

## Identificación de nuevos marcadores citogenéticos con valor pronóstico en cáncer de mama

### *New cytogenetic prognostic markers in breast cancer*

M.I. Zudaire<sup>1</sup>, M.D. Otero<sup>1</sup>, M.C. Caballero<sup>2</sup>, C. Valenti<sup>2</sup>, J.M. Martínez-Peñuela<sup>2</sup>, M.J. Calasanz<sup>1</sup>

#### RESUMEN

**Fundamento.** El objetivo del trabajo ha sido la caracterización de las alteraciones cromosómicas en una serie de 70 carcinomas de mama de tipo ductal invasivo. Para identificar nuevos marcadores citogenéticos con valor pronóstico se estudió la asociación entre las alteraciones cromosómicas, determinados factores anatomopatológicos y la supervivencia e incidencia de recidivas de las pacientes.

**Material y métodos.** Se seleccionaron 70 tumores diagnosticados en el Hospital de Navarra entre 1991-1994. La técnica utilizada fue la Hibridación Genómica Comparada (CGH) aplicada a tejidos incluidos en parafina.

**Resultados.** Se obtuvieron resultados satisfactorios en 57 de 70 muestras (81,4%). Las ganancias cromosómicas detectadas con mayor frecuencia afectaron a 8q, 17q, 1q, 20q, 11q, y 6q y las pérdidas más frecuentes fueron en 16q, X, 13q, 11q y 8p. Como factores pronósticos, las ganancias en 1q y 11q13 se mostraron significativamente asociadas a mayor incidencia de recidivas de las pacientes (41,3% vs 18,5% y 50% vs 23,7%). Las pérdidas en 16q resultaron ser el principal marcador citogenético con valor pronóstico: 100% de los tumores con pérdidas en 16q fueron positivos para la sobreexpresión de Bcl-2 y 75% no presentaron afectación ganglionar. Además, 46,7% de los casos positivos para la expresión de receptores de estrógenos también presentaron esta alteración.

**Conclusiones.** La técnica de CGH es de gran utilidad para el estudio de tumores incluidos en parafina. Los resultados obtenidos confirman la conveniencia de considerar la determinación citogenética de las alteraciones presentes en el tumor como un posible factor pronóstico que contribuya a un mejor conocimiento de la evolución clínica del tumor.

**Palabras clave:** Carcinoma ductal infiltrante de mama. Hibridación genómica comparada. Factores pronósticos.

#### ABSTRACT

**Background.** The aim of this study was to identify chromosomal imbalances in a series of invasive ductal carcinomas. In order to characterize the prognostic value of the chromosomal aberrations, we determined the association between genetic changes, overall survival, recurrences and some well-known prognostic and diagnostic parameters.

**Material and methods.** We included in this study 70 ductal invasive carcinomas diagnosed at the Hospital of Navarra during 1991-1994. We used the Comparative Genomic Hybridization Technique (CGH) for the molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin embedded specimens.

**Results.** We obtained successful results in 57 out of 70 cases (81.4%). The most frequent recurring findings were DNA gains on 8q, 17q, 1q, 20q, 11q and 6q and losses on 16q, Xp, Xq, 13q, 11q and 8p. In the survival study, gains on 1q and 11q13 were more frequent in patients with recurrence (41.3% vs. 18.5% and 50% vs. 23.7%). Loss of 16q appears as a prognostic factor of good outcome because of its association with good pathological prognostic features: 100% of tumors with this aberration showed overexpression of Bcl-2, and 75% of them were node negative. Besides, 46.7% of the positive cases for the expression of estrogen receptors also showed this imbalance.

**Conclusions.** The CGH is a useful technique for the study of paraffin embedded tumors. Our results confirm that the cytogenetic aberrations of tumors could be considered as prognostic factors contributing to a better knowledge of tumor outcome.

**Key words:** Invasive ductal carcinoma. Comparative Genomic Hybridization. Prognostic factors.

ANALES Sis San Navarra 2001; 24 (1): 25-37.

1. Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona.
2. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Navarra. Pamplona.

Este trabajo ha sido subvencionado mediante el proyecto "Contribución entre alteraciones citogenéticas y la participación de genes supresores de tumores en el cáncer de mama: factores diagnósticos y pronósticos", resolución 634/1996 de 17 de junio de 1996 del Gobierno de Navarra; una beca correspondiente al Programa de "Becas para la formación de personal investigador del Gobierno de Navarra" (convocatoria 1995) y una beca de la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

Aceptado para su publicación el 19 de diciembre de 2000.

#### Correspondencia

M<sup>a</sup> Isabel Zudaire Ripa  
Departamento de Genética  
Universidad de Navarra  
Irunlarrea, s/n  
31008 Pamplona  
Tfno. 948 425600. Ext 6214  
Fax: 948 425649  
E-mail: izudaire@unav.es

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres de los países del mundo occidental. En España, representa el 34% de las neoplasias femeninas, con tasas de incidencia que oscilan entre los 33 y 53 casos por cada 100.000 mujeres<sup>1</sup>. En Navarra, el incremento de la incidencia en los últimos quince años ha sido de un 60%, pasando de presentar una tasa de incidencia de 42,2 casos por 100.000 habitantes en el periodo 1980-1984 a 67,7 en el periodo 1990-1994<sup>2</sup>.

A pesar de los factores de riesgo conocidos en cáncer de mama, menos de la mitad de las pacientes no pertenecen a ninguno de los grupos de riesgo<sup>3</sup>. Ante esta situación, resulta imprescindible la identificación de nuevos marcadores que permitan predecir la evolución de la enfermedad. Rasgos morfológicos como el tamaño tumoral, el grado y la afectación ganglionar son considerados de forma unánime como los principales factores pronósticos en cáncer de mama. Muchos marcadores biológicos como la expresión de los receptores hormonales, Bcl-2, ErbB-2, la acumulación de p53 y otros rasgos como la proliferación celular, fase del ciclo celular, angiogénesis, invasión vascular, contenido en ADN, etc. han sido descritos como posibles factores pronósticos y predictivos<sup>4</sup>. Sin embargo, pocos han sido aceptados en la rutina diagnóstica de los servicios de anatomía patológica, debido a las importantes discrepancias encontradas entre las distintas series publicadas<sup>5</sup>.

