

# Correlación entre ploidia y fase S, y características morfológicas y receptores hormonales en el cáncer de mama. Estudio de 402 casos

Drs. Pedro J Grases, Francisco Tresserra, Vilma Molina, Rafael Fábregas\*, Marta Carrera\*\*, Alfonso Fernández-Cid\*

Servicio de Anatomía Patológica, Departamento de Obstetricia y Ginecología\*, y Centro de Patología Celular\*\*  
Institut Universitari Dexeus, Barcelona (España)

## RESUMEN

Con la finalidad de establecer la relación entre ploidia, fase S y las características morfológicas del carcinoma de mama se estudiaron 402 muestras de material en fresco. No se encontró ninguna relación entre ploidia y fase S, y el status de los ganglios linfáticos y la edad de las pacientes. Las lesiones aneuploides resultaron de mayor tamaño que los tumores diploides y usualmente no expresaban receptores hormonales. Los carcinomas ductales infiltrantes (322/402) mostraron mayor porcentaje de lesiones aneuploides y una fase S más elevada en relación con el incremento del grado histológico, la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y el índice mitótico. En el análisis multivariante, el pleomorfismo nuclear y el tamaño tumoral constituyeron las únicas variables independientes y con valor de predicción para la aneuploidia. El patrón de ADN y la fase S constituyen variables que se correlacionan con los cambios morfológicos y así proporcionan información objetiva y reproducible.

*Palabras clave:* Citometría de flujo. Neoplasia mamaria. Patología.

## SUMMARY

In order to establish the relationship between ploidy, S-Phase fraction and morphological features in breast carcinoma, 402 frozen specimens were studied. No relationship could be found when ploidy and S-phase fraction were correlated with lymph node status and patient's age. Aneuploid lesions were larger than diploid tumors and usually did not express hormone receptors. Infiltrating duct carcinoma (322/402) showed a higher rate of aneuploidy and S-phase fraction related to the increase

of the histological grade, scores of tubule formation, nuclear pleomorphism and mitotic rate. In a multivariate regression analysis the nuclear pleomorphism and tumoral size were the only independent variables and most powerful predictive for aneuploidy in infiltrating duct carcinomas.

*DNA pattern and S-phase fraction are variables that correlate with morphological features, providing more objective and reproducible information.*

*Key words:* Flow cytometry. Breast neoplasm. Pathology.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en mujeres y representa aproximadamente el 30% del total de cánceres diagnosticados en el sexo femenino. En la actualidad constituye la tercera causa de muerte por cáncer, siendo superada sólo por el cáncer de pulmón y el colorrectal. Casi el 18% de las muertes por cáncer en mujeres se encuentran relacionadas con el cáncer de mama (1). Se han establecido muchos factores pronósticos con la finalidad de determinar qué tumores comportan mayor agresividad; el estadio clínico y las características histopatológicas son los únicos factores utilizados en la práctica con fines pronósticos. Sin embargo, estos sólo representan aspectos estáticos de la enfermedad neoplásica, pero son importantes para predecir la evolución, conocer el ritmo y la dinámica de crecimiento tumoral. En los últimos años, el análisis del ADN mediante citometría de

flujo ha aportado información acerca de la ploidia y cinética celular para predecir el comportamiento de esta modalidad de cáncer (2-6).

La relación entre el contenido de ADN y la fase S (FS) de las células tumorales se ha establecido no solamente con la edad, la menopausia y el estadio clínico, sino también con el tamaño tumoral, el tipo y grado histológico, la existencia o no de metástasis en los ganglios linfáticos y el status de los receptores hormonales (2-5, 7-11). Aquellos tumores de alto grado que no expresan receptores hormonales son usualmente aneuploides y contienen un alto porcentaje de células en FS (3,4,6,7,9,10,12,14).

En esta contribución presentamos los patrones de ploidia y FS en relación con diversos aspectos morfológicos del tumor, como tipo y grado histológicos, tamaño, afectación de ganglios linfáticos axilares y status de los receptores hormonales estudiados en muestras de tejido tumoral congelado provenientes de 402 cánceres de mama.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Pacientes.** Se incluyó en el estudio un total de 402 carcinomas infiltrantes de mama intervenidos quirúrgicamente en nuestro instituto, en el curso de los últimos 5 años. Todas las pacientes eran de raza caucásica con una media de edad de 50 años (25-83 años).

