



Universitat de Lleida

Cinètica celular del càncer de mama, citometria de flujo, valor pronóstico

Miquel Sisteré Manonelles

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE LLEIDA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA I CIRURGIA

CINETICA CELULAR DEL
CANCER DE MAMA.
CITOMETRIA DE FLUJO.
VALOR PRONOSTICO.

Miquel Sisteré i Manonelles

Prof. Dr. E. Iglesias Martínez
LLEIDA 1993.

2.- Desparafinización

En esta etapa se realizan los procesos siguientes:

- 1.- La muestra se deposita en un tubo de ensayo.
- 2.- Al tubo de ensayo se añaden 5 ml. de Xilol, dejándose en reposo durante 20 min.
- 3.- Cambiar el Xilol cada 20 min. por decantación, haciéndolo 4 veces.
- 4.- Decantado el último Xilol, poner 3 ml. de alcohol etílico 100%.
- 5.- Realizar lavados por decantación con alcohol, 3-4 veces.
- 6.- Dejar el último alcohol durante 10 min.
- 7.- Decantar el alcohol 100% y poner 3 ml. de alcohol al 95%, durante 10 min.
- 8.- Cambiar de nuevo el alcohol de 95 por uno de 70, mantenerlo con la muestra 10 minutos.
- 9.- Cambiar de nuevo el alcohol de 70 por uno de 50, mantenerlo 10 min.
- 10.- Tras el último alcohol, lavar por decantación mediante agua destilada, 3-4 veces.

Para obtener una optimización de los resultados hemos observado una rigurosidad en los siguientes aspectos prácticos:

Se ha procurado que las muestras queden perfecta y constantemente cubiertas por el xilol y alcohol o agua.

En las decantaciones hemos tenido que prestar sumo cuidado, pues puede perderse gran cantidad de muestra.

Los lavados con alcohol al 100%, deben realizarse metódicamente, pues si no se han realizado bien, al añadir los alcoholes de menor gradación la muestra se enturbiará, debiendo empezar de nuevo el proceso.

Una vez se han realizado los lavados con agua destilada, se pueden dejar reposar las muestras durante unos días a temperatura ambiente, aunque no se recomienda sean más de 4, y mejor si se puede seguir el procesado de las muestras en las 24 horas siguientes.

Algunos autores por ser este apartado tan largo y mecánico han optado por idear técnicas automáticas de desparafinado e hidratación.^{194,195}

3.- Homogeneización de los cortes del tumor

Los pasos a realizar son los siguientes:

- 1.- El contenido de los tubos de ensayo se deposita en unas placas de Petri, y mediante sección con bisturí, se realizan múltiples cortes en las muestras de tumor hasta conseguir un material homogeneizado.
- 2.- Se recoge la pulpa, guardándose en un tubo de Eppendorf, que será el continente que utilizaremos en

las sucesivas etapas del proceso.

Comentario a la etapa de trituración.- Antes de vaciar los tubos de ensayo en las placas de Petri, es conveniente quitar el agua destilada, aunque no totalmente, si quedan 1 ó 2 centímetros cúbicos, nos ayudarán en la maniobra de trituración.

Se debe procurar mantener la muestra húmeda, pues se seca rápidamente.

4.- Digestión enzimática mediante Pepsina

El primer paso consiste en la preparación de la solución de pepsina de la siguiente forma:

- 1.- Obtener una solución salina al 0.9% o suero fisiológico.
- 2.- Ajustar el pH de la solución salina a 1.5 con HCl 1N.
- 3.- Añadir a la solución salina de pH 1.5, pepsina, a una concentración de 0.5 gr./100ml.

Una vez tenemos la solución de pepsina, se puede proceder a realizar los pasos de la digestión enzimática.

- 1.- Depositar en el interior del tubo de Eppendorf (donde se halla la muestra), 1 ml. de la solución de pepsina.
- 2.- Los tubos de Eppendorf conteniendo la muestra con la solución de pepsina, se deben incubar al baño maría a una temperatura de 37 ° C durante una hora.
- 3.- Realizar de forma periódica (cada 10 minutos) una agitación enérgica de la muestra mediante vortex, para conseguir una buena digestión de las membranas.

Comentario a la etapa de digestión enzimática.- Antes de empezar a preparar la solución, es aconsejable conectar el pHmetro y ajustarlo convenientemente.

Al utilizar la pepsina se debe tener cuidado por ser muy corrosiva para la piel.

Después de preparar la solución de pepsina, se debe utilizar inmediatamente para evitar su inactivación.

El pH en que debe estar la muestra ha de ser muy ácido (pH= 1,5) y la incubación ha de ser a 37° C para de este modo conseguir la máxima actividad de degradación de la pepsina.

La inmersión de las muestras en baño maría, ha de ser entre una hora y hora y cuarto, pero nunca inferior a una hora.

5.- Centrifugación

Terminado el proceso de digestión enzimática. Los tubos de Eppendorf se centrifugan a 2000 rpm, durante 10 minutos.

El sobrenadante que resulte se desecha mediante un delicado pipeteado para evitar turbulencias y aspirar por error los núcleos celulares.

6.- Tinción del DNA y destrucción del RNA

Terminada la centrifugación, en el fondo de los tubos de Eppendorf se hallan los núcleos de las células. Para su tinción se debe usar un colorante de características fluorescentes, en nuestro caso se ha utilizado el **Ioduro de Propidium**.

Para evitar falsos resultados al colorearse los dos ácidos ribonucleicos, procuraremos destruir el RNA, mediante una **Ribonucleasa**.

El proceso de tinción del DNA se realiza de la siguiente manera:

- 1.- Obtención de agua destilada.
- 2.- Disolver en el agua destilada el Ioduro de Propidium a una concentración de 40 microgramos / ml.

- 3.- Añadir a la solución de Ioduro de Propidium Ribonucleasa en una proporción de 0,5 mgr./ 100 ml.
- 4.- Remover suavemente la solución.
- 5.- Depositar 1 ml. de la solución realizada en cada tubo Eppendorf.
- 6.- Proteger a los tubos Eppendorf de la luz (por ser el Ioduro de Propidium fotosensible).
- 7.- Guardar las muestras a 4 grados centígrados para que se realice la tinción, durante 12-14 horas.

Para la tinción del DNA, se pueden utilizar varios productos, entre ellos, Mitramicina, Bromuro de Etidio, Naranja de Acridina, DAPI, Hoechst 33258, Ioduro de Propidium, siendo los tres últimos los más utilizados. El colorante Hoechst 33258, se localiza en la banda azul de la región ultravioleta, el Ioduro de Propidium en la banda roja.¹⁸³

7.- Preparación de la muestra para su procesamiento por el Citómetro de Flujo

Los pasos a realizar son los siguientes:

Citometría de Flujo

- 1.- Filtrar mediante una malla de nylon de 50 micras de poro el contenido de cada tubo Eppendorf.
- 2.- Para realizar el filtrado se utilizará una jeringuilla aspirando el contenido del tubo de Eppendorf, cambiando la aguja y la malla; que se intercala entre aguja y jeringuilla, utilizando un nuevo juego para el aspirado y espirado.
- 3.- Cuando tengamos aspirado todo el contenido de cada tubo, se depositará (previo reemplazamiento de aguja y malla) en un tubo de ensayo de 6 ml., protegido de la luz.

Comentario a la etapa de preparación de las muestras para el procesamiento por el citómetro de flujo.- Se recortan cuadrados de nylon de unos 1.5 x 1.5 centímetros de lado, introduciendo el cuadrado hasta el fondo del tubo de Eppendorf, empujado por la aguja de la jeringuilla. Se realizará una aspiración y posterior expulsión para crear una turbulencia y poder poner en movimiento los núcleos, evitando que se sedimenten en el fondo del tubo. Conseguida esta turbulencia, se realizará una aspiración, pasando la muestra a la jeringuilla. Entonces se cambiará la aguja y se interpondrá entre jeringuilla y aguja otro fragmento de malla de nylon, expeliendo la muestra a un tubo de ensayo, normalmente de plástico y de unos 6 ml.

8.- Elaboración del grupo control

Como control se ha empleado linfocitos, separándolos de sangre total mediante el método de Ficoll.

Obtenidos los linfocitos, se tiñen con Ioduro de Propidium a la misma concentración que las muestras (20-30 microgramos por ml.). Para que se realice la tinción del material nuclear, se añade conjuntamente con el Ioduro de Propidium, Triton X-100 a una concentración de 0.1-0.2 ml./100.

El Triton X-100 es el encargado de romper las membranas de los linfocitos y dejar penetrar el Ioduro de Propidium en su interior.

Al cabo de 1 a 3 horas se puede realizar la lectura, pues el material nuclear ya está teñido.

Los linfocitos, suelen dar un pico bien delimitado, con unas pequeñas fases S, siendo un ejemplo de células diploides. (Fig. 7)

Delimitado el canal donde se encuentra la fase G₀-G₁ de los linfocitos; correspondiente al pico 2n, ya se pueden procesar las muestras y así podremos saber el índice de DNA de cada pico.

Según sea el índice de DNA de cada pico que aparezca en el histograma, podremos clasificar los tumores en **diploides** (Índice de DNA = 1), o **aneuploides** (Índice de DNA distinto de 1).

Este control de linfocitos se puede procesar al principio de una serie de varios casos; dándonos la referencia del canal donde se situará el pico diploide. Si pensamos que ha

podido haber oscilaciones en los parámetros del Citómetro de Flujo (fluorescencia, voltaje), se puede volver a pasar el control al cabo de varios casos.

Algunos autores, mezclan la muestra con los linfocitos control, apareciendo el histograma con un gran pico diploide, si se superponen las poblaciones, o claramente diferenciados, el pico correspondiente a los linfocitos-control y el pico de las células tumorales.

Extracción de linfocitos de sangre total mediante el método de ficoll

Material:

Sangre total, mínimo 3 ml.

Ficoll, mínimo 3 ml.

PBS, mínimo 20 ml.

Tubos de ensayo, 4 tubos.

Centrífuga.

Descripción del método:

a/ Preparación de PBS.

Se necesita:

Na₂HPO₄.

NaH₂PO₄.

CLNa.

KCL.

Agua destilada.

Balanza.

El tampón fosfato ha de tener una molaridad igual a 0.2.

Preparación de 150 ml. de PBS:

- 1/ Pesar 1.379 gr. de NaH_2PO_4 y añadir 50 ml. de agua destilada.
- 2/ Pesar 3.55 gr. de Na_2HPO_4 y añadir 100 ml. de agua destilada.
- 3/ Realizar una solución mezclando las dos soluciones anteriores.
- 4/ Pesar 1.314 gr de CLNa, y añadirlos a la solución anterior.
- 5/ Pesar 30 mgr. de KCL, y añadirlos al total.

b/ Preparación de Ficoll.

Se realiza mezclando convenientemente Ficoll y Pielograf.

Solución de Pielograf= Se realiza mediante Pielograf y agua destilada a una concentración del 33.9% (solución A).

Solución de Ficoll= Se realiza mediante Ficoll y agua destilada a una concentración del 9% (solución B).

Preparación de un litro de solución de Ficoll:

- 1.- Mezclar 293.7 ml de solución A con 706.2 ml. de solución B.
- 2.- Agitar durante una hora en un agitador magnético.
- 3.- Ajustar la densidad entre 1077 y 1075 con agua destilada o pielograf.
- 4.- Guardar a 4 grados centígrados. Protegida de la luz.

c/ Método de Ficoll.

- 1/ Añadir a la sangre total la misma proporción de PBS, realizándose la mezcla suavemente.
- 2/ Depositar con la ayuda de una pipeta y muy lentamente la mezcla de PBS y sangre sobre el ficoll, en un tubo de ensayo para centrífuga. Se ha de procurar que se mantenga la interfase entre el ficoll y la sangre.
- 3/ Una vez tengamos la sangre sobre el ficoll, se centrifuga a 2000 rpm durante 30 minutos.
- 4/ Terminada la centrifugación en el tubo de ensayo se podrán diferenciar varios estratos correspondientes desde la parte superior a la inferior a: plasma, linfocitos, ficoll y hematíes.
- 5/ Los linfocitos están en forma de nube separando el plasma del ficoll. Esta nube de linfocitos debe ser aspirada cuidadosamente con una pipeta, depositándolos en otro tubo de ensayo con PBS.

- 6/ A continuación se realiza una nueva centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, por decantación se elimina el sobrenadante y se vuelve a llenar de PBS, para repetir de nuevo el centrifugado, quedando en el fondo del tubo los linfocitos preparados para ser teñidos.

9.- Utilización del Citómetro de Flujo

Para la correcta utilización de un Citómetro de Flujo son indispensables los siguientes pasos:

- a/ Revisión de los valores de fluorescencia, voltaje y potencia de láser.
- b/ Calibración del Citómetro mediante bolitas de material inerte, utilizando el programa **DNA Check**.
- c/ Selección del programa **DNA 1 Color**, si utilizamos únicamente un colorante.
- d/ Aspirar la muestra. Tras unos instantes, durante los cuales, la muestra sigue los circuitos del Citómetro hasta llegar a la cámara de lectura, aparece en la pantalla las células o partículas que se están identificando. Pudiéndose observar el ritmo de lectura que mantiene el aparato. (Fig. 13)
- e/ A medida que la muestra va pasando por la cámara de conteo, en la pantalla del Citómetro se van dibujando los histogramas y mediante unos **cursores**, que pueden moverse libremente, conoceremos el canal en que se

Citometría de Flujo

halla cada pico y el número de células que se encuentran bajo el área delimitada por el cursor.

(Fig. 13)

- f/ El Citómetro detiene el procesado de un caso cuando ha llegado a 20.000 partículas.
- g/ Terminado un caso, se almacena la información y el Citómetro proporciona una copia mediante documento escrito.
- h/ Entre los casos a leer se ha procesar un grupo control, para que nos sirva de referencia a la hora de interpretar los histogramas.
- i/ Terminados los casos que queramos procesar, es indispensable el realizar un lavado de los circuitos con lejía y agua, mediante un programa determinado.

Canal en Citometría de Flujo, se denomina a cada una de las subdivisiones correspondientes al eje de las equis que forman un histograma. Cada canal corresponde a un valor numérico procedente de las señales de fluorescencia recibidas por el Citómetro.

El Citómetro con que se realizó este trabajo constaba de 1024 canales.

Comentario a la etapa de utilización del Citómetro de Flujo.- La calibración del citómetro es muy importante, se realiza con unas bolitas de material inerte que simulan células. Estas bolitas salen representadas en la pantalla

pudiéndose objetivar el grado de dispersión que presentan, para de esta manera conseguir un mayor agrupamiento, mediante la variación de parámetros como son voltaje y fluorescencia o modificar manualmente la cámara del citómetro para conseguir que la incidencia del láser sobre las células sea plena.

Durante la maniobra de aspirado es aconsejable agitar suavemente el tubo de ensayo para evitar que los núcleos se sedimenten.

Seleccionando individualmente cada histograma, se pueden movilizar 4 cursores que son a modo de segmentos en los que las puntas indican el canal donde se encuentran y la longitud, el número de células comprendidas entre cada canal.

Si se desea, con los cursores podríamos conocer el número de células que se encuentran en cada fase (G0-G1, S y G2-M), mediante la localización en la pantalla de los diversos picos del histograma y el englobe mediante los cursores de las áreas correspondientes.

Durante la utilización del Citómetro de Flujo deberemos vigilar los niveles de residuos o líquido propulsor que utiliza el citómetro, de esta manera nos evitaremos múltiples molestias, inconvenientes y averías.

Para finalizar, hemos realizado un metódico proceso para desconectar el citómetro, utilizando un programa denominado "Shut Down", este programa indica la manera de parar adecuadamente el citómetro de flujo.

D.- VARIABLES A MEDIR

En este estudio se han obtenido para cada caso, dos variables de máximo interés, que son:

1.- PLOIDIA

2.- FASE S

La Ploidía es una variable cualitativa, pudiendo expresarse como euploidía o aneuploidía.

La Fase S es una variable cuantitativa.

Otras variables medidas han sido:

- El valor de la fase G0-G1.
- El valor de la fase G2-M.

La Ploidía es una variable de gran importancia para el estudio, por ser un parámetro de malignidad. Según numerosos estudios los tumores con características diploides

(euploides) tienen menor malignidad que los aneuploides. 164,167,169,175

La Fase S, es otra variable también relacionada con la agresividad tumoral. Tumores con una pequeña fase S, presentan un comportamiento menos agresivo que los que tienen una fase S elevada. 132,177,179

Los valores de la Fase S se han dividido en tres categorías:

Fase S pequeña = Fase S < 7

Fase S mediana = 7.1 > Fase S < 11.9

Fase S alta = Fase S > 12

E.- INTERPRETACION DE LAS VARIABLES

Los histogramas se pueden interpretar de forma objetiva mediante el empleo de varios programas internacionalmente aceptados. En este trabajo se ha utilizado el denominado **EPICS CYTOLOGIC SOFTWARE. Versión 2.01.**¹⁹⁶ (Coulter Co.).

Este programa está preparado para realizar una interpretación de forma matemática de un histograma, calculando el número de células y el tanto por ciento de estas, que se encuentran en cada fase del ciclo celular. Consta de 4 métodos distintos de análisis.

Los pasos a seguir dentro del programa para la interpretación de los histogramas son los siguientes:

- 1.- Cargar la memoria del ordenador con los diversos histogramas archivados en un disco blando.
- 2.- Selección del tipo de fluorescencia a emplear, en nuestro caso la FL2.
- 3.- Selección del programa DNA.
- 4.- En la pantalla aparecerán diversos picos. El primer pico que se encuentra desde la izquierda a la derecha del gráfico es el correspondiente al tipo diploide ($2n$), que se identifica con la población de núcleos

en fase de presíntesis (G0-G1). A continuación sigue la fase de Síntesis (S), y el segundo pico lo forman los núcleos que están en Mitosis (G2-M). Si en el gráfico hay otros picos, pertenecen a las poblaciones aneuploides. Normalmente el primer pico aneuploide suele aparecer después de G0-G1, para tener su réplica G2-M también después de la fase G2-M de la población principal. Algunas veces algún pico se puede superponer, haciendo difícil su interpretación. En estas circunstancias se desechaba el caso.

- 5.- Con el histograma en pantalla se ha de seleccionar el área de interés. Existen unos cursores que deberán moverse a lo largo de la pantalla hasta delimitar los picos que realmente nos interesan. Si no se realiza esa selección, el ordenador utiliza toda el área de la pantalla. La idea de delimitar un área de interés es para eliminar de entrada detritus que no nos interesen y puedan interferir en la lectura.
- 6.- Otra forma de eliminar detritus es mediante la utilización del background. Que produce un recorte en la base de los histogramas.
- 7.- A continuación el programa delimita los picos G0-G1 y G2-M, pudiendo ser aceptados o no. Caso de no aceptarse. Pueden desplazarse los cursores hasta delimitar el pico deseado. Lo mismo ha de realizarse cuando aparecen picos aneuploides.
- 8.- Para seguir con la interpretación se ha de seleccionar uno de los cuatro métodos que nos da a

elegir el programa, que son:

Método 1: SFIT with Constant S-Phase Model.

Método 2: SFIT with Linear S-Phase Model.

Método 3: SFIT with Quadratic S-Phase Model.

Método 4: Multiple Broadened Rectangle S-Phase Model.

El método utilizado en este trabajo de investigación ha sido el **SFIT con un modelo de Fase S constante**, que calcula la **Fase S** mediante la obtención del número de células incluidas dentro de un rectángulo que abarca desde la base del pico G1 hasta el pico G2.

9.- Seleccionado el método a emplear el programa calcula los valores totales y porcentuales de células correspondientes a cada fase del ciclo celular. Obteniéndose una tabla de valores numéricos donde destaca la **fase S**, que es el principal valor de interés para nosotros, además del coeficiente de variación (CV), utilizado para desechar los casos si no se adaptaban dentro de unos parámetros congruentes (CV= 5.8 +/- 2.2).

Si el tumor es diploide, el procedimiento para el cálculo de la **Fase S** es sencillo. Pero si se trata de un tumor aneuploide, la valoración de las células en **fase S** es más complicada. Se han desechado casos

aneuploides en los que la valoración de la fase S era imposible, ya sea por tener un ID (Índice de DNA) inferior a 1.3 o superponerse la fase G2-M de la población diploide.

El cálculo de la Fase S se basa en el método utilizado por Baisch:¹⁹⁷

Para los tumores diploides:

número de eventos/10 X número del canal del pico diploide

100

Para los tumores aneuploides:

número de eventos/10 X número del canal del pico aneuploide

% de células aneuploides

10.- La otra variable a medir es la Ploidía.

Se ha considerado **aneuploide** todo tumor con un Índice de DNA superior a 1.2 o en cuyo histograma aparecieran más de un pico G0-G1.

Comentario a la interpretación de resultados.-

Respecto a la utilización del background, muchos trabajos lo consideran necesario con la finalidad de obtener valores de fase S más acertados.^{116,193}

Para la correcta interpretación de los resultados, a falta de un método objetivo, se han realizado numerosos experimentos, como por ejemplo enviar a diferentes centros histogramas del mismo tumor para que fueran evaluados. En uno de esos estudios,¹⁹⁸ se remitieron una serie de histogramas a 6 investigadores, para que se determinara la ploidía. Coincidiendo los seis en un 44% de los casos, cuando sólo eran cinco los investigadores que coincidían, se llegaba a un 85%. Esto da idea de la enorme dificultad o gran variedad de criterios existentes en la interpretación de los resultados obtenidos mediante Citometría de Flujo.

La interpretación de un histograma, se realiza mediante complicados métodos estadísticos y matemáticos.

Entre las principales preocupaciones a la hora de evaluar un histograma, están las interferencias que puedan causar los detritus y los falsos picos. Para salvar el primer inconveniente existen detallados estudios que facilitan algunas técnicas para llevarlo a cabo.^{117,198} Estos falsos picos pueden aparecer por:

- a/ Sufrir el tejido fenómenos de autólisis.¹⁹⁹
- b/ Mediante los métodos de fijación del tejido (formalina).
- c/ Una mala metodología de la preparación de las muestras. Ya sea a la hora de realizar el corte-s¹⁹⁸ del material seccionando núcleos, o en el resto

de pasos de la preparación.

El trabajo se ha realizado de una forma uniforme y metódica, poniendo especial énfasis en el periodo de preparación de la muestra, por la gran facilidad con que se puede ver alterada toda la técnica.²⁰⁰

En cuanto a la interpretación matemática de los histogramas, para evitar errores subjetivos, el estudio se ha ceñido estrechamente a los patrones dictados por el programa de interpretación de DNA (Epics Cytologic Software), mencionado anteriormente. Cuando algún caso no reunía las condiciones adecuadas (deformidad del histograma, exceso de detritus, valores de coeficiente de variación desmesurados), era descartado.

F.- ESTUDIO ESTADISTICO

En este trabajo de investigación se han interpretado los resultados utilizando el programa de estadística SPSS/PC+ (Versión 4.0).

Los datos obtenidos en el laboratorio se han evaluado estadísticamente mediante los métodos:

Prueba Chi Cuadrado para tablas de contingencia.

Tablas clásicas de supervivencia de Kaplan y Meier.

Prueba de Regresión Logística Múltiple.

Mediante el estudio univariante χ^2 , se ha relacionado:

1.- Cada una de las variables clásicas con los valores obtenidos mediante Citometría de Flujo de la fase S del tumor primario.

2.- Todas las variables clínico-patológicas tradicionales con la ploidía del tumor primario.

3.- Cada una de las variables del estudio con la supervivencia.

4.- Los valores de la fase S del tumor primario con los valores de la fase S de los ganglios axilares, de las metástasis, de las recidivas locorregionales y los ganglios axilares de esas recidivas.

5.- Los valores de la fase S del tumor primario con los valores de la ploidía obtenidos de los ganglios axilares, de las metástasis, de las recidivas locorregionales y de los

ganglios axilares de esas recidivas.

6.- Los valores de la **ploidía del tumor primario** con los valores de la ploidía obtenida en los ganglios axilares, en las metástasis, en las recidivas locorreregionales y en los ganglios axilares de esas recidivas.

7.- Los valores de la **ploidía del tumor primario** con los valores de la fase S de los ganglios axilares, de las metástasis, de las recidivas locorreregionales y de los ganglios axilares de esas recidivas.

Las tablas de supervivencia se han confeccionado en relación con la edad, antecedentes familiares de cáncer de mama, antecedentes personales mamarios, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, la aparición de metástasis (M) en el momento del diagnóstico y en el seguimiento, los receptores hormonales, el número de ganglios invadidos mediante determinación histológica, la **Fase S** y la **Ploidía** del tumor primario, las recidivas y la situación de pre-postmenopausia.

