

Original

Factores pronósticos en el cáncer de mama

M.J. Fernández Aceñero, M. Galindo Gallego, P. Aragoncillo Ballesteros,
M.C. Millana de Ynes y J. Fariña González

Servicio de Anatomía Patológica II (Prof. J. Fariña), Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid.

SUMMARY

Background: In this article we estimate the hypothetical prognostic influence of some new factors, including the oncogene c-erbB-2, the suppressor gene p53 and neovascularization, in breast carcinoma. Material and methods: We collected 112 cases of ductal breast carcinoma (NOS) treated with modified radical mastectomy. The minimal follow-up time was 60 months. The prognostic factors were evaluated by means of immunohistochemistry performed in formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues. Results: In our series only the tumor stage (TNM) and the neovascularization behaved as independent significant prognostic factors for breast cancer patients. Conclusions: Neovascularization is a very promising issue with prognostic implications in breast carcinoma, especially for node-negative patients. Rev Esp Patol 1997; 30(4): 302-308.

Key words: Breast carcinoma - Prognostic factors - Neovascularization - Oncogenes

RESUMEN

Planteamiento: En este artículo se valora la posible influencia pronóstica de ciertos factores, como el oncogén c-erbB-2, el gen supresor p53 y la neovascularización en el cáncer de mama. Material y métodos: El trabajo se ha realizado en 112 mujeres diagnosticadas de carcinoma ductal infiltrante de tipo clásico y tratadas mediante mastectomía radial modificada. El seguimiento mínimo ha sido de 60 meses y la detección de los factores pronósticos se ha hecho mediante inmunohistoquímica en tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina. Resultados: En nuestra serie de pacientes sólo el estadio tumoral (TNM) y la neovascularización se han comportado como factores pronósticos independientes en el carcinoma ductal de mama. Conclusiones: La detección de la densidad vascular en el tumor puede ser un factor pronóstico de importancia en las pacientes con cáncer de mama, sobre todo en aquellas sin metástasis ganglionares. Rev Esp Patol 1997; 30(4): 302-308.

Palabras clave: Cáncer de mama - Factores pronósticos - Neovascularización - Oncogenes

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres occidentales (18%) (1). En España la incidencia es relativamente baja si se compara con otros

países de Europa occidental (2), pero parece observarse una clara tendencia al aumento, explicable en parte por el diagnóstico precoz (3). Se han realizado multitud de estudios para identificar los factores que determinan el pronóstico en estas pacientes. Sin embargo, mujeres que

comparten alguno de los factores pronósticos denominados clásicos (estadio, grado histológico) evolucionan de modo muy diferente. Este hecho ha movido a muchos grupos de autores a la búsqueda de nuevos factores pronósticos. En este estudio hemos analizado la posible influencia pronóstica del oncogén c-erbB-2 (uno de los más estudiados en el cáncer de mama) (4, 5), del gen supresor p53 y de la neovascularización, siguiendo el diseño experimental de los trabajos de Weidner y otros autores (6, 7).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 112 pacientes afectas de carcinoma ductal infiltrante de mama de tipo clásico. El diagnóstico de la lesión se hizo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid entre 1984 y 1990. En todos los casos el tratamiento consistió en una mastectomía radical modificada. Se fijó un seguimiento mínimo de 60 meses (5 años), siendo excluidas tanto las que abandonaron el seguimiento durante este periodo como las fallecidas durante el mismo por causas intercurrentes no relacionadas con el tumor.

Se valoraron el grado histológico (según los criterios de Bloom-Scarff-Richardson) (8), el estadio tumoral (siguiendo la clasificación TNM) (9) y otros factores epidemiológicos con posible influencia pronóstica, como la edad de la paciente y la localización del tumor. En todas ellas también se valoró el Índice Pronóstico Morfométrico Multiparamétrico (IPMM) de Baak (10).

Las muestras quirúrgicas se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina. El análisis inmunohistoquímico se realizó según el método de la inmunoperoxidasa indirecta, añadiendo tratamiento en horno microondas de 750 W (dos ciclos de 7 y 5 minutos con un descanso de 2 minutos entre ambos) en el caso de los receptores hormonales (estrógenos, clon ER1D5 de Immunotech al 1/5 y progesterona, clon 1AG de Novocastra al 1/10), p53 (clon DO7 al 1/50, Novocastra) y c-erbB-2 (clon CB11 al 1/40, Medac Diagnostika) y tripsinización en el caso del factor VIII (Enzo Diagnostics, prediluido). La incubación con el anticuerpo primario se hizo durante una noche a 4 °C. El anticuerpo secundario fue un suero de conejo anti-ratón, RAM-DAKO p161 al 1/20. El

revelado de la reacción se hizo con diaminobencidina y las muestras se contrastaron con hematoxilina de Harris.