**Hallazgos anatomopatológicos.** En los casos en que fue posible, el tumor se midió en su diámetro mayor. Los tipos histológicos incluidos fueron los siguientes: carcinoma ductal infiltrante (CDI), carcinoma lobulillar infiltrante (CLI), carcinoma infiltrante mixto (CIM) (coexistencia de componente ductal y lobulillar en la misma lesión) y carcinoma medular (CM). En 336 casos se practicó linfadenectomía ipsolateral a fin de determinar el status ganglionar. El resto de las muestras correspondía a 44 biopsias por incisión, 15 mastectomías simples y 7 biopsias de lesiones recidivadas.

En los carcinomas ductales infiltrantes, el grado histológico se estableció de acuerdo con la clasificación de Scarff-Bloom-Richardson modificada por Elston (15), especificándose la formación de túbulos (FT), el pleomorfismo nuclear (PN) y el índice mitótico (IM). Estos parámetros aparecen resumidos en el Cuadro 1.

Cuadro 1  
Características clinicopatológicas y biológicas de los casos

	N	%
Edad		
< 50	238	59,2
> 50	164	40,8
Tamaño tumoral		
Sin determinar	28	6,9
< 2 cm	185	46,0
2-5 cm	168	41,8
> 5 cm	21	5,3
Afectación ganglionar		
pN(-)	202	60,1
pN(+)	134	39,9
Tipo histológico		
Carcinoma ductal infiltrante	322	80,1
Carcinoma lobulillar infiltrante	44	10,9
Carcinoma infiltrante mixto	21	5,3
Carcinoma medular	15	3,7
Grado histológico*		
Combinado		
I	123	38,2
II	147	45,7
III	52	16,1
Pleomorfismo nuclear		
1	70	21,7
2	180	55,9
3	72	22,4
Índice mitótico		
1	170	52,8
2	125	38,8
3	27	8,4
Formación de túbulos		
1	56	17,4
2	125	38,8
3	141	43,8
Receptores hormonales		
RE+	180	47,2
RE-	201	52,8
RP+	204	53,5
RP-	177	46,5

\* En el carcinoma ductal infiltrante.

**Citometría de flujo.** Con el espécimen en fresco se tomó una muestra de tumor de unos 0,5 g y se almacenó a -30°C. Las muestras fueron troceadas y sumergidas en tampón citrato según la técnica propuesta por Vindelov y col. (16), preparándose una suspensión de núcleos aislados que se coloreó con yoduro de propidio (Sigma®). Las suspensiones

celulares se analizaron en un citómetro de flujo Becton-Dickinson-Faxscan y el programa Cellfit (Becton-Dickinson®) para la adquisición de datos. El citómetro utilizado estaba equipado con un rayo láser de argón de 488 nm. El análisis del ADN fue el resultado del estudio de 15 000 núcleos en cada caso a una razón de 40-100 núcleos/seg. Se utilizaron eritrocitos de pollo y linfocitos humanos como controles externos. El índice de ADN se calculó mediante el cociente entre el contenido de ADN de las células tumorales en  $G_0/G_1$  y el contenido de las células normales en  $G_0/G_1$ . En el presente estudio, los tumores fueron clasificados como diploides o aneuploides. La FS pudo calcularse en 343 casos (85%).

**Análisis de receptores hormonales.** En el curso del estudio peroperatorio de las muestras se obtuvieron seis cortes congelados adicionales de 7  $\mu$ m y se colocaron en portaobjetos especialmente preparados. La determinación de receptores se realizó mediante la utilización de equipos comerciales para receptores estrogénicos (RE) Abbott ER-ICA monoclonal® y receptores de progesterona (RP) Abbott PgR-ICA monoclonal®. Los tumores se consideraron positivos o negativos para cada tumor después de aplicar métodos estandarizados (17).

