

Original

Grado nuclear en punciones de carcinoma de mama: características ópticas y análisis de imagen

R. Martínez-Girón*, M.T. García-Miralles** y A. Sampedro-Nuño***

*Instituto de Piedras Blancas; **Sección de Anatomía Patológica, Servicio de Anatomía Patológica II, Hospital Central de Asturias;
***Servicio de Proceso de Imagen, Universidad de Oviedo.

SUMMARY

Aim: To establish the reliability of subjective parameters (size and nuclear pleomorphism, nucleoli and cellular dispersion) used to establish the nuclear grade of malignancy (NG) in fine needle aspiration (FNA) of the breast and correlate them using an image analysis system. Materials and methods: The study was done using 60 FNAs from invasive ductal carcinoma. The NG was microscopically ascertained for each one. A morphometric study was carried out for a series of parameters (area, perimeter, maximum diameter, circular shape and rugose shape). Results: The microscopic exam identified 21 cases (35%) with NG I, 31 cases (51.7%) with NG II and 8 cases (13.3%) with NG III. The morphometric analysis showed a significant correlation ($p < 0.05$) between pleomorphism and mean standard deviation. Conclusions: The cytologic parameters which best represent the NG are the size of the nucleus and its pleomorphism, since these also correlate best with the morphometric results. Rev Esp Patol 2000; 33(2): 139-145.

Key words: Breast cancer - Fine needle aspiration - Nuclear grade - Image analysis - Computer-assisted

RESUMEN

Planteamiento: Establecer la fiabilidad de unos parámetros subjetivos (tamaño y pleomorfismo nuclear, nucléolo y grado de dispersión celular) utilizados para establecer el grado nuclear de malignidad en punciones de mama, mediante su comparación con un examen morfométrico a través de un proceso digital de imagen. Material y métodos: El trabajo se realizó con 60 punciones con aguja fina (PAAF) correspondientes a carcinoma ductal infiltrante de mama. En primer lugar se estableció en cada una de las PAAF el grado nuclear mediante observación al microscopio. A continuación se realizó el estudio morfométrico, seleccionando una serie de parámetros (área, perímetro, diámetro máximo, forma circular y forma rugosa). Resultados: En el examen microscópico, 21 casos (35%) correspondieron a un grado nuclear I, 31 casos (51,7%) a un grado nuclear II y ocho casos (13,3%) a un grado nuclear III. Se estableció un estudio comparativo microscópico/morfométrico, así como una correlación entre los grados nucleares y los resultados morfométricos de los diferentes parámetros estudiados. Con respecto al tamaño y el área media, existió una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con los grados subjetivos. En cuanto al pleomorfismo y la desviación estándar media, también la correlación fue significativa ($p < 0.05$). Conclusiones: Los parámetros citológicos que mejor representan al grado nuclear son el tamaño de los núcleos y el pleomorfismo de los mismos, siendo además los que mejor se correlacionan con los resultados morfométricos. Rev Esp Patol 2000; 33(2): 139-145.

Palabras clave: Cáncer de mama - Punción aspiración con aguja fina - Grado nuclear de malignidad - Proceso digital de imagen

INTRODUCCIÓN

El grado nuclear de malignidad es una variable independiente que se ha correlacionado con la supervivencia de las pacientes con carcinoma de mama y se ha considerado de valor pronóstico. En un principio, dicho grado nuclear se aplicó a cortes histológicos (1, 2), pero ya existen estudios que lo utilizan en las punciones de mama (3, 4). En este sentido, la Consensus Conference on Early Stage Breast Cancer, aceptada por los National Institutes of Health (5), ha demostrado la utilidad pronóstica del grado nuclear en los cánceres de mama, evaluándolo en preparaciones citológicas.