La valoración de las técnicas se realizó según los siguientes criterios:

- p53: sólo se consideró positiva la tinción nuclear. La positividad fue débil si entre el 0% y el 10% de las células se teñían e intensa cuando se teñían más del 10% (Fig. 1).
- c-erbB-2: sólo se consideró positiva la tinción de membrana. Según los criterios de Wright (11) los casos fueron positivos cuando se teñían más del 50% de las células tumorales (Fig. 2).
- Factor VIII: siguiendo el primer diseño experimental de Weidner (6), se realizó un doble recuento de los vasos empleando un microscopio Olympus BH2. En primer lugar se eligió a pequeño aumento ($\times 4$) el campo más vascular (el denominado *hotspot* vascular) (Fig. 3) y en él se realizó el recuento de los vasos con el objetivo $\times 20$ ($0,7386 \text{ mm}^2$) (Fig. 4). Se obtuvieron

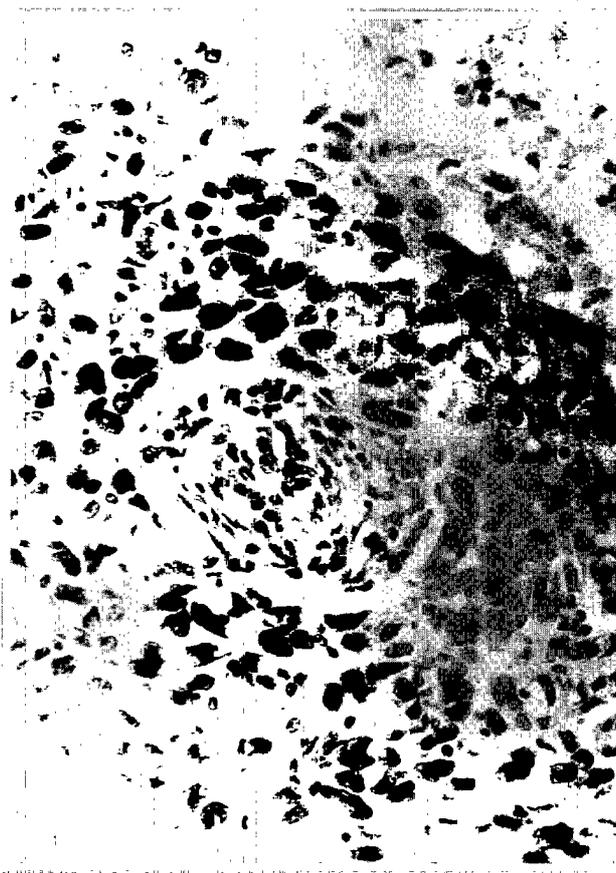


Figura 1. Expresión intensa de p53 en los núcleos de más del 10% de las células tumorales (técnica de inmunohistoquímica para p53, original $\times 200$).



Figura 2. Positividad de c-erbB-2 en la membrana de las células tumorales (inmunohistoquímica para c-erbB-2, original $\times 200$).

dos valores: la densidad vascular (vasos/ mm^2) en el campo más vascular y un valor medio de los tres campos más vascularizados. Habitualmente, los campos más vasculares se localizan en la periferia del tumor y, siguiendo los criterios de Gasparini y Harris (7), se evitaron las áreas de necrosis tumoral.

Los receptores hormonales en tejido se consideraron positivos cuando más del 10% de las células tumorales mostraron tinción nuclear (12).

El análisis estadístico se hizo empleando el programa estadístico BMDP Statistical Software Package en un ordenador Convex C3210. Se empleó el test de χ^2 para valorar la asociación entre los factores clásicos y las tres variables analizadas. La relación entre cada una de las variables y el pronóstico (estimado mediante el intervalo libre de enfermedad) se analizó con el método de Kaplan-Meier (estudio univariante). El estudio multivariante (empleando el modelo de riesgo proporcional de Cox) permitió definir las relaciones entre las variables

con influencia pronóstica demostrada para identificar aquellas con un valor pronóstico independiente.

