

CANCER DE MAMA Y CITOMETRIA DE FLUJO

Una alternativa para otorgar un Factor Pronostico

El carcinoma de mama es una de las neoplasias malignas más frecuentes y una de las primeras causas de muerte por cáncer¹. Es causalmente este hecho el que me impulsa a estudiar mas a fondo una patología que consigo lleva la carga peyorativa de miles de vidas que se pierden día tras día.

La incidencia con la que se desencadena esta enfermedad es un indicador inadecuado de la frecuencia con la cual los problemas de la mama hacen que las pacientes acudan a la consulta médica de cualquier especialidad. Es triste saber que por cada paciente diagnosticada con cáncer de mama, otras 5 a 10 mujeres son biopsiadas debido a la sintomatología sospechosa y por cada paciente biopsiada, docenas de mujeres acuden al médico debido a la sintomatología o a preocupación en relación con algún problema de la mama, o simplemente acuden a la consulta por razones de tipo estético y se encuentran con la fatidica noticia de ser flanco de un estudio de neoplasia cancerigena de mama.

En la actualidad el cáncer de mama es uno de los pocos tumores en los que existen datos concluyentes, pues las técnicas de detección en grandes masas de población disminuyen la tasa de mortalidad de forma sustancial. Todo esto debido a el ague otorgado en la última

¹ Harrison. "Principios de medicina interna". Mac Graw Hill, 13 edición; 1997

década, el cual ha incrementado notablemente su detección clínica y radiológica en estadios incipientes, y el diagnóstico de lesiones precursoras. Alrededor del 65% de los casos se diagnostican sin metástasis ganglionares, evolucionando favorablemente un 70% de ellos después del tratamiento quirúrgico, sin terapia coadyuvante.²

La identificación del 30% restante, que cursará con recidiva o progresión de la enfermedad podría beneficiarse de tratamientos complementarios; a pesar de lo último son considerados como un grupo de alto riesgo. Y es casualmente este grupo el que cobra importancia en el adelanto de estudios acerca del pronóstico, dado a que este parámetro no se consigue con los factores clásicos y justifica la búsqueda de nuevas alternativas para solucionar la incertidumbre que asalta un significativo 30% de la población implicada. Población a la que con el presente trabajo busco abrir la puerta a las posibilidades de una esperanza en el curso de una enfermedad que deambula en medio de las tinieblas y deja consigo miles de hogares sin uno de los pilares con los cuales se constituyó.

En las pacientes con enfermedad avanzada que requieren una selección de terapia complementaria entre opciones diversas, también es esencial disponer de nuevos parámetros capaces de predecir la respuesta al tratamiento.

Entre los factores de pronóstico clásicos para el cáncer de mama, los de mayor significación son el tamaño tumoral y el estado de los ganglios linfáticos axilares. La supervivencia a 5 años varía desde el

² J. Vinueza, Trujillo. Derly “Cáncer de Seno”. Guías de práctica clínica basado en la evidencia. Instituto de Seguro Social, 2002.

45,5% en tumores mayores de 5 cm con metástasis ganglionares hasta el 96,3 % en tumores menores de 2 cm con ganglios indemnes.

³

Otros parámetros de pronóstico que proporciona el estudio morfológico comprenden el grado de diferenciación de la neoplasia y su clasificación. Es conocido que algunos de los tipos histopatológicos se caracterizan por un comportamiento menos agresivo que el del carcinoma ductal convencional (carcinoma coloide, tubular, papilar y medular).

En la última década han sido constantes los aportes encontrados en la literatura de nuevos marcadores de pronóstico, discutiendo su posible utilidad clínica en distintas neoplasias a partir de trabajos experimentales y estudios clínicos. Las tecnologías implicadas incluyen estudios de fenotipo con técnicas de inmunohistoquímica, detectando productos nucleares o citoplasmáticos relacionados con oncogenes y genes supresores. Técnicas diversas de biología molecular han sido también aplicadas al estudio tisular, analizando directamente el genotipo de la neoplasia.