En el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama han surgido nuevas modalidades terapéuticas, siendo una de ellas la administración de quimioterapia preoperatoria (6). Su finalidad se centra en poder disminuir el tamaño del tumor antes de la intervención y mejorar las posibilidades de supervivencia de estas pacientes. Para llevar a cabo dicho tratamiento se necesitan unos datos pronóstico preoperatorios que desempeñarían un papel importante en la selección de aquellas pacientes que se deberían someter a un tratamiento con quimioterapia coadyuvante (7). Informar del grado nuclear en el diagnóstico de las enfermas con cáncer de mama cuando se realiza una punción diagnóstica puede aportar información adicional a otros datos utilizados en la actualidad para la selección de las pacientes, tales como el tamaño tumoral, la presencia o no de adenopatías, etc.

El grado nuclear en los informes citológicos de punciones de mama se realiza sobre la base de unos parámetros subjetivos (tamaño, pleomorfismo, presencia o no de nucléolo, grado de dispersión celular, etc.). Y puesto que en la actualidad se pueden utilizar estudios morfométricos que proporcionarían objetividad, la comparación del examen subjetivo con el morfométrico nos indicaría si los estudios al microscopio son fiables para establecer una graduación nuclear.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el trabajo se seleccionaron 60 punciones de carcinoma de mama, del Servicio de Anatomía Patológica, en que se había comprobado por estudio histológico que eran carcinomas ductales. En la selección de dichas punciones, se desecharon aquellas que contenían

poco material celular o si dicho material poseía amplias áreas de necrosis. Los métodos de tinción fueron HE y Papanicolaou.

Para establecer el grado nuclear al microscopio utilizamos una serie de parámetros basados en el trabajo de Robinson y cols. (8). Los autores valoraron la disociación celular, el tamaño nuclear, el pleomorfismo, el nucléolo, el aspecto de la membrana nuclear y el aspecto de la cromatina.

En nuestro trabajo sólo se han tenido en cuenta cuatro de los seis parámetros mencionados con anterioridad: el grado de dispersión (disociación celular), el tamaño de los núcleos, el pleomorfismo de los mismos y el nucléolo. A cada uno de ellos se le asignó un valor comprendido entre 1 y 3:

- Con respecto al tamaño nuclear, el valor 1 corresponde a un tamaño de los núcleos similar al de uno o dos hematíes (tamaño próximo al de las células ductales normales), el valor 2 al de tres o cuatro hematíes, y el valor 3 a un tamaño igual o superior al de cinco hematíes.
- Con respecto al pleomorfismo de los núcleos, el valor 1 correspondería a extendidos con núcleos uniformes; el valor 2 lo daríamos cuando hay ligeras variaciones en tamaño y forma, y el valor 3 cuando existe una gran variación de ambos.
- El nucléolo se valoró del siguiente modo: el valor 1 se aplicó cuando no se evidenciaban nucléolos en los extendidos, y el valor 3 cuando los nucléolos eran de gran tamaño.
- Por último, con respecto al grado de dispersión celular, el valor 1 correspondía a la existencia de grupos celulares cohesivos; el valor 2 a la presencia de grupos celulares y células sueltas, y el valor 3 cuando prácticamente todas las células del extendido estaban sueltas.

Una vez asignados los valores a cada parámetro y sumándolos en cada laminilla examinada, se obtuvo una puntuación para cada caso clínico, cuyo valor mínimo era 4 y cuyo valor máximo era 12.

La observación microscópica se hizo en primer lugar separadamente por dos observadores. En los casos en que existían discrepancias se efectuó, al microscopio de doble cabezal, una segunda observación. Una vez obtenidos los valores correspondientes a cada caso clínico utilizando un sistema de variables dispersas, el rango se estableció de la siguiente forma:



Figura 1. PAAF de carcinoma de mama correspondiente a un grado nuclear I. Presencia de grupos celulares cohesivos con núcleos de pequeño tamaño uniformes y ausencia de nucléolo (coloración de Papanicolaou, original $\times 400$).

– Grado nuclear I: grupo de valores comprendidos entre 4 y 6 (Fig. 1).

– Grado nuclear II: grupo de valores comprendidos entre 7 y 9 (Fig. 2).

– Grado nuclear III: grupo de valores comprendidos entre 10 y 12 (Fig. 3).