RESULTADOS

Características de la serie

La edad de las pacientes osciló entre 33 y 80 años (media: 55,8). El 36,6% (41 pacientes) eran premenopáusicas. La mama derecha se afectó con más frecuencia que la izquierda (50,8% frente a 49,2%), y la localización más habitual fue el cuadrante superoexterno (41,1%). El 18,8% de las pacientes tenían tumores en estadio I, el 47,2% en estadio II y el 34% en estadio III. El grado histológico fue 1 en el 10% de los casos, 2 en el 59% y 3 en el 31%. Los valores del IPMM oscilaron entre 0,95 y 2,78 (media: 0,71), y un 44,6% de las pacientes tuvieron índices de buen pronóstico ($<0,6$).



Figura 3. Identificación del *hotspot* vascular en la periferia de un carcinoma ductal infiltrante de mama (inmunohistoquímica para el factor VIII, original $\times 40$).

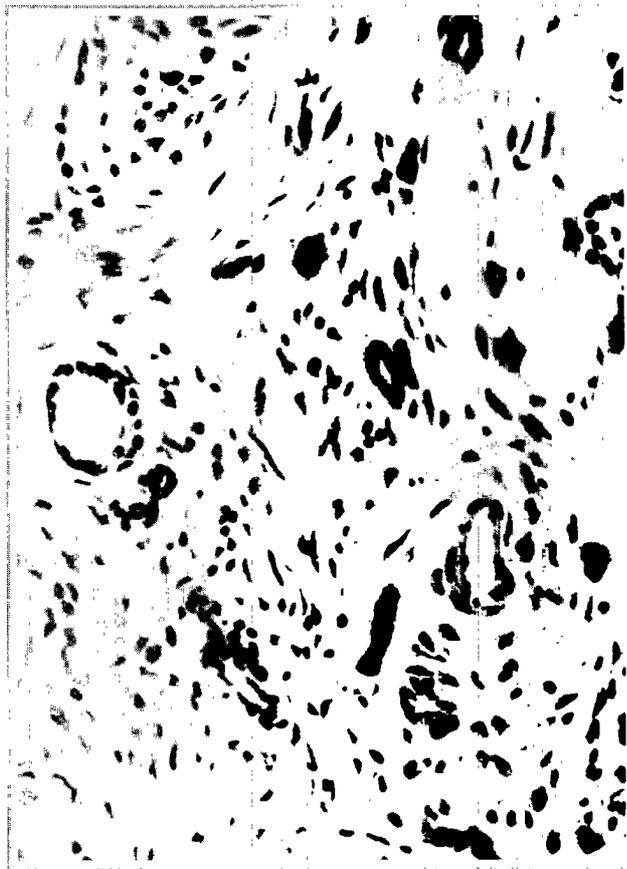


Figura 4. Detalle a gran aumento de los campos en que se realiza la medición en un caso muy vascularizado (inmunohistoquímica para el factor VIII, original $\times 200$).

Técnicas de inmunohistoquímica

Los receptores de estrógeno fueron positivos en el 26% de los casos y los de progesterona en el 37,5%. La prueba de p53 fue negativa en el 62,5% de los pacientes (70 casos), positiva débil en el 20,5% e intensa en el 17%. Sólo el 17% de las pacientes mostraron positividad para c-erbB-2 según los criterios antes enunciados.

En relación con la neovascularización, las dos medidas realizadas se consideraron intercambiables, ya que el análisis estadístico demostró una correlación entre ellas prácticamente perfecta ($r=0,99$), similar a la demostrada por Weidner en su primer estudio (6). Los valores considerados en el estudio estadístico posterior fueron sólo los obtenidos en el campo más vascular, que oscilaron entre 10,83 y 151,6 vasos/ mm^2 (media: 54,33).

Relación entre las distintas variables y la supervivencia (análisis univariante)

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1. Como puede observarse, ni la expresión de receptores hormonales ni la del gen supresor p53 en tejido tuvieron influencia pronóstica significativa. En relación con la expresión del oncogén c-erbB-2, no se observó influencia pronóstica cuando se consideraban todas las pacientes globalmente, pero al dividir las según su afectación ganglionar se observó que en las que presentaban ganglios negativos sí tenía influencia pronóstica (Fig. 5). En cuanto a la vascularización, las pacientes que tenían más de 48 vasos/ mm^2 presentaban un pronóstico significativamente peor (Fig. 6).