La regresión logística múltiple, es una prueba estadística que valora exclusivamente la probabilidad de supervivencia "al final" del estudio. Es el método multivariante empleado en este trabajo. Tras la inclusión de una serie de variables consideradas de mayor interés pronóstico, realiza una selección de las que mayor influencia tienen en la predicción de la supervivencia. Nos permite calcular la probabilidad de supervivencia en función de cualquier valor que pueda adoptar cada una de las

variables pertenecientes al estudio por separado.

La fórmula a emplear es:²⁰¹

$$P(\text{Superv}) = \frac{1}{1 + e^{-Z}}$$

Donde Z es:

$$Z = B_0 + B_1 \cdot X_1 + B_2 \cdot X_2 + \dots + B_n \cdot X_n$$

B y X son:

B_0 = Constante.

B_1 , B_2 , B_3 son los diversos valores de las constantes obtenidos para cada variable en el estudio de regresión logística.

X_1 , X_2 , X_3 son las diversas variables con las que se ha realizado el estudio.

A continuación se detallarán los resultados obtenidos tras el estudio de las diferentes variables y se aplicará el método estadístico correspondiente en cada caso con el fin de obtener la mayor información útil de la investigación.

RESULTADOS

RESULTADOS

En la elaboración de los resultados, inicialmente se realiza una descripción de todas las variables que intervienen en el estudio:

- Las variables clínico-patológicas obtenidas de la historia clínica de cada paciente.
- El contenido de DNA (Ploidía) correspondiente a cada masa tumoral estudiada mediante Citometría de Flujo.
- El valor de la fase de síntesis (Fase S), obtenido de cada tumor al ser procesado mediante Citometría de Flujo.

Con los datos de las diversas variables se ha realizado el estudio estadístico, basado en la utilización de tres pruebas:

Estudio univariante mediante χ^2 .

Tablas de supervivencia.

Regresión logística múltiple.

A.- RESULTADOS DE LAS VARIABLES CLINICO-PATOLOGICAS

En la tabla 2, se describe la variable edad, indica que una inmensa mayoría de pacientes se hallan en el periodo medio de la vida, para poder realizarse mejor los estudios estadísticos se ha tabulado en tres valores, menores de 35 años, entre 35 y 65 y mayores de 65.

Tabla 2.

Edad.			
Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
< 35	5	4.7	4.7
35-65	72	67.3	67.3
> 65	30	28.0	28.0
Total	107	100.0	100.0

Cáncer de mama

En las tablas 3 y 4 se describen los antecedentes familiares de cáncer de mama y personales de patología mamaria.

Tabla 3.

Antecedentes familiares de cáncer de mama.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
NO	48	44.9	80.0
SI	12	11.2	20.0
No figura	47	43.9	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 4.

Antecedentes personales de patología mamaria benigna y maligna.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
NO	40	37.4	67.8
SI	19	17.8	32.2
No figura	48	44.8	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

El número de embarazos que ha tenido cada paciente se ha evaluado, pero no se ha tenido en cuenta al realizar el trabajo de investigación, por ser una variable muy estudiada desde antaño y de escasa significación pronóstica. (Tabla 5).

Tabla 5.

Número de embarazos.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
0	6	5.6	9.4
1	8	7.5	12.5
2	27	25.2	42.2
3	14	13.1	21.9
4	5	4.7	7.8
5	3	2.8	4.7
7	1	0.9	1.6
No figura	43	40.2	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

En las tablas 6, 7 y 8 se describen el número de casos clasificados en función del valor de T, N y M.

Los diversos valores adoptados por cada variable son:

T 1 < 2 cm. T 2 = 2 - 5 cm. T 3 > 5 cm.

T 4 si se afecta piel o pared.

N 0 = No hay afectación ganglionar.

N 1 = Ganglios axilares móviles.

N 2 = Ganglios axilares fijos.

N 3 = Afectación de la cadena mamaria interna.

M 0 = No hay metástasis a distancia.

M 1 = Metástasis a distancia.

Tabla 6.

T Tamaño tumoral.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
T 1	18	16.8	17.3
T 2	36	33.6	34.6
T 3	25	23.4	24.0
T 4	25	23.4	24.0
No figura	3	2.8	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 7.

N Afectación ganglionar.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
N 0	37	34.6	35.6
N 1	52	48.6	50.0
N 2	14	13.1	13.5
N 3	1	0.9	1.0
No figura	3	2.8	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 8.

M Metástasis.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
M 0	86	80.4	82.7
M 1	18	16.8	17.3
No figura	3	2.8	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Citometría de Flujo

La mayoría de tumores estudiados han sido del tipo histológico, carcinoma ductal infiltrante, que representa sin lugar a dudas el más frecuente de los cánceres de mama. (Tabla 9).

Tabla 9.

Tipo histológico.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
C. Ductal I.	95	88.8	89.6
C. Medular.	6	5.6	5.7
C. Inflamatorio	1	0.9	0.9
Otros	4	3.7	3.8
No figura	1	0.9	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

La valoración de los receptores hormonales, desde hace un tiempo ya viene haciéndose de forma sistemática en nuestro medio. (Tablas 10 y 11)

Tabla 10.

Receptores Estrogénicos.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Negativos	18	16.8	24.0
Positivos	57	53.3	76.0
No figura	32	29.9	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 11.

Receptores Progestágenos.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Negativos	28	26.2	37.3
Positivos	47	43.9	62.7
No figura	32	29.9	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Acompañando a la cirugía, se realizó radioterapia en más de la mitad de las pacientes. Todos los casos con receptores hormonales negativos recibieron hormonoterapia. Con respecto a la quimioterapia, la ciclofosfamida fue el fármaco más utilizado. (Tablas 12, 13, 14)

Tabla 12.

Radioterapia.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
NO	44	41.1	44.4
SI	55	51.4	55.6
No figura	8	7.5	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 13.

Quimioterapia.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
NO	54	50.5	58.1
CMF	26	24.3	28.0
Genoxal,MTX,5-FU	2	1.9	2.2
CTX,MTX,5-FU	5	4.7	5.4
Altres	6	5.6	6.5
No figura	14	13.1	Perdidos
Total	107	100.0	100.

Tabla 14.

Hormonoterapia.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
NO	46	43.0	50.0
SI	46	43.0	50.0
No figura	15	14.0	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

En las tablas 15 y 16 se han valorado los casos que sufrieron una recidiva en el lecho quirúrgico o zona ganglionar durante el periodo de seguimiento, así como en los que se observó metástasis (óseas, hepáticas, pulmonares o cerebrales).

Tabla 15.

Recidivas locorregionales de partes blandas.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
NO	62	57.9	72.9
SI	23	21.5	27.1
No figura	22	20.6	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 16.

Aparición de metástasis en el seguimiento.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
NO	56	52.3	65.1
SI	30	28.0	34.9
No figura	21	19.6	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

En la tabla 17, se especifica el total de supervivientes y fallecimientos al final del estudio.

Tabla 17.

Supervivencia.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Muertos	39	36.4	36.4
Vivos	68	63.6	63.6
Total	107	100.0	100.0

Tabla 18.

Pacientes clasificados por estadios.

Estadios	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
0	0	0	0
I	15	14.0	14.4
II A	22	20.5	21.2
II B	18	16.8	17.3
III A	14	13.1	13.5
III B	17	15.9	16.3
IV	18	16.9	17.3
No Figura	3	2.8	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

B.- RESULTADOS DEL CONTENIDO DE DNA (PLOIDIA)

La ploidía o cantidad de DNA que expresa el material nuclear, considerada como una de las variables a investigar de mayor interés, se ha determinado en la totalidad de tumores primarios (Tabla 19), en los ganglios invadidos, pertenecientes a esos tumores primarios (Tabla 20), en las metástasis (Tabla 21), cuando una paciente sufría una recidiva y era extirpada quirúrgicamente, también se determinaba esta variable, tanto en la masa principal (Tabla 22), como en los ganglios (tabla 23).

Se considera a un tumor **diploide** ($2n$) mediante Citometría de Flujo, cuando el pico G0-G1 coincide con el Índice de DNA igual a 1, o con el pico G0-G1 del grupo control, en este caso linfocitos.

Un tumor es aneuploide cuando el pico G0-G1 no coincide con el Índice de DNA, o existen dos o más picos G0-G1 en el histograma obtenido mediante Citometría.

Tabla 19.

Ploidía del tumor primario.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Aneuploides	35	32.7	32.7
Diploides	72	67.3	67.3
Total	107	100.0	100.0

Tabla 20.

Ploidía de los ganglios axilares invadidos.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Aneuploides	20	18.7	35.7
Diploides	36	33.6	64.3
No figura	51	47.7	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 21.

Ploidía de las metástasis procesadas.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Aneuploides	1	0.9	11.1
Diploides	8	7.5	88.9
No figura	98	91.6	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 22.

Ploidía de las recidivas locorregionales de partes blandas.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Aneuploides	3	2.8	42.9
Diploides	4	3.7	57.1
No figura	100	91.6	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 23.

Ploidía de los ganglios axilares invadidos correspondientes a las recidivas locorregionales de partes blandas.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
Diploides	3	2.8	100.0
No figura	104	97.2	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

C.- RESULTADOS DEL CALCULO DE LA FASE S

La otra variable de máximo interés del estudio es el valor correspondiente a la fase S, que se determinó al igual que la ploidía en todas las muestras cancerosas obtenidas. (Tablas 24, 25, 26, 27, 28)

Se ha subdividido la fase S en tres grupos. Adoptándose como límites los siguientes:

Fase S pequeña = Valor de la fase S < de 7.

Fase S mediana = Valor de la fase S entre 7 y 12.

Fase S alta = Valor de la fase S superior a 12.

Tabla 24.

Fase S del tumor primario.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
< 7	15	14.0	14.0
7-12	45	42.1	42.1
> 12	47	43.9	43.9
Total	107	100.0	100.0

Tabla 25.

Fase S de los ganglios axilares invadidos.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
< 7	15	14.0	26.8
7-12	19	17.7	33.9
> 12	22	20.6	39.3
No figura	51	47.7	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 26.

Fase S de las metástasis.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
< 7	3	2.8	33.3
7-12	3	2.8	33.3
> 12	3	2.8	33.3
No figura	98	91.5	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 27.

Fase S de las recidivas locorregionales de partes blandas.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
< 7	3	2.8	37.5
7-12	3	2.8	37.5
> 12	2	1.9	25.0
No figura	99	92.5	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

Tabla 28.

Fase S de los ganglios axilares invadidos correspondientes a las recidivas locorregionales de partes blandas.

Valoración	Frecuencia	Porcentaje	% Válido
7-12	1	0.9	33.3
> 12	2	1.9	66.7
No figura	104	97.2	Perdidos
Total	107	100.0	100.0

D.- RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTADISTICO

1.- Estudio Univariante

Mediante la prueba estadística χ^2 , se ha relacionado el valor de la fase S, la ploidía y la supervivencia, con el resto de variables, además de ellas entre sí. Sólo se han tenido en cuenta las variables clásicas más significativas en relación al pronóstico (TNM, Receptores Hormonales, metástasis en el seguimiento, número de ganglios invadidos, situación hormonal de la paciente,..).

1a.- Relación de las variables clínico-patológicas de interés pronóstico con la fase S del tumor primario. Prueba Chi Cuadrado:

* Entre paréntesis se indica el valor del residual ajustado.

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Fase S</u>			<u>valor p</u>
		<u>< 7</u>	<u>7-12</u>	<u>> 12</u>	
<u>Edad</u>					
< 35	5	1 (0.4)	3 (0.8)	1 (-1.1)	N.S.
35-65	72	11 (0.5)	27 (-1.4)	34 (1.0)	p = 0.61
> 65	30	3 (-0.7)	15 (1.0)	12 (-0.5)	

Citometría de Flujo

Variable	Nº casos	Fase S			valor p
		< 7	7-12	> 12	
T					
T 1	18	3 (0.3)	7 (-0.3)	8 (0.1)	N.S.
T 2	36	5 (-0.1)	16 (0.3)	15 (-0.2)	p = 0.99
T 3	25	4 (0.3)	11 (0.2)	10 (-0.4)	
T 4	25	3 (-0.4)	10 (-0.3)	12 (0.5)	
N					
N 0	37	6 (0.4)	14 (-0.7)	17 (0.4)	N.S.
N 1	52	6 (-0.8)	24 (0.8)	22 (-0.2)	p = 0.83
N 2	14	3 (0.8)	5 (-0.5)	6 (0.0)	
N 3	1	0 (-0.4)	1 (1.2)	0 (-0.9)	
M					
M 0	86	14 (1.2)	40 (1.9)	32 (-2.7)	p = 0.02
M 1	18	1 (-1.2)	4 (-1.9)	13 (2.7)	
Receptores Estrogénicos					
Negativos	18	2 (-0.1)	10 (0.9)	6 (-0.8)	N.S.
Positivos	57	7 (0.1)	25 (-0.9)	25 (0.8)	p = 0.65
Receptores Progestágenos					
Negativos	28	2 (-0.1)	14 (0.4)	12 (0.2)	N.S.
Positivos	47	7 (1.0)	21 (-0.4)	19 (-0.2)	p = 0.60

Cáncer de mama

Fase S

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>< 12</u>	<u>> 12</u>	<u>valor p</u>
Antecedentes personales de patología mamaria				
NO	40	24 (1.7)	16 (-1.7)	N.S.
SI	16	6 (-1.7)	11 (1.7)	p = 0.08
Número de embarazos				
0	6	6 (2.1)	0 (-2.1)	
1	8	5 (0.2)	3 (-0.2)	N.S.
2	27	14 (-1.0)	13 (1.0)	p = 0.38
3	14	8 (-0.2)	6 (0.2)	
4	5	3 (0)	2 (0)	
5	3	1 (-0.9)	2 (0.9)	
7	1	1 (0.8)	0 (-0.8)	
Quimioterapia				
NO	54	32 (0.5)	22 (-0.5)	N.S.
CMF	26	15 (0.1)	11 (-0.1)	p = 0.57
G,MTX,5FU	2	0 (-1.6)	2 (1.6)	
CTX,MTX,5FU	5	3 (0.1)	2 (-0.1)	
Otros	6	3 (-0.4)	3 (0.4)	
Hormonoterapia				
NO	46	25 (-0.2)	21 (0.2)	N.S.
SI	46	26 (0.2)	20 (-0.2)	p = 0.83

Citometría de Flujo

Fase S

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>< 12</u>	<u>> 12</u>	<u>valor p</u>
Antecedentes familiares de cáncer de mama				
NO	48	30 (1.3)	18 (-1.3)	N.S.
SI	12	5 (-1.3)	7 (1.3)	p = 0.19

Radioterapia

NO	44	20 (-1.4)	24 (1.4)	N.S.
SI	55	33 (1.4)	22 (-1.4)	p = 0.14

Fase S

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>< 7</u>	<u>7-12</u>	<u>> 12</u>	<u>valor p</u>
Recidivas locorregionales de partes blandas.					
NO	62	6 (-2.4)	31 (2.3)	25 (-0.6)	p = 0.01
SI	23	7 (2.4)	5 (-2.3)	11 (0.6)	

Nº de ganglios invadidos en cada paciente

Ninguno	36	6 (0.8)	13 (-0.3)	17 (-0.3)	N.S.
1-2	14	3 (1.0)	5 (-0.2)	6 (-0.5)	p = 0.67
Más de 2	40	3 (-1.5)	16 (0.4)	21 (0.6)	

Situación en relación a la Menopausia

Premenopausia	24	7 (2.1)	7 (-1.5)	10 (0.0)	N.S.
Menopausia	72	8 (-2.1)	34 (1.5)	30 (0.0)	p = 0.07

Metástasis aparecidas en el seguimiento

NO	56	8 (-0.3)	28 (1.8)	20 (-1.6)	N.S.
SI	30	5 (0.3)	9 (-1.8)	16 (1.6)	p = 0.18

1b.- Relación de las variables clínico-patológicas de interés pronóstico con la ploidía del tumor primario. Prueba Chi Cuadrado.

* Entre paréntesis se indica el valor del residual ajustado.

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Aneuploides</u>	<u>Diploides</u>	<u>Valor p</u>
Edad				
< 35	5	3 (1.3)	2 (-1.3)	N.S.
35-65	72	25 (0.6)	47 (-0.6)	p = 0.22
> 65	30	7 (-1.3)	23 (1.3)	
T				
T 1	18	3 (-1.6)	15 (1.6)	N.S.
T 2	36	13 (0.5)	23 (-0.5)	p = 0.12
T 3	25	12 (1.9)	13 (-1.9)	
T 4	25	6 (-1.1)	19 (1.1)	
N				
N 0	37	12 (0.0)	25 (0.0)	N.S.
N 1	52	16 (-0.4)	36 (0.4)	p = 0.74
N 2	14	6 (0.9)	8 (-0.9)	
N 3	1	0 (-0.7)	1 (0.7)	

Citometría de Flujo

Variable	N^o casos	Aneuploides	Diploides	Valor p
M				
NO	86	26 (-1.2)	60 (1.2)	N.S.
SI	18	8 (1.2)	10 (-1.2)	p = 0.24
Receptores Estrogénicos				
Negativos	18	7 (0.6)	11 (-0.6)	N.S.
Positivos	57	18 (-0.6)	39 (0.6)	p = 0.56
Receptores Progestágenos				
Negativos	28	15 (2.9)	13 (-2.9)	p = 0.004
Positivos	47	10 (-2.9)	37 (2.9)	
Antecedentes familiares de cáncer de mama				
NO	48	17 (-1.2)	31 (-1.2)	N.S.
SI	12	2 (-1.2)	10 (1.2)	p = 0.21
Antecedentes personales de patología mamaria				
NO	40	12 (-0.4)	28 (0.4)	N.S.
SI	17	6 (0.4)	11 (-0.4)	p = 0.69

<u>Variable</u>	<u>N^o casos</u>	<u>Aneuploides</u>	<u>Diploides</u>	<u>Valor p</u>
Número de embarazos				
0	6	3 (0.8)	3 (-0.8)	
1	8	4 (1.0)	4 (1.0)	N.S.
2	27	9 (-0.1)	18 (0.1)	p = 0.66
3	14	5 (0.1)	9 (-0.1)	
4	5	1 (-0.7)	4 (0.7)	
5	3	0 (-1.3)	3 (1.3)	
7	1	0 (-0.7)	1 (0.7)	

Recidivas locorregionales de partes blandas.

NO	62	17 (-1.0)	45 (1.0)	N.S.
SI	23	9 (1.0)	14 (-1.0)	p = 0.29

<u>Variable</u>	<u>N^o casos</u>	<u>Aneuploides</u>	<u>Diploides</u>	<u>Valor p</u>
N^o de ganglios invadidos en cada paciente				

Ninguno	36	12 (-0.4)	24 (0.4)	N.S.
1-2	14	4 (-0.6)	10 (0.6)	p = 0.69
> 2	40	16 (0.8)	24 (-0.8)	

Situación en relación con la menopausia

Premenopausia	24	7 (-0.5)	17 (0.5)	N.S.
Menopausia	72	25 (0.5)	47 (-0.5)	p = 0.61

Aparición de metástasis en el seguimiento

NO	56	16 (-0.8)	40 (0.8)	N.S.
SI	30	11 (0.8)	19 (-0.8)	p = 0.44

Citometría de Flujo

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Aneuploides</u>	<u>Diploides</u>	<u>Valor p</u>
Quimioterapia				
NO	54	16 (-0.6)	38 (0.6)	
CMF	26	13 (2.3)	11 (-2.3)	p = 0.05
G,MTX,5FU	2	1 (0.5)	2 (-0.5)	
CTX,MTX,5FU	5	0 (-1.6)	5 (1.6)	
Otros	6	0 (-1.7)	6 (1.7)	
Hormonoterapia				
NO	46	17 (0.9)	29 (-0.9)	N.S.
SI	46	13 (-0.9)	33 (0.9)	p = 0.37
Radioterapia				
NO	44	15 (0.1)	29 (-0.1)	N.S.
SI	55	18 (-0.1)	37 (0.1)	p = 0.88

1c.- Relación de todas las variables estudiadas con la supervivencia. Prueba Chi Cuadrado.

* Entre paréntesis se indica el valor del residual ajustado.

<u>Variable</u>	<u>N^o casos</u>	<u>Muertos</u>	<u>Vivos</u>	<u>Valor p</u>
Edad				
< 35	5	1 (-0.8)	4 (0.8)	N.S.
35-65	72	27 (0.3)	45 (-0.3)	p = 0.7
> 65	30	11 (0.0)	19 (0.0)	
Antecedentes personales de patología mamaria				
NO	40	11 (-1.0)	29 (1.0)	N.S.
SI	17	7 (1.0)	10 (-1.0)	p = 0.30
Número de embarazos				
0	6	0 (-1.5)	6 (1.5)	
1	8	3 (0.7)	5 (-0.7)	N.S.
2	27	6 (-0.7)	21 (0.7)	p = 0.37
3	14	5 (0.9)	9 (-0.9)	
4	5	1 (-0.3)	4 (0.3)	
5	3	2 (1.6)	1 (-1.6)	
7	1	0 (-0.6)	1 (0.6)	

Citometría de Flujo

<u>Variable</u>	<u>N^o casos</u>	<u>Muertos</u>	<u>Vivos</u>	<u>Valor p</u>
-----------------	----------------------------	----------------	--------------	----------------

T

T 1	18	3 (-2.0)	15 (2.0)	
T 2	36	9 (-1.9)	27 (1.9)	p=0.008
T 3	25	13 (1.7)	12 (-1.7)	
T 4	25	14 (2.2)	11 (-2.2)	

N

N 0	37	10 (-1.6)	27 (1.6)	N.S.
N 1	52	20 (0.2)	32 (-0.2)	p = 0.12
N 2	14	8 (1.6)	6 (-1.6)	
N 3	1	1 (1.3)	0 (-1.3)	

<u>Variable</u>	<u>N^o casos</u>	<u>Muertos</u>	<u>Vivos</u>	<u>Valor p</u>
-----------------	----------------------------	----------------	--------------	----------------

M

M 0	86	25 (-3.9)	61 (3.9)	p=0.0001
M 1	18	14 (3.9)	4 (-3.9)	

Tipo Histológico

C. Ductal I.	95	36 (0.7)	59 (-0.7)	N.S.
C. Medular	6	1 (-1.1)	5 (1.1)	p = 0.38
C. Informat.	1	1 (1.3)	0 (-1.3)	
Otros	4	1 (-0.5)	3 (0.5)	

Receptores Estrogénicos

Negativos	18	4 (-0.9)	14 (0.9)	N.S.
Positivos	57	19 (0.9)	38 (-0.9)	p = 0.37

Cáncer de mama

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Muertos</u>	<u>Vivos</u>	<u>Valor p</u>
Receptores Progestágenos				
Negativos	28	8 (-0.3)	20 (0.3)	N.S.
Positivos	47	15 (0.3)	32 (-0.3)	p = 0.76
Número de ganglios axilares afectados (N histológico)				
Ninguno	36	10 (-1.8)	26 (1.8)	p = 0.01
1-2	14	3 (-1.5)	11 (1.5)	
3 o más	40	22 (2.8)	18 (-2.8)	
Menopausia				
NO	24	9 (0.2)	15 (-0.2)	N.S.
SI	72	25 (-0.2)	47 (0.2)	p = 0.80
Radioterapia				
NO	44	15 (-0.2)	29 (0.2)	N.S.
SI	55	20 (0.2)	35 (-0.2)	p = 0.81
Quimioterapia				
NO	54	16 (-0.9)	38 (0.9)	N.S.
CMF	26	8 (-0.3)	18 (0.3)	p = 0.09
Ge MTX 5FU	2	2 (2.0)	0 (-2.0)	
CTX MTX 5FU	5	1 (-0.7)	4 (0.7)	
Otros	6	4 (1.8)	2 (-1.8)	
Hormonoterapia				
NO	46	15 (-0.4)	31 (0.4)	N.S.
SI	46	17 (0.4)	29 (-0.4)	P = 0.66

Citometría de Flujo

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Muertos</u>	<u>Vivos</u>	<u>Valor p</u>
Recidivas locorregionales de partes blandas.				
NO	62	19 (-1.8)	43 (1.8)	N.S.
SI	23	12 (1.8)	11 (-1.8)	p = 0.06

Aparición de Metástasis en el seguimiento del paciente

NO	56	12 (-3.9)	44 (3.9)	p=0.0001
SI	30	19 (3.9)	11 (-3.9)	

Ploidía del tumor primario

Aneuploides	35	14 (0.5)	21 (-0.5)	N.S.
Diploides	72	25 (-0.5)	47 (0.5)	p = 0.59

Ploidía de los ganglios invadidos

Aneuploides	20	8 (-0.7)	12 (0.7)	N.S.
Diploides	36	18 (0.7)	18 (-0.7)	p = 0.47

Ploidía de las metástasis

Aneuploides	1	1 (0.8)	0 (-0.8)	N.S.
Diploides	8	5 (-0.7)	3 (0.8)	p = 0.45

Ploidía de recidivas locorregionales de partes blandas.