**Análisis estadístico.** La media de células en FS se comparó con otras variables mediante el test de ANOVA o el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney y el análisis de la varianza de Kuskal-Wallis. Para comparar la ploidia se utilizó el test exacto de Fisher. El análisis multivariante se realizó de acuerdo con una regresión logística no condicional. La diferencia se consideró estadísticamente significativa ante valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

De los 402 tumores estudiados, 322 (80%) eran carcinomas ductales infiltrantes, 44 (11%) carcinomas lobulillares infiltrantes, 21 (5%) carcinomas mixtos infiltrantes, y 15 (4%) carcinomas medulares. El 62% de los CDI, el 25% de CLI, el 40% de CIM, y el 87% de CM fueron aneuploides, y se constató además, una relación entre el tipo histológico y la ploidia ( $p < 0,001$ ). En los tumores diploides la media de FS de los CDI fue de 3,03 (desviación estándar  $\pm 2,43$ ), en los CLI de 2,78 ( $\pm 2,18$ ), en los CIM de 3,12 ( $\pm 2,08$ ) y en los CM de 6,20 ( $\pm 4,80$ ). En lesiones aneuploides, la media de FS fue de 9,18 ( $\pm 6,55$ ) en los CDI, de 10,41 ( $\pm 7,56$ ) en los CLI, de

8,66 ( $\pm 3,87$ ) en los CIM y de 19,98 ( $\pm 8,71$ ) en los CM. La media de FS en neoplasias aneuploides fue mayor que en las diploides, independientemente del tipo histológico, pero en los tumores aneuploides se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ) entre el tipo histológico y la media de FS.

Existió una relación estadísticamente significativa entre el grado histológico, el PN, la FT y el IM, y el tipo de ploidia. El porcentaje de tumores aneuploides fue mayor cuando el grado histológico, el PN, la FT y el IM aumentaban (Figura 1). La FS fue significativamente mayor cuando el grado histológico era alto, no sólo en tumores aneuploides, sino también en los diploides (Cuadro 2). También se constató una relación positiva entre la media de FS y el PN, la FT y el IM, independientemente de la ploidia. Cuando los valores de estas variables aumentaban, la FS era mayor.

En las 336 pacientes en las cuales se practicó linfadenectomía axilar no se encontró relación entre el tipo y grado histológicos, el patrón de ploidia, la media de FS y la existencia de metástasis ganglionares o no. El porcentaje de lesiones aneuploides en pacientes con ganglios negativos fue del 54% y del 60% cuando se encontraron metástasis ganglionares. La media de FS fue de 2,64 ( $\pm 2,36$ ) en pacientes con tumores diploides y en ganglios negativos y de 9,79 ( $\pm 7,01$ ) en aquellas con lesiones aneuploides y ganglios negativos. En pacientes con ganglios positivos, la media de FS fue de 3,43 ( $\pm 2,50$ ) en tumores diploides y de 8,14 ( $\pm 5,29$ ) en los aneuploides.

No se encontraron diferencias significativas cuando todas estas variables se confrontaron con la edad de cada paciente. La edad media de las pacientes con lesiones aneuploides fue de 50,9 años ( $\pm 12,3$ ) y de 50,2 años ( $\pm 11,8$ ) para aquellas con tumores diploides.

El tamaño medio de los tumores fue de 2,32 cm ( $\pm 1,62$ ) con una variación entre 0,3 y 13 cm. Los tumores con una población celular aneuploide fueron mayores que los diploides ( $p < 0,05$ ). El tamaño medio de los tumores diploides fue de 2,03 cm ( $\pm 1,22$ ) y el de los aneuploides de 2,53 cm ( $\pm 1,83$ ). La FS no mostró relación alguna con el tamaño tumoral. En aquellos tumores en los que se estableció el grado histológico, el tamaño medio fue mayor cuando el grado y cada una de las variables morfológicas (PN, FT e IM) aumentaban de forma independiente. El tamaño del tumor fue la única