Estudio de la dependencia entre las variables con influencia pronóstica (estudio multivariante)

Al realizar este análisis se observó que los dos únicos factores con influencia pronóstica independiente en nuestra serie eran el estadio tumoral y la densidad vascular del tumor.

DISCUSIÓN

En la actualidad, se están realizando multitud de estudios para tratar de definir los factores pronósticos en el cáncer de mama. Entre los diversos factores que se están analizando cabe destacar la expresión de oncogenes y genes supresores (sobre todo p53 y c-erbB-2), los marcadores de proliferación celular (tanto inmunohistoquímicos como por citometría de flujo o estática) (13, 14) y, de modo más reciente, la neovascularización en el seno del tumor (6).

Uno de los oncogenes más estudiados es el c-erbB-2, que codifica una proteína análoga estructural del receptor del factor de crecimiento epidérmico y que se sobreexpresa en $\geq 20\%$ de los cánceres de mama humanos (15). Según la mayor parte de las series publicadas (16, 17) su expresión parece definir un grupo de pacientes con mal pronóstico. En nuestro estudio, c-erbB-2 tuvo importancia pronóstica sólo en las pacientes con ganglios negativos, resultado similar al obtenido por el grupo de Paik y cols. (18), quienes observaron una mortalidad cinco

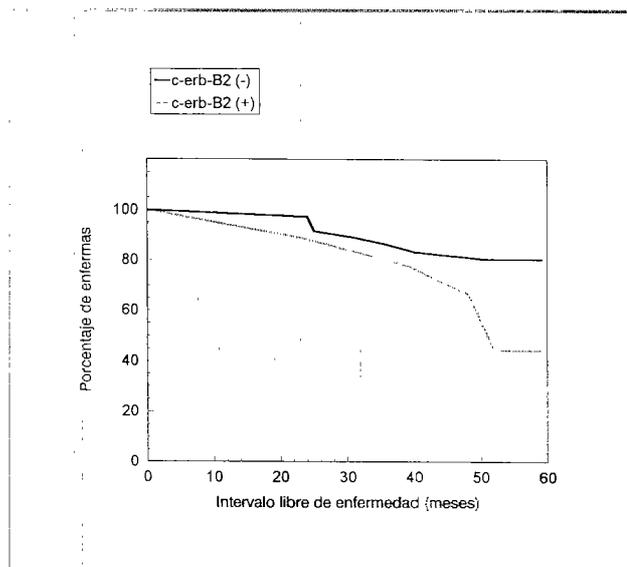
Tabla 1. Significación estadística de las distintas variables.

Variable	n	%	p	Significación
Edad (años)			0.04	S
≤65	93	83,1		
>65	19	16,9		
Menopausia			0.4	NS
Premenopáusicas	41	36,6		
Postmenopáusicas	71	63,4		
Localización			0.004	S
Retroareolar	35	31,2		
No retroareolar	77	68,8		
Ganglios			0.0026	S
No	45	40,2		
Sí	67	59,8		
Estadio			0.001	S
I	21	18,7		
II	53	47,3		
III	38	34		
Grado histológico			0.38	NS
1	11	69		
2-3	101	31		
IPMM			0.01	S
≤0,6	50	44,6		
>0,6	62	55,4		
Receptores estrogénicos			0.86	NS
Negativos	83	74		
Positivos	29	26		
Receptores de progesterona			0.55	NS
Negativos	70	62,5		
Positivos	42	37,5		
p53			0.76	NS
Negativo	70	62,5		
Positivo	42	37,5		
c-erbB-2			0.89	NS
Negativo	93	83		
Positivo	19	17		
Densidad vascular			0.03	S
<48	57	50,9		
≥48	55	49,1		

NS: no significativo; S: significativo.