Clasificados los 60 casos en los tres grupos establecidos según la observación microscópica (estimación

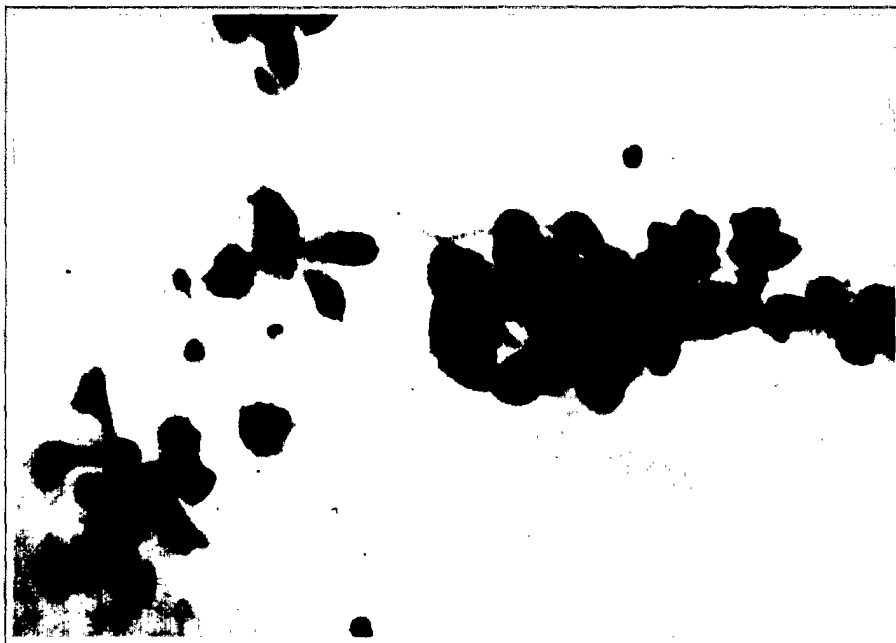


Figura 2. PAAF de carcinoma de mama correspondiente a un grado nuclear II. Variación en el tamaño de los núcleos, presencia de nucléolos y cierta tendencia a la dispersión celular (coloración de Papanicolaou, original $\times 400$).

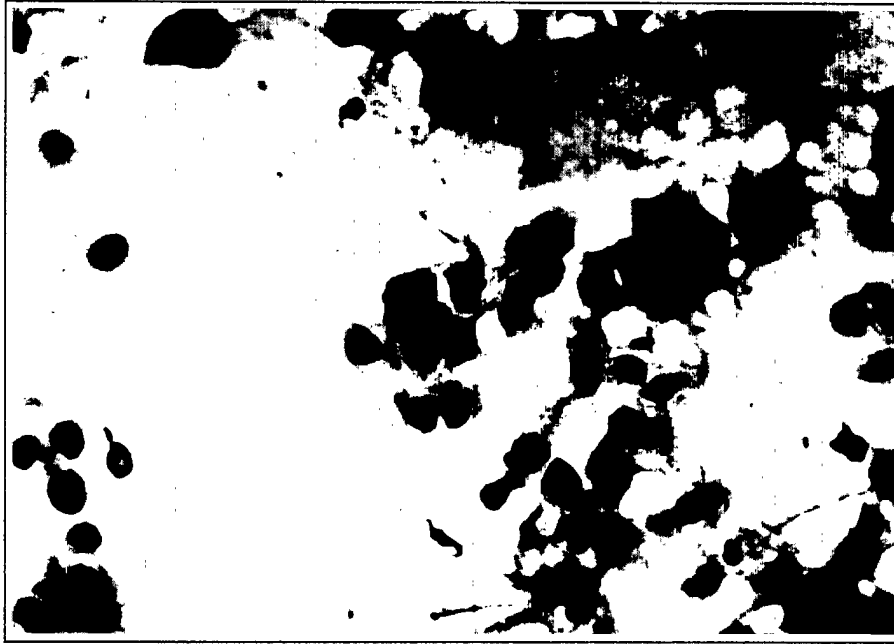


Figura 3. PAAF de carcinoma de mama correspondiente a un grado nuclear III. Núcleos con gran pleomorfismo y marcada pérdida de la relación N/C, con nucléolos evidentes y notable dispersión celular (coloración de Papanicolaou, original $\times 400$).

subjetiva), se procedió a su examen morfométrico (estimación objetiva) mediante un proceso digital de imágenes (Fig. 4) sobre los extendidos teñidos con la tinción de Papanicolaou:

– *Hardware:* sistema IMCO 1. MICROM S.A.