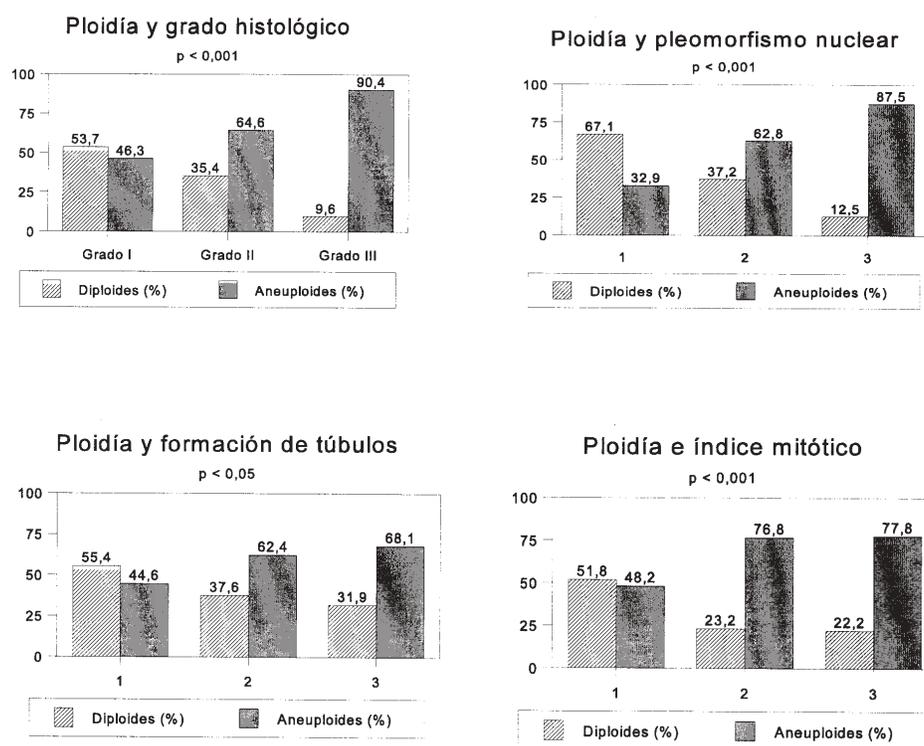


Figura 1. Patrón de ploidia en función del grado histológico y cada una de sus variables en los carcinomas ductales infiltrantes.

variable relacionada con la existencia de metástasis ganglionares; los tumores mayores presentaron metástasis más frecuentemente (p< 0,001).

En 381 casos se determinaron los receptores hormonales, 180 de los cuales expresaron RE y 204 RP; la mayoría de los tumores (39%) fueron positivos para RE y RP. El porcentaje de aneuploidia en los tumores positivos para RE fue del 53% y del 72% en negativos para RE. En positivo para RP el 52% de los tumores fueron aneuploides y el 75% de los negativos para RP. Los tumores aneuploides usualmente no expresaban ni RE (p< 0,001) ni RP (p< 0,001). Los tumores diploides fueron con mayor frecuencia positivos para ambos receptores.

No se encontró ninguna relación entre la FS y la existencia de RE o no en las lesiones diploides. Sin embargo, en las lesiones aneuploides, la FS fue significativamente mayor (p< 0,05) en los tumores negativos para RE. En cambio, la relación entre la FS y la existencia de RP o no, fue estadísticamente significativo (p< 0,05), independientemente del tipo de ploidia, de forma que los tumores negativos para

Cuadro 2

Fase S y grado histológico en los carcinomas ductales infiltrantes

	Diploides		Aneuploides	
	X	P	X	P
<b>Grado histológico</b>				
I	2,28 ± 1,49	P< 0,001	5,51 ± 4,39	P< 0,001
II	3,77 ± 2,99		7,98 ± 5,22	
III	4,42 ± 0,81		12,50 ± 7,56	
<b>Pleomorfismo nuclear</b>				
1	2,38 ± 2,63	P<0,001	5,51 ± 4,39	P<0,001
2	3,29 ± 2,19		7,89 ± 5,22	
3	4,46 ± 1,77		12,50 ± 7,56	
<b>Formación de túbulos</b>				
1	1,87 ± 1,21	P< 0,001	6,57 ± 4,31	P<0,05
2	3,14 ± 2,29		7,63 ± 4,68	
3	3,67 ± 2,80		10,99 ± 7,52	
<b>Índice mitótico</b>				
1	2,55 ± 1,64	P< 0,05	7,07 ± 5,39	P< 0,001
2	2,83 ± 2,32		9,56 ± 5,28	
3	5,82 ± 6,93		15,90 ± 10,11	

RP mostraron una media de FS mayor. El status de los receptores hormonales no estaba relacionado ni con el *status* ganglionar ni con el tamaño tumoral.