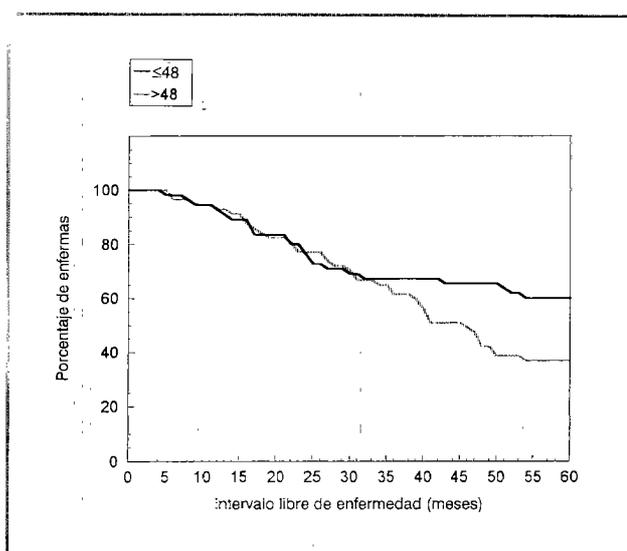
veces superior entre las pacientes con ganglios negativos que expresaban este oncogén.

El gen supresor p53 se ha estudiado en multitud de tumores. Codifica una proteína que parece inhibir el paso de las células de fase G1 a S, comportándose por ello como un gen supresor de tumores (19). Los resultados sobre su posible influencia pronóstica son muy

**Figura 5.** Comparación entre las curvas de supervivencia de las pacientes con ganglios negativos según la expresión de c-erbB-2.

variados (20, 21) por la diversidad de criterios y tipos de anticuerpos empleados. En nuestra serie no hemos podido demostrar ninguna influencia pronóstica de este factor, ni al considerar todo el grupo de pacientes ni al dividirlos según su afectación ganglionar.

El objetivo más importante de nuestro estudio era valorar la posible influencia pronóstica de la neovascularización en el cáncer de mama. Este nuevo factor pronóstico fue introducido en la literatura médica por

**Figura 6.** Comparación entre las curvas de supervivencia de las pacientes según la densidad vascular del tumor.

Weidner y cols. (6) en 1991 en un estudio realizado en 49 pacientes. Este trabajo pionero demostró que la tasa de recidivas en las pacientes con ganglios negativos era mayor cuantos más vasos había en el tumor. A este estudio han seguido otros muchos tratando de confirmar la supuesta influencia pronóstica de la vascularización. Estos trabajos no han sido homogéneos en su diseño y desarrollo, lo que los hace difícilmente comparables. Así, como marcador vascular se han usado el factor VIII (6), CD31 (22) o CD34. El sistema de medición tampoco es homogéneo, ya que hay autores que emplean campos de 200 aumentos, otros campos de 400 y otros que miden campos a pequeño aumento. Todos estos problemas técnicos han llevado a Gasparini y Harris (7) a definir los criterios que se deben seguir en la medida de los vasos para que los trabajos sean comparables (criterios seguidos en nuestro estudio) (Tabla 2).

El estudio estadístico ha demostrado que las pacientes con tumores muy vascularizados tienen un pronóstico significativamente peor, y que esta influencia es independiente del estadio tumoral. Esta influencia pronóstica se daba tanto en el grupo de pacientes con ganglios positivos como con ganglios negativos. El número de vasos es ligeramente más alto en las pacientes con ganglios negativos, pero la diferencia entre los dos grupos no es significativa (56,8 frente a 50,63/mm²). En nuestra serie sólo el estadio tumoral y la vascularización en el tumor se han comportado como factores pronósticos independientes. Nuestros resultados confirman los de la mayor parte de las series publicadas, ya que los tumores que superan 48 vasos/mm² (punto de corte establecido a partir de la media de vasos) muestran una peor evolución con más riesgo de recidiva en el periodo estudiado. Los resultados negativos obtenidos por algunas series

(23) se pueden justificar por la falta de homogeneidad de los diseños.

Este nuevo factor pronóstico resulta especialmente atractivo ya que genera unas perspectivas terapéuticas novedosas si se emplean los fármacos antiangiogénicos que se están desarrollando en el momento actual. Podría introducirse así una nueva arma terapéutica en la lucha contra el cáncer de mama, sobre todo en las pacientes con ganglios negativos.

En resumen, el presente estudio confirma, en pacientes españolas seguidas durante un mínimo de 60 meses, la importancia pronóstica del número de vasos en el tumor, demostrada y contrastada por varios estudios internacionales. Nuestro estudio parece contradecir la posible influencia pronóstica de la expresión del oncogén c-erbB-2 y del gen supresor p53. Sin embargo, antes de introducir en la rutina diagnóstica del cáncer de mama el estudio de los vasos consideramos necesaria la perfecta unificación de los sistemas y criterios de medida, e incluso la utilización de sistemas automáticos de recuento vascular.