Aneuploides	3	1 (-0.4)	2 (0.4)	N.S.
Diploides	4	2 (0.4)	2 (-0.4)	p = 0.65

Ploidía de los ganglios axilares correspondientes a las recidivas locorregionales de partes blandas.

Diploides	3	1 ()	2 ()	N.S.
-----------	---	-------	-------	------

Variable Nº casos Muertos Vivos Valor p

Fase S del tumor primario

< 7	15	4 (-0.8)	11 (0.8)	p=0.005
7-12	45	10 (-2.6)	35 (2.6)	
> 12	47	25 (3.2)	22 (-3,2)	

Fase S de los ganglios invadidos

< 7	15	2 (-3.0)	13 (3.0)	p<0.0006
7-12	19	6 (-1.6)	13 (1.6)	
> 12	22	18 (4.3)	4 (-4.3)	

Fase S de las metástasis procesadas

< 7	3	3 (1.5)	0 (-1.5)	N.S.
7-12	3	1 (-1.5)	2 (1.5)	p = 0.22
> 12	3	2 (0.0)	1 (0.0)	

Fase S de las recidivas locorregionales de partes blandas.

< 7	3	2 (0.7)	1 (-0.7)	N.S.
7-12	3	0 (-2.2)	3 (2.2)	p = 0.06
> 12	2	2 (1.6)	0 (-1.6)	

Fase S de los ganglios axilares invadidos correspondientes a recidivas locorregionales de partes blandas.

7-12	1	1 (1.7)	0 (-1.7)	N.S.
> 12	2	0 (-1.7)	2 (1.7)	p = 0.08

1d.- Relación entre: Valor de la fase S del tumor primario y los diferentes valores de fase S de las muestras. Prueba Chi Cuadrado.

* Entre paréntesis se indica el valor del residual ajustado.

Variable	N ^o casos	Fase S			valor p
		< 7	7-12	> 12	
Fase S de los ganglios invadidos					
< 7	15	4 (2.3)	7 (0.5)	4 (-0.2)	p = 0.03
7-12	19	1 (-0.9)	10 (1.3)	8 (-0.7)	
> 12	22	1 (-1.2)	6 (-1.7)	15 (2.4)	

Fase S de las metástasis

< 7	3	0 (-0.8)	1 (0.0)	2 (0.5)	N.S.
7-12	3	0 (-0.8)	2 (1.5)	1 (-0.9)	p = 0.35
> 12	3	1 (1.5)	0 (-1.5)	2 (0.5)	

Fase S correspondiente a las recidivas locorregionales de partes blandas.

< 7	3	1 (0.4)	--	2 (-0.4)	N.S.
7-12	3	1 (0.4)	--	2 (-0.4)	p = 0.64
> 12	2	0 (-0.9)	--	2 (0.9)	

1e.- Relación entre: Valor de la fase S del tumor primario y los diferentes valores de ploidía de las muestras. Prueba Chi Cuadrado.

* Entre paréntesis se indica el valor del residual ajustado.

Variable	N ^o casos	Fase S			valor p
		< 7	7-12	> 12	
Ploidía de los tumores primarios					
Aneuploides	35	2 (-1.7)	13 (-0.7)	20 (1.9)	N.S.
Diploides	72	13 (1.7)	32 (0.7)	27 (-1.9)	p = 0.08
Ploidía de los ganglios invadidos					
Aneuploides	20	0 (-1.9)	9 (0.4)	11 (0.8)	N.S.
Diploides	36	6 (1.9)	14 (-0.4)	16 (-0.8)	p = 0.15
Ploidía de las metástasis					
Aneuploides	1	0 (-0.4)	0 (-0.8)	1 (0.9)	N.S.
Diploides	8	1 (0.4)	3 (0.8)	4 (-0.9)	p = 0.63
Ploidía de las recidivas locorregionales de partes blandas.					
Aneuploides	3	1 (1.2)	--	2 (-1.2)	N.S.
Diploides	4	0 (-1.2)	--	4 (1.2)	p = 0.21

Citometría de Flujo

Al relacionar las variables Fase S (<7, 7-12, >12) y Ploidía del tumor primario, no ha aparecido más que una gran tendencia estadística ($p=0.08$), pero realizando una división simplemente en fase S alta (> 12) y fase S baja (<12), la valoración estadística ha resultado ser significativa ($p=0.05$).

<u>Variable</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Fase S</u>		<u>valor p</u>
		<u>< 12</u>	<u>> 12</u>	
Ploidía de los tumores primarios				
Aneuploides		15 (-1.9)	20 (1.9)	p = 0.05
Diploides		45 (1.9)	27 (-1.9)	

1f.- Relación entre: Valor de la ploidía del tumor primario y los diferentes valores de ploidía de las muestras. Prueba Chi Cuadrado.

* Entre paréntesis se indica el valor del residual ajustado.

<u>Variable</u>	<u>N^o casos</u>	<u>Aneuploides</u>	<u>Diploides</u>	<u>Valor p</u>
Ploidía de los ganglios invadidos				
Aneuploides	20	16 (4.9)	4 (-4.9)	p < 0.0005
Diploides	36	5 (-4.9)	31 (4.9)	
Ploidía de las metástasis				
Aneuploides	1	1 (1.5)	0 (-1.5)	N.S.
Diploides	8	2 (-1.5)	6 (1.5)	p = 0.13
Ploidía de las recidivas locorreregionales de partes blandas.				
Aneuploides	3	2 (-0.2)	1 (0.2)	N.S.
Diploides	4	3 (0.2)	1 (-0.2)	p = 0.80

1g.- Relación entre: Valor de la ploidía del tumor primario y los diferentes valores de fase S de las muestras. Prueba Chi Cuadrado.

* Entre paréntesis se indica el valor del residual ajustado.

<u>Variable</u>	<u>N^o casos</u>	<u>Aneuploides</u>	<u>Diploides</u>	<u>Valor p</u>
Fase S de los ganglios invadidos				
< 7	15	4 (-1.0)	11 (1.0)	N.S.
7-12	19	11 (2.3)	8 (-2.3)	p = 0.07
> 12	22	6 (-1.3)	16 (1.3)	
Fase S de las metástasis				
< 7	3	2 (1.5)	1 (-1.5)	N.S.
7-12	3	1 (0.0)	2 (0.0)	p = 0.22
> 12	3	0 (-1.5)	3 (1.5)	
Fase S de las recidivas locorregionales de partes blandas.				
< 7	3	2 (0.2)	1 (-0.2)	N.S.
7-12	3	2 (0.2)	1 (-0.2)	p = 0.91
> 12	2	1 (-0.4)	1 (0.4)	
Fase S de los ganglios axilares de las recidivas locorregionales de partes blandas.				
7-12	1	0 (-0.9)	1 (0.9)	N.S.
> 12	2	1 (0.9)	1 (-0.9)	p = 0.38

2.- Tablas de Supervivencia

De acuerdo con los datos obtenidos la probabilidad de supervivencia a los 5 años de un paciente incluido en este estudio con una fase S < de 7 es de 0.64, si la fase S está entre 7-12 es de 0.84 y si la fase S es > 12 la probabilidad se sitúa en 0.45. El que la probabilidad de supervivencia para los valores de fase S < 7 y fase S entre 7-12 se invierta (sea más elevada para la fase S entre 7-12), se debe a la escasa diferencia existente entre esos dos parámetros pronósticos. Si los uniéramos, obtendríamos una gran significación estadística, diferenciándose una clara fase S < 12 con una buena supervivencia (79%), de una fase S > 12 con pequeña supervivencia (45%) ($p=0.03$).

Si buscamos la supervivencia a los 10 años encontramos que para una fase S < 7 le corresponde 0.64, para la fase S 7-12 le corresponde 0.57 y cuando la fase S es > 12 la supervivencia es de 0.23.

Con respecto al Índice de DNA (ploidía) de los diversos tumores primarios. La probabilidad de supervivencia de un tumor aneuploide a los 5 años es de 0.47, a un diploide le corresponde 0.68.

También se han calculado las gráficas de supervivencia correspondientes a otros factores pronósticos como edad, antecedentes familiares de cáncer de mama y personales de patología mamaria, T, N, M, n^o de ganglios afectados en cada paciente, el valor de los receptores hormonales (R.E., R.P.) y la situación de pre-postmenopausia.

GRAFICAS DE SUPERVIVENCIA

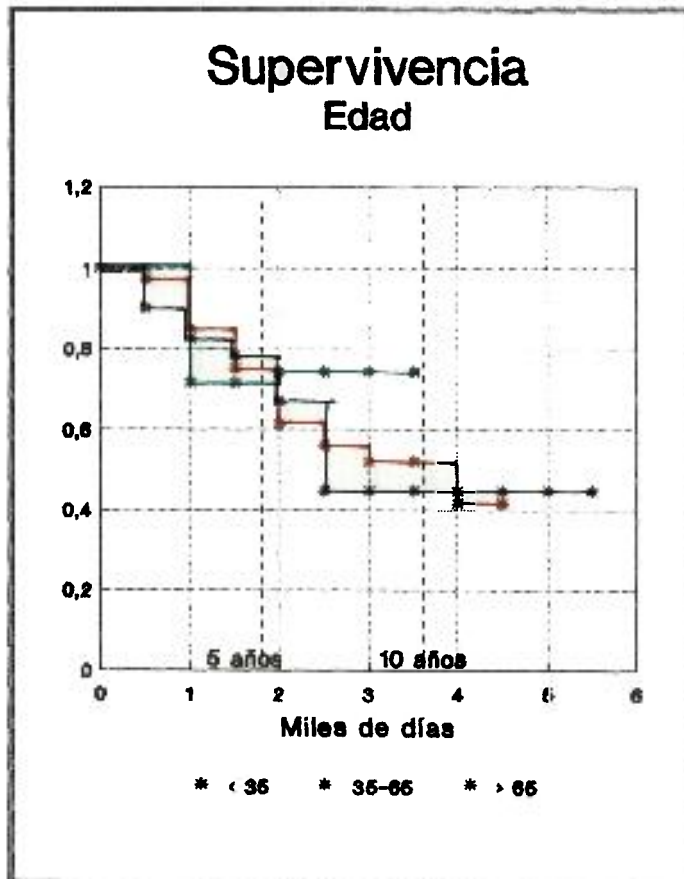


Fig. 18 . Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con la edad ($p=0.96$).

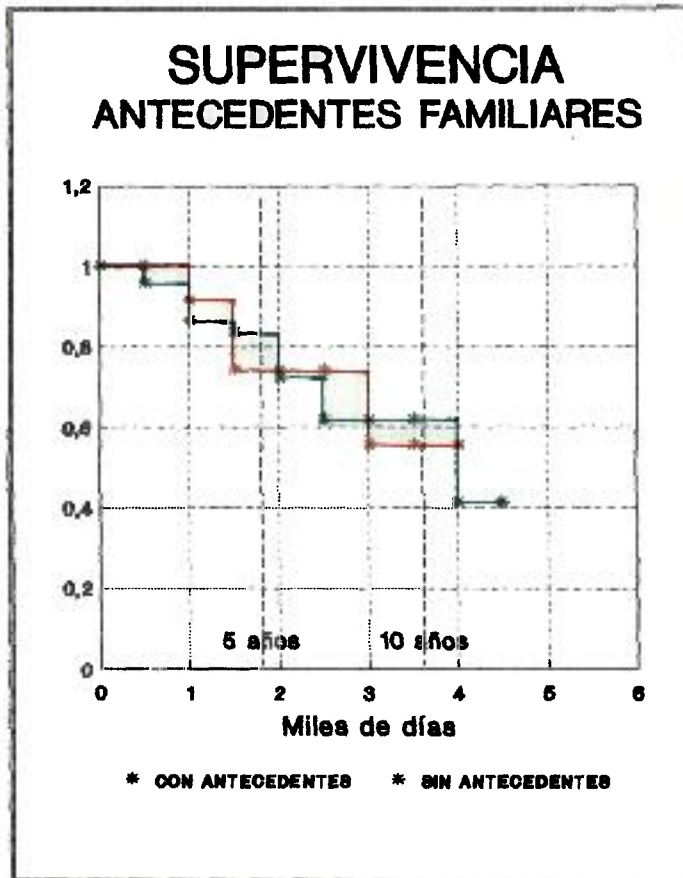


Fig. 19. Gráfica donde se representa la supervivencia en relación a los antecedentes familiares de cáncer de mama ($p=0.77$).

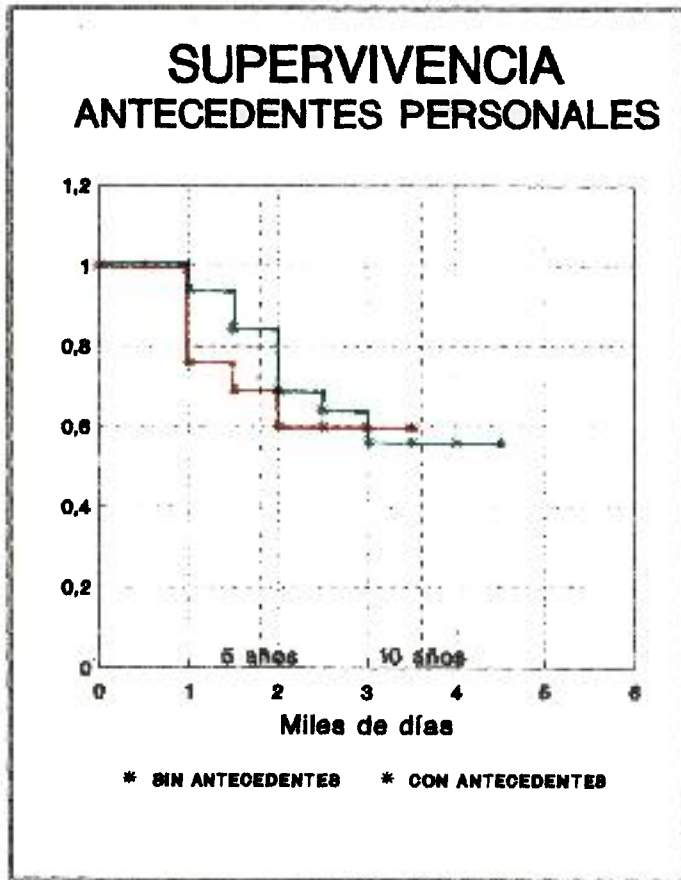


Fig. 20 . Gráfica representando la supervivencia en relación a los antecedentes personales de patología mamaria ($p=0.20$).

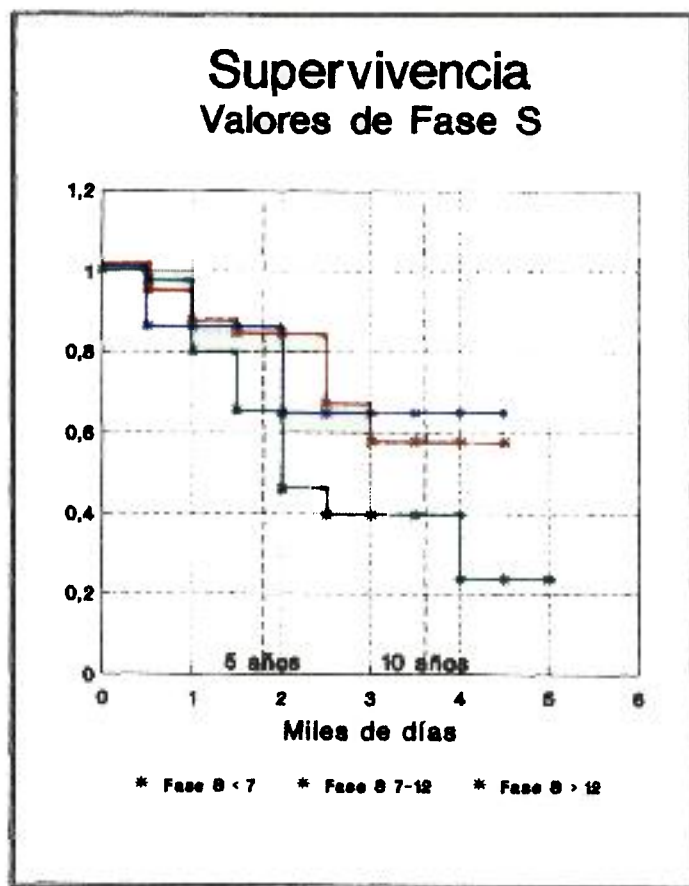


Fig. 21. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el valor de la fase S (< 7, 7-12, >12) del tumor primario (p = 0.09).

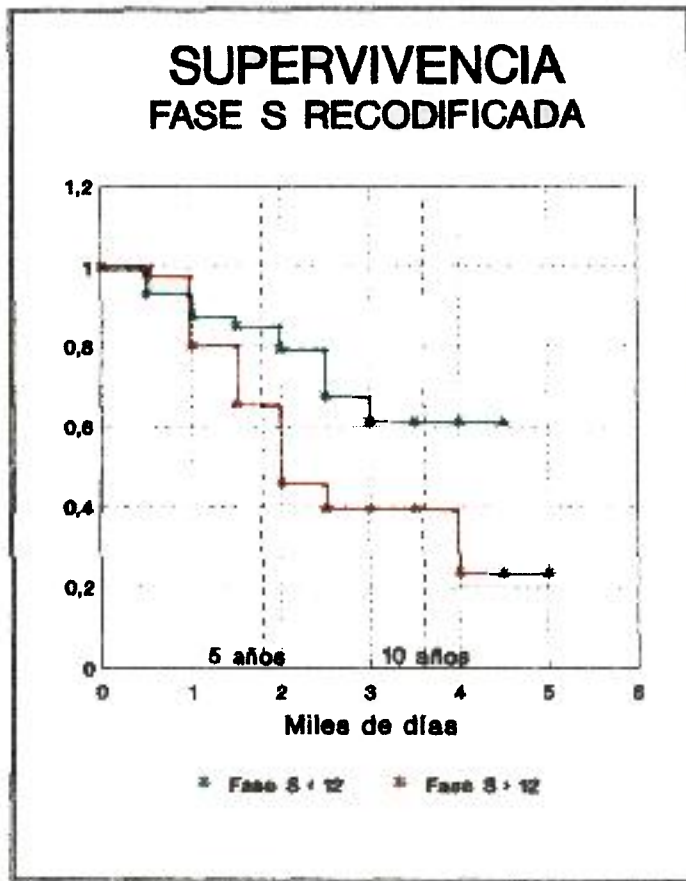


Fig. 22. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el valor de la fase S (< 12, > 12) del tumor primario (p=0.03).

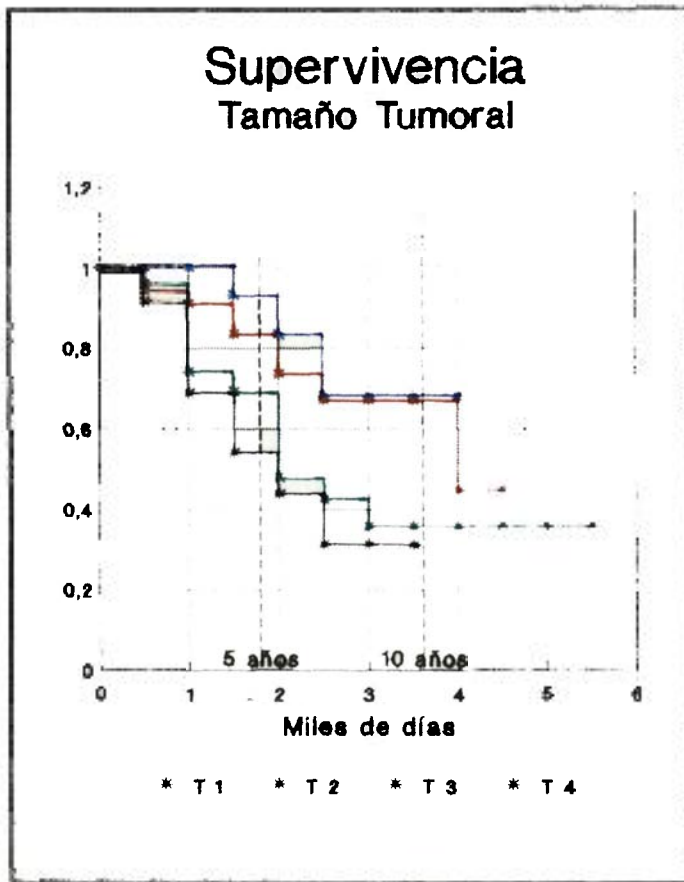


Fig. 23. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el valor del tamaño tumoral ($p=0.009$).

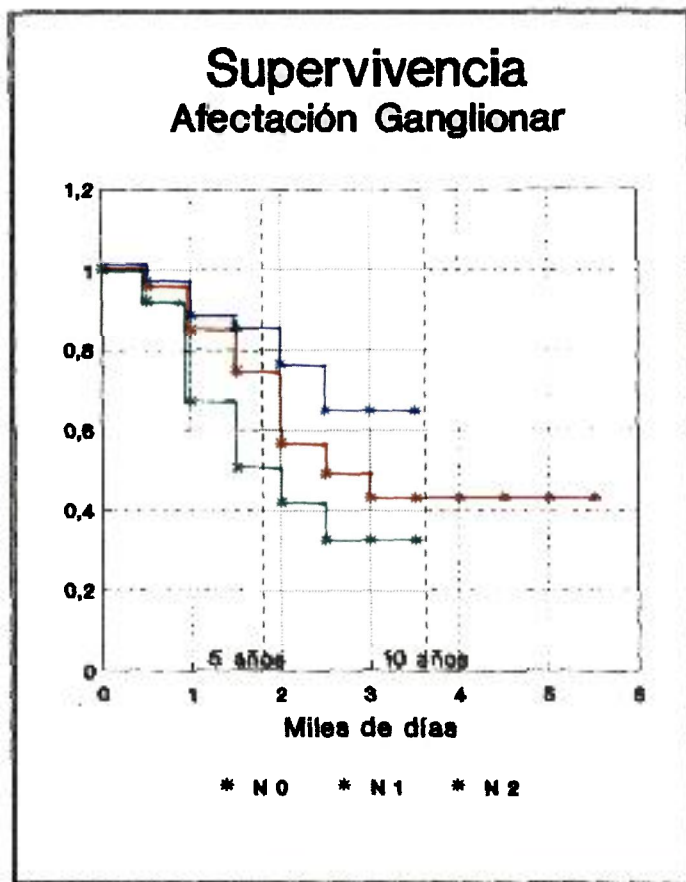


Fig. 24. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el valor de la afectación ganglionar ($p=0.02$).

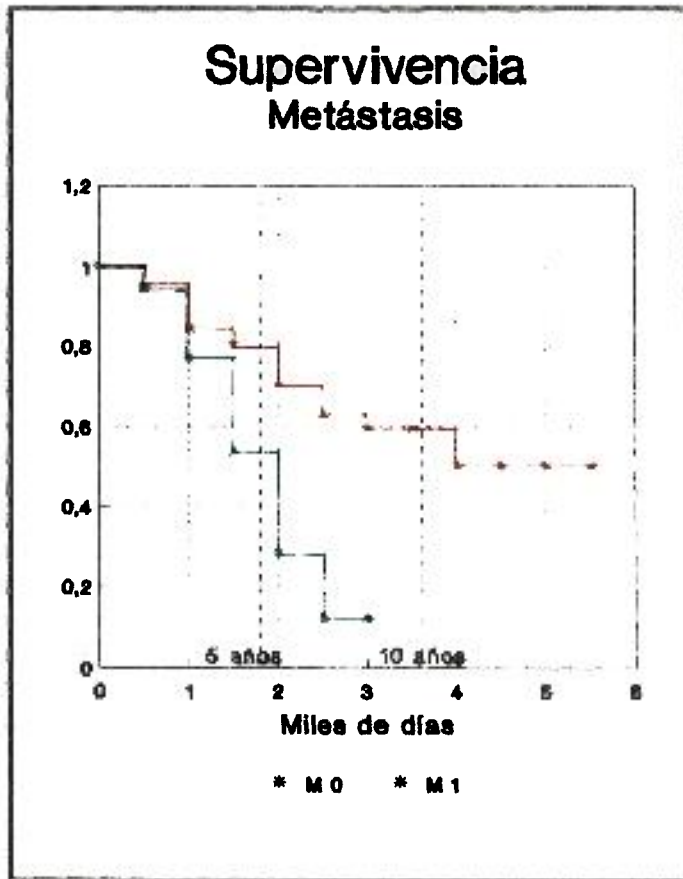


Fig. 25 . Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el valor de la M (metástasis) ($p=0.007$).

