
Estudio de factores pronósticos en carcinoma mamario en dos grupos de pacientes: Estadio 0-21 casos- y Estadio II (con ganglios positivos) 42 casos

Study of prognostic factors in mammary carcinoma in two groups of patients: Stage 0-21 cases, and Stage II (with positive ganglions) 42 cases

F. Vicente¹, B. Larrinaga², P. Soriano¹, M.L. Gómez², J.M. Lera¹

INTRODUCCIÓN

El carcinoma mamario es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres de los países desarrollados¹. La incidencia de la enfermedad varía entre distintos países oscilando entre 11 y 80 casos por 100.000 mujeres/año². En Navarra se estima que la incidencia tasa estandarizada de la enfermedad se sitúa en 37,93 casos/100.000 mujeres/año³. La variabilidad en el comportamiento del cáncer de mama, así como su alta incidencia en la población femenina y sus repercusiones, hacen que los estudios sobre factores pronósticos de la enfermedad aparezcan con profusión en la literatura científica.

Durante años, los factores pronósticos manejados, han estado en relación con los hallazgos histopatológicos (tipo histológico, grado histológico, grado nuclear, número de mitosis, índice de Bloom Richardson) y otros como tamaño tumoral, afectación ganglionar, y receptores hormonales para estrógenos y progesterona. De todos ellos es reconocido que los de mayor significación pronóstica son el tamaño tumoral y la afectación axilar⁴⁻⁵.

En un intento de determinar mejor el pronóstico en tumores mamaros se han estudiado otros factores relacionados con la biología tumoral y su posible relación con el comportamiento evolutivo de la enfermedad.

Entre estos últimos, en la última década se han descrito varios antígenos que actúan como marcadores de distintas fases del ciclo celular - (PCNA, AgNORs, Ki 67).

El PCNA Antígeno Nuclear de Proliferación Celular es una proteína no-histona de 36 Kd y de 261 aminoácidos con alto contenido en ácido glutámico y aspartato⁶. Su determinación se realiza mediante métodos de inmunohistoquímica sobre cortes histológicos.

La acción del PCNA en la proliferación celular se basa en la función que esta proteína ejerce sobre algunas formas de ADN polimerasa^{7,8}. El proceso de síntesis de ADN mediado por la ADN polimerasa es dependiente del PCNA⁹⁻¹⁰.

El PCNA es un marcador de la fase G 1 (síntesis baja de PCNA) que aumenta con

1. Servicio de Cirugía General.
2. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Navarra.

el comienzo de la fase S (síntesis alta de PCNA) para retornar a valores basales durante el periodo final de la fase S¹⁰⁻¹¹.

El Ki 67 es un antígeno que se determina mediante el anticuerpo monoclonal que lleva su nombre y fue desarrollado por Gerdes y col.¹². Es un antígeno que se expresa en la parte final de la fase G 2 y en la fase M.

Tanto el PCNA como el Ki 67 y la fase S han sido estudiados en series amplias, bien documentadas, con resultados contradictorios al correlacionar los valores de aquellos con parámetros histológicos y de supervivencia.

El marcaje de los antígenos de proliferación celular presenta problemas de tipo técnico que unidos a una determinación por métodos semicuantitativos, en la que interviene la valoración subjetiva del que realiza el estudio, pueda dar lugar a resultados dispares.

Para obviar estos problemas hemos realizado la cuantificación de los mismos mediante la utilización de un analizador de imagen que carece de subjetividad, presentando además la ventaja de que el valor del estudio es cuantitativo, lo que nos permite manejar de distinta manera los resultados.

El objetivo de nuestro trabajo es valorar la posible significación pronóstica de PCNA y Ki 67, mediante análisis de imagen, en los grupos de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado, retrospectivamente, 63 pacientes intervenidas de carcinoma mamario en el Hospital de Navarra y distribuidas según el diagnóstico en los siguientes grupos:

Grupo A: Constituido por 42 pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante de mama y clasificadas como Estadio II (patológico) con ganglios positivos. Todas fueron tratadas mediante mastectomía radical modificada Madden.

Grupo B: Formado por 21 pacientes diagnosticadas de carcinoma intraductal "in situ". Siete de las pacientes presentaban microinfiltración y en 16 casos se efectuó cirugía conservadora de la mama.

Hemos valorado la reactividad a PCNA y Ki 67 en el Grupo A y PCNA en el grupo B comparándolos con el resto de hallazgos anatomopatológicos, así como con la evolución seguida.