BIBLIOGRAFÍA

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. *Breast cancer -Epidemiology, risk factors and genetics*. Br J Med 1994; 309: 1003-1006.
2. Gutiérrez M, Cruz F, Machuca L, Bascuas J. *Análisis multifactorial en el carcinoma de mama. Su relación con la evolución clínica y/o supervivencia*. Oncología 1991; 14: 45-53.
3. Jensen OM, Esteve J, Moller H, Renard H. *Cancer in European Community and its Member States*. Eur J Cancer 1990; 26: 1167-1256.
4. Ali IU. *Amplification of the c-erbB-2 and aggressive human breast tumors?* Science 1988; 240: 1795-1798.
5. Rilke F. *Prognostic significance of her-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors*. Int J Cancer 1991; 49: 44-49.
6. Weidner N, Semple P, Welch W, Folkman J. *Tumor angiogenesis and metastasis: Correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med 1991; 324: 1-8.
7. Gasparini G, Harris AL. *Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma. Much more than a new prognostic tool*. J Clin Oncol 1995; 13: 765-782.
8. Bloom HJ, Richardson WW. *Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1,409 cases of which 359 have been followed for 15 years*. Br J Cancer 1957; 11: 359-377.
9. TNM Atlas Illustrated guide to TNM/pTNM Classification of Malignant Tumors. 3ª Ed., 2ª Rev. Springer Verlag, Berlin 1992; 173-183.
10. Van Dienst PJ, Baak JPA. *The morphometric prognostic index is the strongest prognosticator in premenopausal lymph node negative and lymph node positive breast cancer patients*. Hum Pathol 1991; 22: 326-330.

Tabla 2. Criterios de medición de vasos en el cáncer de mama.

- Usar un marcador endotelial adecuado (factor VIII o CD31)
- Elegir las áreas más vascularizadas a pequeño aumento (*hotspot* vascular)
- Considerar como vaso toda estructura teñida con el marcador, aunque no tenga luz (tomar como vasos los cordones sólidos)
- Realizar el recuento en campos de 0,74 mm² (como mínimo)
- El recuento debe realizarse por dos investigadores de modo simultáneo

11. Wright C, Angus B, Nicholson S. *Expression of C-erbB-2 oncoprotein: A prognostic indicator in human breast cancer.* Cancer Res 1989; 49: 2087-2090.
12. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P y cols. *Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma.* J Clin Oncol 1994; 12: 454-466.
13. Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. *Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry.* Am J Pathol 1990; 136: 1115-1124.
14. Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingstone S y cols. *Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma: Correlation with DNA flow cytometry, histopathology and lymph node status.* Cancer 1992; 69: 1739-1744.
15. Heintz NH. *Amplification of the c-erbB-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma.* Arch Pathol Lab Med 1990; 114: 160-163.
16. Walker RA, Gullick WJ, Varley JM. *An evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short-term prognosis in breast cancer.* Br J Cancer 1989; 60: 426-429.
17. Molina R, Ciocca DR, Tandon AK y cols. *Expression of HER-2/neu oncoprotein in breast cancer: A comparison of immunohistochemical and Western blot techniques.* Anticancer Res 1992; 12: 1965-1971.
18. Porter-Jordan K, Lippman ME. *Overview of the biologic markers of breast cancer.* Hematol Oncol Clin North America 1994; 8: 73-100.
19. Paik S, Hazam R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, Schlessinger J, Lippman ME, King CR. *Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: Prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer.* J Clin Oncol 1990; 8: 103-112.
20. Ostrowski JL, Sawan A, Henry L y cols. *p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: An immunohistochemical study.* J Pathol 1991; 164: 75-81.
21. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. *p53 in node-negative breast carcinoma: An immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis.* J Clin Oncol 1995; 13: 821-830.
22. Horak ER, Leek R, Klenk N y cols. *Angiogenesis assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer.* Lancet 1992; 340: 1120-1124.
23. Van Hoef ME, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM. *Assessment of tumor vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer.* Eur J Cancer 1993; 29: 1141-1145.