La combinación de marcadores pronósticos convencionales y nuevos marcadores genéticos podría ayudar a la identificación de subgrupos de pacientes con un comportamiento clínico diferente al esperado según los rasgos morfológicos tradicionales.

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de citogenética molecular, como la Hibridación Genómica Comparada (CGH)<sup>6,7</sup> que están resultando de gran utilidad para el estudio de los tumores sólidos<sup>8</sup>. La CGH es una técnica de cribaje mediante la que se detectan pérdidas y ganancias en todo el genoma en un único experimento de hibridación. Utiliza como

material de estudio el DNA extraído del tumor, lo que permite el análisis de tumores sin necesidad del cultivo fresco de las muestras, con la gran ventaja de poder utilizar el material fijado en formol e incluido en parafina. Esto posibilita la realización de estudios retrospectivos en pacientes cuya evolución clínica se conoce. La descripción de regiones cromosómicas frecuentemente afectadas ha orientado estudios moleculares para la descripción de genes implicados en el desarrollo y progresión de tumores.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron seleccionados 70 tumores de mama, todos ellos de tipo ductal invasivo, correspondientes a pacientes diagnosticadas en el Hospital de Navarra en el periodo comprendido entre los años 1991 y 1994. A partir de las historias de las pacientes se seleccionaron los rasgos anatomopatológicos de reconocido valor pronóstico como son el tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado histológico, expresión de receptores de estrógenos y progesterona,  $\beta$ cl-2, ErbB-2, acumulación de p53, contenido en ADN y proliferación celular (Ki67). Además se calculó el índice pronóstico de Nottingham (NPI) para cada uno de los tumores (Tabla 1). Se recogieron también los datos clínicos correspondientes a la presencia de metástasis (local, ganglionar o a distancia) y la supervivencia de las pacientes.

## Análisis de las muestras mediante CGH

La técnica utilizada para el análisis citogenético fue la CGH. Se llevó a cabo según el protocolo tradicional, con pequeñas modificaciones técnicas condicionadas por el estudio de tejido incluido en parafina<sup>9</sup>. La CGH se basa en el marcaje del ADN en estudio mediante un fluorocromo de emisión verde y de un ADN normal de referencia con un fluorocromo de emisión roja. Mezclados en cantidades equimoleculares, los dos ADN se utilizan como sondas en la hibridación sobre una metafase normal; cuando existe ganancia de material en la muestra test, en un cromosoma (o en parte de él) se detectará en esa zona una mayor intensidad verde; será roja en el

**Tabla 1.** Resumen de los factores anatomopatológicos analizados en la serie de 57 tumores.

	n	Porcentaje
<b>Tamaño</b>		
<2 cm	10	17,5
≥2 cm	47	82,5
<b>Grado histológico</b>		
I	3	7
II	34	59,6
III	20	35,1
<b>Afectación ganglionar</b>		
grupo I	26	45,6
grupo II	16	28,1
grupo III	13	22,8
perdidos *	2	3,5
<b>Receptores de estrógenos</b>		
negativo	42	73,6
positivo	15	26,4
<b>Receptores de progesterona</b>		
negativo	37	65
positivo	20	35
<b>p53</b>		
negativo	31	54,4
positivo	26	45,6
<b>ErbB-2</b>		
negativo	31	54,4
positivo	26	45,6
<b>Bcl-2</b>		
negativo	16	28
positivo	41	72
<b>Ki-67</b>		
negativo	0	0
positivo	57	100
<b>Ploidía</b>		
diploides	15	26,3
aneuploides	41	71,9
perdidos**	1	1,8
<b>Índice pronóstico de Nottingham</b>		
buen pronóstico	10	17,5
pronóstico moderado	24	42,1
mal pronóstico	21	36,8
perdidos*	2	3,5

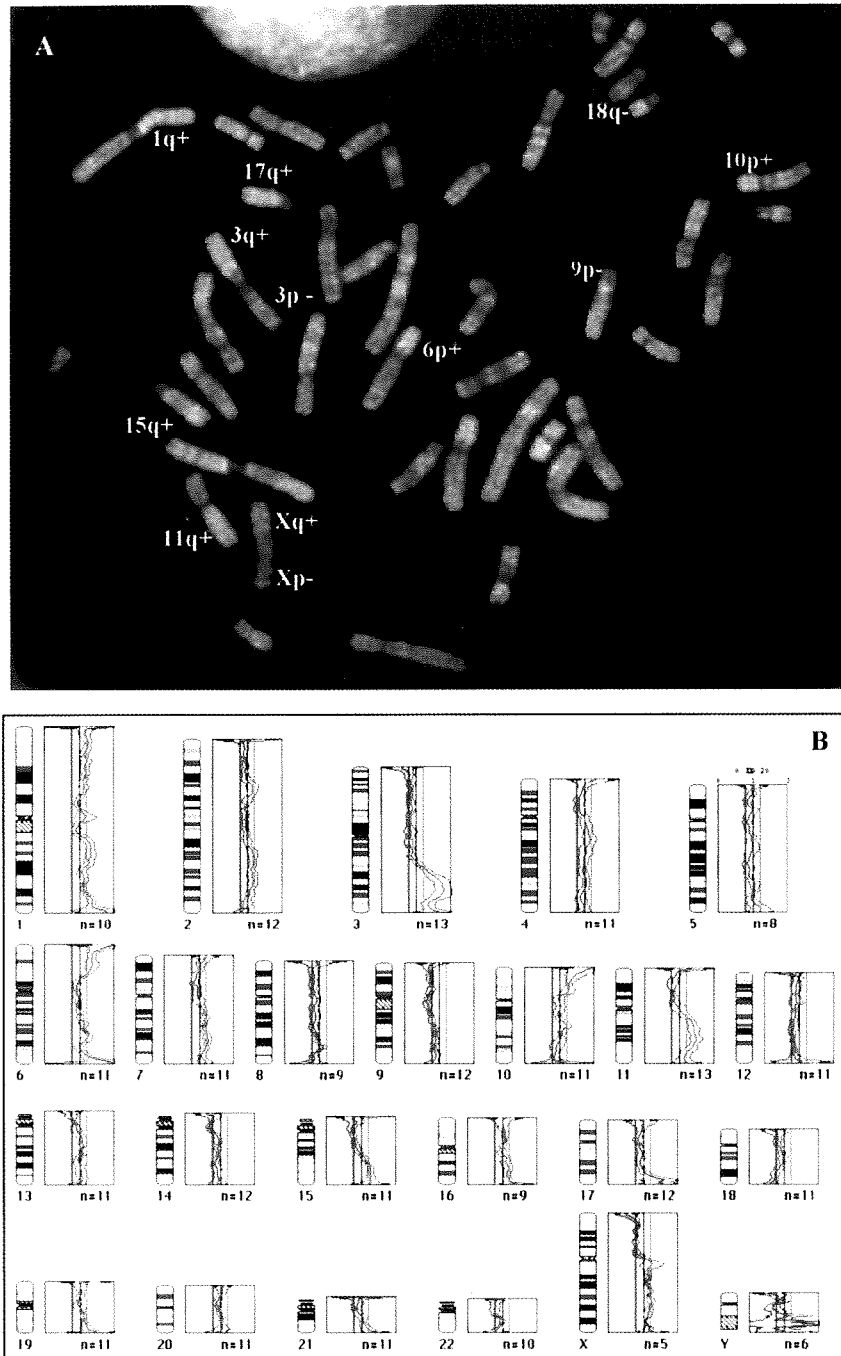
\*Los dos casos perdidos pertenecen a pacientes que no fueron sometidas a linfadenectomía.