Recogida de datos

Se han obtenido los datos clínicos evolutivos intervalo libre de enfermedad -ILE-, éxitos y supervivencia de las historias de las pacientes procedentes del archivo de nuestro centro. Se ha efectuado una nueva evaluación de la pieza histológica antes de la determinación de los marcadores en estudio, valorándose:

Grupo A: Tamaño tumoral, grado histológico, número de ganglios afectados, frente de crecimiento infiltrativo o expansivo, invasión vascular y se consideraron los resultados obtenidos en la determinación de receptores hormonales que constaban en el informe del momento de la intervención.

Grupo B: Tamaño tumoral, presencia de microinfiltración (definida como: foco aislado de infiltración de diámetro máximo de 1 mm en campo de gran aumento) y patrón histológico. Al igual que en el Grupo A se consideraron los resultados obtenidos en la determinación de receptores hormonales en el informe del momento de la intervención.

Determinación de PCNA

Se ha realizado en los dos grupos de estudio (A y B). Se consideró valores positivos de PCNA cuando el Score obtenido fue superior a 100.

Para la realización del proceso hemos utilizado el método de Immunoperoxidasa Avidina-Biotina con el kit "Immunoperoxidase AutoProbe II™ Staining Kit" de Biomedica corp. P.O. Box 8045. Foster City, CA 94404 USA, como marcador se ha utilizado el PCNA Pc 10 prediluido Biomedica corp.) y cuantificación del resultado mediante Análisis de Imagen (Visilog-TEXCAN).

Determinación de Ki 67

Se ha realizado en el Grupo A de pacientes (tumores infiltrantes con ganglios positivos). Se consideró valores posi-

tivos de Ki 67 cuando el Score obtenido fue superior a 30.

Para la realización del proceso hemos utilizado el método de Immunoperoxidasa Avidina-Biotina con el kit "Immunoperoxidase AutoProbe IITM Staining Kit" de Biomedica corp. (P.O. Box 8045. Foster City, CA 94404 USA), Utilizando como marcador Ki 67 monoclonal prediluido (Immunotech S.A.) y cuantificación del resultado mediante Análisis de Imagen (Visilog-Texcan).

Análisis estadístico

Para el estudio estadístico de los datos obtenidos hemos utilizado el método de las tablas de contingencia χ^2 para variables cualitativas y la t de Student y análisis de la varianza para variables cuantitativas, se ha utilizado el programa StatViewTM SE^{Graphics} (Abacus Concepts).

El método de Kaplan-Meier¹³ ha sido utilizado para calcular las curvas de supervivencia libre de enfermedad en razón de los resultados de PCNA y Ki 67 en tumor y frente de crecimiento. Las diferentes curvas fueron comparadas mediante el método de Mantel-Haenzel¹⁴.

RESULTADOS

Grupo A: Las pacientes incluidas en este grupo fueron intervenidas entre 1981 y 1987. Todas ellas sufrieron una mastectomía radical modificada (Madden), y fueron diagnosticadas de carcinoma ductal infiltrante con afectación axilar (Estadio II patológico).

La edad media era de 59,9 ($\pm 11,5$) años, límites 37-84.

El tamaño medio de las lesiones extirpadas fue de 3,15 \pm 1 cm, con un rango de 3 (2-5 cm).

La extirpación media de ganglios axilares fue de 8,9 \pm 5,4. Todas las pacientes presentaban afectación ganglionar axilar con una media de 3,73 \pm 2,8 ganglios afectados, veinte de las 42 pacientes tratadas presentaban más de 3 ganglios metastásicos, lo que representa el 47,6% del total de casos.

De todos los tumores estudiados el 61,9% presentaban un frente de crecimiento infiltrativo y un 38,1% lo presentaban expansivo.

La invasión vascular se demostró en el 73,8% de los casos y el grado histológico de las lesiones fue Grado II en el 64,3% de los casos, y Grado III en un 35,7%.

Los resultados de la determinación de PCNA tanto en el centro del tumor como en el frente de crecimiento quedan recogidos en la tabla 1; no se han encontrado diferencias significativas entre los mismos ($p=0,49$).

Tabla 1. Determinación de PCNA en el grupo A.

Frente del tumor		
Valor medio	170	$p=0,49$
D. estándar	± 117	
Centro del tumor		
Valor medio	167	
D. estándar	± 117	

El Ki 67 determinado en el frente de crecimiento y en el seno del tumor (Tabla 2) tampoco ha mostrado diferencias significativas en los resultados obtenidos ($p=0,93$).