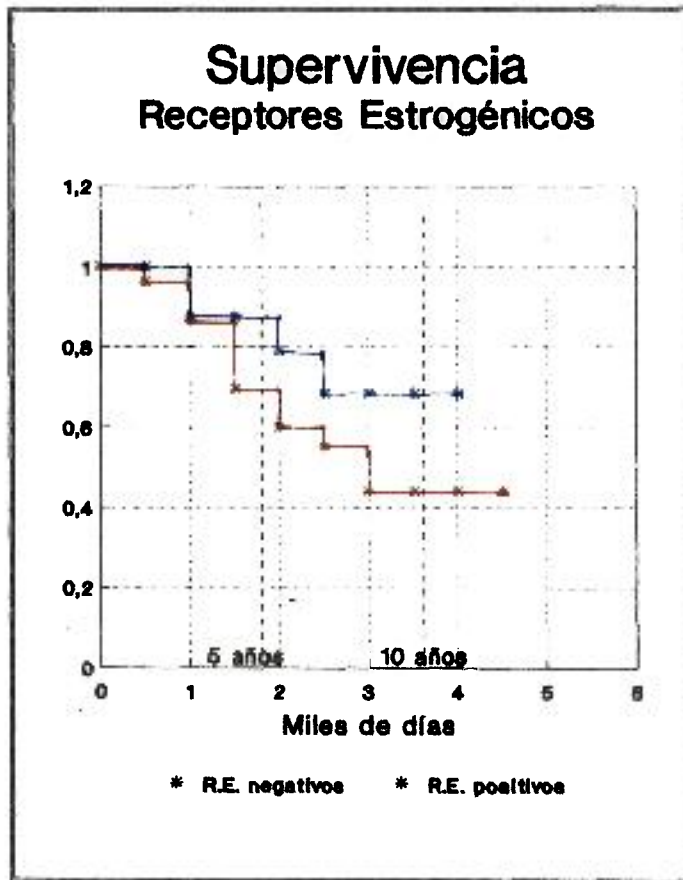


Fig. 26. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el valor de los Receptores Estrogénicos ($p=0.26$).

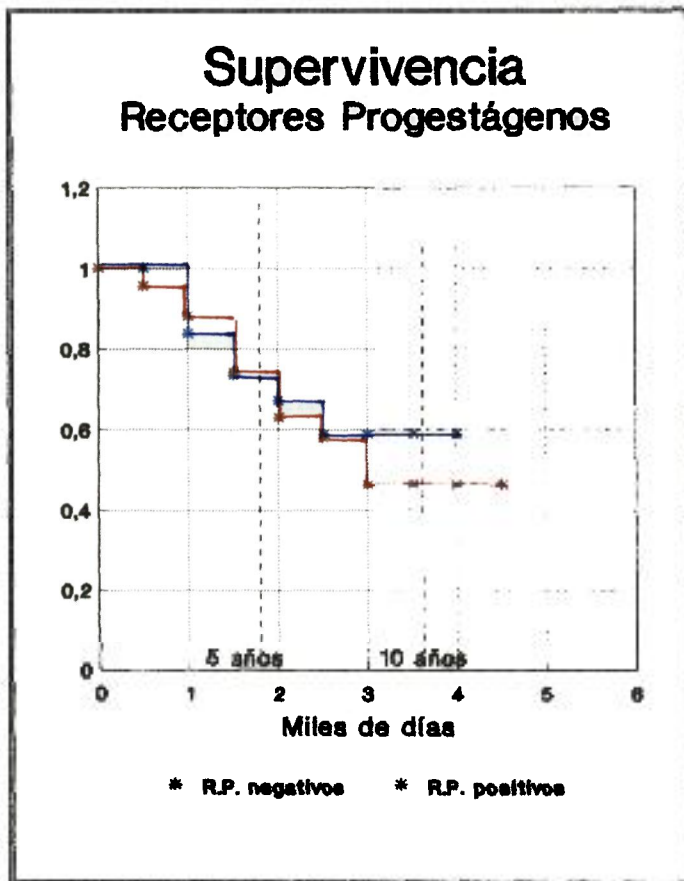


Fig. 27. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el valor de los Receptores Progestágenos ($p=0.94$).

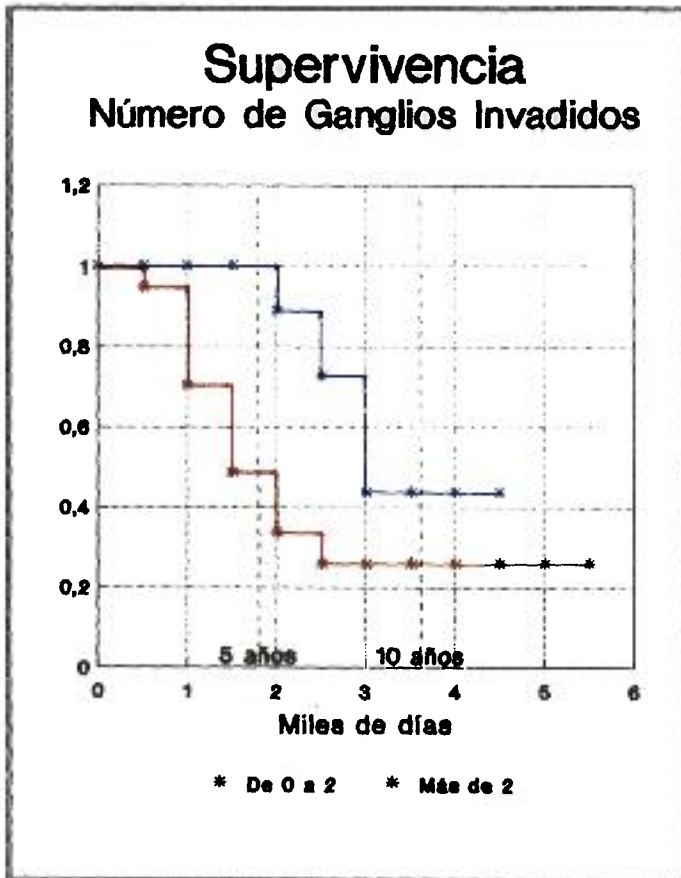


Fig. 28. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación con el número de ganglios invadidos (N Histológico) de cada individuo del estudio ($p=0.001$).

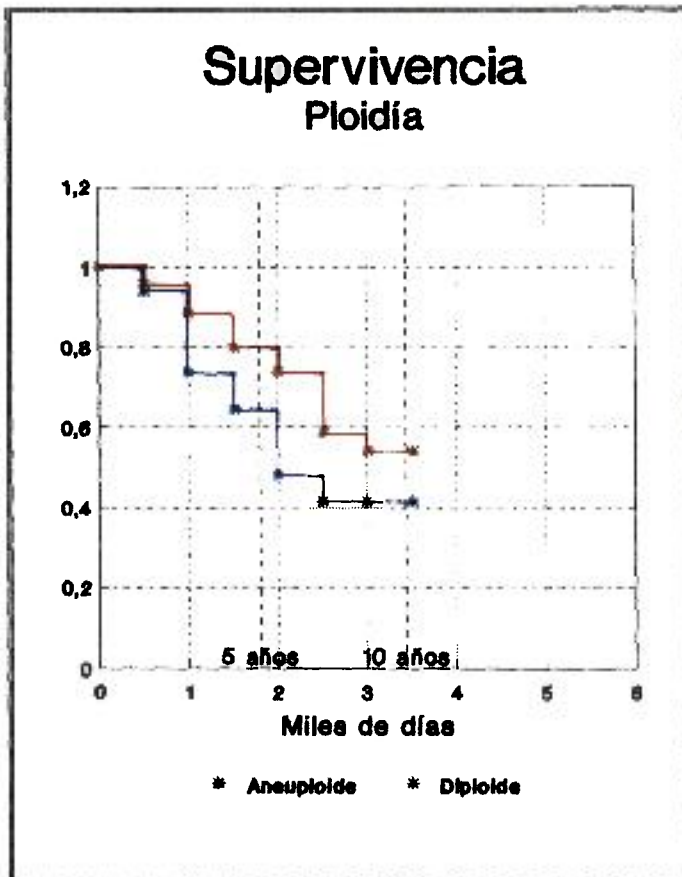


Fig. 29. Gráfica correspondiente a la supervivencia a los 5 años en relación con el valor de la ploidía ($p=0.05$).

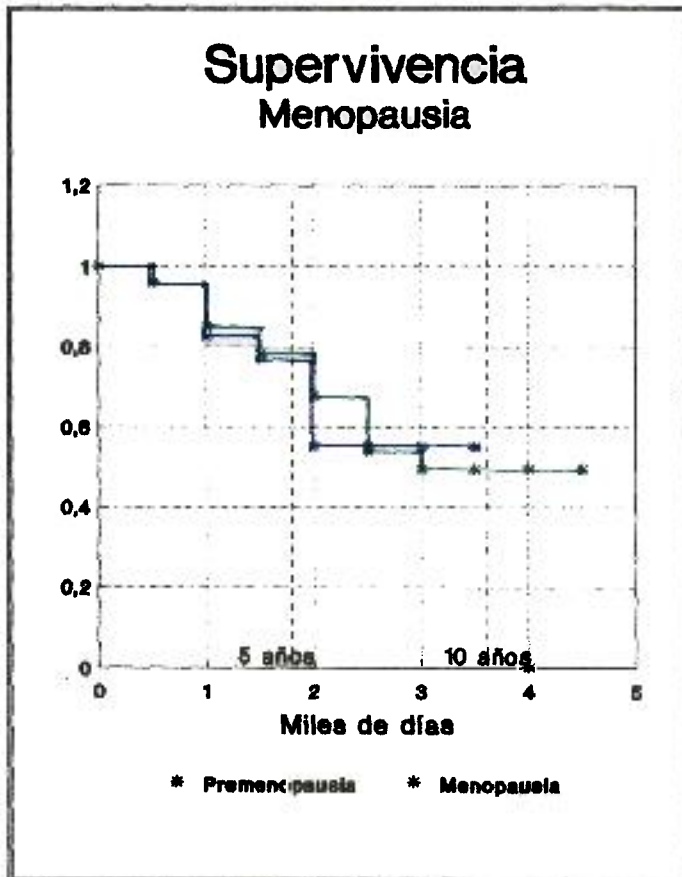


Fig. 30. Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación a la menopausia ($p = 0.76$).

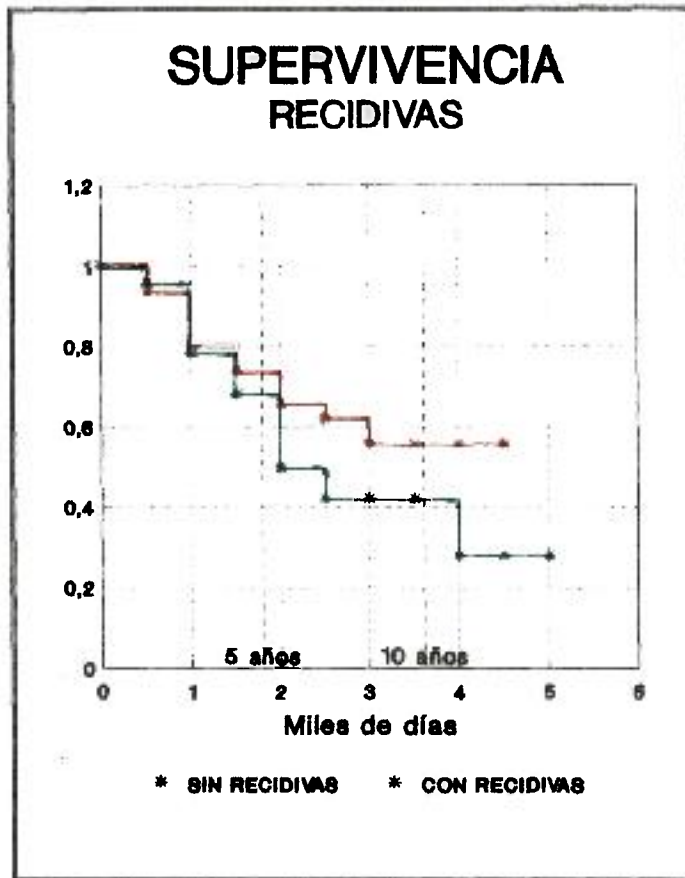


Fig. 31 . Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación a las recidivas locorregionales ($p=0.39$).

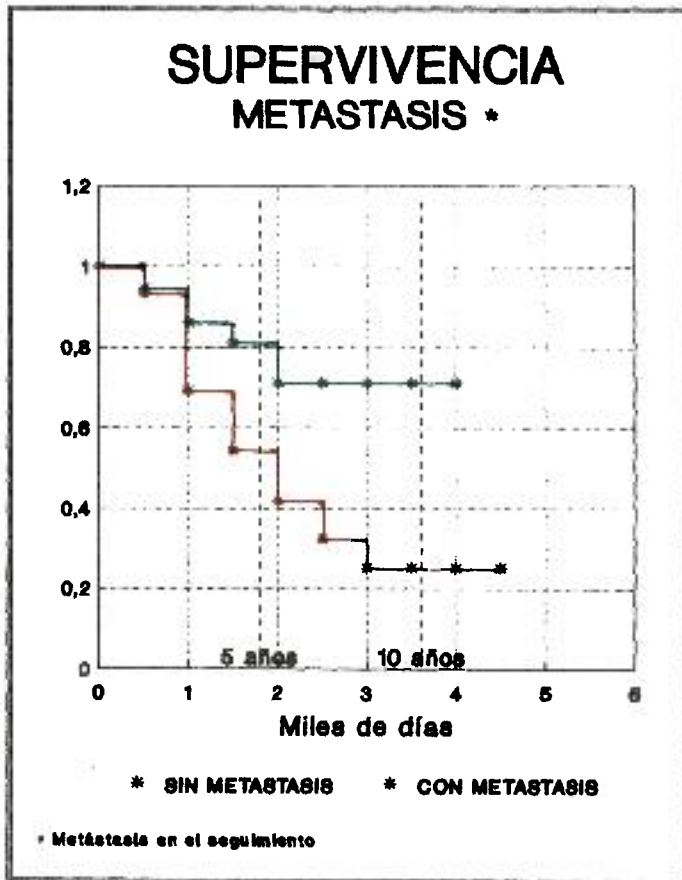


Fig. 32 . Gráfica correspondiente a la supervivencia global en relación a las metástasis diagnosticadas durante el seguimiento ($p=0.01$).

3.- Regresión Logística Múltiple

Esta prueba estadística, valora exclusivamente la probabilidad de supervivencia "al final" del estudio (en nuestro caso algo más de 10 años). Consideradas inicialmente ocho variables (T, N, M, aparición de metástasis en el seguimiento, número de ganglios aislados en cada paciente, pre-postmenopausia, valor de la ploidía y valor de la fase S), se van eliminando en la medida de lo posible, en función de su significación estadística con respecto a la predicción de probabilidad de supervivencia final. Con ello se selecciona el grupo de variables que desde un punto de vista estadístico, pueden considerarse buenas predictoras de probabilidad de supervivencia (P(S)). Al final del proceso se ha conseguido una probabilidad para predecir la supervivencia de un 86.36%, con una sensibilidad de un 92.86% y una especificidad de un 75%, permaneciendo en el estudio las variables T, N, M, metástasis aparecidas a lo largo del seguimiento, N histológico y el valor de Fase S.

Tabla inicial del estudio multivariable:

Variablen	B	S.E.	Significación
T	-1.1143	0.4903	0.0230
N	2.2367	1.2175	0.0662
M	-2.4526	1.5081	0.1039
Metástasis*	-2.9538	1.0987	0.0072
N Histologic	-0.8506	0.4777	0.0750
Menopausia	1.3890	0.9390	0.1391
Fase S	-1.5118	0.7371	0.0403
Ploidía	-0.4154	0.8660	0.6315
Constante	7.8312	3.0740	0.0108

* Metástasis aparecidas durante el seguimiento de la paciente.

La primera variable eliminada del estudio ha sido la ploidía. Quedando una probabilidad de supervivencia del 87.88%, con una sensibilidad y especificidad del 95.24% y 75% respectivamente.

Una segunda variable fue eliminada, el estado en relación con la menopausia, resultando una probabilidad de supervivencia de 83.33%, con una sensibilidad y especificidad respectivamente de 90.48% y 70.83%.

Aplicando la fórmula mencionada en el apartado de material y método, buscaremos la probabilidad de supervivencia correspondiente a cualquier valor que pueda adoptar una variable por separado.

La fórmula es:

$$P(\text{Superv}) = \frac{1}{1 + e^{-Z}}$$

Z es: $Z = B_0 + B_1 \cdot X_1 + B_2 \cdot X_2 + \dots + B_n \cdot X_n$

Los valores de B son: $B_0 = \text{Constante}$.

B_1, B_2, B_3, \dots los diversos valores de las constantes obtenidos para cada variable en el estudio de regresión logística.

Los valores de X_1, X_2, X_3, \dots son las diversas variables con las que se ha realizado el estudio. Tienen varios valores estipulados previamente que son:

$T = 1, 2, 3, 4.$

$N = 0, 1, 2, 3.$

$M = 0, 1.$

Metástasis * = 0, 1.

Nº de ganglios = 1, 2, 3. (1=ninguno, 2=1-2, 3= más de 2)

Fase S = 1, 2, 3. (1= < 7, 2= 7-12, 3= > 12)

La tabla de valores que se ha obtenido con este método estadístico es la siguiente:

Variables	B	S.E.	Significación
T	-0.9051	0.4373	0.0385
N	2.1421	1.1524	0.0631
M	-2.5565	1.4745	0.0830
N Histologic	-0.7963	0.4453	0.0738
Metástasis *	-2.5681	1.0045	0.0106
Fase S	-1.1409	0.6517	0.0800
Constante	6.5939	2.1179	0.0018

* Metástasis aparecidas durante el seguimiento de la paciente.

Aplicando la fórmula y ecuación anterior a esta tabla de valores podremos calcular cualquier valor de P(S).

Para nosotros resulta de gran interés hallar la probabilidad de supervivencia de los pacientes cuando los ganglios no están invadidos y cuando no existen metástasis, a fin de individualizar el tratamiento a impartir a cada paciente. Por lo cual pensamos que basándonos en la ayuda de un nuevo factor pronóstico como es el valor de la fase S podremos discernir mejor ese porcentaje de pacientes que siguen escapándose a las previsiones actuales.

Seguidamente se darán unos ejemplos de como se calcula esa probabilidad de supervivencia al final del estudio en función del valor que adopte la variable "fase S":

Ejemplo para T1N0M0 con fase S pequeña (< 7):

$$z = 6.5939 + (-0.9051 \times 1) + (-0.7963 \times 1) + (-1.1409 \times 1) = 3.7516$$

$$P(\text{Superv}) = \frac{1}{1 + e^{-z}} = \frac{1}{1 + e^{-3.7516}} = 0.977$$

Aplicando los mismos criterios se pueden obtener los demás valores de interés.

Ejemplos:

Probabilidad de supervivencia al final del estudio para los siguientes estadios de cáncer de mama.

T1N0M0 con fase S < 7, P (Supervivencia) = 0.977

T1N0M0 con fase S 7-12, P (Supervivencia) = 0.931

T1N0M0 con fase S > 12, P (Supervivencia) = 0.813

T2N0M0 con fase S < 7, P (Supervivencia) = 0.945

T2N0M0 con fase S 7-12, P (Supervivencia) = 0.846

T2N0M0 con fase S > 12, P (Supervivencia) = 0.637

T3N0M0 con fase S < 7, P (Supervivencia) = 0.874

T3N0M0 con fase S 7-12, P (Supervivencia) = 0.690

T3N0M0 con fase S > 12, P (Supervivencia) = 0.415

T4N0M0 con fase S < 7, P (Supervivencia) = 0.738

T4N0M0 con fase S 7-12, P (Supervivencia) = 0.473

T4N0M0 con fase S > 12, P (Supervivencia) = 0.223

DISCUSION
DE LOS
RESULTADOS

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La clasificación TNM clásica con sus estadios correspondientes, se ha mostrado de gran utilidad como medio de establecer un pronóstico y homogeneizar los resultados, así como establecer protocolos terapéuticos en los diferentes laboratorios y servicios asistenciales. Sin embargo, aunque las pacientes en Estadio I son consideradas como de buen pronóstico, aproximadamente el 30% de ellas,⁴¹ presentarán recidivas y morirán de la enfermedad dentro de los 10 primeros años que siguen al diagnóstico.

En la reciente Consensus Development Conference on Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer se ha concluido, que aunque la administración rutinaria de terapéutica sistémica (Q.T., H.T.) en estas mujeres en Estadio I de su enfermedad (con ganglios negativos), no debe ser indicada, se reconoce la existencia de un subgrupo de pacientes de alto riesgo, en las cuales el tratamiento sistémico deberá realizarse.²⁰²

La cuestión estriba en determinar, cuales son los marcadores o factores pronósticos adicionales que identifiquen este subgrupo de pacientes de alto riesgo (en Estadio I con ganglios negativos).

Desde la década de los setenta-ochenta, se han estudiado varios de estos marcadores, como son: los receptores de estrógenos y progesterona, los grados nucleares, los grados histológicos y más recientemente los oncogenes (erb-B-2 neu

y proteína p-53). A pesar de los progresos obtenidos en la identificación de estos factores, es necesario establecer marcadores más precisos que discriminen cual es el grupo de pacientes en Estadio I que tienen una mayor probabilidad de no responder al tratamiento locorregional y por tanto desarrollar una recidiva o metástasis. Estas serían las pacientes que precisarían de la adjuvancia terapéutica.

Otra variable extensamente investigada como de significación pronóstica, es la tasa de proliferación del tumor, para lo cual se utilizaba inicialmente el Índice de Timidina marcada (TLI). Hallándose que es el indicador de mayor valor predictivo con respecto a la supervivencia, seguido por el tamaño tumoral y afectación ganglionar.²⁰³ Sin embargo estas técnicas de TLI, precisan de mucho tiempo para su realización y examinan sólo 2000 células por caso. Más recientemente las técnicas de estudio del DNA mediante Citometría de Flujo, permiten medir la capacidad proliferativa tumoral (Fase S) de más de 100.000 células en muy pocos minutos,¹³³ siendo además que la Citometría de Flujo ofrece la capacidad de estudiar la ploidía como otro posible marcador de la agresividad del tumor mamario.

Nuestro objetivo ha sido desarrollar un método de Citometría de Flujo para la determinación de la capacidad proliferativa, la ploidía y la cinética celular de cada muestra tumoral, examinando además las relaciones de estos factores con otras variables pronósticas consideradas más clásicamente.

A.- IDENTIFICACION Y VALORACION DE LOS FACTORES PRONOSTICOS

Desde un punto de vista conceptual el análisis de los diferentes factores pronósticos, pretende explicar la heterogeneidad inherente a las características individuales de los pacientes y al comportamiento de las enfermedades humanas. Un factor pronóstico, es una variable estudiada en un paciente individual que sola o en combinación con otros factores, explique parte de esta heterogeneidad. El objetivo de todo trabajo que estudie estos factores, es identificar los más importantes en el análisis univariable para trascender posteriormente al estudio multivariable que va a ser en última instancia quien nos determinará cuales de ellos tienen un valor predictivo per se.

Hay, desde un punto de vista teórico, diferentes motivos por los que se estudian los factores pronósticos.²⁰⁴

Citaremos los siguientes:

- 1.- **Predicción:** Cuando nos interese predecir el comportamiento de una determinada enfermedad.
- 2.- **Modificación:** En este caso la necesidad surge al comparar tratamientos o grupos de pacientes de distintos centros o tipos de estudios, en los que la identificación de los factores pronósticos nos capacita para hacer las modificaciones estadísticas precisas para establecer comparaciones válidas. Esto

actualmente es muy útil en el caso de los estudios multicéntricos o metaanálisis.