– *Software:* sistema de proceso digital de imágenes MICROM ESPAÑA S.A.

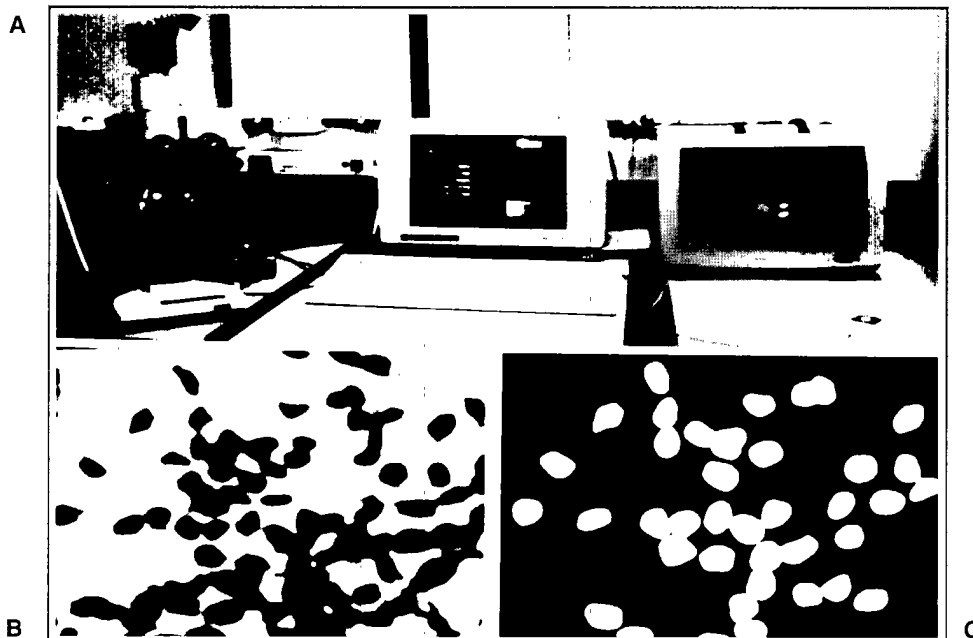


Figura 4. A) Equipo utilizado para la medición morfométrica. B) Los núcleos que van a analizarse son contorneados mediante un proceso denominado segmentación. C) Las imágenes en blanco corresponden a los núcleos que van a ser analizados después de efectuar la segmentación.

En el estudio se utilizaron los siguientes parámetros morfométricos, que cuantifican el tamaño y la forma de cada objeto considerado individualmente: área, perímetro, diámetro máximo, forma circular y forma rugosa.

El objetivo utilizado para la captación de la imagen fue de 40x, estudiándose como mínimo en cada caso 100 núcleos.

Todas las mediciones fueron almacenadas en un fichero relacionado con un sistema estadístico que forma parte del propio sistema.

Los datos estadísticos de cada parámetro morfométrico a estudiar fueron: el número de datos, el valor máximo, el valor mínimo, la media aritmética, la varianza, la desviación estándar y el sumatorio. En el caso del área, el perímetro y el diámetro máximo (estimación objetiva), sus medias aritméticas se correlacionan con el tamaño (estimación subjetiva) de los núcleos, mientras que las desviaciones estándar de las áreas (estimación objetiva) se correlacionan con el pleomorfismo (estimación subjetiva) de los núcleos.