Tabla 2. Determinación de Ki 67 en el Grupo A.

Frente del tumor		
Valor medio	43	$p=0,93$
D. estándar	± 50	
Centro del tumor		
Valor medio	48	
D. estándar	± 60	

Comparando los valores obtenidos de ambos marcadores, tanto en el seno del tumor como en el frente de crecimiento, con edad, tamaño tumoral, grado histológico, tipo de frente de crecimiento, invasión vascular, número de ganglios afectados e intervalo libre de enfermedad, sólo se han demostrado diferencias significativas en el valor de PCNA en el seno del tumor entre los tumores con Grado Histológico II y Grado Histológico III ($p=0,03$).

Del análisis de las curvas de supervivencia libre de enfermedad en razón de los scores tanto de PCNA y Ki 67 (Figs. 1-4) no

hemos encontrado diferencias significativas con ninguna de las medidas utilizados frente y centro del tumor.

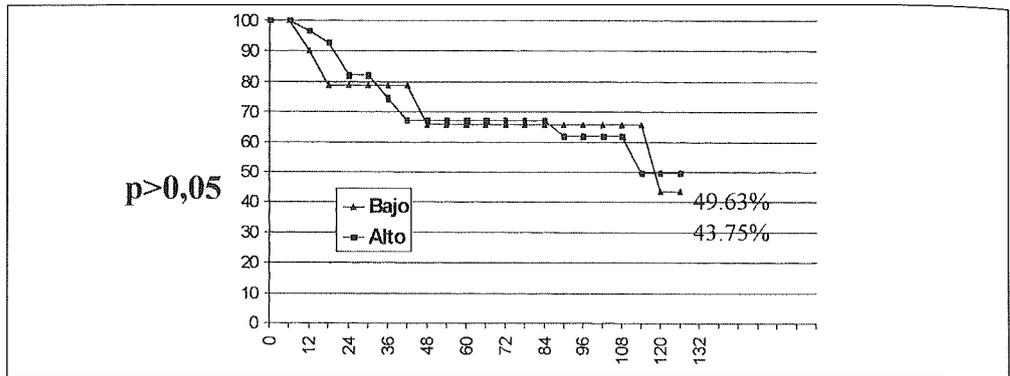


Figura 1. Intervalo libre de enfermedad según PCNA en el centro del tumor.

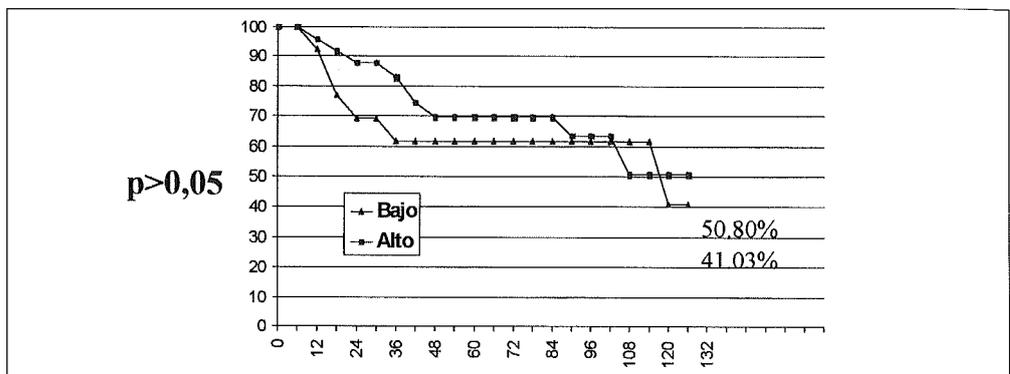


Figura 2. Intervalo libre de enfermedad según PCNA en el frente del tumor.