- 3.- **Definición de grupos de riesgo:** En este caso se parte de la identificación de las variables pronósticas a partir de las cuales se agrupa a los pacientes en grupos de características similares.
- 4.- **Diseño:** Al diseñar los protocolos diagnósticos o terapéuticos o los ensayos clínicos, los factores pronósticos son útiles para definir los criterios de inclusión-exclusión o para discriminar a los pacientes según grupos de riesgo y en consecuencia hacer que éstos sean comparables.
- 5.- **Selección del tratamiento:** En este caso estos factores pronósticos son determinantes para la elección del tratamiento idóneo para cada paciente entre todas las posibilidades existentes.
- 6.- **Número limitado:** Los posibles nuevos factores pronósticos deberán ser contrastados individualmente y establecer su validez antes de sumarse a los ya tradicionales, puesto que el número y complejidad de las variables pronósticas de un tumor deben ser reducidas si se pretende obtener una utilidad práctica.

En el presente estudio se ha realizado una definición de los grupos de riesgo con la finalidad de obtener un valor predictivo del comportamiento del tumor. Para ello hemos desarrollado un método de análisis estadístico conocido con el nombre de análisis de univariable, con el objetivo de identificar aquellas variables pronósticas que estén íntimamente relacionadas con la biología y comportamiento tumoral. El objetivo primordial, especialmente cuando hay un gran número de variables, como en este estudio, es eliminar aquellas menos significativas con la finalidad de hacer más manejables las sometidas al análisis de multivariable.

En esta tesis estudiando el DNA de las células tumorales, se ha pretendido encontrar una explicación al comportamiento de las diversas células, con el ánimo de considerar el material cromosómico como el indicador de la actividad de la célula; ya no el grado de diferenciación de ésta,⁷²⁻⁷⁴ (que serían criterios igualmente válidos, de aparición más tardía), si no que se ha valorado en porcentajes de células clasificadas como diploides o aneuploides, y según la fase de síntesis en que se halle el mayor % de células que formen el tumor, dividiéndose cada caso en fase S pequeña, mediana y alta.

El estudio del material cromosómico celular, permite conocer la cantidad de éste, que es $2n$ para las células autosómicas, que no estén en mitosis, pero difiere cuando las células presentan anomalías o exceso de material nuclear, características comunes de los tumores de gran agresividad. La ventaja de la determinación de la cantidad

de material cromosómico mediante Citometría de Flujo, radica en la gran rapidez con que se puede realizar, facilidad y número de células que contabiliza, siendo la aproximación diagnóstica más fiable¹³⁰⁻¹³⁴ que la simple inspección óptica o la citometría estática.

Al procesar mediante Citometría de Flujo las células correspondientes a un tumor de mama, se obtiene los valores de las diferentes fases del ciclo celular, la fase G₀-G₁, la fase S y la fase G₂-M (Fig. 5, 9), expresadas en un histograma. Dejando de lado las demás fases y valorando sólo la fase S (de síntesis); por ser la de mayor interés pronóstico, encontraremos que presenta bastantes dificultades en su interpretación. Para evitar falsos resultados, o que fueran subjetivos, en esta tesis se ha realizado la valoración de cada caso siguiendo los principios de Baisch,¹⁹⁷ a través de un programa de interpretación de DNA, denominado "Epics Cytologic Software",¹⁹⁶ al igual que otros muchos autores.^{133,155,192}

En una revisión exhaustiva de la literatura relacionando la ploidía y la fase S con la evolución de los pacientes con cáncer de mama, se observa una diversidad de resultados que pueden hacer difícil el establecimiento de unas conclusiones de validez universal. Por lo que es preciso comentar alguno de los factores responsables de esta aparente heterogeneidad en los distintos estudios y que en nuestra opinión son los siguientes:

- 1.- Uno de los mayores problemas que nos encontramos en la validez de numerosos trabajos, que utilizan la ploidía y

la fase S para predecir el riesgo de recidiva o la supervivencia a largo plazo de determinadas pacientes con respecto a unos valores obtenidos mediante Citometría de Flujo, es el conocer si se les ha realizado un tratamiento sistémico o no. La quimioterapia y la hormonoterapia, pueden alterar los valores de Citometría de Flujo, ya comentado por otros autores.¹⁶⁰ En nuestro trabajo se ha buscado si realmente existía una relación entre el tratamiento suministrado y los valores obtenidos mediante Citometría de Flujo, al no encontrarse ningún tipo de significación estadística entre los tratamientos efectuados a nuestras pacientes (radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia) y el valor obtenido para la fase S, creemos que debe considerarse como una variable independiente con significado pronóstico a pesar de haber recibido nuestras pacientes tratamientos coadyuvantes.^{160,205}

2.- Otra dificultad es la relacionada con la disparidad en el seguimiento de las pacientes de muchos estudios. En algunos es difícil saber con certeza el tiempo de seguimiento,^{125,165} mientras que en otros el seguimiento fue de 5 años o menos²⁰⁶⁻²¹¹ y de 5 a 8 años en otros.^{168,212} En nuestro trabajo se ha realizado un seguimiento de hasta 10 años. En los resultados publicados por la NSABP B-04, se demuestra que un seguimiento de 10 años proporciona una mejor determinación de los parámetros citométricos (ploidía y fase S) en relación al pronóstico que los obtenidos por este mismo grupo pero con períodos de seguimiento más cortos.

3.- Debemos considerar también que los tejidos conservados en parafina por largos períodos de tiempo, dan lugar a histogramas con un mayor coeficiente de variación que los obtenidos en tejido fresco.²¹³ Así sucede que con coeficientes de variación muy altos (> 8), disminuye la exactitud en la estimación del porcentaje de células en fase S. En este punto nuestra metodología, ha sido el desechar del estudio los histogramas formados por picos que tuvieran un coeficiente de variación elevado. El coeficiente de variación medio, en nuestro trabajo ha sido de 5.8 ± 2.2 .

4.- La variabilidad de instrumentos tecnológicos para realizar los diversos estudios de Citometría de Flujo, empleada en distintos centros, contribuyen a la heterogeneidad de resultados. Hay que tener en cuenta que muchos autores utilizan los **Citómetros Estáticos**,^{208,209} otros, diferentes modelos de citómetros entre ellos, el modelo **Ortho**,^{170,206} el modelo **Becton Dickinson-FACS**¹⁶⁵ y también varios modelos de la casa Coulter.^{136,214} En nuestro caso el citómetro utilizado es el **EPICS PROFILE II**.

B.- ANALISIS DE LOS FACTORES PRONOSTICOS CLINICO-PATOLOGICOS CLASICOS

Al estudiar la relación entre la supervivencia y cada una de las variables clínico-patológicas valoradas, mediante la prueba χ^2 , no se ha encontrado relación significativa con la edad ($p=0.7$). El tamaño tumoral (T), ha demostrado una significación estadística en relación con la supervivencia en todas las pruebas realizadas (en el estudio univariante, $p=0.008$, en las tablas de supervivencia, $p=0.009$, en el estudio multivariable, $p=0.02$). La presencia de metástasis al momento del diagnóstico (M), también ha mostrado una relación significativa en el análisis univariante ($p=0.0001$), en las tablas de supervivencia ($p=0.007$) y se ha incluido en el estudio de regresión logística múltiple. La afectación ganglionar N (valoración clínica), no demostró tener significación en el estudio univariante ($p=0.12$), pero sí la tuvo en las tablas de Kaplan y Meier ($p=0.02$) y se mantuvo dentro de las seis variables más importantes del estudio multivariante.

La valoración de los receptores hormonales (R.E. y R.P.), no mostró relación significativa, ni en las pruebas de χ^2 ($p=0.37$ y $p=0.76$), ni en las tablas de supervivencia ($p=0.26$ y $p=0.94$), en contra de lo habitualmente afirmado por muchos autores,^{215,216,217} pero en concordancia con otros.¹⁶³

El número de ganglios invadidos (N histológico) comprobados histológicamente al extirparse el tumor, tuvo significación estadística en el método univariante ($p=0.01$), en las tablas de supervivencia ($p=0.001$) y fue una de las

seis variables incluidas en el estudio multivariable.

La aparición de **metástasis en el seguimiento** ha tenido una fuerte significación tanto en el método univariante ($p=0.0001$), como en las tablas de supervivencia ($p=0.01$) y en la regresión logística múltiple ($p=0.007$).

En cuanto al **tipo histológico**, no se observó una relación significativa ($p=0.38$), pues la gran mayoría (89.6%) fueron clasificados como **Carcinoma Ductal Infiltrante**.

El **tratamiento administrado** a las pacientes después de la intervención, no tuvo ninguna relación significativa con la supervivencia en el estudio univariable (Q.T. un valor de $p=0.09$, H.T. un valor de $p=0.66$, y R.T. un valor de $p=0.81$).

La **menopausia**, no evidenció significación pronóstica en el estudio univariante ($p=0.80$), tampoco en las tablas de supervivencia ($p=0.76$) y pese a introducirse en el estudio multivariante fue rechazada por el método de regresión logística múltiple, sin llegar a quedar dentro de las seis de mayor valor pronóstico..

El estudio univariante de las variables, **antecedentes personales de patología mamaria y número de embarazos** de las pacientes de nuestro estudio, no evidenció significación estadística ($p=0.30$ y $p=0.37$ respectivamente).

C.- ANALISIS DEL CONTENIDO DE DNA MEDIANTE LA CITOMETRIA DE FLUJO. ANALISIS DE LA PLOIDIA

La medida del contenido de DNA mediante Citometría de Flujo puede proporcionar información valiosa sobre el comportamiento biológico de las células neoplásicas, tal como han confirmado numerosos autores.^{171,172,218} Más recientemente un número considerable de autores demuestran una relación entre el contenido anormal de DNA y un comportamiento tumoral más agresivo.^{132,138,172,219}

En general, puede decirse que aproximadamente el 50% de los carcinomas de mama tienen una población celular aneuploide. Sin embargo, algunos estudios han mostrado proporciones muy divergentes en estos tumores hallando hasta un 92 y 72% respectivamente de cánceres de mama aneuploides.^{220,221} En nuestro estudio han sido diploides el 67.3 y aneuploides el 32.7%.

Tal variabilidad creemos, que puede ser debida a los diferentes métodos de estudio (I.P., Bromuro de Etidium, Naranja de Acridina, Mitramicina), y a los distintos criterios usados para definir la presencia de poblaciones celulares aneuploides. En este estudio los criterios empleados para el análisis de la ploidía, han sido los propuestos por la Convention on Nomenclature for DNA Cytometry¹²³ y actualizados por Joensuu y Kallioniemi, aceptados internacionalmente.^{178,198.199} Son los siguientes:

1.- Los histogramas con un pico G0-G1 simétrico fueron clasificados como TIPO DIPLOIDE.

2.- Si se evidenció más de un pico G0-G1, el histograma no clasificó como TIPO ANEUPLOIDE.

3.- Cuando un tumor presentaba un pico G0-G1 con un I.D. distinto de 1 también era considerado ANEUPLOIDE.

Otro posible origen de la disparidad en la clasificación de la ploidía se debe a la existencia de falsos picos aneuploides, producidos por preparación deficiente de las muestras y errores en la interpretación, a causa de la existencia de detritus tisulares producidos en el momento del corte de los bloques de parafina, y por otros tipos de destrucción nuclear, originada durante el proceso de digestión de las membranas, que se realiza en todas las muestras y que se comportan como contaminantes no tumorales.

Se han considerado otras causas de distorsión de los resultados tales como: autólisis, necrosis, inflamación o hemorragia en el tejido previamente a la inclusión en parafina. Para eliminar estas falsas señales del histograma de DNA en nuestro estudio, se ha empleado el método de corrección-interpretación EPICS CYTOLOGY SOFTWARE (Version 2.1).¹⁹⁶

Es importante, para obtener una homogeneización de los criterios de interpretación de los histogramas de DNA, considerar cinco variables que se presentan con relativa

frecuencia, en las que definimos nuestro criterio para la correcta caracterización del histograma y de acuerdo con el método más internacionalmente aceptado:126,198

1.- Clasificación de picos G0-G1 asimétricos: La mayoría de los investigadores consideran la evidencia de DNA aneuploide cuando dos picos pueden ser identificados en la región G0-G1 o si se localiza un pico bifásico en la región G2-M.

2.- Otro problema importante es la clasificación de pequeños picos anormales. En algunos casos el análisis de otras regiones del tumor pueden solucionar el problema. El tamaño del pico puede ser interpretado como anormal si es difícil de definir, dependiendo de varios factores como detritus nucleares presentes, índice de DNA y el uso de "light scatter", así como otros parámetros adicionales.

3.- El tercer problema que puede presentarse, es la definición de una población celular tetraploide. Para ello han sido publicadas en la literatura varias definiciones: Un pico G2-M mayor de 5%, del 10%,^{222,223} del 15%^{224,225} o del 20%,^{208,226} todos ellos clasificados como tetraploides. Sin embargo, la validez universal de tales definiciones puede ser cuestionada. Nosotros pensamos que la fracción G2-M depende de la actividad proliferativa del tumor y del tiempo que las células invierten en las fases G2 y M del ciclo celular.

Una de las principales causas de aparición de un pico tetraploide es debido a la contabilización de dobletes como un sólo núcleo, problema que puede resolverse mediante la función "gating" del Citómetro.

4.- Porcentaje de células tumorales con contenido de DNA mayor de 5c:

El contenido de DNA en los tejidos proliferativos normales varía entre 2c y 4c. Antes de la mitosis los núcleos contienen el doble de su contenido de DNA, el cariotipo de tales células normales consiste en 46 cromosomas dobles, lo cual significa un contenido de DNA tetraploide (4c). A pesar de que el contenido de DNA de dichas células es todavía euploide. Otro fenómeno observado en las células normales igual que en tejido neoplásico es la presentación de células poliploides. La **poliploidía** significa la apariencia de los núcleos, con un contenido de DNA que representa un número global, por ejemplo un incremento geométrico del valor diploide del DNA. La **poliploidía** representa pues un valor biológico básico y normal observado tanto en el reino vegetal como animal. Células poliploides han sido halladas en varios órganos humanos incluyendo la glándula mamaria. Por tanto valores de DNA por encima de 2.5c pueden representar tanto células euploides proliferantes, como células poliploides e incluso células aneuploides. El porcentaje de células tumorales por encima del límite 5c, son consideradas como una medida de DNA aneuploide. En este estudio los tumores tetraploides se han incluido en el grupo de los aneuploides.

5.- Índice de DNA o valor modal:

El Índice de DNA se define como la relación entre el valor modal del DNA de las células tumorales con el valor medio de DNA de las células control (2c). El cálculo del Índice de DNA, a pesar de la variabilidad en el contenido nuclear de DNA, puede ser considerado como un cálculo solamente aproximado para distinguir entre tumores euploides-tetraploides y tumores aneuploides.

Clasificación de los histogramas de DNA según Auer²²⁷

- a.- Histograma tipo I: Se caracteriza por un valor modal de DNA igual a 1, en la región diploide o casi-diploide de las células normales.
- b.- Histograma tipo II: Es el que tiene un pico en la región tetraploide de las células normales o dos picos bien definidos en las regiones 2c y 4c.
- c.- Histograma tipo III: Generalmente muestra dos picos, difiere del tipo II en que el histograma muestra un número (> 5%) de células con una cantidad de DNA similar a la de las células normales durante la síntesis de DNA.
- d.- Histograma tipo IV: Es claramente aneuploide con un incremento y dispersión de los valores de DNA excediendo la región normal 4c.

En todo caso, debemos considerar que, la vía óptima para clasificar los histogramas de DNA, no está plenamente establecida y por lo tanto, se precisa estudios más extensos sobre la correlación clínico-patológica y la ploidía del DNA, definidos según varios criterios en los diferentes tipos de neoplasias humanas hasta alcanzar un consenso general.

Finalmente hemos de considerar para la correcta interpretación del histograma de DNA, la posible existencia de una heterogeneidad en el contenido de DNA de diferentes partes de los tumores primarios de mama a diferencia de los tumores secundarios (metástasis ganglionares), donde esta heterogeneidad parece mucho menor.^{151,228,229,230} Estos hallazgos pueden ser de relevancia y deben ser tenidos en cuenta en la discusión sobre el valor pronóstico de la ploidía del DNA en el cáncer de mama.

La presencia de diferentes líneas celulares en un tumor no está relacionada con el área de donde procede la muestra y no significa que sea igual a la existencia de heterogeneidad histopatológica;¹⁵¹ además la circunstancia de que los métodos de obtención y preparación de las muestras y de interpretación de la ploidía del DNA, tal como hemos dicho son variables y pueden explicar algunas de estas diferencias de resultados. Los estudios que usan biopsias pequeñas múltiples presentan unas variaciones en la frecuencia de diversas líneas celulares con respecto al estudio de la ploidía oscilando entre el 10-23%.²³¹ Sin

embargo, ninguno de los estudios realizados ha confirmado la naturaleza epitelial neoplásica de las células diploides, siendo posible incluso que se trate de contaminates no tumorales. El método más fácil para demostrar que estas células diploides son neoplásicas es tomar múltiples biopsias y comprobar la existencia de poblaciones celulares diploides y aneuploides monoclonales en las distintas muestras del tumor. Es por tanto preciso, como ya hemos comentado en el método, una confirmación patológica estandar para asegurar que las biopsias contienen tejido neoplásico y así lo hemos realizado con todas las muestras de nuestro estudio. Siguiendo esta línea metodológica, sólo en el caso de que se halle células diploides en una biopsia y en la otra existan células aneuploides se podrá concluir que hay múltiples líneas celulares y por tanto una heterogeneidad tumoral.

Debemos considerar no obstante, que estudios más recientes publicados en 1992,²³¹ sugieren que la causa radica posiblemente en la variabilidad de interpretación de los histogramas de DNA y en las dificultades inherentes de la estimación de la fase S más que a la real existencia de una heterogeneidad tumoral en el contenido de DNA.

Está plenamente confirmado en la bibliografía que los carcinomas mamarios con elevada malignidad (grado histológico III) y/o los tumores de gran tamaño (> 2 cm.) son predominantemente aneuploides.^{133,155,170,232} Esto puede ser una de las razones, como ya demostró Auer y colaboradores,^{126,227} por las que los tumores aneuploides tienen peor pronóstico que los tumores diploides. En esa

misma línea conceptual puede decirse que los tumores pequeños (< 2 cm.) son predominantemente diploides. Esto puede ser un reflejo de la selección clonal que tiene lugar constantemente en las neoplasias. Estos estudios igualmente sugieren que los carcinomas de mama se inicien como neoplasias diploides y después se transforman gradualmente en aneuploides durante su crecimiento.¹⁷⁰ La existencia de tumores aneuploides puede también indicar que se trata de neoplasias en un estadio relativamente avanzado de su desarrollo siendo pues simplemente un signo de su historia natural.²³³

Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, existen algunas disparidades en la definición y clasificación de los histogramas que hacen que el significado pronóstico de las determinaciones del DNA pueda ser cuestionado. En un extenso trabajo de Fallenius sobre 409 casos de cáncer de mama,¹²⁶ los resultados demuestran una estrecha relación entre el contenido nuclear de DNA y el pronóstico, independientemente del porcentaje de células por encima de 2.5c ó 5c, del I.D. o de la clasificación de Auer. Un aspecto interesante a tener en cuenta en el trabajo de este autor es la implicación genética y biológica de los valores bimodales del I.D., ya sugerido por experiencias anteriores.^{139,208,234,235} Estos autores sugieren que los tumores diploides y aneuploides reflejan diferencias en cuanto al grado de estabilidad del genoma. En este sentido se piensa, que los tumores aneuploides al contrario que los tumores diploides, pueden estar caracterizados por una elevada inestabilidad del genoma, lo

cual podría llevar a una rápida generación de nuevos fenotipos que podría constituir una premisa para la progresión de la enfermedad neoplásica. Obviamente existen hipótesis alternativas que incluyen incrementos de la mutabilidad, alta frecuencia de fenómenos de recombinación, amplificación de genes y otras combinaciones del DNA que deben ser consideradas.^{236,237} Estudios más recientes como el de López-Ginés (1991),¹⁴⁹ muestran en un análisis multivariable, que la **ploidía** del tumor proporciona una información independiente sobre el periodo libre de enfermedad y la supervivencia global y por lo tanto, ser de utilidad en discriminar con más exactitud los pacientes con cáncer de mama y nódulos ganglionares negativos. En esa misma línea, está también el trabajo reciente de Noguchi (1991).¹⁷⁴

En nuestro estudio, realizado a través del análisis univariable, la variable **ploidía correspondiente al tumor primario** y las demás variables **clínico-patológicas estudiadas** (edad ($p=0.22$), antecedentes familiares de cáncer de mama ($p=0.21$) y personales de patología mamaria ($p=0.69$), número de embarazos ($p=0.66$), T ($p=0.12$), N ($p=0.74$), M ($p=0.24$), R.E. ($p=0.56$), recidivas ($p=0.29$), ganglios afectados histológicamente ($p=0.69$), situación hormonal de las pacientes ($p=0.61$), aparición de metástasis en el seguimiento ($p=0.44$), hormonoterapia ($p=0.37$) y radioterapia ($p=0.88$)) **no demostraron relación significativa**, por lo que creemos debe considerarse como un **factor pronóstico independiente** coincidiendo con lo publicado por otros autores.^{149,153,155,174,177,238}

Los resultados de las tablas de supervivencia a los cinco años de nuestras pacientes, han demostrado una relación significativa de la **ploidía** ($p=0.5$), según la cual los tumores diploides evidencian menor agresividad que los aneuploides (68% versus 47% respectivamente). Estos resultados concuerdan con la mayoría de los aportados en la bibliografía por autores como Ellis,¹⁶⁶ Clark,¹⁶³ Trope,¹⁶⁴ Kallioniemi¹⁶⁸ y otros.^{126,167}

Un aspecto que nos interesa resaltar, es la relación estadísticamente significativa que encontramos entre la **ploidía** del tumor primario y la **ploidía** estudiada en los ganglios linfáticos axilares histológicamente invadidos ($p<0.0005$). Esto pensamos, es una aportación original de nuestro estudio y que confirma las hipótesis teóricas que sugieren la existencia de un mismo clon celular que desde el tumor primario va invadiendo los diferentes tejidos y estructuras, de las cuales hay algunas referencias bibliográficas,^{126,139,208,234,235} pero sin una demostración clínica con suficiente número de casos como nosotros aportamos (56).

En el estudio multivariable, considerando a la **ploidía** junto a las demás variables se llegó a alcanzar un valor predictivo de probabilidad de supervivencia de un 86.36%, con una sensibilidad de un 92.86% y una especificidad de un 75%; aunque se va perdiendo significación en los seguimientos a largo plazo (a partir de 100 meses), lo que coincide con otros autores como Dowle.²³⁸

La relación entre el estatus de los **Receptores Tumorales de Estrógenos** y la **ploidía** del DNA ha sido establecida por

varios autores.^{220,232,239} Sin embargo, esta asociación es débil y no ha podido ser confirmada en nuestro estudio ($p=0.56$), coincidiendo en este sentido con los resultados de Thorud.¹⁷⁰ Por otra parte, sí hemos hallado en nuestras pacientes una relación estadísticamente significativa ($p=0.004$) con el estatus de los **Receptores de Progesterona Negativos** y la **aneuploidía**. Así mismo, hemos observado una relación significativa entre la **ploidía** y el tratamiento con **quimioterapia** coadyuvante ($p=0.05$).

No se ha observado relación significativa al relacionar mediante el análisis univariante, la variable **ploidía del tumor primario** y las siguientes variables, **fase S de los ganglios axilares invadidos** ($p=0.07$), **fase S y ploidía de las metástasis valoradas mediante Citometría de Flujo** ($p=0.22$, $p=0.13$), **fase S y ploidía de las recidivas locorregionales de partes blandas** ($p=0.91$, $p=0.80$) y **fase S de los ganglios que acompañaban a las anteriores recidivas** ($p=0.38$), fenómeno que atribuimos al tamaño de las muestras relacionadas.

**D.- ANALISIS DE LA FASE DE SINTESIS CELULAR NEOPLASICA O
INDICE PROLIFERATIVO**

La fase de síntesis celular (Fase S), es la fase del ciclo celular situada entre la fase G0-G1 y la fase G2-M. Representa el momento en que la célula se prepara para afrontar una división. Tanto en células normales como en células neoplásicas, el valor de la fase S es variable dependiendo del tipo de tejido u órgano estudiado (tabla 1).