Aunque se han descrito en la literatura más de 100 posibles factores pronósticos, son pocos los que pueden considerarse suficientemente caracterizados o validados. En general, para establecer la utilidad de un marcador de pronóstico, debe validarse tanto en aspectos técnicos como clínicos. La técnica de estudio debe ser suficientemente sensible, específica y reproducible, y los resultados deben ser fácilmente interpretables y significativos para el clínico.

³ Ibid, et al.

En este punto la Citometría de flujo cobra un papel relevante en el estudio de los factores pronósticos otorgados al cáncer de mama puesto que con ella la cuenta de la mitosis utilizada en paralelo con marcadores de proliferación tales como Ki67/MIB1 ó el índice del ciclina A, permite proporcionar valor pronóstico reproductivo e independiente en cáncer de mama invasor. Para con ello dar respuesta a la necesidad de predecir el tratamiento y hacer una comparación anticipada entre el valor pronóstico y predictivo de la enfermedad.

Se propone que a través de la citometría es posible la investigación del pronóstico y de la patógena de las neoplasias de la mama puesto que con el uso de esta es posible realizar el estudio de la ploidia o cantidad de DNA, la fracción de células en proliferación o fase S y la morfometría de estructuras tisulares como el área nuclear, nucleolar y de los vasos sanguíneos.

Auer, Caspersson y Gustafsson en 1980, demostraron en un trabajo retrospectivo con Citometría estática que la cantidad de DNA o PLOIDIA de los tumores de mama se relaciona con la supervivencia de los pacientes. Clasificaron los tumores en cuatro grupos. El I se asociaba a una buena supervivencia de las enfermas a los diez años y en la citometria los tumores eran diploides, los del grupo IV sobrevivían menos de dos años y los tumores eran muy aneuploides. Los incluidos en los grupos II y III presentaban histogramas tetraploides o una combinación de tetraploide y diploide. Trabajos posteriores de citometría estática y de flujo han corroborado el valor

de la ploidía para la predicción del pronóstico sobre la supervivencia de los pacientes al cáncer de mama, demostrando que es un marcador pronóstico independiente. Se ha observado a lo largo de la mayoría de los trabajos se han hecho con Citometría de flujo que las lesiones mamarias benignas son en su mayoría de tipo diploides. Las lesiones malignas, sin diferenciar tipos tumorales ni estadios de enfermedad, son aneuploides entre el 35 al 70% de los casos y que la presencia de tumores con población aneuploide o de tipo multiploide son los de peor pronóstico⁴.

Es de gran importancia resaltar un hecho ventajoso que ofrece la citometría y es que los equipos tienen la capacidad de analizar células en suspensión que interfieren de forma individual con una fuente de luz. Dicha intersección que realiza cada célula con el haz de luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada, por su tamaño relativo, por sus granulaciones o bien por su reactividad con fluorocromos previa incubación con diversos anticuerpos monoclonales; siendo esto totalmente ventajoso en patologías como las carcionides en las cuales existen una multiplicidad de células las cuales en esencia deberían ser analizadas con el único fin de conocer todas las poblaciones presentes en la muestras y las cuales ofrecen de modo singular un aspecto pronóstico de importancia vital en el paciente que se enfrenta a la enfermedad.

⁴ Antonio E. Pinto, Saudade, A., Soares “ Short term significace of DNA ploidy and cell proliferation in breast carcinoma: a multivariable analysis of prognostic markers in a series of 308 parients”. Journal of clinical Pathology, Aug 1999; 53; 8

Ademas de lo anterior la citometría es un método de lectura rápido, que permite analizar un elevado número de células que oscila entre 1.000 a 50.000 para cada anticuerpo monoclonal y el cual proporciona un registro computarizado de los resultados. La citometría de flujo permite la determinación de antígenos celulares de superficie, la cuantificación del ADN y la determinación de la actividad proliferativa de la población celular. Siendo estas tres características de ventajosa utilidad en el estudio de factores pronóstico debido a que nos proporciona sin problema alguno la información básica requerida para obtener resultados fiables en cuanto a la necesidad de otorgar a las pacientes alternativas y expectativas de tratamiento ante la aparición de una cruel enfermedad como lo es el carcinoma de mama.