\*\*No se dispuso de material suficiente de este tumor para el análisis del contenido en ADN.

caso de la detección de pérdidas. La cuantificación de esa diferencia de intensidades se realiza mediante un equipo informático que calcula el cociente de intensidades verde/rojo a lo largo de cada cromosoma de la metafase (Fig. 1).

La sensibilidad de la CGH a la hora de detectar ganancias y pérdidas viene condicionada principalmente por la contamina-

ción por células normales; en general se calcula que es necesario una presencia de un 30% de células tumorales para que una alteración pueda ser detectada<sup>10</sup>. Por ello, en cada muestra se seleccionó la región más representativa y con mayor componente tumoral. Además, la sensibilidad va a depender del nivel y del tamaño de la región alterada. Un aumento de material



**Figura 1.** Análisis mediante CGH del caso 6445-93. A) Imagen real de una de las metafases estudiadas. B) Análisis del cociente de intensidades. En esta muestra se detectaron ganancias en 1q, 3q22-qter, 6p, 10p, 11q, 15q24-qter, 17q24-qter, Xq y pérdidas en 3 p, 18q21-qter y Xp.

en 50% se detecta si la región es de un tamaño de 2Mb o mayor, y una región que está amplificada y tiene un tamaño de 250Kb necesita estar presente en un porcentaje de 400%<sup>11</sup>. De igual forma, cuando una deleción está presente en 100% del ADN se puede alcanzar una resolución de entre 1 a 2 Mb<sup>12</sup>. Sin embargo, el límite real de resolución se encuentra entre 10 y 20Mb<sup>13</sup>.

### Análisis estadístico

Para la comparación entre el número medio de alteraciones, ganancias y pérdidas detectadas y los factores anatomopatológicos se utilizó el test de t de Student para las variables distribuidas normalmente y el test U de Mann-Whitney para las variables que no seguían una distribución normal. El análisis de más de dos muestras se llevó a cabo mediante el test de ANOVA de un factor si la variable seguía una distribución normal (previo estudio de la homoscedasticidad de las muestras con el test de Levene), y el test de Kruskal-Wallis para variables no distribuidas normalmente.

La asociación entre la presencia o ausencia de una determinada alteración y los factores anatomopatológicos se estudió mediante el test de contingencia (chi-cuadrado) y prueba exacta de Fisher.

El análisis de supervivencia se realizó utilizando el método de Kaplan-Meier para variables cualitativas y la regresión de Cox univariante para variables cuantitativas.

## RESULTADOS

### Descripción de las alteraciones citogenéticas obtenidas mediante CGH

Se obtuvieron resultados satisfactorios en 57 de las 70 muestras analizadas (81,4%). Dos de las muestras presentaron cariotipos normales y en el resto se describieron alteraciones que afectaban a todos los cromosomas, exceptuando el cromosoma 21 y el Y.

Se describieron un número medio de 5,81 alteraciones por tumor (DE=0,45; rango 0-15). El número medio de ganancias

fue de 3,66 (DE=0,28; rango 0-9) que resultó ser significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) que el número de pérdidas detectadas (2,18; DE=0,27; rango 0-8).