La proporción de células que se hallan sintetizando DNA, también conocida como fase S, ha sido calculada en nuestro estudio mediante el programa de interpretación de DNA, EPICS CYTOLOGIC SOFTWARE (Versión 4.0),¹⁹⁶ basado en el método de Baisch et al.¹⁹⁷ Esquemáticamente esto supone dibujar un rectángulo entre los canales en que se halla el pico G1 y G2. La altura del rectángulo se determina mirando el número de células en una región central de 10 canales de la fase S y usando ésta para calcular el número medio de células por canal. Una vez obtenido esto, en el caso de tumores diploides se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{número de eventos}}{10 \times \text{número del canal del pico diploide}}$$

100

En el caso de tumores aneuploides, el porcentaje de células aneuploides en fase S se obtiene de forma parecida,

siendo la altura del rectángulo calculada usando una parte del histograma no sobrepuesta por la distribución del DNA diploide. La fórmula es la siguiente:

$$\frac{\text{número de eventos}/10 \times \text{número del canal del pico aneuploide}}{\% \text{ de células aneuploides}}$$

Cuando un tumor es aneuploide se encuentran problemas importantes en el cálculo de la fase S:

a.- Si el Índice de DNA es de 1.3, no se puede calcular la fase S por sobreponerse la zona diploide y aneuploide del mismo tumor.

b.- Cuando el Índice de DNA se sitúa entre 1.3 y 1.4, será posible lograr el cálculo de un gran porcentaje de casos.

c.- Cuando en un histograma aparecen dos picos aneuploides, con una pequeña separación entre los dos ($n=3$), si se emplea la técnica de Braylan et al.²⁴⁰ se podrá obtener el valor de la fase S.

d.- En el caso de encontrarnos con tumores aneuploides que presenten dos picos bastante separados ($n=5$), no puede utilizarse el método de Braylan et al. cuando se está trabajando con tumores conservados en parafina, debido al inconveniente que plantean los detritus.²⁴¹ Pero puede

medirse la fase S de las células aneuploides mediante el método del rectángulo de Baisch et al.¹⁹⁷ Este ha sido el procedimiento utilizado en nuestro modelo de estudio coincidiendo con la metodología empleada por otros autores como Campeljohm et al.¹⁸³

Algunos autores (Poot M.),²⁴² apuntan que la Citometría de Flujo presenta una limitación en el sentido de no poder distinguir las células que realizan múltiples divisiones en un determinado periodo de tiempo y otras que no realizan más de una división. Para solucionar este problema y delimitar mejor las distintas fases del ciclo celular incluyendo a la fase S, propone un técnica basada en la tinción continua de Bromodeoxyuridina, colorante que permitiría distinguir a las cromátides que intervinieran en sucesivos ciclos celulares y la duración de cada una de las fases.

De nuestros resultados se deduce que, aunque los valores de la fase S están ampliamente distribuidos, son más bajos en los tumores diploides que cuando se compara con los tumores aneuploides ($p=0.05$).

En nuestro estudio, la media de células que se encontraron en fase de síntesis, fue del 11% para los tumores diploides y del 13% para los tumores aneuploides.

Esta tendencia es una constante establecida con carácter de significación estadística en la bibliografía.^{133,243} Hemos tenido en cuenta que los efectos de dilución de las células normales como los linfocitos, pueden causar en un tumor diploide una subestimación de la fase S. En este sentido nuestros resultados son bastante similares a los

publicados por Mc.Divitt²⁴³ y Dressler.¹³³

Parece evidente que hasta que no tengamos un marcador capaz de distinguir entre las células normales y las células tumorales, no podremos estar seguros de la exactitud biológica de la estimación de la fase S de los tumores diploides. Sin embargo, también es obvio que tenemos dos diferentes poblaciones celulares de tumores, diploides y aneuploides.

Para la obtención de información pronóstica a partir del estudio de la fase S, clásicamente se usaba el valor medio de la misma como único punto de referencia. Sin embargo, después de los trabajos de Sigurdsson¹⁸⁰ y Kallioniemi,¹³⁶ hemos dividido a la fase S en tres subgrupos:

- 1.- Un grupo con un valor de fase S pequeño (< 7).
- 2.- Un grupo con valor de fase S mediano (entre 7 y 12)
- 3.- Un grupo con valor de fase S elevado (> 12).

Este sistema de división ha demostrado un mayor rendimiento en el valor pronóstico ajustándose a una metodología más rigurosa.

En nuestra experiencia, hemos obtenido un 14% de las pacientes con un valor de la fase S inferior a 7, un 42.1% con un valor entre 7 y 12, y un 43.9% con un valor de fase S superior a 12.

En este sentido, nuestros resultados coinciden plenamente con la bibliografía, habiendo podido comprobar que un valor de fase S bajo (< 7%), está relacionado con un pronóstico muy favorable, mientras que un valor de fase S elevado (> 12%) está relacionado con el peor pronóstico.

Así hemos podido constatar mediante las tablas de supervivencia, que los tumores con fase S < 12, tienen una supervivencia a los 5 años del 79% y a los 10 años del 61%, mientras que los tumores con fase S > 12, la supervivencia a los 5 años es del 45% y a los 10 años del 23%, con una gran significación estadística ($p=0.03$). Lo mismo ha sucedido al utilizar el método univariable ($p=0.005$) y el multivariable ($p=0.04$), quedando mostrada la validez de la determinación de la fase S como un factor pronóstico de gran interés.

Al igual que ha ocurrido en la ploidía se ha encontrado una significación estadística muy intensa entre los valores de fase S de los tumores primarios y los valores de fase S de los ganglios axilares invadidos ($p < 0.0006$). Lo que representa de nuevo, una aportación innovadora de nuestro estudio al confirmar prácticamente (56 casos) la hipótesis existente sobre la idea de un mismo clon celular como el responsable de la invasión de los ganglios a partir del tumor primario. En esta misma línea, hemos observado en nuestra casuística, que la fase S del tumor primario y los valores de fase S y ploidía de las metástasis ($p=0.35$, $p=0.63$), recidivas locorregionales ($p=0.64$, $p=0.21$) y ganglios correspondientes, mostraron resultados similares, si bien no llegaron al nivel de significación estadística atribuible probablemente al tamaño de la muestra.

Al relacionar las distintas variables clínico-patológicas clásicas estudiadas, con los valores de la fase S del tumor primario mediante el método univariante, se ha demostrado la existencia de significación estadística entre la fase S y M (metástasis al momento del diagnóstico, según criterio TNM)

($p=0.02$). También, la relación significativa se ha establecido con la variable **recidivas locorregionales de partes blandas** ($p=0.01$), lo que da a entender que los tumores con una fase S elevada acostumbra a dar recidivas con mayor frecuencia que los de una fase S pequeña. Idea que estaría a favor de considerar más agresivos a estos tumores, coincidiendo con múltiples autores.^{133,134,178-180} **El hecho de que con el resto de variables** (edad ($p=0.61$), antecedentes personales mamarios ($p=0.08$) y familiares de cáncer de mama ($p=0.19$), número de embarazos ($p=0.38$), T ($p=0.99$), N ($p=0.83$), R.E. ($p=0.65$), R.P. ($p=0.60$), número de ganglios histológicamente invadidos ($p=0.67$), menopausia ($p=0.07$), metástasis aparecidas durante el seguimiento ($p=0.18$), hormonoterapia ($p=0.83$), radioterapia ($p=0.14$) y quimioterapia ($p=0.57$)) **no se encuentre relación significativa, está a favor de considerar a la fase S del tumor primario como una variable independiente de significación pronóstica.**^{133,177}

Por otra parte parece existir una relación entre el grado nuclear y una fase S alta o baja. Los tumores diploides, tienen más frecuentemente que los tumores aneuploides mejor grado nuclear (72% versus 55, $p < 0.001$). De la misma manera, muchos tumores con una fase S elevada tuvieron un peor grado nuclear que los tumores que con una fase S baja (45% versus 28%, $p = 0.002$).¹⁶⁰

No se demostró tampoco en nuestro estudio una diferencia significativa entre **el tamaño tumoral y las distribuciones altas o bajas de la fase S**, en lo cual coincidimos también con los resultados de la NSABP B-04, de Fisher¹⁶⁰ y otros

autores.¹⁵³ Esto nos induce a pensar que independientemente del tamaño que puede alcanzar un cáncer de mama existe una capacidad de proliferación intrínseca al tumor, la cual determina el potencial de invasión y metastatización.

Nuestros hallazgos en el análisis multivariable indican que la fase S tiene un valor significativo en relación a la supervivencia al final del estudio (5000 días; > 10 años) ($p=0.03$), coincidiendo también en esta ocasión con el riguroso estudio de Fisher.¹⁶⁰ Esto está en desacuerdo con los hallazgos de otros autores,^{210,211,212,244} los cuales no consideran a la fase S como un factor pronóstico independiente, si bien hemos de considerar que esos resultados fueron obtenidos después de un seguimiento de 5 años, comparado con nuestro periodo de observación que fue muy superior (más de 10 años) al igual que el trabajo de Fisher.

Abundando en los resultados del estudio multivariante de Regresión Logística Múltiple, el valor de la fase S, demostró ser una de las seis mejores variables de información pronóstica ($p=0.04$), coincidiendo con numerosos autores.^{132,136,177,179,180}

No hemos encontrado significación estadística en relación con la fase S y el estatus ganglionar clínico (N) ($p=0.83$), lo cual además de coincidir con la bibliografía,^{160,243,245,246} no sorprende, pues es bien conocido el hecho de que la valoración clínica del estatus ganglionar es muy inexacta (30-40% de falsos negativos y similar proporción de falsos positivos) y en consecuencia impide una adecuada determinación de la relación entre el

estado de los ganglios y la ploidía y fase S. Por otra parte si consideramos el estatus ganglionar desde el punto de vista histológico, tampoco encontramos una relación estadística significativa ($p=0.67$). Esto nos induce a pensar en la apertura de una nueva línea de valoración pronóstica y terapéutica, como sería la de identificar subgrupos de riesgo dentro de los T1-2N0M0 con una actividad proliferativa alta (fase S elevada), como parámetro discriminatorio de valor independiente.

Hemos observado una relación inversa entre los receptores tumorales de estrógenos y progesterona y la fase S ($p=0.65$ y $p=0.60$ respectivamente), en valores similares a los referidos en la bibliografía.^{133,139,245,247}

Finalmente, hemos de enfatizar la importancia de los resultados de nuestro estudio multivariable de Regresión Logística Múltiple. Basándonos en el estudio multivariable, podemos calcular la probabilidad de supervivencia de un individuo, con respecto al valor que adopte cada una de las variables. Así, hemos obtenido los valores de la fase S según la división ya establecida anteriormente (fase S < 7, fase S entre 7 y 12, fase S > 12), que han mostrado una relación estadísticamente significativa ($p=0.04$) en relación con la supervivencia.

Esto tiene a nuestro juicio, una gran trascendencia clínica, pues nos permite una mejor discriminación de las pacientes en estadio T1N0M0, atendiendo al valor obtenido de la fase S.

En este sentido, hemos comprobado que las pacientes con una fase S < 7, presentan una supervivencia al final del

estudio (10 años) del 97.7%, mientras que las que en el mismo estadio (T1N0M0) tienen una fase S > 12, la probabilidad de supervivencia es del 81.3%. Estos valores de supervivencia; obtenidos mediante el método multivariable con una clara significación estadística ($p=0.04$), nos proporcionan una base argumental suficiente para pensar que la estimación de la fase S en este grupo (T1N0M0) considerado clásicamente de buen pronóstico, es de gran utilidad para identificar un subgrupo de pacientes de alto riesgo en el Estadio I. Ello nos capacita para considerar que se ha cumplido uno de los objetivos propuestos al inicio de este trabajo de investigación, como fue el de estudiar un nuevo factor pronóstico que nos permite una mejor discriminación desde el punto de vista de la biología tumoral y en consecuencia, apoyándonos en el valor de la fase S, se podría llegar a conocer mejor el 30% de pacientes con cáncer de mama clasificadas como T1N0M0 (y en consecuencia de buen pronóstico según los parámetros clásicos), que estadísticamente mueren antes de los 10 años siguientes al tratamiento quirúrgico. Por lo tanto, este sería el subgrupo de pacientes que se beneficiarían de un tratamiento sistémico (Q.T., H.T.).

Siguiendo la misma línea de pensamiento, se podrán evitar tratamientos excesivamente agresivos en aquellas pacientes que, utilizando éstos criterios citométricos, no presenten riesgo de recidiva tan evidente.

Continuando con el análisis multivariable, hemos comprobado que los tumores clasificados clásicamente como T3N0M0, pero con valor de fase S < 7, tienen una

probabilidad de supervivencia, en nuestro estudio, superior a los clasificados como T1N0M0 pero con una fase S > 12 (87.4% versus 81.3%).

Así mismo, también es destacable en este estudio que los tumores en estadio T4N0M0, con fase S < 7, tienen una probabilidad de supervivencia del 73.8%, mientras que los mismos tumores (T4N0M0) pero con una fase S > 12, la probabilidad de supervivencia es significativamente menor, llegando sólo a un 22.3% (p=0.04).

Estos resultados confirman con claridad nuestra hipótesis de trabajo inicial, en el sentido de que el cáncer de mama, posee una cinética celular tumoral característica que nos explica esta aparente diversidad en el comportamiento entre tumores clasificados clásicamente (morfológicamente) en un mismo estadio y que de forma paradójica, muestran una evolución y supervivencia muy diferentes.

Todo ello nos conduce a juzgar al cáncer de mama, como una entidad biológica, con una dinámica intrínseca, lo que tiene una repercusión pronóstica y terapéutica, y en consecuencia debe impulsarnos por líneas de investigación que tomen en consideración este dato y valoren otros factores pronósticos diferentes de los tradicionalmente considerados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Los parámetros clínico-patológicos clásicos, definidos según el sistema TNM, poseen una significación pronóstica de gran interés práctico. Corroborado una vez más por el estudio de nuestra casuística.
- 2.- Los antecedentes familiares de cáncer de mama, los antecedentes personales mamarios y los antecedentes ginecológico-obstétricos de nuestras pacientes con cáncer de mama, no son factores de importancia pronóstica.
- 3.- La Citometría de flujo, permite determinar la capacidad proliferativa, la ploidía y la cinética celular de los cánceres de mama.
- 4.- No se ha hallado ningún tipo de significación estadística entre los tratamientos sistémicos efectuados a nuestras pacientes (RT, QT, HT) y el valor obtenido para la Fase S.
- 5.- El empleo de métodos histológicos para la preselección del área tumoral, es imprescindible para la rigurosidad del estudio de la ploidía y fase S. Debiéndose cuestionar el valor de dichos análisis en los estudios en los que no se ha realizado esta

metodología.

- 6.- Se ha podido constatar del estudio de los histogramas de DNA, que existe una heterogeneidad en el contenido de DNA en los tumores primarios, a diferencia de las metástasis (ganglionares y a distancia o sistémicas).
- 7.- Los carcinomas mamarios con contenido de DNA aneuploide, tienen peor pronóstico que los diploides, mostrando una menor supervivencia a los 5 años, con significación estadística.
- 8.- La determinación del valor de la ploidía en el cáncer de mama, es considerada como una variable independiente de significación pronóstica.
- 9.- Existe una gran significación estadística entre la ploidía del tumor primario y la de las metástasis (ganglionares y a distancia) procedentes de este tumor, lo que induce a pensar que un mismo clon celular es el que desde el tumor primario va invadiendo los diferentes tejidos y estructuras.
- 10.- Hemos comprobado una relación estadísticamente significativa entre la ploidía del DNA y los Receptores de Progesterona, lo que no ha podido ser demostrado en relación a los Receptores Tumoraes de Estrógenos.

- 11.- En relación a la Fase S, hemos verificado que, aunque los valores de Fase S están ampliamente distribuidos, muestran unos valores más bajos en el caso de tumores diploides que cuando se compara con los tumores aneuploides.
- 12.- Los carcinomas mamarios con valor de Fase S elevada (> 12), se relacionan con peor pronóstico, mientras que, los carcinomas con fase S baja (< 7), muestran un pronóstico más favorable.
- 13.- Al igual que lo observado con la ploidía, hemos encontrado una gran significación estadística entre los valores de la Fase S de los tumores primarios y los valores de Fase S de los ganglios axilares invadidos. Por ello creemos que esto constituye una aportación original de nuestro estudio al confirmar en la práctica clínica, la hipótesis de la existencia de un mismo clon celular como responsable de la invasión de las estructuras tisulares a partir del tumor primario.
- 14.- La Fase S también se ha mostrado como una variable independiente de interés pronóstico en el cáncer de mama.
- 15.- Apoyándonos en el estudio multivariable de Regresión Logística Múltiple, pensamos que los valores de Fase

S pueden ser útiles para una mejor discriminación de los carcinomas mamarios en estadio T1N0M0, permitiéndonos establecer un subgrupo de pacientes de alto riesgo en el Estadio I, en las cuales estaría indicado el empleo de terapéutica sistémica coadyuvante; con lo cual mejoraría la supervivencia de estas pacientes, que según los parámetros hasta ahora considerados (TNM), no reciben tratamiento coadyuvante. Ello pensamos constituye una respuesta claramente positiva a los objetivos planteados en nuestra hipótesis de trabajo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1.- Hirayama T.

Epidemiología y Factores de Riesgo del Cáncer de Mama.

En: Diaz-Faes J. Eds., Cáncer de Mama. Avances en el Diagnóstico y Tratamiento. León -España-. Pag.21-38. 1990.

2.- MacMahon B., Cole P. and Brown J.

Etiology of Human Breast Cancer: A Review.

J. Natl. Cancer Inst. 50:21-42. 1973.

3.- Parkin D.M., Stjernsward J., and Muir C.S.

Estimates of the Worldwide Frequency of Twelve Major Cancers.

Bull WHO. 62:163-182. 1984.

4.- Herranz M.

Cancer de mama, Epidemiología, Factores de Riesgo.

Diploma Universitario. Patología Mamaria. Curso Postgrado.

Universidad de Barcelona.

Lección 71. Pag. 1-11. 1991.

5.- Kelsey J.L.:

A Review of the Epidemiology of Human Breast Cancer.

Epidem. Rev. 1:74-109. 1979.

6.- Tulinius H., Day N.E., Johannesson G. et al.

Reproductive Factors and Risk for Breast Cancer in Iceland.

Int. J. Cancer 21:724-730. 1978.

7.- Mostafa M.S.

Epidemiology of Breast Cancer. Descriptive and Analytical Review.

J. Egypt Public Health Assoc. 65:11-36. 1990.

8.- McDermott F.

Risk Factors in Breast Cancer.

Aust. Fam. Physician. 20:1455-1460. 1991.

9.- Steel M., Thompson A., and Clayton J.

Genetics Aspects of Breast Cancer.

Br. Med. Bull. 47:504-518. 1991.

10.- Lynch H.T., Watson P., Conway T.A. and Lynch J.F.

Natural History and Age at Onset of Hereditary Breast Cancer. Cancer. 69:1404-1407. 1992.

11.- Fernandez-Cid A.

La Patología Mamaria en la Práctica Clínica Ginecológica.

Diploma Universitario. Patología mamaria. Curso Postgrado.

Universidad de Barcelona.

Lección 11. Pag.1-21. 1991.

12.- Ribalta T.

Formas especiales, las mastopatias de riesgo.

Diploma Universitario. Patología Mamaria. Curso Postgrado.

Universidad de Barcelona.

Lección 66. Pag. 1-6. 1991.

13.- Black M., and Chabon A.

In Situ Carcinoma of the Breast.

Pathology. Annual Soramen S.C. Ed. New York. 1969.

14.- Silverberger G.D.

Busing Lesions of the Breast and Cancer.

Cancer. 29:574. 1972.

15.- De Brux J.

Dysplasies on Hyperplasies Atypiques.

Histopatologie du Sein.

Ed. Mason 1979.

16.- Alvarenga M.

Anatomía Patológica. Diagnóstico en Mastología.

J.A. Pinotti. Ed. Monole. Brasil 1980.

17.- Gros Ch.

Senología. El Médico.

Pag. 11. Madrid 1980.

18.- McDivitt R.W., Stevens J.A., Lee N.C., Wingo P.A.,
Rubin G.L., and Gersell D.

Histologic Types of Benign Breast Disease and the Risk for
Breast Cancer. The Cancer and Steroid Hormone Study Group.

Cancer 69:1408-1414. 1992.

- 19.- Olsson H., Borg A., Ferno M., Moller T.R., and Raustam J.
Early Oral Contraceptive Use and Premenopausal Breast Cancer, a Review of Studies Performed in Southern Sweden.
Cancer Detect. Prev. 15:265-271. 1991.
- 20.- Staffer J.A., Newschaffer C.J., Jones J.K., and Miller V.
Progestins and Breast Cancer: An Epidemiologic Review.
Fertil Steril. 57:473-491. 1992.
- 21.- Marselos M. and Vainio H.
Carcinogenic Properties of Pharmaceutical Agents Evaluated in the IARC Monographs Programme. Commentary.
Carcinogenesis. Vol. 12. 10:1751-1766. 1991.
- 22.- Blot W.J.
Alcohol and Cancer.
Cancer Res. 52:2119s-2123s. 1992.
- 23.- Harvey E.B., Schairer C., and Brinton L.A.
Alcohol Consumption and Breast Cancer.
J. Natl. Cancer Inst. 78:657-661. 1987.
- 24.- Willett W.C., Stampfer M.J., and Colditz G.A.
Moderate Alcohol Consumption and the Risk of Breast Cancer.
N. Engl. J. Med. 316:1174-1180. 1987.

- 25.- Zaridze D., Lifanova Y., Maximovitch D., Day N.E., and Duffy S.W.
Diet, Alcohol Consumption and Reproductive Factors in a Case-Control Study of Breast Cancer in Moscow.
Int. J. Cancer. 48:493-501. 1991.
- 26.- Plant M.L.
Alcohol and Breast Cancer: A Review.
Int. J. Addict. 27:107-128. 1992.
- 27.- Ono H.
Molecular Biology of Type A Endogenous Retrovirus.
Kitasato Arch. Exp. Med. 63:77-90. 1990.
- 28.- Singer B., and Essigmann J.M.
Commentary. Site-Specific Mutagenesis: Retrospective and Prospective.
Carcinogenesis vol 12. 6:949-955. 1991.
- 29.- Pitot H.C., and Dragan Y.P.
Facts and Theories Concerning the Mechanisms of Carcinogenesis.
FASEB J. 5:2280-2286. 1991.
- 30.- Sahu S.C.
Oncogenes, Oncogenesis, and Oxygen Radicals.
Biomed. Environ. Sci. 3:183-201. 1990.

31.- Devilee P., and Cornelisse C.J.

Genetics of Human Breast Cancer.

Cancer Surv. 9:605-630. 1990.

32.- Wall K.L., Gao W., Koppele J.M., Kwei G.Y., Kauffman F.C., and Thurman R.G.

The Liver Plays a Central Role in the Mechanism of Chemical Carcinogenesis Due to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

Carcinogenesis. Vol. 12. 5:783-786. 1991.

33.- Hozumi M., Bloch A., Koeffler H.P., and Pierce G.B.

Cell Differentiation and Cancer Control.

Meeting Report of Ninth Annual Sapporo Cancer Seminar.

Cancer Research 50:1346-1350. 1990.

34.- Gullino P.M.

Natural History of Breast Cancer.

Cancer 39:2697-2703. 1977.

35.- Bond W.H.

The Influence of Various Treatments on Survival Rates in Cancer of the Breast. In: The Treatment of Carcinoma of the Breast. A.S. Jarret, Ed, Amsterdam, Excerpta Medica Foundation. Pag. 24-39. 1968.

36.- Dickson R.B., Gottardis M.M. and Merlino G.T.

Molecular Insights into Breast Cancer from Transgenic Mouse Models.

Bioessays. 13:591-596. 1991.

37.- Tannock I.F.

Principles of Cell Proliferation: Cell Kinetics.

In: De Vita VT., Hellman S., and Rosenberg SA. eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, ed. 3. Philadelphia: JB Lippincott, P. 3-13. 1989.

38.- Prats M.

Historia Natural del Cáncer de Mama.

Diploma Universitario. Patología Mamaria. Curso Postgrado. Universidad de Barcelona. Lección 73. Pag. 1-4. 1991.

39.- Liotta L.A., and Stetler-Stevenson W.G.

Principles of Molecular Cell Biology of Cancer: Cancer Metastasis. In: De Vita VT., Hellman S., and Rosenberg SA. eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, ed. 3. Philadelphia: JB Lippincott. Pag. 98-115. 1989.