Sin embargo hay que tener en cuenta que algunos tipos de carcinoma pueden presentar valores engañosos de ploidia. Ello ocurre en el carcinoma coloidal, de conocida baja malignidad, en el que aparecen casos muy aneuploides debido a las células degeneradas, en los carcinomas medulares, una ploidia elevada se asocia con mejor pronóstico que los ductales quizá por la menor tendencia a las metástasis. Se acepta que la ploidia se correlaciona con el pronóstico de los carcinomas ductales pero no con el de los lobulillares o medulares. Los tumores neuroendocrinos de la mama pueden presentar un pico próximo a tetraploide ó aneuploidia⁵.

⁵ J. Vinuesa, Trujillo. Derly “Cancer de Seno”. Guías de práctica clínica basado en la evidencia. Instituto de Seguro Social, 2002.

Por todo lo anterior es conveniente que los estudios reúnan tumores de tipos histológicos determinados y utilicen en paralelo a el estudio del ciclo de DNA e Índice de DNA marcadores de proliferación^{6 7}, los cuales permiten proporcionar valor pronóstico reproductivo e independiente en cáncer de mama invasor.

La ploidía encontrada en piezas fijadas en formol e incluidas en parafina coincide en el 89%⁸ de los casos con la obtenida en tejido fresco. Muy probablemente los detritus celulares generados al destruir el bloque y la mayor fragilidad de las células malignas al procesamiento de disociación ayudan a explicar estos resultados. Los trabajos que utilizan material fresco consiguen una relación mayor entre pronostico y ploidia que los realizados con material fijado. En general para diagnóstico se debe usar material fresco o congelado, aunque para estudios retrospectivos, en los que se puede hacer seguimiento más fácilmente, el material en parafina es válido pues hay abundante bibliografía sobre la correspondencia entre ambos tipos de muestra.

Sin embargo hay que buscar la concordancia en la valoración de los resultados de los diferentes observadores, por lo que es necesario tener a la mano estudios realizados en instancias puntuales tal y como son las realizadas por el grupo de A. Elzagheid y Y Collan en el 2002, quienes analizaron muestras en dependencia directa con el

⁶ Guise R, Lee K, Sung R. " Multiparametric flow cytometric analisis in breast cancer aell line MCF 7". Journal of obstetrics and Gynecology Research. Vol 28 issue 3, pag 141 jun 2002

⁷ Michels J, duigou F. "Flow cytometry in primary breast cancrinomas. Prognostic impact of proliferative activity". Breast Cancer research; Jul 200; 62, 2

⁸ Ibid, et al

histograma y con los cuales se analizan a través de la citometría la ploidía presente en 48 muestras de 25 casos que delucidaron de manera eficaz las ventajas que ofrece la dicha tecnología en este campo.

Según las pautas indicadas por Kallionemi que establece el histograma según el índice de DNA: Los tumores diploides en mama tienen un ID de 0,75 a 1,25, los aneuploides de 1,25 a 1,8, los tetraploides de 1,8 a 2,2 e hipertetraploides por encima de 2,2

De igual manera es de vital importancia revisar las diversas técnicas en comparación a la citometría para ver el índice de coincidencia que surge en los casos diploides, hiperdiploides y multiploides; con el único fin de evidenciar que la citometría ofrece resultados mucho más precisos y esto había de verse reflejado en el valor p obtenido en estudios como el realizado por Antonio Pinto en el cual se indica un valor p menor de 0.0001.

