y=1$ ). Un valor inferior a 1 nos indica que estamos en presencia de un factor  $x$  protector de la aparición de  $Y$ .

**ABRIR CAPÍTULO V**