40.- Nachlas M.M.

Irrationality in the Management of Breast Cancer. The Staging System.

Cancer 68:681-690. 1991.

41.- Harris JR., Hellman S., Canellos GP., and Fisher B.

Cancer of the Breast. In: De Vita VT., Hellman S., and Rosenberg SA. eds., Cancer : Principles and Practice of Oncology, ed. 2 Philadelphia: JB Lippincott, 1119-1177. 1985.

42.- Noguchi M., Ohta N., Koyasaki N., Taniya T., Miyazaki I., and Mizukami Y.

Reappraisal of Internal Mammary Node Metastases as a Prognostic Factor in Patients with Breast Cancer.

Cancer 68:1918-1925. 1991.

43.- Joensuu H., and Toikkanen S.

Prognosis of Breast Cancer with Small Primary Tumor. (pT1)

Acta Oncol. 30:793-796. 1991.

44.- Kinne D.W.

Staging and Follow-up of Breast Cancer Patients.

Cancer 67:1196-1198. 1991.

45.- Schunemann H., Langecker P.J., Ellgas W., Leonhardt A., and Merkl H.

Value of Bone Scanning in the Follow-up of Breast Cancer Patients. A Study of 1000 cases.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 116:486-491. 1990.

46.- Prats M.

Hacia una Clasificación Biológica.

Diploma Universitario. Patología Mamaria. Curso Postgrado.

Universidad de Barcelona. Lección 75. Pag. 1-3. 1991.

47.- Mitra I., and MacRae K.D.

A Meta-Analysis of Reported Correlations between Prognostic Factors in Breast Cancer: Does Axillary Lymph Node

Metastasis Represent Biology of Chronology ?

Eur. J. Cancer. 27:1574-1583. 1991.

48.- Koenders P.G., Beex L.V., Langens R., Kloppenborg P.W., Smals A.G., and Benraad T.J.

Steroid Hormone Receptor Activity of Primary Human Breast Cancer and Pattern of First Metastasis. The Breast Cancer Study Group.

Breast Cancer Res. Treat. 18:27-32. 1991.

49.- Winstanley J., Cooke T., George W.D. et al.

The Long Term Prognostic Significance of Oestrogen Receptor Analysis in Early Carcinoma of the Breast.

Br. J. Cancer. 64:99-101. 1991.

50.- Campani D., De Negri F., Fabbri R., et al.

Estrogen, Progesterone Receptors and Proliferating Activity Evaluated by Immunocytochemistry in Breast Cancer.

Int. J. Biol. Markers. 6:144-150. 1991.

51.- Amadori D., Bonaguri C., Nanni O., et al.

Cell Kinetics and Hormonal Features in Relation to Pathological Stage in Breast Cancer.

Breast Cancer Res. Treat. 18:19-25. 1991.

52.- Pertschuk L.P., Kim D.S., Nayer K., et al.

Immunocytochemical Estrogen and Progestin Receptor Assays in Breast Cancer with Monoclonal Antibodies.

Cancer. 66:1663-1670. 1990.

53.- Gelbfish G.A., Davidson A.L., Kopel S. et al.

Relationship of Estrogen and Progesterone Receptors to Prognosis in Breast Cancer.

Ann. Surg. Vol. 207. Nº 1:75-79. 1988.

54.- Cassanelli S., Guillaud P., Louis J., and Seigneurin D.
Image Cytometry of Progesterone Receptor Expression During the Cell Cycle in the MCF-7 Cell Line.

J. Histochem. Cytochem. 39:1713-1718. 1991.

55.- Graham M.L.2d., Smith J.A., Jewett P.B., and Horwitz K.B.

Heterogeneity of Progesterone Receptor Content and Remodeling by Tamoxifen Characterize Subpopulations of Cultured Human Breast Cancer Cells: Analysis by Quantitative Dual Parameter Flow Cytometry.

Cancer Res. 52:593-602. 1992.

56.- Bezwoda W.R., Esser J.D., Dansey R., Kessel I., and Lange M.

The Value of Estrogen and Progesterone Receptor Determinations in Advanced Breast Cancer. Estrogen Receptor Level but not Progesterone Receptor Level Correlates with Response to Tamoxifen.

Cancer. 68:867-872. 1991.

57.- Crowe J.P., Gordon N.H., Hubay C.A. et al.

Estrogen Receptor Determination and Long Term Survival of Patients with Carcinoma of the Breast.

Surgery, Gynecology & Obstetrics. Vol.173. pag.273-278. 1991.

58.- Crowe J.P., Gordon N.H., Hubay C.A. et al.

Interaction of Estrogen Receptor Status and Race in Predicting Prognosis for Stage I Breast Cancer Patients.

Surgery. 100:599-605. 1986.

59.- Yao X.Y., Hao Y., Sutherland D.J., Sidlofsky S., and Blackstein M.E.

DNA Content and Estrogen Receptors in Primary Carcinoma of the Breast.

Can. J. Surg. 34:349-355. 1991.

60.- Yao X.Y., and Fernandes B.J.

The Relation of Deoxyribonucleic Acid Contents and Nuclear Estrogen Receptors in Breast Cancers.

Chung-hua Ping Li Hsueh. Tsa. Chih. 20:28-31. 1991.

61.- Vielh P., Magdelenat H., Mosseri V., Remvikos Y., and di Bonito L.

Immunocytochemical Determination of Estrogen and Progesterone Receptors on 50 Fine-Needle Samples of Breast Cancer. A Prospective Study Including Biochemical Correlation and DNA Flow Cytometric Analysis.

Am. J. Clin. Pathol. 97:254-261. 1992.

- 62.- Van Naegell J.R., Donalson E.S., and Hanson H.B.
Biochemical Markers in the Plasma and Tumors of Patients
with Gynaecologic Malignancies.
Cancer. 48:495-503. 1981.
- 63.- Ballesta A.M.
Marcadores Tumorales: Definición, Clasificación y Utilidad
Clínica.
Diploma Universitario. Patología Mamaria. Curso Postgrado.
Universidad de Barcelona. Lección 82. Pag.1-16. 1991.
- 64.- Iaffaioli R.V., Caponigro F., Esposito G. et al.
Impact of Preoperative CA 15.3 Levels in Operable Breast
Cancer. Comparison with Tissue Polypeptide Antigen (TPA)
and Carcinoembryonic Antigen (CEA).
Int. J. Biol. Markers. 6:21-24. 1991.
- 65.- Nicolini A., Colombini C., Luciani L., Carpi A., and
Giuliani L.
Evaluation of Serum CA 15.3 Determination with CEA and TPA
in the Post-Operative Follow-up of Breast Cancer Patients.
Br. J. Cancer. 64:154-158. 1991.
- 66.- Jensen J.L., Maclean G.D., Suresh M.R., Almeida A.,
Jette D., Lloyd S., Bodnar D., Krantz M., and Longenecker
B.M.
Possible Utility of Serum Determinations of CA 125 and CA
27.29 in Breast Cancer Management.

Int. J. Biol. Markers. 6:1-6. 1991.

67.- Sahin A.A., Ro J., Ro J.Y., Blick M.B. et al.
Ki-67 Immunostaining in Node-Negative Stage I/II Breast
Carcinoma. Significant Correlation with Prognosis.
Cancer. 68:549-557. 1991.

68.- Guillaud P., du Manoir S., and Seigneurin D.
Quantification and Topographical Description of Ki-67
Antibody Labelling During the Cell Cycle of Normal
Fibroblastic (MCR-5) and Mammary Tumour Cell Lines (MCF).
Anal. Cell Pathol. 1:25-39. 1989.

69.- Dnistrian A.M., Schwartz M.K., Greenberg E.J., Smith
C.A., Dorsa R., and Schwartz D.C.
CA 549 as a Marker in Breast Cancer.
Int. J. Biol. Markers. 6:139-143. 1991.

70.- Gioanni J., Caldani C., Zanghellini E. et al.
A New Epithelial Membrane Antigen (Calam 27) as a Marker of
Carcinoma in Serous Effusions.
Acta Cytol. 35:315-319. 1991.

71.- Whitford P., George W.D., and Campbell A.M.
Flow Cytometric Analysis of Tumor Infiltrating Lymphocyte
Activation and Tumor Cell MHC Class I and II Expressin in
Breast Cancer Patients.
Cancer Lett. 61:157-164. 1992.

72.- Bloom H.J.G., and Richardson W.W.

Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer.

Br. J. Cancer. 11:359-373. 1957.

73.- Bloom H.J.G., Richardson W.W. and Harries E.J.

Natural History of Untreated Breast Cancer (1805-1933).

Br. Med. J. July. P 213-221. 1962.

74.- Bloom H.J.G., Richardson W.W., and Field J.R.

Host Resistance and Survival in Carcinoma of Breast: A Study of 104 Cases of Medullary Carcinoma in a Series of 1411 Cases of Breast Cancer Followed for 20 Years.

Papers and Originals.

Br. Med. J. 3:181-188. 1970.

75.- Rosen P.P., and Groshen S.

Factors Influencing Survival and Prognosis in Early Breast Carcinoma (T1N0M0-T1N1M0).

Surg.Clinics of North Amer. Vol.70. 4:937-962. 1990.

76.- Davis B.W., Gelber R.D., Goldhirsch A., et al.

Prognostic Significance of Tumor Grade in Clinical Trials of Adjuvant Therapy for Breast Cancer with Axillary Lymph Node Metastasis.

Cancer 58:2662-2670. 1986.

77.- Ruso J., Frederick J., Ownby H.E., et al.

Predictors of Recurrence and Survival of Patients with Breast Cancer.

Am. J. Clin. Pathol. 88:123-131. 1987.

78.- Lash R.H., Bauer T.W., Hermann R.E., and Esselstyn C.B.
Partial Mastectomy: Pathologic Findings and Prognosis.

Hum. Pathol. 17:813-822. 1986.

79.- Black M.M., Barclay T.H.C., and Hankey B.F.
Prognosis in Breast Cancer Utilizing Histologic
Characteristics of the Primary Tumor.

Cancer 36:2048-2055. 1975.

80.- Pienta K.J., and Coffey D.S.

Correlation of Nuclear Morphometry with Progression of
Breast Cancer.

Cancer 68:2012-2016. 1991.

81.- Clemente C.G., Boracchi P., Andreola S., Del Vecchio
M., Veronesi P., and Rilke F.O.

Peritumoral Lymphatic Invasion in Patients with
Node-Negative Mammary Duct Carcinoma.

Cancer. 69:1396-1403. 1992.

82.- Rubbert A., Manger B., Lang N., Kalden J.R., and
Platzer E.

Functional Characterization of Tumor-Infiltrating
Lymphocytes from Patients with Breast Cancer.

Int. J. Cancer. 49:25-31. 1991.

83.- Aaltomaa S., Lipponen P., Eskelinen M., Kosma V.M.,
Mari S., Alhava E., and Syrjanen K.

Histological Assessment of the Prognostic Factors in Female
Breast Cancer.

Oncology. 49:1-8. 1992.

84.- Baak J.P.A., van Dop H., Kurver P.H.J., Hermans J.

The Value of Morphometry to Classic Prognosticators in
Breast Cancer.

Cancer 56:374-382. 1985.

85.- Mckenzie S.J.

Diagnostic Utility of Oncogenes and their Products in Human
Cancer.

Biochim. Biophys. Acta. 1072:193-214. 1991.

86.- Gullick W.J.

Growth Factors and Oncogenes in Breast Cancer.

Prog. Growth Factor Res. 2:1-13. 1990.

87.- Anderson D.E.

Genética y Cáncer de Mama. En: Diaz-Faes J. Eds., Cancer de
Mama: Avances en Diagnóstico y Tratamiento.

León -España-Pag. 40-51. 1990.

88.- Cooper C.S., and Stratton M.R.

Commentary. Soft Tissue Tumors: The Genetic Basis of Development.

Carcinogenesis. Vol.12. 2:155-165. 1991.

89.- Nowell P.C., Emanuel B.S., Finan J.B., Erikson J., and Croce C.M.

Chromosome Rearrangements in Oncogenesis.

Microbiol. Sci. 1:223-228. 1984.

90.- Szepietowski P., Nguyen C., Perucca-Lostanlen D., et al. D11S146 and BCL1 are Physically Linked but Can Be Discriminated by their Amplification Status in Human Breast Cancer.

Genomics. 10:410-416. 1991.

91.- Hudziak R.M., and Ullrich A.

Cell Transformation Potential of a HER2 Transmembrane Domain Deletion Mutant Retained in the Endoplasmic Reticulum.

J. Biol. Chem. 266:24109-24115. 1991.

92.- Madsen M.W., Lykkesfeldt A.E., Laursen I., Nielsen K.V., and Briand P.

Altered Gene Expression of C-Myc, Epidermal Growth Factor Receptor, Breast Epithelial Cell Line, HMT-3522, is associated with Decreased Growth Factor Requirements.

Cancer Res. 52:1210-1217. 1992.

93.- Lupu R., Colomer R., Kannan B., and Lippman M.E.

Characterization of a Growth Factor that Binds Exclusively to the ErbB-2 Receptor and Induces Cellular Responses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:2287-2291. 1992.

94.- Muller W.J.

Expression of Activated Oncogenes in the Murine Mammary Gland: Transgenic Models for Human Breast Cancer.

Cancer Metastasis Rev. 10:217-227. 1991.

95.- Editorials.

Breast Cancer Genetics: Some Clues, More Questions.

The Lancet. Vol.337. Pag. 329-331. 1991.

96.- Horak E., Smith K., Bromley L., et al.

Mutant p53, EGF Receptor and C-ErbB2 Expression in Human Breast Cancer.

Oncogene 6:2277-2284. 1991.

97.- Davidoff A.M., Herndon J.E. 2d, Glover N.S., et al.

Relation between p53 Overexpression and Established Prognostic Factors in Breast Cancer.

Surgery. 110:259-264. 1991.

98.- Heyderman E., and Dagg B.

p53 Immunostaining in Benign Breast Disease.

The Lancet.338:1532. 1991.

99.- Molina R.

HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer.

J. Nucl. Med. Allied Sci. 34 (Suppl. to Nº 3) 120-127.1990.

100.- Tommasi S., Paradiso A., Mangia A., et al.

Biological Correlation between HER-2/neu and Proliferative Activity in Human Breast Cancer.

Anticancer Res. 11:1395-1400. 1991.

101.- Allred D.C., Clark G.M., Tandon A.K., et al.

HER-2/neu in Node-Negative Breast Cancer: Prognosis Significance of Overexpression Influenced by the Presence of In Situ Carcinoma.

J. Clin. Oncol. 10:599-605. 1992.

102.- Tamura G., Maesawa C., Mikawa S., and Satodate R.

Significance of Immunohistochemically Detected C-ErbB-2 Protein Expression in Stage III Breast Cancer, with Reference to Nuclear Deformity, DNA Content and Prognosis.

Jpn. J. Clin. Oncol. 21:264-267. 1991.

103.- Marth C., Cronauer M.V., Doppler W., Ofner D., Ullrich A., Daxenbichler G.

Effects of Interferons on the Expression of the Proto-Oncogene HER-2 in Human Ovarian Carcinoma Cells.

Int. J. Cancer 50:64-68. 1992.

104.- Fernandez-Pol J.A.

Modulation of EGF Receptor Protooncogene Expression by Growth Factors and Hormones in Human Breast Carcinoma Cells.

Crit. Rev. Oncog. 2:173-185. 1991.

105.- Somerville J.E., Clarke L.A., and Biggart J.D.
C-ErbB-2 Overexpression and Histological Type of In Situ and
Invasive Breast Carcinoma.
J. Clin. Pathol. 45:16-20. 1992.

106.- Miles J.S., and Wolf C.R.
Commentary. Developments and Perspectives on the Role of
Cytochrome P450s in Chemical Carcinogenesis.
Carcinogenesis. Vol.12. 12:2195-2199. 1991.

107.- Collynn-d'Hooghe M., Vandewalle B., Hornez L., et al.
C-Myc Overexpression, C-Mil, C-Myb expression in a Breast
Tumor Cell Line. Effects of Estrogen and Antiestrogen.
Anticancer Res. 11:2175-2179. 1991.

108.- Kikuchi K., Ueda M., Kitagawa Y., Ando N., and Abe O.
Cancer Metastasis and Recurrence from the Standpoint of
Amplification and Expression of Oncogenes in Human Malignant
Tumors.
Nippon Geka Gakkai Zasshi. 92:1090-1093. 1991.

109.- Wright C., Nicholson S., Angus B., et al.
Relationship between C-ErbB-2 Protein Product Expression and
Response to Endocrine Therapy in Advanced Breast Cancer.
Br. J. Cancer. 65:118-121. 1992.

110.- Bandyopadhyay D., Dani H.D., Samant U.C., Redkar A.A., and Mitra I.

Correlations between C-Erb Beta-2 Oncogene Amplification and the Expression of its mRNA and Protein in Human Breast Carcinomas.

Oncology. 49:9-14. 1992.

111.- Correlation of C-ErbB-2 Protein Expression with Histologic Grade, Lymph Node Involvement and Steroid Receptor Status in Human Breast Tumors.

Arch. Gynecol. Obstet. 251:45-50. 1992.

112.- Hollingsworth R.E., and Lee W.H.

Tumor Suppressor Genes: New Prospects for Cancer Research.

J. Natl. Cancer Inst. 83:91-96. 1991.

113.- Chen P.L., Chen Y.M., Bookstein R., and Lee W.H.

Genetic Mechanisms of Tumor Supression by Human p53 Gene.

Science. 250:1576-1580. 1990.

114.- The Human Prohibitin Gene Located on Chromosome 17q21 is Mutated in Sporadic Breast Cancer.

Cancer Res. 52:1643-1646. 1992.

115.- Devilee P., and Cornelisse C.J.

Genetics of Human Breast Cancer.

Cancer Surv. 9:605-630. 1990.

116.- Gray J.W., Dolbeare F., and Pallavicini M.G.

Quantitative Cell-Cycle Analysis.

Flow Cytometry and Sorting. Published by Wiley-Liss, Inc.
2nd Edition Pag. 445-467. 1990.

117.- Colomb E., Kopp F., Spyrtos F., Martin P-M.

Cell-Cycle Studies by Multiparametric Automatic Scanning of
Topographically Preserved Cells in Culture.

Cytometry 10:263-272. 1989.

118.- Gomez X.

Citometría de Flujo.

Beca del Institut d'Estudis Ilerdencs. Salamanca 1990.

119.- Willman Ch.L., Tomasi T.B., Stewart C.C., and Scoot L.

Applications of Flow Cytometry to Diagnostic Surgical
Pathology.

Departments of Cell Biology and Patology. University of New
Mexico. Pag. 144-181. 1985.

120.- Shapiro H.M.

Multistation Multiparameter Flow Cytometry: A Critical
Review and Rationale.

Cytometry. 3:227. 1983.

121.- Lovett E.J., Schnitzer B., Keren D.F., Flint A.,
Hudson J.L., and McClatchey K.D.

Application of Flow Cytometry to Diagnostic Pathology.

Laboratory Investigation. Vol. 50. 2:115-140. 1984.

122.- Shackney S.E., Burholt D.R., Pollice A.A., Smith Ch.A., Pugh R.P., and Harsock R.J.

Discrepancies between Flow Cytometric and Cytogenetic Studies in the Detection of Aneuploidy in Human Solid Tumors.

Cytometry 11:94-104. 1990.

123.- Hiddemann W., Schumann J., Andreef M. et al.

Convention on Nomenclature of DNA Cytometry.

Short Communication.

Cancer Genetics and Cytogenetics 13:181-183. 1984.

124.- Kotilo P.K.

DNA Analysis of Neoplasia: An Introduction for the Family Physician. 43:1259-1263. 1991.

125.- Fallenius A.G., Franzen S.A., and Auer G.U.

Predictive Value of Nuclear DNA Content in Breast Cancer in Relation to Clinical and Morphologic Factors.

Cancer 62:521-530. 1988.

126.- Fallenius A.G., Auer G.U., and Carstensen J.M.

Prognostic Significance of DNA Measurements in 409 Consecutive Breast Cancer Patients.

Cancer 62:331-341. 1988.

127.- Dressler L.G., Seamer L., Owens M.A., McGuire W.L.,
Clark G.M.

Evaluation of a Modeling System for S-Phase Estimation in
Breast Cancer by Flow Cytometry.

J. Clin. Oncol. Oct. 5:1690-1703. 1987.

128.- Barlogie B., Raber M.N., Schumann J., Johnson T.S.,
Göhde W., Drewinko B., Swartzendruber D.E., Adreef M., and
Freireich E.J.

Flow Cytometry in Clinical Research.

Cancer Research 43, 3982-3997. September 1983.

129.- Coulson P., Seckinger D., Thornthwaite J.T.,
Sugarbaker E.V., Woolley T.W.

Prognostic Indicators Including DNA Histogram Type, Receptor
Content, and Staging Related to Human Breast Cancer Patient
Survival.

Cancer Research 44:4187-4196. 1984.

130.-Kute T.E., and Muss H.

Flow Cytometry in Solid-Tumor Prognosis.

Laboratory Management. July 21-32. 1987.

131.- Uyterlinde A.M., Schipper N.W., and Baak J.P.

Comparison of Extent of Disease and Morphometric and DNA
Flow Cytometric Prognostic Factors in Invasive Ductal Breast
Cancer.

J. Clin. Pathol. 40:1432-1436. 1987.

132.- Abe R. Ueki H.

Flow Cytometric Analysis for Assessing The Malignant Potential of Breast Cancer.

J.Surg. Oncol. 36:259-262. 1987.

133.- Dressler L.G., Seamer L., Owens M.A., Clark G.M., McGuire W.L.

DNA Flow Cytometry and Prognostic Factors in 1331 Frozen Breast Cancer Specimens.

Cancer. 61:420-427. 1988.

134.- Feichter G.E., Muller A., Kaufmann M., Haag D., Born I.A., Abel U., Klinga K., Kubli F., Goerttler K.

Correlation of DNA Flow Cytometric Results and other Prognostic Factors in Primary Breast Cancer.

Int. J. Cancer. 41:823-828. 1988.

135.- Kallioniemi O.P., Karkkainen A., Auvinen O., Mattila J., Koivula T., and Hakama M.

DNA Flow Cytometric Analysis Indicates that Many Breast Cancers Detected in the First Round of Mamographic Screening Have a Low Malignant Potential.

Int. J. Cancer. Nov. 42:697-702. 1988.

136.- Kallioniemi O.P., Blanco G., Alavaikko M. et al.

Improving the Prognostic Value of DNA Flow Cytometry in Breast Cancer by Combining DNA Index and S-Phase Fraction.

A Proposed Classification of DNA Histograms in Breast

Cancer.

Cancer. Nov.15. 62:2183-2190. 1988.

137.- Trope C., Kaern J., Pettersen E.O., and Iversen O.E.
; DNA Examinations in Gynecological Cancer and Breast
Cancer &

Tidsskr Nor Laegeforen. 111:1638-1642. 1991.

138.- Feichter G.E.

Flow Cytometry of Breast Cancer.

Zentralbl. Pathol. 137:220-226. 1991.

139.- Moran R.E., Black M.M., Alpert L., and Straus M.J.
Correlation of Cell-Cycle Kinetics, Hormone Receptors,
Histopathology, and Nodal Status in Human Breast Cancer.
Cancer 54:1586-1590. 1984.

140.- Raber M.N.

Clinical Applications of Flow Cytometry.

Oncology. Vol.2. 3:36-39. 1988.

141.- Fuhr J.E., Frye A., Kattine A.A., and van Meter S.

Flow Cytometric Determination of Breast Tumor Heterogeneity.

Cancer. 67:1401-1405. 1991.

142.- Manni A., Wright C., Davis G., Glenn J., Joehl R., and
Feil P.

Promotion by Prolactin of the Growth of Human Breast
Neoplasms Cultured in Vitro in the Soft Agar Clonogenic

Assay.

Cancer Res. 46:1669-1672. 1986.

143.- Wang D.Y., Hampson S., Kwa H.G. et al.

Serum Prolactin Levels in Women with Breast Cancer and their Relationship to Survival.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. Vol. 22. 4:487-492. 1986.

144.- Zbieranowski I., Le Riche J.C., Jackson S.M., and Olivotto I.

The Use of Sequential Fine-Needle Aspiration Biopsy with Flow Cytometry to Monitor Radiation Induced Changes in Breast Carcinoma.

Anal. Cell. Pathol. 4:13-24. 1992.

145.- Laerum O.D., and Farsund T.