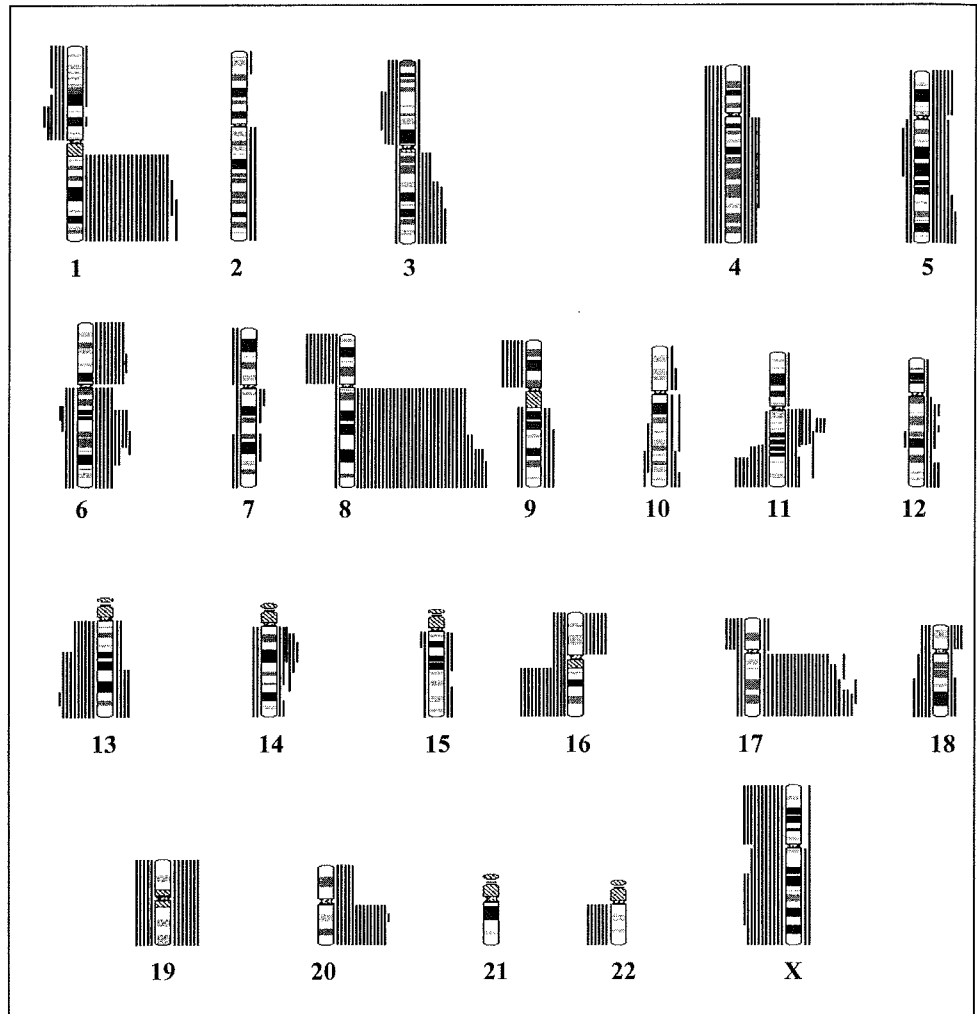
Las alteraciones citogenéticas descritas en esta serie se representan en la figura 2. Considerando conjuntamente todas las alteraciones descritas en un mismo brazo, las ganancias detectadas con mayor frecuencia afectaron a 8q (63,1%), 17q (45,6%), 1q (38,6%), 20q (26,3%), 11q (21%) y 6q (17,5%) y las pérdidas más frecuentes fueron en 16q (21%), Xp y Xq (19,3%), 13q (17,5%), 11q (15,7%) y 8p (15,7%). En la mayor parte de los cromosomas se detectaron tanto ganancias como pérdidas excepto en 1q, 2, 6p, 10p, 11p, 12p y 20 donde no se detectaron pérdidas de material. Tampoco se detectaron ganancias en 7p, 9p, 16q y 22.

La mayor parte de las alteraciones descritas afectaron a un cromosoma o al brazo completo de un cromosoma, pero también se definieron alteraciones en regiones de menor tamaño. Las más frecuentes fueron las pérdidas detectadas en 11q (afectando a la región 11q21-qter), las ganancias detectadas en 11q (en 11q13), ganancias en 8q (principalmente en la región terminal 8q23-qter), 6q (en distintas regiones comprendidas entre las bandas 6q16 y q24, siendo 6q22-q23 la menor región afectada), 17q (principalmente 17q21-qter, 17q22-qter y 17q23-qter) y ganancias en 14q (con 14q13-q21 como la menor región involucrada en la ganancia de material). En ocasiones, las ganancias o pérdidas afectaron a una sola banda como es el caso de la ganancia en 1p21, 7q11, 11q13 y 12q15.

### Marcadores citogenéticos y análisis de supervivencia

#### Número de alteraciones y análisis de supervivencia

Se estudió la asociación existente entre el número de alteraciones descritas en los tumores y la supervivencia global (SG) e incidencia de recidivas (IR) de los pacientes. No se detectaron asociaciones significativas para el número de alteraciones, las ganancias o las pérdidas analizadas de forma independiente.



**Figura 2.** Representación de las ganancias y pérdidas descritas en la serie de 57 tumores de mama. Las líneas de la derecha señalan la región involucrada en la ganancia; las líneas de la izquierda la región involucrada en la pérdida.

**Tipo de alteraciones y análisis de supervivencia**

Estudiamos la asociación existente entre la presencia y ausencia de un determinado marcador citogenético y la SG e IR de las pacientes. Sólo se observó una ligera tendencia a mostrar una recidiva más temprana a las pacientes con ganancias en 1q ( $p=0,063$ ) y 11q13 ( $p=0,066$ ) (Tabla 2). Sin alcanzar un valor estadísticamente sig-

nificativo, se observó que las pacientes cuyos tumores presentaron ganancias en 3q y 12q y pérdidas de 11q, 16q o Xq presentaron una supervivencia global mayor y una incidencia de recidivas menor que en el caso de ausencia de estas alteraciones. Por ejemplo, las pacientes en cuyos tumores se describieron ganancias en 12q presentaron una supervivencia a los 5 años de 100% frente a un 73,5% en los casos de ausencia de esta alteración. Para

**Tabla 2.** Resultado del análisis de supervivencia de las pacientes en función de la presencia (sí) o ausencia (no) de algunos marcadores citogenéticos. En cada casilla se indica la supervivencia acumulada o la incidencia de recidivas, la desviación estándar, el número de eventos acumulados y el número de pacientes a riesgo.