Para la correlación de datos ordinales/numéricos se utilizó la R de Spearman, y para la de los numéricos entre sí, el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Del primer examen microscópico de las 60 preparaciones y con dos observadores por separado, hubo una discordancia de apreciación en 15 casos (25%), siendo los parámetros subjetivos en los cuales existía mayor discordancia el tamaño y el pleomorfismo. Después de aclarar las discrepancias, los resultados consensuados finales fueron:

- Grado nuclear I: 35% (21 casos).
- Grado nuclear II: 51,7% (31 casos).
- Grado nuclear III: 13,3% (8 casos).

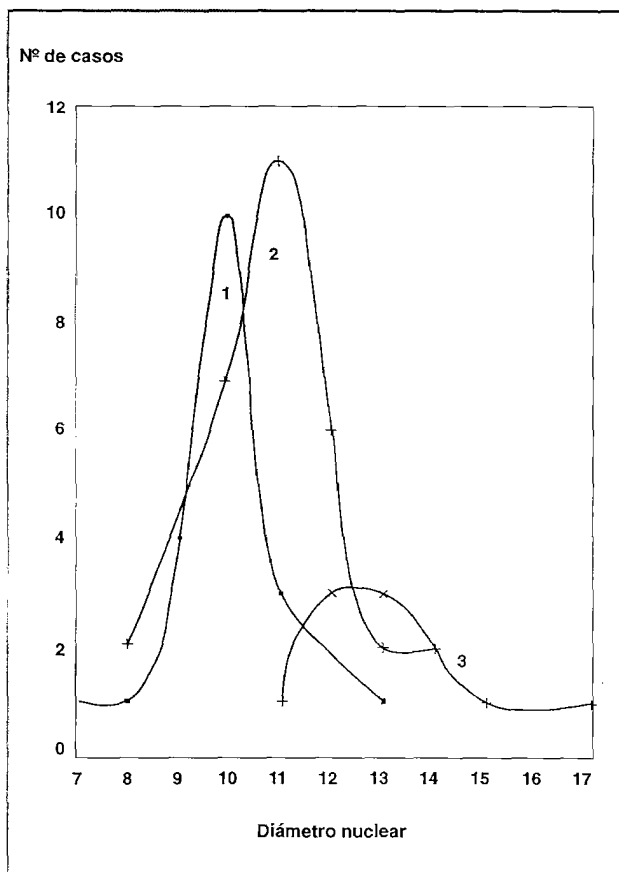


Figura 5. Las curvas observadas corresponden a los valores asignados a los tamaños nucleares en la estimación subjetiva, que los relacionan con los diámetros máximos de los núcleos analizados.

El estudio morfométrico mediante análisis digital de imagen de cada una de las preparaciones examinadas ofreció los resultados que vienen reflejados en la Tabla 1. Los valores para cada parámetro morfométrico y para cada grado nuclear son la media aritmética de cada una de las mediciones morfométricas.

Con respecto al diámetro máximo de los núcleos y relacionado con la valoración subjetiva establecida para el tamaño nuclear, se obtuvieron los resultados de la Fig. 5. En ella se puede observar que, si bien se diferencian

Tabla 1. Estudio morfométrico mediante análisis digital de imagen.

	Área	Perímetro	Diámetro máximo	Forma circular	Forma rugosa
Grado nuclear I	55,0±13,0	28,9±3,7	10,1±1,4	0,8±0,008	0,7±0,007
Grado nuclear II	67,4±17,7	31,6±4,8	11,0±1,7	0,8±0,008	0,7±0,007
Grado nuclear III	89,4±24,3	36,4±5,7	12,6±2,1	0,8±0,008	0,7±0,007

Tabla 2. Correlación* entre los valores del tamaño de los núcleos y su área media.

Tamaño	Área media
Valor 1	53,2±13,1
Valor 2	67,2±13,7
Valor 3	96,7±27,8

*Correlación de Spearman: R=0,67.

claramente los valores 1 y 3, existe un solapamiento con respecto al valor 2.