En cuanto a los estudios de proliferación celular, hay controversia sobre cuál es el parámetro que circunscribe mejor las células tumorales que están sintetizando DNA. La mayoría de los trabajos lo hacen estudiando la fracción de fase S que se correlaciona con los resultados obtenidos con bromodeoxiuridina, Ki-67 y Citoqueratinas⁹, pero otros buscan el porcentaje de células que están en fase S y G2-M. Sin embargo Sharma, Gonzales y Cols entre otros demostraron

⁹ Ignacio C., Juana C. "Evaluation of Multiparameter Flow Cytometry for the Detection of Breast Cancer Tumor Cells in Blood Samples". American Journals Clinical Pathology; 2005;123:66-74

que si se quita el efecto de la fracción de la fase S sobre el pronóstico, la fracción de la fase G2-M pierde el valor pronostico por lo que podemos prescindir de ella para calcular la actividad proliferativa tumoral. La fracción de la fase S es el mejor parámetro relacionado con el tiempo libre de enfermedad.

En 308 pacientes de carcinoma de mama estudiados con Citometría de flujo por Antonio Pinto., ven que el valor de la fase S de proliferacion celular es un marcador de la supervivencia a la enfermedad, del período libre de recaída y de la supervivencia despues de esta. La fiabilidad para la supervivencia y el período libre de recurrencia sólo es superada por el status ganglionar, pero para pronosticar la supervivencia tras la recaída es el marcador mas fuerte. Comparada con otros parámetros, la fracción de celulas en proliferacion medida por el pico S es un factor pronostico independiente del grado de tumor y estadio, tamaño tumoral, edad del paciente, status ganglionar, menstrual y de algunos tratamientos. Es pues un predictor muy importante de la evolución clínica que va a tener un tumor de mama.

Como ocurría en la ploidía también es preciso tener en cuenta que los valores de la fase S varían segun la fijación y la preparación del material. En la Citometría de flujo los tumores diploides tienen valores mas bajos de fracción de fase S porque también miden células normales. Esto puede obviarse haciendo marcaje selectivo de las células tumorales con anticuerpos específicos. Por otra parte en los estudios desde parafina los restos tisulares tras la digestión

enzimática se superponen al histograma en Citometría de flujo dando valores de fase S más elevados. Este problema no ocurre en la citometría estática al elegir de forma interactiva las células tumorales. Pero en este caso tenemos la limitación de que el número de células investigados es pequeño. Además está el problema general de que no existe un acuerdo sobre el nivel de corte. La mayoría de los autores consideran en la Citometría de flujo que los tumores con valor medio de la fracción de fase S hasta el 11% tiene un buen pronóstico y malo cuando superan este porcentaje. propone tres grupos, de mejor a peor pronóstico, situados en menos del 7%, entre el 7 y 11,9% y por encima del 12%. En la citometría estática los porcentajes varían algo, siendo más elevados en los aneuploides, y más bajos en los diploides, porque solo contabiliza células tumorales. ¹⁰

Otros valores cuantimétricos de importancia en la glándula mamaria son el índice de actividad mitótica (MAI), el índice pronóstico morfométrico paramétrico (IPMM), algunos estudios morfométricos nucleares y la medida de la angiogénesis.

El índice de actividad mitotica se obtiene contando las mitosis en 10 campos consecutivos de gran aumento. Realizado de forma manual es muy subjetivo y no puede ser reproducido por distintos observadores. Sin embargo efectuado con análisis de imagen es un factor pronóstico individual potente. A mayor valor hay peor pronóstico para la paciente, El índice de mitosis se correlaciona con los resultados del Ki-67, el MIB-1 y la fracción de fase S de proliferación celular.

¹⁰ J. Vinueza, Trujillo. Derly “ Cancer de Seno”. Guías de práctica clínica basado en la evidencia. Instituto de Seguro Social, 2002.

El índice pronóstico morfométrico multiparamétrico o multivariante se calcula según la fórmula descrita por BAAK y cols en 1985 $IPMM = 0,3341(\text{Raíz cuadrada de MAI}) + 0,2342 \times \text{Tamaño del diámetro tumoral mayor en centímetros} - 0,7654 \times \text{Status ganglionar}(\text{afectado}=1, \text{negativo}=2)$

Si es inferior a 0,60 el pronóstico es bueno y por encima de este valor el pronóstico en cuanto a recurrencia y supervivencia es malo. Es un método fácil, barato pues se hace con hematoxilina eosina, aunque como todos los de análisis de imagen relativamente lento.