		Incidencia de recidivas	
		2 años	5 años
<b>Ganancias 1q</b>		(p=0,063)	
sí	n = 21	28,4% (9,8%); 6; 15	41,3% (10,5%); 9; 12
no	n = 27	7,5% (5,0%); 2; 25	18,5% (7,5%); 5; 22
<b>Ganancias 11q13</b>		(p=0,066)	
sí	n = 10	30% (14,5%); 3; 7	50% (15,8%); 5; 5
no	n = 38	10,5% (4,9%); 4; 34	23,7% (6,9%); 9; 29
<b>Ganancias 20q</b>		(p=0,039)	
sí	n = 8	12,5% (11,7%); 1; 7	25% (15,3%); 2; 6
no	n = 15	0%	0%
<b>Ganancias 17q</b>		(p=0,039)	
sí	n = 8	12,5% (11,7%); 1; 7	25% (15,3%); 2; 6
no	n = 15	0%	0%
		<b>Supervivencia</b>	
		2 años	5 años
<b>Ganancias 17q</b>		(p=0,060)	
sí	n = 10	90% (9,5%); 1; 9	80% (12,7%); 2; 8
no	n = 15	100%	100%

el resto de los marcadores, la presencia de las alteraciones se mostró más frecuente en pacientes de peor supervivencia.

Dado el valor pronóstico de la presencia de metástasis en los ganglios axilares estudiamos las posibles asociaciones existentes entre los marcadores citogenéticos descritos y la SG e IR en las pacientes del grupo sin infiltración ganglionar. Las ganancias detectadas en 17q mostraron una tendencia a una menor supervivencia (p=0,066). Además, tanto las ganancias en 17q como en 20q se asociaron significativamente a una mayor incidencia de recidivas (p=0,039 en ambos casos) (Tabla 2, Fig. 3).

#### **Asociación entre las alteraciones citogenéticas y factores anatomopatológicos**

##### **Asociación entre el número de alteraciones citogenéticas descritas y los distintos factores anatomopatológicos**

Hemos detectado una tendencia a la asociación entre el número de ganancias y el tamaño tumoral (p=0,058), el número de pérdidas y la expresión de los receptores de

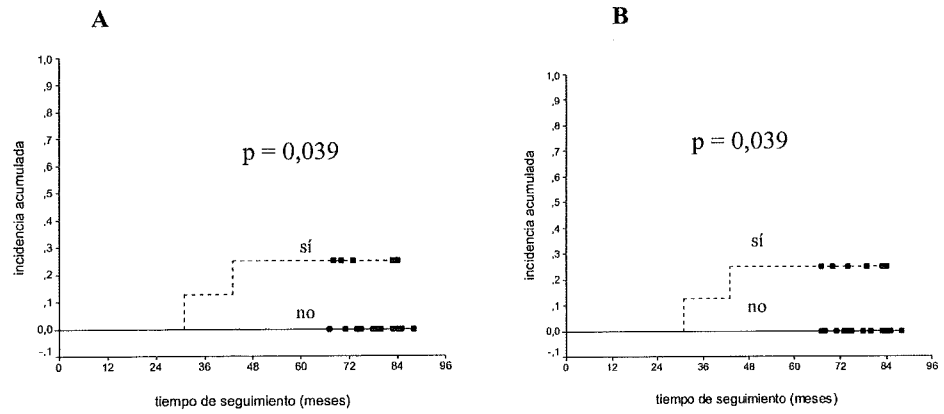
progesterona (p=0,083) y el número, tanto de pérdidas como de ganancias, y la acumulación de proteína p53 (p=0,070 y p=0,059). No se detectaron asociaciones significativas para el resto de los marcadores.

##### **Asociación entre los distintos tipos de alteraciones citogenéticas y los factores anatomopatológicos**

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue la caracterización de alteraciones citogenéticas que puedan contribuir a mejorar el diagnóstico y el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama. Así, pudimos detectar una asociación significativa entre la ganancia de material en el brazo largo del cromosoma 1 y el tamaño tumoral (p=0,041) de forma que el 95% de los tumores en los que se detectó la ganancia 1q (21/22 casos) son tumores de más de 2 cm.

Con respecto a la afectación ganglionar, las pérdidas en 16q y 11q fueron significativamente más frecuentes en los tumores sin afectación ganglionar (p=0,025 y p=0,040, respectivamente).

El resto de las asociaciones significativas se presentan en la tabla 3.



**Figura 3.** Supervivencia global e incidencia de recidas en las pacientes sin infiltración ganglionar en función de la presencia de ganancias en 17q (A) y 20q (B).

**Tabla 3.** Resumen de las asociaciones significativas existentes entre algunas alteraciones citogenéticas descritas y determinados rasgos anatomopatológicos.

Rasgos asociados a buen pronóstico	Alteraciones cromosómicas	p
Tumores sin afectación ganglionar	Pérdidas en 16q y pérdidas en 11q	p=0,002 p=0,040
Tumores de bajo grado	Ganancias en 14q	p=0,003
Receptores de estrógenos positivos	Pérdidas en 16q	p<0,001
Receptores de progesterona positivos	Ganancia en 16p, 19 y pérdidas en Xq	p=0,029 p=0,021
Bcl-2 positivo	Pérdida de 16q	p=0,001
p53 negativo	Pérdidas en 11q y 13q	p=0,020 p=0,012
Tumores diploides	Ganancias en 3q	p=0,029
Baja expresión de Ki67	Ganancias en 16p, 19 y 20q	p=0,014 p=0,044 p=0,039
Rasgos asociados a buen pronóstico	Alteraciones cromosómicas	p
Tumores grandes	Ganancias en 1q	p=0,041
Tumores con recidiva temprana	Ganancias en 1q y en 11q13	p=0,063 p=0,066
p53 positivo	Ganancias en 6q	p=0,016
Grupo de mal pronóstico según NPI	Ganancias en 8q	p=0,022
Tumores aneuploides	Pérdidas en 13q	p=0,027



## DISCUSIÓN

La mayor parte de los trabajos publicados de CGH en tumores sólidos se han realizado a partir de tejido congelado<sup>14</sup>. Sin embargo, dado que la fijación e inclusión en parafina ha sido hasta la fecha el principal método de conservación de las muestras en los servicios de anatomía patológica, los estudios retrospectivos se ven condicionados a la utilización de este tipo de material. La fijación e inclusión en parafina de las muestras provoca la fragmentación del ADN y establece fuertes uniones ADN-proteínas<sup>15</sup> que dificultan las reacciones de marcaje en los ensayos de CGH<sup>14</sup>. En estas condiciones la sensibilidad en la detección de alteraciones cromosómicas es menor que en el caso de tejidos congelados.