Clinical Application of Flow Cytometry: A Review.

Cytometry. Vol. 2. 1:1-9. 1981.

146.- Lee A.K., Dugan J., Hamilton W.M., Cook L., Heatley G., Kamat B., and Silverman M.L.

Quantitative DNA Analysis in Breast Carcinomas: A Comparison between Image Analysis and Flow Cytometry.

Mod. Pathol. Mar. 4:178-182. 1991.

147.- Wingren S., Hatschek T., Stal O., Boeryd B., and Nordenskjold B.

Comparison of Static and Flow Cytofluorometry for Estimation of DNA Index and S-Phase Fraction in Fresh and

Paraffin-Embedded Breast Carcinoma Tissue.

Acta Oncol. 27:793-797. 1988.

148.- Roos G., Arnerlov C., and Emdin S.

Retrospective DNA Analysis of T3/T4 Breast Carcinoma Using Cytophotometry and Flow Cytometry. A Comparative Study with Prognostic Evaluation.

Anal. Quant Cytol. Histol. 10:189-194. 1988.

149.- Shapiro H.M.

Flow Cytometric Probes of Early Events in Cell Activation.

Cytometry. 1:301. 1981.

150.- Lopez-Gines C., Callaghan R.C., Ruiz A., Gil R., Pellin A., Calderon J., Vazquez C., y Llombart-Bosch A.

Cytogenetics, Flow Cytometry, Cytophotometry and Morphometry of 22 Cases of Primary Breast Carcinoma. A Comparative Study.

Virchows Arch. B Cell. Pathol. 61:133-140. 1991.

151.- Kallioniemi O.P., Joensuu H., Klemi P., Koivula T.

Inter-Laboratory Comparison of DNA Flow Cytometric Results from Paraffin-Embedded Breast Carcinomas.

Breast Cancer Res. Treat. 17:59-61. 1990.

152.- Beerman H., Smit V.T., Kluin P.M., Bonsing B.A., Hermans J., and Cornelisse C.J.

Flow Cytometric Analisis of DNA Stemline Heterogeneity in Primary and Metastatic Breast Cancer ; See Comments ; Cytometry 12:147-154. 1991.

153.- Kute T.E., Muss H.B., Cooper M.R., Case L.D., Buss D., Stanley V., Gregory B., Galleshaw J., and Booker K.
The Use of Flow Cytometry for the Prognosis of Stage II Adjuvant Treated Breast Cancer Patients.
Cancer. 66:1810-1816. 1990.

154.- Yuan J., Hennessy C., Givan A.L. et al.
Predicting Outcome for Patients with Node Negative Breast Cancer: A Comparative Study of the Value of Flow Cytometry and Cell Image Analysis for Determination of DNA Ploidy.
Br. J. Cancer. 65:461-465. 1992.

155.- Witzig T.E., Gonchoroff N.J., Therneau T. et al.
DNA Content Flow Cytometry as a Prognostic Factor for Node-Positive Breast Cancer.
Cancer 68:1781-1788. 1991.

156.- Lykkesfeldt A.E., Balslev I., Christensen I.J. et al.
DNA Ploidy and S-Phase Fraction in Primary Breast Carcinomas in Relation to Prognostic Factors and Survival for Premenopausal Patients at High Risk for Recurrent Disease.
Acta Oncol. 27:749-756. 1988.

157.- Merkel D.E., Dressler L.G., and McGuire W.L.

Flow Cytometry, Cellular DNA Content, and Prognosis in Human Malignancy.

J. Clin. Oncol. Oct. 5:1690-1703. 1987.

158.- Opfermann M., Brugal G., and Vassilakos P.

Cytometry of Breast Carcinoma: Significance of Ploidy Balance and Proliferation Index.

Cytometry. 8:217-224. 1987.

159.- Frierson H.F. Jr.

Ploidy Analysis and S-Phase Fraction Determination by Flow Cytometric of Invasive Adenocarcinomas of the Breast.

Am. J. Surg. Pathol. Apr. 15:358-367. 1991.

160.- Fisher B., Gunduz N., Constantino J. et al.

DNA Flow Cytometric Analysis of Primary Operable Breast Cancer. Relation of Ploidy and S-Phase Fraction to Outcome of Patients in NSABP B-04.

Cancer. 68:1465-1475. 1991.

161.- Eliassen C.A., Opitz L.M., Vamvakas E.C. et al.

Flow Cytometric Analysis of DNA Ploidy and S-Phase Fraction in Breast Cancer Using Cells Obtained by Ex-Vivo Fine-Needle Aspiration: An Optimal Method for Sample Collection.

Mod. Pathol. 4:196-200. 1991.

162.- Whitford P., Mallon E.A., George W.D., and Campbell A.M.

Flow Cytometric Analysis of Tumor Infiltrating Lymphocytes
in Breast Cancer.

Br. J. Cancer 62:971-975. 1990.

163.- Clark G.M., McGuire W.L.

New Biologic Pronostic Factors in Breast Cancer.

Oncology (Williston Park). May. 3:49-54. 1989.

164.- Trope C., Kaern J., Pettersen E.O., and Iversen O.E.

DNA Examinations in Gynecological Cancer and Breast Cancer.

Tidsskr. Nor. Laegeforen. 111:1638-1642. 1991.

165.- Cornelisse C.J., van de Velde C.J., Caspers R.J.,
Moolenaar A.J., Hermans J.

DNA Ploidy and Survival in Breast Cancer Patients.

Cytometry. 8:225-234. 1987.

166.- Ellis C.N., Burnette J.J., Sedlak R., Dyas Ch., and
Blakemore W.S.

Prognostic Applications of DNA Analysis in Solid Malignant
Lesions in Humans.

Collective Review.

Surgery, Gynecology & Obstetrics Vol.173. Pag.329-342. 1991.

167.- Baildam A.D., Zaloudik J., Howell A., et al.

DNA Analysis by Flow Cytometry, Response to Endocrine
Treatment and Prognosis in Advanced Carcinoma of the Breast.

Br. J. Cancer. 55:553-559. 1987.

- 168.- Kallioniemi O.P., Blanco G., Alavaikko M. et al.
Tumor DNA Ploidy as an Independent Prognostic Factor in
Breast Cancer.
Br. J. Cancer. Nov.56:637-642. 1987.
- 169.- Aasmundstad T.A. Haugen O.A.
DNA Ploidy in Intraductal Breast Carcinomas.
Eur. J. Cancer. 26:956-959. 1990.
- 170.- Thorud E., Fossa S.D., Vaage S. et al.
Primary Breast Cancer.
Flow Cytometric DNA Pattern in Relation to Clinical and
Histopathologic Characteristics.
Cancer. 57:808-811. 1986.
- 171.- Sharma S., Mishra M.C., Kapur B.M., Verma K., Nath I.
The Prognostic Significance of Ploidy Analysis in Operable
Breast Cancer.
Cancer. 68:2612-2616. 1991.
- 172.- Yuan J., Hennessy C., Corbett I.P. et al.
Node Negative Breast Cancer: The Prognostic Value of DNA
Ploidy for Long-Term Survival.
Br. J. Surg. 78:844-848. 1991.
- 173.- Beerman H., Bonsing B.A., van de Vijver M.J. et al.
DNA Ploidy of Primary Breast Cancer and Local Recurrence
after Breast-Conserving Therapy.

Br. J. Cancer. 64:139-143. 1991.

174.- Noguchi M., Taniya T., Ohta N., Koyasaki N., Miyazaki I., and Mizukami Y.

Lymph Node Metastases Versus DNA Ploidy as Prognostic Factors for Invasive Ductal Carcinoma of the Breast.

Breast Cancer Res. Treat. 19:23-31. 1991.

175.- Carpenter R., Gibbs N., Matthews J., Cooke T.

Importance of Cellular DNA Content In Pre-malignant Breast Disease and Pre-Invasive Carcinoma of the Female Breast.

Br J. Surg. 74:905-906. 1987.

176.- van Dam P.A., van Bockstaele D.R., Keersmaeckers G.H., and Uyttenbroeck F.L.

Flow Cytometric Detection of Multifocal DNA Aneuploid Cell Populations in Mastectomy Specimens Containing a Primary Breast Carcinoma.

Cytometry. 11:300-307. 1990.

177.- Nakamura A.

Experimental and Clinical Study on Flow Cytometry DNA Analysis of Human Breast Carcinoma.

Nippon Geka Gakkai Zasshi. 89:737-746. 1988.

178.- Kallioniemi O.P., Visakorpi T., Holli K., Heikkinen A., Isola J., and Koivula T.

Improved Prognostic Impact of S-Phase Values from Paraffin-Embedded Breast and Prostate Carcinomas after

Correcting for Nuclear Slicing.

Cytometry 12:413-421. 1991.

179.- Clark G.M., Mathieu M.C., Owens M.A. et al.

Prognostic Significance of S-Phase Fraction in Good-Risk, Node-Negative Breast Cancer Patients.

J. Clin. Oncol. 10:428-432. 1992.

180.- Sigurdsson H., Baldetorp B., Gorg A. et al.

Flow Cytometry in Primary Breast Cancer: Improving the Prognostic Value of the Fraction of Cells in the S-Phase by Optimal Categorisation of Cutt-Off Levels.

Br. J. Cancer. 62:786-790. 1990.

181.- Remvikos Y., Vielh P., Padoy E., Benyahia B., Voillemot N., and Magdelenat H.

Breast Cancer Proliferation Measured on Cytological Samples: A Study by Flow Cytometry of S-Phase Fractions and Brdu Incorporation.

Br. J. Cancer. 64:501-507. 1991.

182.- van Dierendonck J.H., Keyzer R., van de Velde C.J.H., and Cornelisse C.J.

Subdivision of S-Phase by Nuclear 5-Bromodeoxyuridine Staining Patterns.

Cytometry 10:143-150. 1989.

183.- Camplejohn R.S., McCartney J.C., Morris R.W.

Measurement of S-Phase Fractions in Lymphoid Tissue Comparing Fresh versus Paraffin-Embedded Tissue and 4',6'-Diamidino-2 Phenylindole Dihydrochloride versus Propidium Iodide Staining.

Cytometry 10:410-416. 1989.

184.- Shapiro H.W.

Practical Flow Cytometry.

Book Review. Second Edition.

Cytometry. 10:490-491. 1989.

185.- Roubinet F., Beral M.M., Legac E., et al.

Description and Performance of a Flow Cytometry Apparatus: The EPICS.

Ann. Biol. Clin. (Paris) 45:423-429. 1987.

186.- Hedley D.W., Friedlander M.L., Taylor I.W., Rugg C.A., and Musgrove E.A.

Method for Analysis of Cellular DNA Content of Paraffin-Embedded Pathological Material Using Flow Cytometry.

J. Histochemistry Cytochemistry. Vol.31. 11:1333-1335. 1983.

187.- Hedley D.W.

Flow Cytometry Using Paraffin-Embedded Tissue: Five Years On.

Cytometry. 10:229-241. 1989.

188.- Schutte B., Reynders M.M.J., Bosman F.T., Blijham G.H.
Flow Cytometric Determination of DNA Ploidy Level in Nuclei
Isolated from Paraffin-Embedded Tissue.

Cytometry 6:26-30. 1985.

189.- Quirke P., and Dyson J.E.D.

Flow Cytometry: Methodology and Applications in Pathology.

Journal of Pathology. 149:79-87. 1986.

190.- van Driel-Kulker A.M.J., Eysackers M.J., Dessing
M.T.M., and Ploem J.S.

A Simple Method to Select Specific Tumor Areas in Paraffin
Blocks for Cytometry Using Incident Fluorescence Microscopy.

Cytometry 7:601-200. 1991.

191.- Oud P.S., Hanselaar T.G.J.M., Beck H.L.M., and Vooijs
G.P.

Extraction of Nuclei from Selected Regions in
Paraffin-Embedded Tissue.

Cytometry. 7:595-600. 1986.

192.- Heiden T., Wang N., and Tribukait B.

An Improved Hedley Method for Preparation of
Paraffin-Embedded Tissues for Flow Cytometric Analysis of
Ploidy and S-Phase.

Cytometry 12:614.621. 1991.

193.- Haag D., Feichter G., Goerttler K., anf Kaufmann M.

Influence of Systematic Errors on the Evaluation of the S-Phase Portions from DNA Distributions of Solid Tumors as Shown for 328 Breast Carcinomas.

Cytometry. 8:377-385. 1987.

194.- Sickle-Santanello B.J., Farrar W.B., DeCenzo J.F. et al. Technical and Statistical Improvements for Flow Cytometric DNA Analysis of Paraffin-Embedded Tissue.

Cytometry. 9:594-599. 1988.

195.- Babiak J., Poppema S.

Automated Procedure for Dewaxing and Rehydration of Paraffin-Embedded Tissue Sections for DNA Flow Cytometric Analysis of Breast Tumors.

Am. J. Clin. Pathol. 96:64-69. 1991.

196.- Epics Cytologic Software. Version 2.1.

(C) 1986-1990. Coulter Corporation.

(C) 1982-1988. Microsoft Corporation.

Izasa-Coulter. Barcelona.

197.- Baisch H., Gohde W, and Linden W.A.

Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of Cell Cycle.

Radiat Environ Biophys. 12:31-39. 1975.

198.- Joensuu H., and Kallioniemi O.P.

Different Opinions on Classification of DNA Histograms Produced from Paraffin-Embedded Tissue.

Cytometry 10:711-717. 1989.

199.- Alanen K.A., Joensuu H, and Klemi P.J.

Autolysis is a Potential Source of False Aneuploid Peaks in Flow Cytometric DNA Histograms.

Cytometry 10:417-425. 1989.

200.- Risberg B., Stal O., Eriksson L.L., and Hussein A.

DNA Flow Cytometry on Breast Carcinomas: Comparison of a Detergent and an Enzyme-Detergent Preparation Method.

Anal. Cell. Pathol. 2:287-195. 1990.

201.- Norusis M.J./SPSS Inc.

Logistic Regresion Analysis: Procedure Logistic Regresion.

In: SPSS/PC+. Advanced Statistic 4.0. 444N. Michigan Avenue.

Chicago IL.60611.Pag. B-39 - B-230. 1990.

202.- Breast Cancer Chemotherapy: Consensus Conference.

Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer.

JAMA 254:3461-3463. 1985.

203.- Tubiana M., Pejovie MH., Chavaudra N et al. The Long-Term Significance of the Thimidine Labeling Index in Breast Cancer.

Int. J. Cancer ; 33:441-445. 1984.

204.- Salud A.

Tesis Doctoral: Factores Pronósticos del Cáncer Colorrectal.

Universidad Autónoma de Barcelona. Pag. 164-169. 1992.

205.- van der Linden J.C., Lindeman J., Baak J.P.A., Meijer C.J.L.M., and Herman C.J.

The Multivariate Prognostic Index and Nuclear DNA Content are Independent Prognostic Factors in Primary Breast Cancer Patients.

Cytometry. 10:56-61. 1989.

206.- Hedley D.W., Rugg C.A., Ng ABP, and Taylor IW.

Influence of Cellular DNA Content on Disease-Free Survival of Stage II Breast Cancer Patients.

Cancer Res. 44:5395-5398. 1984.

207.- Hedley D.W., Friedlander M.L., and Taylor I.W.

Application of DNA Flow Cytometry to Paraffin-Embedded Archival Material for the Study of Aneuploidy and its Clinical Significance.

Cytometry. 6:327-333. 1985.

208.- Ewers S-B, Langstrom E, Baldetorp, and Killander D.

Flow-Cytometric DNA Analysis in Primary Breast Carcinomas and Clinicopathological Correlations.

Cytometry. 5:408-419. 1984.

209.- von Rosen A., Rutqvist L.E., Carstensen J., Fallenius A., Skoog L., and Auer G.

Prognostic Value of Nuclear DNA Content in Breast Cancer in Relation to Tumor Size, Nodal Status, and Estrogen Receptor

Content.

Breast Cancer Res. Treat. 13:23-32. 1989.

210.- Hedley D.W., Rugg C.A., and Gelber R.D.

Association of DNA Index and S-Phase Fraction with Prognosis
of Nodes Positive Early Breast Cancer.

Cancer Res. 47:4729-4735. 1987.

211.- Sigurdsson H., Baldetorp, Borg A., et al.

Indicators of Prognosis in Node-Negative Breast Cancer.

N. Engl. J. Med. 322:1045-1053. 1990.

212.- Klintenberg C., Stal O., Nordenskjold B., Wallgren A.,
Arvidsson S. and Skoog L.

Proliferative Index, Cytosol Estrogen Receptor and Axillary
Node Status as Prognostic Predictors in Human Mammary
Carcinoma.

Breast Cancer Res. Treat. (Suppl) 7:99-106. 1986.

213.- Kallioniemi O.P.

Comparison of Fresh and Paraffin-Embedded Tissue as Starting
Material for DNA Flow Cytometry and Avaluation of Intratumor
Heterogeneity.

Cytometry. 9:164-169. 1988.

214.- Clark G.M., Dressler L.G., Owens M.A., Pounds G.,
Oldaker T., and McGuire W.L.

Prediction of Relapse or Survival in Patients with Node-Negative Breast Cancer by DNA Flow Cytometry.

N. Engl. J. Med. 320:627-633. 1989.

215.- McQuire W.L., Horwitz K.B., Zava D.T. et al.

Progress Endocrinology and Metabolism-Hormones in Breast Cancer: Update, 1978.

Metabolism 27:487-501. 1978.

216.- Hahnel R., Woodings T., and Vivian A.B.

Prognostic Value of Estrogen Receptors in Primary Breast Cancer.

Cancer 44:671-675. 1979.

217.- Cooke T., George D., and Shields R.

Estrogen Receptors and Prognosis in Early Breast Cancer.

Lancet I:995-997. 1979.

218.- Shapiro H.M.

Flow Cytometry of DNA Content and Other Indicators of Proliferative Activity.

Arch. Pathol. Lab. Med. 1213:591.597. 1989.

219.- Noguchi M., Taniya T., Ohta N., Koyasaki N., Miyazaki I., and Mizukami Y.

Lymph Node Metastases versus DNA Ploidy as Prognostic Factors for Invasive Ductal Carcinoma of the Breast.

Breast Cancer Res. Treat. 19:23.31. 1991.

220.- Olszewski W., Darzynkiewicz Z., Rosen PP., Schwartz MK., and Melamed MR.

Flow Cytometry of Breast Carcinoma: 1. Relation of DNA Ploidy Level Histology and Estrogen Receptor.
Cancer 48:980-984. 1981.

221.- Bedrossian CWM., Raber M., Barlogie B.

Flow Cytometry and Cytomorphology in Primary Resectable Breast Cancer.

Anal. Quant. Cytol. 2:112-116. 1981.

222.- Rainwater LM., Farrow GM., Hay ID., and Lieber MM.

Oncocytic Tumors of the Salivary Gland, Kidney, and Thyroid. Nuclear DNA Patterns Studied by Flow Cytometry.

Br. J. Cancer 53:799-804. 1986.

223.- Xiang J., Spanier SS., Benson NA., Braylan RC.

Flow Cytometric Analysis of DNA in Bone and Soft-Tissue Tumors Using Nuclear Suspensions.

Cancer 59:1951-1958. 1987.

224.- Hosaka Y., Rainwater LM., Grant CS., Farrow GM., van Heerden JA., and Lieber MM.

Pheochromocytoma: Nuclear Deoxyribonucleic Acid Patterns Studied by Flow Cytometry.

Surgery 100:1003-1009. 1986.

225.- Kreicbergs A., Silvferswärd C., and Tribukait B.

Flow DNA Analysis of Primary Bone Tumors. Relationship between Cellular DNA Content and Histopathologic Classification.

Cancer 53:129-136. 1984.

226.- Kallioniemi O-P., Hietanen T., Mattila J., Lehtinen M., Lauslahti K., and Koivula T.

Aneuploid DNA Content and High S-Phase Fraction of Tumour Cells are Related to Poor Prognosis in Patients with Primary Breast Cancer.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 23:277-282. 1987.

227.- Auer G., Caspersson T., and Wallgren A.

DNA Content and Survival in Mammary Carcinoma.

Anal. Quant. Cytol. 3:161-165. 1980.

228.- Askensten U.G., Rosen A.K., Nilsson R.S. and Auer G.U.

Intratumoral Variations in DNA Distribution Patterns in Mammary Adenocarcinomas.

Cytometry 10:326-333. 1989.

229.- Erhardt K., and Auer G.

Mammary Carcinoma: DNA Analysis in Areas Showing Different Histological Features in the Same Tumor.

Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 94:21-28. 1986.

230.- Hitchcock A., Ellis I.O., Robertson J.F.R. et al.

An Observation of DNA Ploidy, Histological Grade, and Immunoreactivity for Tumour-Related Antigens in Primary and Metastatic Breast Carcinoma.

J. Pathol. 159:129-134. 1989.

231.- Fernö M., Baldetorp B., Ewers S-B., et al.

One or Multiple Samplings for Flow Cytometric DNA Analyses in Breast Cancer-Prognostic Implications?

Cytometry 13:241-249. 1992.

232.- Bichel P., Skovgaard Poulsen H., and Andersen A.J.

Estrogen Receptor Content and Ploidy of Human Mammary Carcinoma.

Cancer 50:1771-1774. 1982.

233.- Rognum T.O., Brandtzaeg P., and Thorud E.

Is Heterogenous Expression of HLA-DE Antigens and CEA along with DNA-Profile Variations Evidence of Phenotypic Instability and Clonal Proliferation in Human Large Bowel Carcinomas ?

Br. J. Cancer 48:543-551. 1983.

234.- Atkin N.B.

Modal Deoxyribonucleic Acid Value and Survival in Carcinoma of the Breast.

Br. Med. J. 86:271-272. 1972.

235.- Cornelisse C.J., de Koning H.R., Moolenaar A.J. et al.

Image and Flow Cytometric Analysis of DNA Content in Breast Cancer. Relation to Estrogen Receptor Content and Lymph Node Involvement.

Anal. Quant. Cytol. 6:9-18. 1984.

236.- Nowell P.C.

The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations.

Science 194:23-28. 1976.

237.- Sager R.

Genomic Rearrangement and the Origin of Cancer. In: German, ed. Chromosome Mutation and Neoplasia. New York: Allan R. Liss. Pag. 333-346. 1983.

238.- Dowle C.S., Owainati A., Robins A. et al.

Prognostic Significance of the DNA Content of Human Breast Cancer.

Br. J. Surg. 74:133-136. 1987.

239.- Kute T.E., Muss H.B., Anderson D. et al.

Relationship of Steroid Receptor, Cell Kinetics, and Clinical Status in Patients with Breast Cancer.

Cancer Res. 41:3524-3529. 1981.

240.- Braylan R.C., Benson N.A. and Nourse V.A.

Cellular DNA of Human Neoplastic B-Cells Measured by Flow Cytometry.

Cancer Res. 44:5010-5016. 1984.

241.- Stephenson R.A., Gay H., Fair W.R. and Melamed M.R.
Effect of Section Thickness on Quality of Flow Cytometric
DNA Content Determinations in Paraffin-Embedded Tissues.
Cytometry 7:41-44. 1986.

242.- Poot M., Schmitt H., Seyschab H. et al.
Continuous Bromodeoxyuridine Labeling and Bivariate
Ethidium Bromide/Hoechst Flow Cytometry in Cell Kinetics.
Cytometry 10:222-226. 1989.

243.- McDivitt RW., Stone KR., Craig RB., Palmer JG., Meyer
JS., and Bauer WC.
A Proposed Classification of Breast Cancer Based on Kinetic
Information: Derived from a Comparison of Risk Factors in
168 Primary Operable Breast Cancers.
Cancer; 57:269-276. 1986.

244.- Hatschek T., Fagerberg G., Stal O. et al.
Cytometric Characterization and Clinical Course of Breast
Cancer Diagnosed in a Population-Based Screening Program.
Cancer 64:1074-1081. 1989.

245.- Raber MN., Barlogie B., Latreille J., Bedrossian C.,
Fritschey H., and Blumenschein G.
Ploidy, Proliferative Activity and Estrogen Receptor Content
in Human Breast Cancer.
Cytometry; 3:36-41. 1982.

246.- Meyer JS., McDivitt RW., Stone KR. et al. Practical Breast Carcinoma Cell Kinetics: Review and Update. Breast Cancer Res. Treat. 4:79-88. 1984.

247.- McGuire WL., Meyer JS., Barlogie B., and Kute TE. Impact of Flow Cytometry on Predicting Recurrence and Survival in Breast Cancer Patients. Breast Cancer Res. Treat.; 5:117-128. 1985.