Una vez realizados los exámenes microscópico y morfométrico, y observando que en un principio parecía existir correlación entre ambos, llevamos a cabo un análisis estadístico multivarianza, en el cual relacionamos los parámetros subjetivos de tamaño y pleomorfismo con los parámetros de área y desviación estándar de la media de las áreas. Los resultados fueron los siguientes:

- En relación al tamaño y el área media existe una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$), observando que a mayor tamaño de los núcleos el área de los mismos, obtenida morfométricamente, también es mayor (Tabla 2).
- Respecto a la correlación entre el pleomorfismo subjetivo y la desviación estándar media, se vio que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores 1 y 2 y entre los valores 1 y 3, pero no entre los valores 2 y 3 (Tabla 3).
- Correlacionando entre sí el tamaño, el pleomorfismo, el área y la desviación estándar, obtuvimos los resultados de la Tabla 4. Podemos ver que de los dos parámetros subjetivos estudiados (tamaño y pleomorfismo) existe una mayor correlación con respecto al tamaño ($p < 0.001$) que con respecto al pleomorfismo ($p < 0.01$).

Tabla 3. Correlación* entre los valores de pleomorfismo de los núcleos y la desviación estándar media.

Pleomorfismo	DE media
Valor 1	14±4
Valor 2	20,6±7
Valor 3	20,5±6

*Correlación de Spearman: R=0,67.

DISCUSIÓN

Desde los factores morfológicos clásicos, instaurados por Bloom y Richardson (9), a los establecidos gracias a los grandes avances de las nuevas tecnologías que proporcionan la llamada caracterización biológica de los tumores (alteraciones genéticas, ploidía y ciclo celular, marcadores tumorales, presencia de oncogenes y oncogenes supresores, receptores hormonales, etc.), los estudios para predecir cuál va a ser el futuro de las pacientes con carcinoma de mama han mejorado sensiblemente. En este sentido, cabe mencionar que el grado nuclear es un dato citológico que puede considerarse de valor pronóstico en los exámenes microscópicos de las punciones de carcinomas de mama (10).

En contra del grado nuclear se ha criticado la subjetividad y, por lo tanto, la falta de objetividad que presupone su establecimiento. Ésta no es la impresión que nosotros hemos sacado de nuestro estudio, ni tampoco la conclusión a la que han llegado otros autores, puesto que, al examinar casos de punciones de carcinoma de mama y establecer su grado nuclear, hemos visto que hubo bastante grado de concordancia cuando se hizo la gradación por dos observadores por separado (coincidencia en un 75%).

Queriendo tener una confirmación de la fiabilidad a la hora de establecer el grado nuclear mediante una valoración subjetiva de los parámetros mencionados (tamaño

Tabla 4. Correlación entre los diferentes parámetros.

	Tamaño	Pleomorfismo	Área	DE
Tamaño	–	0,49**	0,63**	0,53**
Pleomorfismo	0,48**	–	0,37*	0,49**
Área	0,63**	0,37*	–	0,75**
DE	0,53**	0,49**	0,75**	–

Coeficiente de correlación de Pearson: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

de los núcleos, pleomorfismo de los mismos, presencia o no de nucléolo y grado de dispersión celular), hemos complementado el estudio con una valoración objetiva mediante estudios morfométricos que nos proporcionan valores numéricos.

Observamos que no existe ninguna diferencia significativa entre los parámetros de forma (formas circular y rugosa) y el grado nuclear. Ello puede poner de manifiesto el hecho de no incluir en el grupo de parámetros subjetivos la irregularidad de la membrana nuclear, lo que confirma que es muy difícil apreciar diferencias entre unas células y otras con respecto a este factor en el carcinoma de mama.