Mientras que el porcentaje de éxito en los análisis de tejidos frescos y congelados mediante CGH oscila entre 70 y 90%<sup>16</sup>, en el caso de los tejidos parafinados, el porcentaje esperado es menor. Sin embargo, pequeñas modificaciones técnicas en el proceso de extracción y marcaje del ADN obtenido de parafina, permiten obtener resultados satisfactorios con este tipo de material. En nuestro trabajo conseguimos analizar el 81,4% de los casos.

La sensibilidad alcanzada en la detección de alteraciones en nuestra serie ha sido muy similar a la publicada en otras series de carcinomas ductales infiltrantes (Tabla 4). Sin embargo, cabe destacar la detección de dos alteraciones en una frecuencia diferente a la publicada en el resto de las series: las ganancias en 6q y 14q. Las ganancias en 6q son detectadas habitualmente con menor frecuencia que las pérdidas en el mismo brazo. Sin embargo, en nuestra serie detectamos un mayor número de ganancias afectando principalmente a la región 6q16-q24 (con 6q22-q23 como la mínima región involucrada). Solamente Hermsen y col<sup>17</sup> y Kuukasjarvi y col<sup>18</sup> han detectado ganancias afectando a las mismas bandas, siendo más frecuentes en tumores aneuploides y de mal pronóstico. En 6q22-q23 se localiza el gen *c-MYBx*, un factor de transcripción que ya ha sido descrito amplificado en otras series<sup>19,21</sup>. Las ganancias afectando a 14q11-q24 apenas

han sido descritas en cáncer de mama. En un trabajo reciente en líneas celulares de mama, utilizando la técnica de los microarrays de ADN, se ha señalado el gen *BRF1* como posible gen involucrado<sup>22</sup>.

Existen varios trabajos publicados en los que se estudian las asociaciones existentes entre las alteraciones citogenéticas descritas mediante la técnica de CGH y los rasgos clínicos y anatomopatológicos en cáncer de mama<sup>23-27</sup>, pero son pocos los que incluyen un rango tan amplio de posibles marcadores como el nuestro<sup>17, 28, 29</sup>.

De entre todas las asociaciones descritas entre los marcadores citogenéticos y factores pronósticos, la asociación entre las pérdidas en 16q y el pronóstico de las pacientes ha resultado ser la más importante de la serie. Aunque las pérdidas en 16q no se mostraron significativamente asociadas a la supervivencia y la incidencia de recidivas, las pacientes cuyos tumores presentaron pérdidas en 16q mostraron una supervivencia mayor (83,3% vs 71,4%) y una incidencia menor de recidivas (19,0% vs 33%) que las pacientes que no poseían esa alteración ( $p=0,413$  y  $p=0,313$ , respectivamente). Con respecto a los factores anatomopatológicos estudiados, las pérdidas en el brazo largo de este cromosoma se mostraron significativamente asociadas a tumores sin afectación ganglionar (75% de los tumores con pérdidas en 16q no presentaron afectación ganglionar;  $p=0,025$ ), receptores estrogénicos positivos (el 46,7% de los receptores estrogénicos positivos mostraron pérdidas en 16q;  $p<0,001$ ), y sobreexpresión de Bcl-2 (todos los tumores con pérdidas en 16q eran positivos para la sobreexpresión de Bcl-2;  $p=0,014$ ). Estos tres rasgos han sido considerados indicadores de buen pronóstico en numerosas publicaciones<sup>30-33</sup>.

Las ganancias en 1q se manifestaron en nuestra serie asociadas a mal pronóstico. Por una parte, las pacientes cuyos tumores presentaban dicha alteración mostraron una mayor incidencia de recidivas que en ausencia de la misma ( $p=0,062$ ). Además, la presencia de este marcador se asoció significativamente con tumores de más de 2 cm ( $p=0,041$ ). Es bien sabido que el tamaño tumoral está en relación directa

**Tabla 4.** Comparación de las alteraciones cromosómicas descritas en varias series de tumores de mama. De entre todos los artículos hemos seleccionado únicamente las series que incluyen principalmente tumores ductales invasivos. Cuando ha sido posible, en las publicaciones que incluyen varios tipos histológicos, se han seleccionado solo los casos con carcinomas ductales invasivos.\*En esta columna se especifica el criterio de preselección utilizado por el autor. n: número de casos estudiado. (◊) la frecuencia de la alteración es menor de 15% o no ha sido indicada por el autor<sup>17, 18, 23, 24, 26-28, 37-40</sup>.

	n	Descripción de los tumores*	Ganancias%						Pérdidas%				
			1q	6q	8q	11q	17q	20q	8p	11q	13q	16q	Xq
Kalliomiemi, 1994	33	-	36	9	27	12	18	18	-	-	-	-	-
Ried, 1995	20	-	70	0	50	15	30	10	5	0	0	5	-
Isola, 1995	48	sin infiltración ganglionar	50	0	48	13	-	15	31	13	15	27	-
Tirkkonen, 1997	21	con mutaciones en BRCA1	55	6	73	-	-	-	-	-	55	-	40
	15	con mutaciones en BRCA2	-	-	-	-	87	60	53	53	73	-	47
Kuukasjarvi, 1997	29	-	66	21	59	-	41	-	52	45	21	24	14
Tirkkonen, 1998	55	-	67	-	49	18	18	18	29	18	25	38	-
Schwedel, 1998	39	-	49	5	49	38	28	33	20	49	82	25	7
Hermesen, 1998	53	sin infiltración ganglionar	28	15	41	19	13	-	19	19	-	13	-
Roylance, 1999	90	-	63	8	51	12	30	26	30	29	30	38	27
Buerguer, 1999	39	-	79	-	72	20	10	33	49	23	33	26	-
Loveday, 2000	44	-	50	45	59	-	-	-	36	-	-	16	-
En este trabajo	57	-	39	18	63	21	46	26	16	16	18	21	19

con la agresividad del tumor. Tumores sin infiltración ganglionar y con un tamaño menor de 2 cm pueden alcanzar una supervivencia de más de 82% a los 10 años y ésta podría disminuir hasta la mitad para tumores de más de 5 cm<sup>3</sup>. En nuestra serie, el tamaño tumoral mostró una tendencia a la significación tanto con la supervivencia global como la incidencia de recidivas ( $p=0,052$  y  $p=0,051$ ), mostrando una supervivencia de 100% para las pacientes con tumores menores de dos centímetros y sólo de 70,4% para las pacientes con tumores mayores.