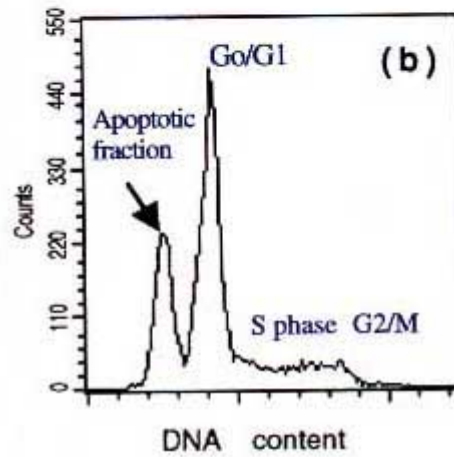
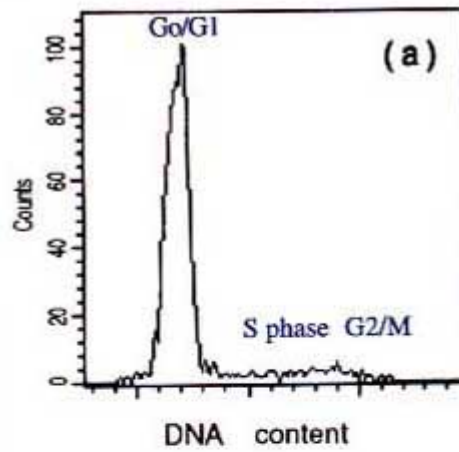
El interés que ha generado en los últimos años la búsqueda de sistemas adecuados para averiguar la actividad proliferativa tumoral ha proporcionado distintos métodos que han permitido establecer su importancia como marcador de pronóstico y su relación con otros parámetros clínico-patológicos. En general, puedo concluir que tanto en el carcinoma de mama como en otras neoplasias, el alto índice proliferativo se asocia a mayor agresividad biológica. Y así mismo que la Citometría de flujo nos proporciona una herramienta útil en el estudio multiparamétrico del DNA que nos permite hacer aproximaciones al factor pronóstico de cada paciente en cuestión de horas y con una alta confiabilidad; todo esto en búsqueda de aquel fin que nos ha puesto en el camino de la medicina: otorgar esperanzas de vida, sueños de un futuro y senderos por construir.