En el análisis multivariante, el PN y el tamaño tumoral fueron las únicas variables independientes y con valor de predicción para aneuploidia en el carcinoma ductal infiltrante.

### DISCUSIÓN

El análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo y la actividad proliferativa celular, se han utilizado como factores pronósticos en diversos tumores (18).

Estos dos parámetros, como en el caso de tumores en otras localizaciones, también en la glándula mamaria se han relacionado con las recidiva de la enfermedad y con la supervivencia (5). En la mayoría de los estudios, las lesiones aneuploides y con FS elevada se asocian con peor pronóstico, alta mortalidad y mayor índice de recidiva (7,8,18). Estos resultados son válidos sobre todo en pacientes sin metástasis en ganglios linfáticos axilares (9,19-21), aunque algunos autores han demostrado una relación y el patrón de ADN y/o FS y la supervivencia o recidiva en pacientes con metástasis en ganglios linfáticos (22,23). La ploidia y la FS también se han relacionado con otros factores pronósticos del cáncer de mama, de forma que los tumores con tipo histológico agresivo, núcleos anaplásicos y numerosas mitosis, suelen ser aneuploides y con una FS alta (6,14,24,25).

El porcentaje de lesiones aneuploides en CDI varía entre el 63% y el 70% (6,9); sin embargo, la mayoría de las series están de acuerdo que el CM es el tipo histológico con el más alto porcentaje de lesiones aneuploides (5,6,25). El CM también es el tumor con la media más alta de FS (4,5,7,25). Este hecho está relacionado muy probablemente con los rasgos citológicos de este tipo de cáncer, aunque los valores de ploidia y FS no concuerdan con el pronóstico favorable (25,26). La existencia de un infiltrado linfocitario prominente en estos tumores se ha utilizado para explicar estos valores (27). En cambio, el CLI es el tumor con mayor porcentaje de lesiones diploides (28).

Cuando se considera el grado histológico del CDI, el porcentaje de lesiones aneuploides aumenta con el grado (4-7,9,10,12-14,18,27,29,30). Una revisión de siete estudios en que se compara ploidia con el grado histológico (basado en la clasificación

de Scarff-Bloom-Richardson), reveló que el 49% de los tumores de grado I, el 66% de los de grado II y el 85% de los de grado III eran aneuploides (6), resultados similares a los que hemos obtenido. Hay, sin embargo, otras contribuciones que no han logrado correlacionar el grado histológico con el patrón de ploidia. Esta discordancia puede atribuirse a la utilización de distintas normas para clasificar los tumores (2,9). La media de FS es habitualmente mayor en las lesiones aneuploides en comparación con las diploides; las diferencias varían entre el doble y el cuádruple (4,5,18). En nuestros casos, los valores de FS fueron algo menores. Ello puede explicarse por el hecho de haber utilizado tejido en fresco en lugar de tejido previamente incluido en parafina, como ocurre en muchas de las series publicadas, donde la existencia de detritos celulares es mayor e incrementan el valor de FS (4,7,18,27). Independientemente de la ploidia, la FS también es mayor en tumores escasamente diferenciados (3-5,7,10,31). La relación existente entre ploidia, FS y grado histológico ha permitido a algunos autores sugerir la utilización de estos parámetros en lugar de sólo el grado histológico porque parece una valoración más objetiva (29,32). Si se emplea la clasificación de Scarff-Bloom-Richardson o alguna de sus variantes para determinar el grado histológico, se ha observado que la ploidia y la FS no sólo aumentan con el grado histológico combinado, sino también con cada una de las variables que lo forman (PN, FT e IM), de forma que el porcentaje de lesiones aneuploides aumenta significativamente cuando hay un incremento de los valores PN, FT e IM. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Frierson quien encontró una correlación entre el porcentaje de lesiones aneuploides y el PN y el IM, pero no con el FT (6). Joensuu y col. mediante una modificación de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, encontraron una relación entre ploidia y el PN y el IM; en la FT, esta relación se obtuvo con el cambio de los valores 1 y 2 frente al 3 (18). Smith y cols. encontraron una correlación directa entre el índice de ADN y el grado nuclear (33).