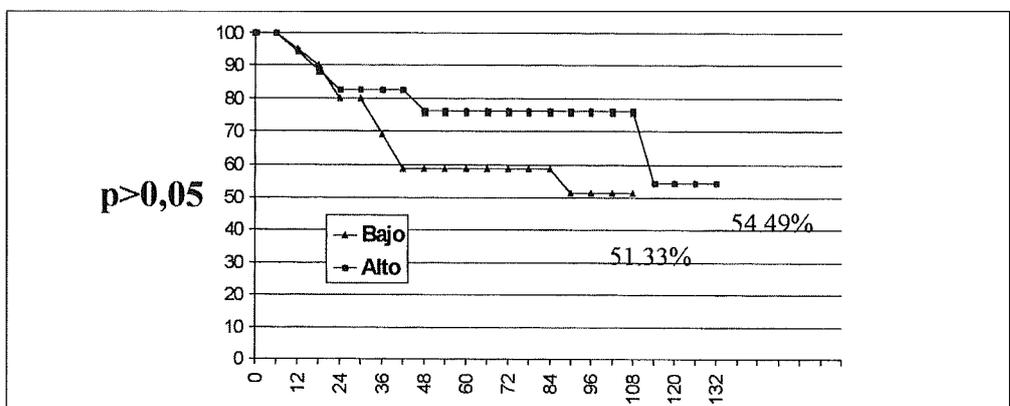


Figura 3. Intervalo libre de enfermedad según Ki 67 en el centro del tumor.

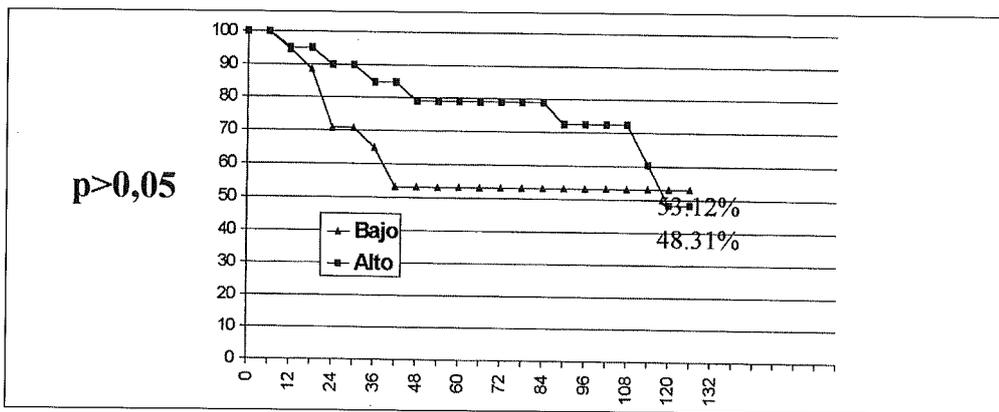


Figura 4. Intervalo libre de enfermedad según Ki 67 en el frente del tumor.

Grupo B: Para este estudio han sido incluidos 21 casos. La edad media de nuestras pacientes era de 53 ± 12 años siendo los extremos 26 y 77 años. El tamaño medio de las lesiones extirpadas ha sido de 1 cm con un mínimo de 0,1 cm y un máximo de 4 cm.

Según el patrón histopatológico un 29% de los casos fue clasificado como comedocarcinoma puro, un 43% con patrón mixto con comedocarcinoma y un 29% no comedocarcinoma (Tabla 3).

Tabla 3. Patrón histológico en el grupo B.

Patrón histológico	número
Comedocarcinoma puro: 6 casos	
• Patrón Mixto: 9 casos	
Cribiforme + Comedocarcinoma	6
Cribiforme + Papilar + Comedocarcinoma	3
• Sin Patrón Comedocarcinoma: 6 casos	
Cribiforme	3
Papilar + cribiforme	2
Papilar	1

En siete casos (33%) se encontró microinfiltración. La asociación de microinfiltración según el patrón histológico queda recogida en la tabla 4, siendo de destacar que la misma está presente en la mitad de los casos diagnosticados de comedocarcinoma puro mientras que sólo

se ha detectado en 1/6 de los no comedocarcinomas. Los receptores de estrógenos sólo han sido positivos en el 19% de los casos, mientras que los de progesterona lo fueron en el 36% de los mismos.

Tabla 4. Presencia de microinfiltración según patrón histológico.

Microinfiltración:	casos
Comedocarcinoma puro	3/9
Mixto con Comedocarcinoma	3/9
No Comedocarcinoma	1/6

La determinación de PCNA fue positiva en 12 casos (57%).

No se ha encontrado relación entre la positividad de PCNA y edad de las pacientes ni tamaño histológico de la lesión.

Del análisis de los resultados de PCNA en relación al patrón histológico se comprueba que, cuando existe patrón comedocarcinoma la prueba es positiva en el 66% de los casos, frente a un 50% cuando no existe componente comedocarcinoma, si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,37$).

Se ha encontrado una relación inversa entre la determinación de PCNA y los receptores hormonales, si bien sólo hay diferencias estadísticamente significativas con los receptores de progesterona ($p=0,0195$).