Con respecto al parámetro morfométrico área, vemos que sí se pueden establecer grupos que se corresponderían, cada uno de ellos, con un determinado grado nuclear. Las diferencias reflejadas en el área constatan la existencia de tres grados nucleares que coinciden con unos determinados intervalos de los valores de las áreas, y las diferencias entre las desviaciones estándar del área constatan dos grados de pleomorfismo. Señalamos que, valorando el diámetro máximo de los núcleos, se pueden establecer dos grupos de tamaños nucleares (núcleos iguales o menores de 11 μ y núcleos iguales o mayores de 12 μ), cuyo corte fue establecido en el trabajo de Zadjela (11). El autor, examinando 245 punciones de tumores mamarios mediante morfometría ocular con aceite de inmersión, es capaz de diferenciar entre lo que él denomina núcleos pequeños (iguales o menores de 12 μ) y núcleos grandes (mayores de 12 μ de diámetro).

No siempre existe una correlación entre el tamaño de los núcleos (pequeños y grandes) y el grado nuclear. Así, vimos que en el grupo de los núcleos pequeños (iguales o menores de 12 μ) existen 19 casos a los cuales asignamos un grado nuclear II, y dos casos con un grado nuclear III. Esto se debe a que al efectuar la suma de los factores subjetivos considerados en la gradación, la presencia de nucléolos prominentes en casos con núcleos pequeños daba una mayor gradación que si sólo se considerase el tamaño del núcleo. Por el contrario, dentro del grupo de mal pronóstico (núcleos grandes), si sólo se considera el tamaño nuclear, no tienen por qué existir un caso de grado nuclear I y 12 casos de grado nuclear II. Ello se debía a la ausencia de nucléolo.

Podemos concluir mencionando que, de los parámetros subjetivos a la hora de poder establecer un determinado grado nuclear (tamaño, pleomorfismo, presencia o no de nucléolo y grado de dispersión celular), son el tamaño de los núcleos y el pleomorfismo los que se correlacionaron con los resultados morfométricos. No existe ninguna correlación entre los factores de forma y el grado nuclear, lo cual era esperado puesto que en el carcinoma de mama los núcleos suelen conservar una forma bastante uniforme. Del examen del análisis morfométrico se deduce que el área y la desviación estándar de la misma son valores a tener en cuenta, mientras que los factores de forma no aportan datos adicionales en la gradación de los núcleos.

La función de los nucléolos, como factor pronóstico independiente, necesita estudios ulteriores que la confirmen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dabbs DJ. *Ductal carcinoma of breast: Nuclear grade as a predictor of S-phase fraction*. Hum Pathol 1993; 24(6): 652-656.
2. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. *Prognostic factors in early breast carcinoma*. Cancer 1994; 74(1): 381-400.
3. Moroz K, Lipscomb J, Vial LJ, Dhurandhar N. *Cytologic nuclear grade of malignant breast aspirates as a predictor of histologic grade. Light microscopy and image analysis characteristics*. Acta Cytol 1997; 41(4): 1107-1111.
4. Saner T, Beraki K, Jebsen PW, Ormerod E, Naess O. *Ploidy analysis by in situ hybridization of interphase cell nuclei in fine-needle aspirates from breast carcinoma: Correlation with cytologic grading*. Diagn Cytopathol 1997; 17(4): 267-271.
5. NIH Consensus Conference. *Treatment of early stage breast cancer*. JAMA 1991; 265: 391-395.
6. Wood WC. *Integration of risk factors to allow patient selection for adjuvant systemic therapy in lymph node-negative breast cancer patients*. World J Surg 1994; 18(1): 39-44.
7. Figueroa JA, Yee D, McGuire WL. *Prognostic indicators in early breast cancer*. Am J Med Sci 1993; 305(3): 176-182.
8. Robinson IA, McKee G, Nicholson A y cols. *Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas*. Lancet 1994; 343: 947-949.
9. Bloom HJG, Richardson WW. *Histological grading and prognosis in breast cancer: A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years*. Br J Cancer 1957; 11: 359-377.
10. Dabbs DJ, Silverman JF. *Prognostic factors from the fine needle aspiration: Breast carcinoma nuclear grade*. Diagn Cytopathol 1994; 10(3): 203-208.
11. Zadjela A, De la Riva LS, Ghossein NA. *The relation of prognosis to the nuclear diameter of breast cancer cells obtained by cytologic aspiration*. Acta Cytol 1979; 23(1): 75-80.