Uno de los marcadores citogenéticos se mostró significativamente asociado al NPI: las ganancias en 8q ( $p=0,02$ ). Las ganancias en el brazo largo de este cromosoma resultaron ser indicativas de mal pronóstico ya que, mientras que sólo el 30% de las pacientes del grupo de buen pronóstico presentó esa alteración, la frecuencia aumentó hasta el 58,3% en las pacientes con pronóstico moderado y el 81% en las pacientes de mal pronóstico. En los trabajos publicados de CGH en mama las ganancias en 8q siempre se han asociado a fenotipos agresivos y de mal pronóstico. Se ha relacionado con tumores con mayor contenido en ADN y una alta fracción S<sup>28</sup>, con el grupo de mal pronóstico<sup>17</sup> y

asociadas a una mayor incidencia de recidivas en pacientes sin infiltración ganglionar<sup>23</sup>. Además se ha detectado con mayor frecuencia en tumores de grado III (68%) que en tumores de grado I (30%)<sup>27</sup> y también con mayor frecuencia en tumores aneuploides (70%) que diploides (30%)<sup>24</sup>. Su asociación a tumores más agresivos se confirma también por su presencia tanto en la lesión *in situ*, como invasiva y la metástasis del mismo tumor<sup>25,34</sup>, y por su frecuencia mayor en tumores ductales frente a los lobulillares<sup>35</sup>.

En nuestra serie, aunque sin llegar a alcanzar valores estadísticamente significativos, la ganancia de 8q mostró el mismo patrón definido en la bibliografía al estar presente en 66% de los tumores aneuploides, frente a 33% de los diploides ( $p=0,298$ ) y en 36% de los tumores sin infiltración ganglionar frente a una frecuencia de 64% en los tumores con ganglios afectados ( $p=0,074$ ).

De especial interés son las asociaciones encontradas entre las ganancias en 17q y 20q y la incidencia de recidivas en las pacientes sin infiltración ganglionar ( $p=0,039$ ) (Tabla 2, Fig. 3). Dos de las pacientes en cuyos tumores se describieron ganancias en 17q recidivaron, mientras

que no lo hizo ninguna de las pacientes en cuyos tumores no se detectó ganancias en 17q. De igual forma, en su estudio sobre carcinomas ductales *in situ*, Buerger y col<sup>26</sup> describieron la ganancia en 17q12 asociada a carcinomas de grado moderado y poco diferenciados que pudieran desarrollarse directamente del tejido en proliferación sin pasar por estadios menos agresivos.

El hecho de que, aun observando diferencias importantes en la supervivencia de las pacientes, en función de la presencia o ausencia de una determinada alteración, ésta no se haya manifestado como significativa, puede ser debido principalmente a la elevada supervivencia de las pacientes de esta serie (75% a los 5 años). Esta elevada supervivencia se debe a que un porcentaje importante de las pacientes de este estudio fueron diagnosticadas de cáncer de mama dentro del programa de Detección Precoz del Gobierno de Navarra. Tal y como ha descrito Cabello<sup>36</sup>, el diagnóstico precoz de una enfermedad puede producir un sesgo en la supervivencia por adelantamiento en el diagnóstico. La ausencia de significación se debe a una ausencia de eventos causada por un periodo insuficiente de seguimiento de las pacientes. Ante esta situación, se prevé completar el estudio de esta serie en los próximos años, de forma que el aumento del tiempo de seguimiento compense el sesgo introducido por el diagnóstico precoz.

En resumen, la técnica de CGH nos ha permitido describir las alteraciones citogenéticas características de los carcinomas ductales invasivos de mama. A pesar de la dificultad del análisis del tejido incluido en parafina, hemos podido confirmar las alteraciones ya descritas en otras series similares y mostrar además dos nuevas regiones afectadas en cáncer de mama en 6q22-q23 y 14q11-q24. La asociación de los marcadores citogenéticos y los rasgos clínicos de las pacientes ha puesto de manifiesto que la caracterización de determinadas alteraciones como las pérdidas en 16q o las ganancias en 17q podrían ser utilizadas, junto con los rasgos anatómopatológicos clásicos, como marcadores de la evolución clínica de las pacientes. Sin

embargo, serán necesarios estudios en series mayores que confirmen los resultados obtenidos.

#### Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de los servicios miembros de la Unidad de mama del Hospital de Navarra su aportación en este trabajo, así como la colaboración de los miembros del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra y de la Universidad de Tampere en Finlandia.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. BORREGO M, ROSILLO F, PASTOR P. Cáncer de mama. Clasificación. Etiopatogenia. Manifestaciones clínicas. Actitudes terapéuticas. *Medicine* 1999; 7: 5312-5316.
2. Registro de Cáncer de Navarra. Incidencia del cáncer en Navarra. *Anales Sis San Navarra* 1999; 22: 383-392.
3. GUILLEM V, MUÑOZ M. Diagnóstico Precoz. *El médico* 1997; 653: 51-56.
4. MIDULLA C, DE IORIO P, NAGAR C, PISANI T, CENCI M, VALLI C et al. Immunohistochemical expression of p53, nm23-H1, Ki67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 4033-4037.
5. HALL PA, GOING JJ. Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies. *Histopathology* 1999; 35: 489-494.
6. KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
7. KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN FM, GRAY JW et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10: 231-243.
8. JAMES LA. Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol* 1999; 187: 385-395.
9. ISOLA J, DeVRIES S, CHU L, GHAZVINI S, WALDMAN F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994; 145: 1301-1308.
10. CIGUDOSA JC, RAO PH, CALASANZ MJ, ODERO MD, MICHAELI J, JHANWAR SC et al. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative

- genomic hybridization [see comments]. *Blood* 1998; 91: 3007-3010.
11. MOORE E, MAGEE H, COYNE J, GOREY T, DERVAN PA. Widespread chromosomal abnormalities in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. Comparative genomic hybridization study of pure high-grade DCIS. *J Pathol* 1999; 187: 403-409.
  12. PIPER J, RUTOVITZ D, SUDAR D, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, WALDMAN FM et al. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19: 10-26.
  13. BENTZ M, PLESCH A, STILGENBAUER S, DOHNER H, LICHTER P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 172-175.
  14. WEISS MM, HERMSEN MA, MELJER GA, VAN GRIEKEN NC, BAAK JP, KUIPERS EJ et al. Demystified...Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 1999; 52: 243-251.
  15. WERNER M, CHOTT A, FABIANO A, BATTIFORA H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1016-1019.
  16. PERSSON K, PANDIS N, MERTENS F, BORG A, BALDETORP B, KILLANDER D et al. Chromosomal aberrations in breast cancer: a comparison between cytogenetics and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 115-122.
  17. HERMSEN MA, BAAK JP, MELJER GA, WEISS JM, WALBOOMERS JW, SNIJDERS PJ et al. Genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors. *J Pathol* 1998; 186: 356-362.
  18. KUUKASJARVI T, KARHU R, TANNER M, KAHKONEN M, SCHAFFER A, NUPPONEN N et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1597-1604.
  19. GUERIN M, SHENG ZM, ANDRIEU N, RIOU G. Strong association between c-myc and oestrogen-receptor expression in human breast cancer. *Oncogene* 1990; 5: 131-135.
  20. GUDAS JM, KLEIN RC, OKA M, COWAN KH. Posttranscriptional regulation of the c-myc proto-oncogene in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 235-243.
  21. KAURANIEMI P, HEDENFALK I, PERSSON K, DUGGAN D, TANNER M, JOHANSSON O et al. MYB Oncogene Amplification in Hereditary BRCA1 Breast Cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 5323-5328.
  22. FOROZAN F, MAHLAMAKI EH, MONNI O, CHEN Y, VELDMAN R, JIANG Y et al. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 2000; 60: 4519-4525.
  23. ISOLA JJ, KALLIONIEMI OP, CHU LW, FUQUA SA, HILSENBECK SG, OSBORNE CK et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 905-911.
  24. RIED T, JUST KE, HOLTGREVE-GREZ H, DU MANOIR S, SPEICHER MR, SCHROCK E et al. Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5415-5423.
  25. NISHIZAKI T, DEVRIES S, CHEW K, GOODSON WH, 3RD, LJUNG BM, THOR A et al. Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 267-272.
  26. BUERGER H, OTTERBACH F, SIMON R, SCHAFFER KL, POREMBA C, DIALLO R et al. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* 1999; 189: 521-526.
  27. ROYLANCE R, GORMAN P, HARRIS W, LIEBMAN R, BARNES D, HANBY A et al. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 1433-1436.
  28. TIRKKONEN M, TANNER M, KARHU R, KALLIONIEMI A, ISOLA J, KALLIONIEMI OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 177-184.
  29. MALAMOU-MITSI VD, SYRROU M, GEORGIU I, PAGOULATOS G, AGNANTIS NJ. Analysis of chromosomal aberrations in breast cancer by comparative genomic hybridization (CGH). Correlation with histoprognostic variables and c-erbB-2 immunorexpression. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 357-361.
  30. ALLRED DC, HARVEY JM, BERARDO M, CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11: 155-168.
  31. GALEA MH, ELLIS IO, ELSTON CW, BLAMEY RW. Node negative breast cancer prognosis and DNA ploidy [letter; comment]. *Br J Surg* 1992; 79: 181.
  32. HOHAUS S, FUNK L, MARTIN S, SCHLENK RF, ABDALLAH A, HAHN U et al. Stage III and

- oestrogen receptor negativity are associated with poor prognosis after adjuvant high-dose therapy in high-risk breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1500-1507.
33. NAKOPOULOU L, MICHALOPOULOU A, GIANNOPOULOU I, TZONOU A, KERAMOPOULOS A, LAZARIS AC et al. bcl-2 protein expression is associated with a prognostically favourable phenotype in breast cancer irrespective of p53 immunostaining. *Histopathology* 1999; 34: 310-319.
  34. AUBELE MM, CUMMINGS MC, MATTIS AE, ZITZELSBERGER HF, WALCH AK, KREMER M et al. Accumulation of chromosomal imbalances from intraductal proliferative lesions to adjacent in situ and invasive ductal breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9: 14-19.
  35. NISHIZAKI T, CHEW K, CHU L, ISOLA J, KALLIONIEMI A, WEIDNER N et al. Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 1997; 74: 513-517.
  36. CABELLO J. El consejo médico: la prevención primaria y secundaria de la enfermedad, principios del screening. *Medicine* 1998; 7: 4866-4871.
  37. KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, PIPER J, TANNER M, STOKKE T, CHEN L et al. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2156-2160.
  38. TIRKKONEN M, JOHANNSSON O, AGNARSSON BA, OLSSON H, INGVARSSON S, KARHU R et al. Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res* 1997; 57: 1222-1227.
  39. SCHWENDEL A, RICHARD F, LANGRECK H, KAUFMANN O, LAGE H, WINZER KJ et al. Chromosome alterations in breast carcinomas: frequent involvement of DNA losses including chromosomes 4q and 21q. *Br J Cancer* 1998; 78: 806-811.
  40. LOVEDAY RL, GREENMAN J, SIMCOX DL, SPEIRS V, DREW PJ, MONSON JR et al. Genetic changes in breast cancer detected by comparative genomic hybridisation. *Int J Cancer* 2000; 86: 494-500.