El resultado del estudio de PCNA en relación con la presencia de microinfiltración ha demostrado una relación inversa con significación estadística ($p=0,005$).

Al estudiar los casos con componente comedocarcinoma hemos podido comprobar que la relación inversa con la microinfiltración es altamente significativa $p=0,0008$, sin que encontremos diferencias significativas entre los resultados de PCNA y receptores hormonales en los mismos.

Las 21 pacientes de este grupo tienen un seguimiento medio de 78 ± 26 meses con un rango comprendido entre 72 y 176 meses. En la evolución postoperatoria una paciente presentó recidiva local a los 38 meses de la intervención; dicha paciente era portadora de un carcinoma mixto con comedocarcinoma, y la determinación de PCNA fue negativa existiendo microinfiltración en la pieza extirpada.

DISCUSIÓN

Desde que en 1978 se descubrió¹⁵ la molécula proteica PCNA-ciclina, cofactor de la DNA polimerasa $\delta^{9,10}$ se ha intentado en numerosas formas valorar sus niveles en tejido tumoral para usarlo como factor pronóstico. Los niveles de PCNA-ciclina se relacionan con el momento en que se encuentra cada célula, siendo sus niveles máximos en la fase S, indicativa de actividad de síntesis celular. La cuantificación de células en fase S se puede hacer por citometría de flujo, o por incorporación de timidina, pero resultan métodos inadecuados para su aplicación clínica, por sus dificultades técnicas y por su alto coste económico.

El problema de la determinación de PCNA-ciclina ha sido, inicialmente técnico, hasta que se han ido introduciendo métodos inmunohistoquímicos¹⁶ para su determinación sobre tejido fijado y parafinado¹⁷.

Actualmente son varios los estudios que determinan PCNA y Ki 67 con resultados dispares¹⁷⁻²², pero todos ellos adolecen del sistema de lectura de la inmunohistoquímica de PCNA-ciclina, que suele ser semi-cuantitativa. Para el actual estudio hemos usado un analizador de imagen que origina un valor definido, cuantitativo, no

sometido al influjo subjetivo de la opinión del investigador. Este sistema posibilita el uso objetivo de datos que son manejables estadísticamente.

Al relacionar los scores medios de Ki 67 y PCNA de los pacientes con recidiva frente a los que no tienen recidiva no se han encontrado diferencias significativas. Sin embargo, hay una significación cuando se compara la proporción de pacientes con score de Ki 67 altos (>30) en pacientes con recidiva de la enfermedad y sin recidiva. La fiabilidad de este resultado es escasa dado que tampoco hay diferencia cuando consideramos las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier entre los pacientes con scores de PCNA y Ki 67 bajos y altos. Estos resultados reproducen los producidos por medios semicuantitativos en algunos trabajos^{20,22}. Otros investigadores usando sistemas semejantes encuentran mejoras en la supervivencia entre el 8% y 20%^{17,21} con significación en la comparación de las curvas de Kaplan-Meier. Estas diferencias de la proporción en mejora de la supervivencia son aceptadas por los propios autores que se deben a la metodología empleada¹⁷. En cualquier caso esta metodología no es reproducible de manera fiable por su dependencia de la subjetividad del investigador. Además ninguno de éstos aclara si la zona medida de PCNA se encuentra en el mismo centro del tumor o en el frente de crecimiento, aunque nosotros no hemos encontrado diferencias.

Con respecto al resto de estudios tan sólo se observa asociación del PCNA tumoral con el grado histológico, dado que los pacientes con grado III tienen un score medio de PCNA mayor que los de grado II $p < 0,05$. Esta asociación no se observa en el PCNA medido en el frente del tumor. Aunque es mayor en los de grado III, no tiene significación estadística. El Ki 67 tanto del interior como del frente del tumor obtiene mayores scores en los tumores de grado III que en los de grado II, pero sin significación. No hay asociación de los scores de PCNA y Ki 67 con los otros factores pronósticos histológicos, como el tipo de frente de tumor (infiltrativo o expansivo), ni con la presencia de invasión vascular o no. Por la

propia naturaleza del estudio, no podemos valorar la asociación de PCNA con la presencia o ausencia de afectación ganglionar¹⁹. En general los scores de Ki 67 han seguido a los de PCNA, pero sin alcanzar en ningún momento significación, como ocurre en otras series¹⁷.

Destacar por último la asociación estadísticamente significativa entre tres factores pronósticos como son el tipo de frente del tumor, la presencia de invasión vascular y la afectación ganglionar.