Existe controversia en la bibliografía al valorar la relación entre el contenido de ADN y la FS con la existencia de metástasis en ganglios linfáticos o no (5). Algunos estudios indican que las pacientes sin metástasis ganglionares tienen más frecuentemente tumores diploides y con una FS baja (4,34). La FS en pacientes con ganglios positivos y tumores diploides tienden a ser más alta si se compara con la

de pacientes con tumores diploides y ganglios negativos. En lesiones aneuploides, la FS es elevada, independientemente de la positividad o negatividad de los ganglios linfáticos (2). Cuando en otros estudios se analiza la afectación ganglionar, sólo se encuentran diferencias en los valores de la FS, pero no en el patrón de ploidia (7,10). Nosotros no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la media de FS y en el contenido de ADN entre las pacientes con ganglios afectados o no; paradójicamente, la FS fue mayor en lesiones aneuploides con metástasis ganglionares. Hay algunos estudios en los que no se encuentra relación entre el patrón de ploidia, la FS y la afectación ganglionar (13,30,35,36).

Parece que el porcentaje de tumores aneuploides es mayor en mujeres con 50 años o más (4,34). Otros estudios han intentado relacionar el porcentaje de lesiones aneuploides con la menopausia sin encontrar relación alguna, aunque la FS es significativamente mayor en mujeres jóvenes o premenopáusicas (2,5,12,37). Nosotros no hemos encontrado diferencias entre la edad y el contenido de ADN y FS, en contraste con otros autores (9,13,18). Si las pacientes se estratifican por edad en un grupo menor o mayor de 50 años, las más jóvenes tienen un porcentaje ligeramente menor de lesiones aneuploides. En nuestro estudio, la edad no está relacionada con otras variables, como el tamaño del tumor, las metástasis ganglionares, el tipo o grado histológico.

El tamaño tumoral se ha considerado una variable fuertemente relacionada con el patrón de ADN y los valores de FS. Los tumores de mayor tamaño son más frecuentemente aneuploides y cursan con una FS elevada (7-10,12). Algunos autores han sugerido que el cáncer de mama comienza como una lesión diploide y se convierte en aneuploide a medida que aumenta su tamaño (12). En cambio, otros estudios no han encontrado relación entre el tamaño del tumor, la ploidia y la FS (5,13,35).

El *status* de los receptores hormonales es también un factor de predicción importante en el cáncer de mama (38,40); las pacientes con tumores positivos para RE y RP, tienen una supervivencia libre de enfermedad más larga si se compara con pacientes cuyas lesiones no expresan receptores hormonales. Además la respuesta a la terapia hormonal es más favorable (24,38-40). Tal y como ocurre en otras series, en este estudio la mayoría de los tumores fueron positivos para RE y RP (2,40). La relación

entre ploidia y el *status* de los receptores hormonales no ha sido comprobada estadísticamente en todas las series (5,10,12), pero parece que los tumores negativos para RE y RP tienden a ser aneuploides (2,4-6,13,38). Parece que existe una relación inversa entre el *status* de receptores hormonales, el porcentaje y la FS. Las lesiones con receptores hormonales negativos tienen la media de FS más elevada y mayor porcentaje de lesiones aneuploides en contraste con las neoplasias con receptores hormonales positivos con una FS menor y menor frecuencia de lesiones aneuploides.