BIBLIOGRAFIA

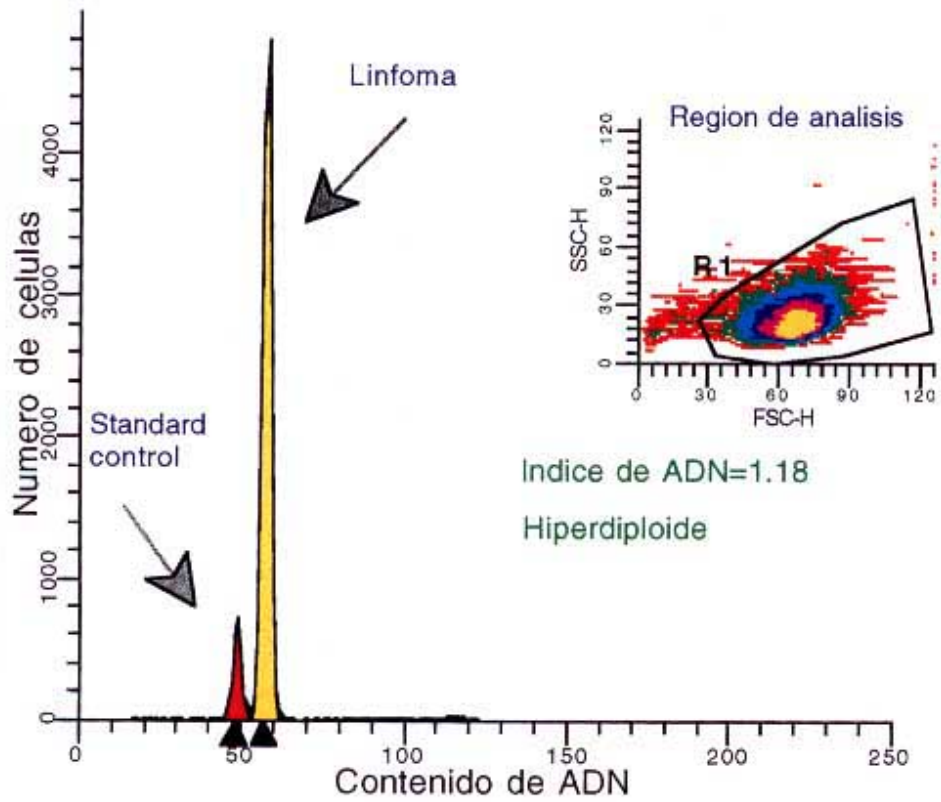
1. Harrison. "Principios de medicina interna". Mac Graw Hill, 13 edición; 1997
2. J. Vinueza, Trujillo. Derly " Cancer de Seno". Guías de práctica clínica basado en la evidencia. Instituto de Seguro Social, 2002.
4. Antonio E. Pinto, Saudade, A., Soares " Short term significace of DNA ploidy and cell proliferation in breast carcinoma: a multivariable analysis of prognostic markers in a series of 308 parients". Journal of clinical Pathology, Aug 1999; 53; 8
6. Guise R, Lee K, Sung R. " Multiparametric flow cytometric analisis in breast cancer Cell line MCF 7". Journal of obstetrics and Gynecology Research. Vol 28 issue 3, pag 141 jun 2002
7. Michels J, duigou F. "Flow cytometry in primary breast canrcinomas. Prognostic impact of proliferative activity". Breast Cancer research; Jul 2000; 62
9. Ignacio C., Juana C. "Evaluation of Multiparameter Flow Cytometry for the Detection of Breast Cancer Tumor Cells in Blood Samples". American Journals Clinical Pathology; 2005;123:66-74
10. A.Elzagheid and Y. Collan. "Dependence of DNA-histograms on the sampling techniques in fine needle aspirates of the breast". Analytical Cellular Pathology 24 (2002) 159-165

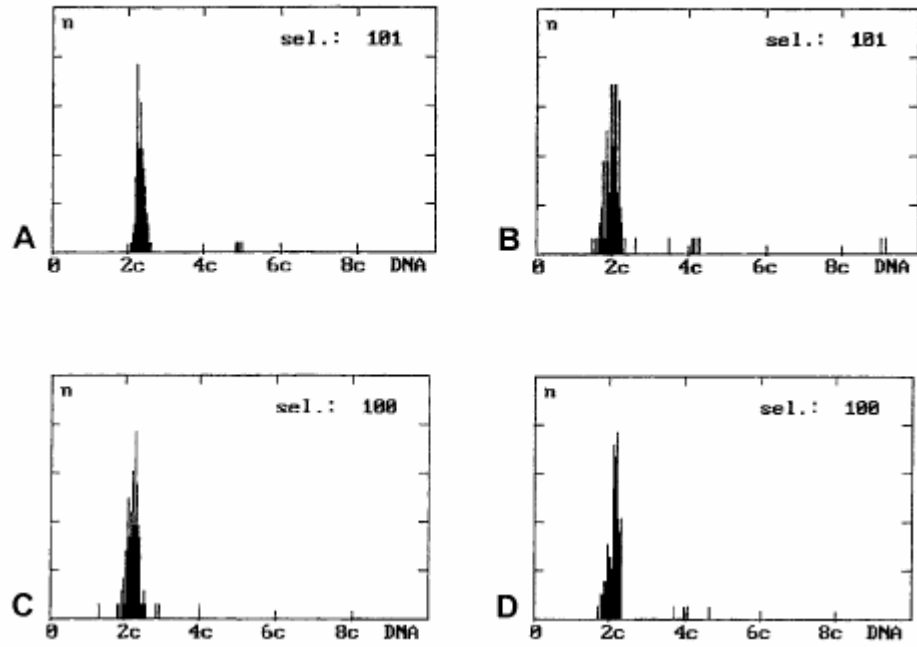
Anexo 1
ciclo celular por citometría de flujo