En el estudio de los tumores "in situ" la única asociación de PCNA con significación es la inversa con la presencia de comedocarcinoma y receptores de progesterona, sin poder conocer su relación con la supervivencia por lo corto de la serie y de su seguimiento. La asociación inversa de PCNA con la microinfiltración en tumores sin componente comedocarcinoma es difícil de interpretar porque la serie es corta y no hay en la literatura revisada casos suficientes estudiados para poder contrastar los resultados.

Como conclusión podemos decir que en el grupo A:

- La determinación de PCNA en el centro y en el frente del tumor no ha demostrado ser un factor pronóstico con significación en la supervivencia ni en el intervalo libre de enfermedad.

- La única relación de PCNA con otros factores pronósticos es con el grado histológico.

El Ki 67 no demuestra ninguna asociación con ningún factor pronóstico, ni con la supervivencia, aunque parece ser más alto en las pacientes que recidivan.

En el grupo B:

- En los tumores "in situ" no podemos afirmar que PCNA sea factor pronóstico por lo corto de la serie y del seguimiento. Las asociaciones con otros factores no permite deducir su importancia.

- Se ha demostrado una relación inversa estadísticamente significativa entre microinfiltración y PCNA, que es más intensa en los tumores que existe patrón comedocarcinoma.

BIBLIOGRAFÍA

1. PARKIN DM, PISANI P, FERLAY J. Estimates of world-wide frequency of sixteen major cancers. 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594-606.
2. KELSEY JL, HILDRETH NG, THOMPSON WD. Epidemiologic aspects of breast cancer. *Radiol Clin North Am* 1983; 21: 3-12.
3. ASCUNCE N, DEL MORAL A. Programa de detección precoz del cáncer de mama en Navarra. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud. 1991.
4. JOHNSTONE FR. Carcinoma of the breast: Influence of size of primary lesion and life node involvement based on selective biopsy. *Am J Surg* 1972; 124: 158-164.
5. International Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancer. *Lancet* 1990; 335: 1565-1568.
6. ALMENDRAL JM, HUEBSCH D, BLUNDELL PA, MACDONALL-BRAVO H, BRAVO R. Cloning and sequence of human nuclear protein cyclin: homology with ADN binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1575-1579.
7. MEYER JS. Cell kinetics of breast and breast tumors. En: *Cancer of the breast*. Donegan and Spratt 4th edition. W. B. Saunders Company. 1995.
8. SYVAOJA JE. DNA polymerasa epsilon: The latest member in the family of mammalian DNA polymerases *Bioessays* 1990; 12: 533-536.
9. GOULIAN M, HERRMANN SM, SACKETT JW, GRIMM SL. Two forms of DNA polymerase delta from mouse cells. Purification and properties. *J Biol Chem* 1990; 265: 16402-16411.
10. BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL PA, MC DONALD-BRAVO H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of ADN polymerasa delta. *Nature* 1987; 326: 515-517.
11. CELIS JE, CELIS A. Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cell: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-3266.
12. GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, STEIN H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
13. KAPLAN E.L, MEIER P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.
14. MANTEL N, HAENZEL W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 1959; 22: 719-748.
15. MIYACHI K, FRITZLER MJ, TAN EM. Auto-

- antibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-2234.
16. HSU SM, RAINE L, RANGER H. Use of avidinbiotin peroxidase complex ABC in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody PAP procedure. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 557-580.
 17. HAERSLEV T, JACOBSEN GK. Proliferating cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. *Virchows Arch* 1994; 424: 39-46.
 18. ROBBINS BA, DE LA VEGA D, OGATA K, TAN EM, NAKAMURA RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-845.
 19. SCHÖNBORN Y, MINGUILLON C, MÖHNER M, EBELING K. PCNA as a potential prognostic marker in breast cancer. *Breast* 1994; 3: 97-102.
 20. SITTONEN SM, ISOLA JJ, RANTAL IS, HELIN HJ. Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by anti-PCNA monoclonal antibody and automated image analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 226-231.
 21. TAHAN SR, NEUBERG DS, DIEFFENBACH A, YACOB L. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 1993; 71: 3552-3559.
 22. GASPARINI S, MELI S, POZZA S, CAZZAVILLAN S, BEALACQUA P. PC-10 antibody to proliferating cell nuclear antigen PCNA is not related to prognosis in human breast carcinomas. *Growth Reg* 1992; 2: 145-150.