En resumen, tanto la ploidia como FS son variables importantes que se correlacionan con determinadas características morfológicas. Los tumores con un patrón de ADN aneuploide y FS alta, tienden a ser más grandes, ocurren en pacientes más jóvenes y pertenecen a tipos histológicos biológicamente más agresivos, con excepción del carcinoma medular, se correlacionan con un alto grado histológico (pleomorfismo nuclear marcado, índice mitótico alto y escasa formación de túbulos), con receptores hormonales negativos y metástasis en ganglios linfáticos axilares. Queda pendiente para un futuro, correlacionar estas variables con la evolución de la enfermedad (intervalo libre de recidiva y supervivencia) y eventualmente indentificar grupos de pacientes en las cuales, además del valor pronóstico, se obtenga información útil con indicaciones terapéuticas.

## REFERENCIAS

1. Coleman MP, Esteve J, Darniecki P, Arsland A, Renard H. Trends in cancer incidence and mortality. Lyon: IARC Scientific Publications; 1993.
2. Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WI. DNA flow cytometry and prognostic factors in 331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988;61:420-427.
3. Christov K, Milev A, Todorov V. DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors. *Cancer* 1989;64:673-679.
4. Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Matilla J, Lauslahti K, et al. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-Phase fraction. *Cancer* 1988;62:2183-2190.
5. Frierson HF. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive

## CORRELACIÓN ENTRE PLOIDIA Y FASE S

- adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991;15:358-367.
6. Frierson HF. Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. *Hum Pathol* 1993;24:24-29.
  7. Arnelöw C, Emdin SO, Lundgren B, Roos G, Söderström J, Ångquist A. Breast carcinoma growth rate described by mammographic doubling time and S-phase fraction. Correlations to clinical and histopathologic factors in a screened population. *Cancer* 1992;70:1928-1934.
  8. Meyer JS, Proince MA. S-phase fraction and nuclear size in long term prognosis of patients with breast cancer. *Cancer* 1994;74:2287-2299.
  9. Witzig TE, Ingle JN, Cha SS, Schaid DJ, Tabery RL, Wold LE, et al. DNA ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer* 1994;74:1752-1761.
  10. Gnant MFX, Blijham G, Reiner A, Reynders M, Schutte B, van Asche C, et al. DNA ploidy and other results of DNA flow cytometry as prognostic factors in operable breast cancer; 10 years result of a randomized study. *Eur J Cancer* 1992;28:711-716.
  11. Haghbin M, McCue PA, Mansfield CM, Komarnicky LT, Benmarr A, Schwartz GF. Correlation of flow cytometry to clinical, hormone receptors, and morphological grade in stage I and II invasive breast carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1996;19:54-58
  12. Thorud E, Fossa SD, Vaage S, Kaalhus O, Knudsen OS, Borner O, et al. Primary breast cancer. Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. *Cancer* 1986;57:808-811.
  13. Lo SS, Wang HC, Shyr YM, Lai CR, Lui WY. DNA flow cytometric analysis of primary breast cancer in chinese women: The relationship of DNA aneuploidy to clinical characteristics. *Eur J Surg Oncol* 1994;20:553-556.
  14. Veneti S, Ioannidou-Mouzaka L, Papaioannou D, Viglas J, Papadimitriou JM. DNA ploidy of breast cancer analyzed in association with classical morphologic factors and hormonal receptors. *The Breast* 1994;3:227-229.
  15. Elston CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. En: Page DL, Anderson TJ, editores. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburg: Churchill-Livingstone; 1987.p.300-311.
  16. Vindelov L, Christiansen I, Nissen N. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983;3:323-327.
  17. Jonat W, Mass H, Stepner HE. Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res* 1986;46(Suppl):4296-4298.
  18. Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ. DNA index and S-phase fraction and their combination as a prognostic factor in operable ductal breast carcinoma. *Cancer* 1990;66:331-340.
  19. Sigurdson H, Baldetorp B, Dalberg M, Ferno M, Killander D, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322:1045-1053.
  20. Peiro G, Lerma E, Climent MA, Segui MA, Alonso MC, Prat J. Prognostic value of S-phase fraction in lymph-node-negative breast cancer by image and flow cytometric analysis. *Mod Pathol* 1997;10:216-222.
  21. Merkel DE, Winchester DJ, Goldschmidt RA, August CZ, Wruck DM, Rademaker AW. DNA flow cytometry and pathologic grading as prognostic guides in axillary lymph node negative breast cancer. *Cancer* 1993;72:1926-1932.
  22. Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987;47:4729-4735.
  23. Beerman IL, Kluin PM, van de Velde CJH, Hermans J, Cornelisse CJ. DNA flow cytometry in the prognosis of node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1989;321:473-474.
  24. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991;15:334-349.
  25. Cook DL, Weaver DL. Comparison of DNA content, S-phase fraction, and survival between medullary and ductal carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol* 1995;104:17-22.
  26. Pedersen L, Larsen JK, Christiansen IJ, Lykkesfeldt A, Holck S, Schiodt T. DNA ploidy and S-phase fraction in medullary carcinoma of the breast: A flow cytometric analysis using archival material. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:297-306.
  27. Somoza G, Solá J, Diez-Caballero A, Torremadé J, Regueira FM, Pardo F, et al. Citometría de flujo en el cáncer de mama: Análisis de la ploidia y fase S en relación con otros factores pronóstico. *Rev Senología Patol Mam* 1995;8:3-7.
  28. Frost Ar, Karcher DS, Terahata S, Siegel RS, Silverberg SG. DNA analysis and S-phase fraction determination by flow cytometric analysis of infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 1996;9:930-937.
  29. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Allen D, Rubens RD, et al. DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1990;61:671-674.
  30. Batsakis JG, Sneige N, El-Naggar A. Flow cytometric (DNA content and S-phase fraction) analysis of breast