figura de <http://scsle.uv.es>



Dra. Carmen Cao
Dpto. de Hemato-Oncológico, Clínica Las Condes.
(Con la colaboración de la Sra. María Valeska Simon)





Anexo 2
DISTRIBUCION DE LOS TIPOS HISTOLOGICOS DE CARCINOMA DE MAMA

	Carcinomas totales
Carcinoma in situ	15 – 30%
Ca ductal in situ	80%
Ca lobulillar in situ	20%
Carcinoma infiltrante	70 – 85%
Ca ductal	79%
Ca lobulillar	10%
Ca tubular/cribiforme	6%
Ca coloide(mucinoso)	2%
Ca medular	2%
Ca papilar	1%

Guías de práctica clínica basado en la evidencia. Instituto de Seguro Social, 2002.

Anexo 3
TIPIFICACION CLINICA DEL CANCER DE MAMA SEGUN TNM

Estado 0 M0	Tis	N0
Estado I M0	T1	N0
Estado II a M0	T0	N1
M0	T1	N1
M0	T2	N0
Estado II b M0	T2	N1
M0	T3	N0
Estado III a M0	T0	N2
M0	T1	N2
M0	T3	N2
M0	T3	N1,N2
Estado III b M0	T4	N cualquiera
M0	T cualquiera	N3
Estado IV M1	T cualquiera	N cualquiera

El cáncer de mama se ha clasificado en 5 grupos para estandarizar las comparaciones de los resultados de las diferentes modalidades terapéuticas y para guiar el tratamiento:

- **Estadio 0:** CDIS o CLIS, tasa de supervivencia a los 5 años del 92%.
- **Estadio I:** carcinoma infiltrante de 2 cm o menos de diámetro (incluido el carcinoma in situ con microinfiltración) sin afectación de ganglios linfáticos y sin metástasis a distancia, tasa de supervivencia a los 5 años del 87%.
- **Estadio II:** carcinoma infiltrante de 5 cm o menos de diámetro con ganglios linfáticos axilares afectados pero móviles sin metástasis a distancia, o bien carcinoma infiltrante mayor de 5 cm de diámetro sin metástasis ganglionares ni a distancia, tasa de supervivencia a los 5 años del 75%.
- **Estadio III:** carcinoma de mama con más de 5 cm de diámetro y con metástasis ganglionares, o bien cualquier cáncer de mama con ganglios metastásicos fijos o fusionados, o bien cualquier cáncer de mama con afectación de ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales, o bien cualquier cáncer de mama con afectación cutánea, fijación del pectoral o a la pared torácica, edema o carcinoma inflamatorio clínico, en ausencia de metástasis a distancia, tasa de supervivencia a los 5 años del 46%.
- **Estadio IV:** cualquier forma de cáncer de mama con metástasis a distancia, incluidos los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales, tasa de supervivencia a los 5 años del 13%.

CANCER DE MAMA Y CITOMETRIA DE FLUJO
Una alternativa para otorgar un Factor Pronostico

Premonografía

Presentado como requisito en el área de Genética

Presentado por:

CINDY VIVIANA BUITRAGO TORRES

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Medicina
Área de Genética
Mayo 24 de 2005

CANCER DE MAMA Y CITOMETRIA DE FLUJO
Una alternativa para otorgar un Factor Pronostico

Presentado por:

CINDY VIVIANA BUITRAGO TORRES

Presentado a:

Dra. ADRIANA ORDOÑEZ
Dr. JORGE MONTOYA

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Medicina
Área de Genética
Mayo 24 de 2005