- cancer. *Cancer* 1993;71:2151-2153.
31. Camplejohn RS, Ash RR, Guillett CE, Raikundaia B, Barnes DM, Gregory WM, et al. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single center. *Br J Cancer* 1995;71:140-145.
  32. Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry* 1993;14:482-485.
  33. Smith FB, Zappi ME. Relationship between image cytometric DNA index, proliferation fraction and multiploidy and conventional nuclear grade in breast carcinoma. *Mod Pathol* 1993;6:606-611.
  34. Taylor IW, Musgrove EA, Friedlancer ML, Foo MJ, Badley DW. The influence of age on the DNA ploidy levels of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19:623-628.
  35. Stal O, Carstensen JM, Wingren S, Rutqvist LE, Skoog L, Klintonberg C, et al. Relationship of DNA ploidy and S-phase fraction to survival after first recurrence of breast cancer. *Acta Oncol* 1994;33:423-429.
  36. Bergers E, van Diest PJ, Baak JP. Cell cycle analysis of 932 flow cytometric DNA histograms of fresh frozen breast carcinoma material. Correlation between flow cytometric, clinical, and pathologic variables. MMMCP collaborative group. Multicenter morphometric mammary carcinoma. *Projet collaborative group. Cancer* 1996;77:2258-2266.
  37. Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, et al. DNA ploidy, S-phase and steroid receptors in more than 127 000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993;28:9-20.
  38. Keshgegian AA. Biochemically estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive breast carcinoma. Immunocytochemical hormone receptors and prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:240-244.
  39. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994;74:381-400.
  40. De Sombre ER, Carbone PP, Jensen EV, McGuire WL, Wells SA Jr, Wittliff JL, et al. Steroid receptors in breast cancer. *N Engl J Med* 1979;301:1011-1012.

Correspondencia: Pedro J Grases  
 Institut Universitari Dexeus  
 Paseo de la Bonanova 67-69  
 08017 Barcelona (España)  
 Tel: 34-93-211.8390  
 Fax 34-93-211.1654.

Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.  
 Barquisimeto Estado Lara

Barquisimeto, 26 de febrero de 1998

Señor:  
 Presidente de la Academia de Medicina  
 Caracas

Distinguido señor:

En nombre del Consejo de Redacción de la Revista PRINCIPIA, tengo el gusto de dirigirme a usted, con el propósito de enviarle, acompañado a ésta, un ejemplar correspondiente al número 7; y a la vez para solicitar su valiosa colaboración, a través de monografías, ensayos o trabajos de investigación, constantes de tres a treinta cuartillas, cuyo contenido genérico sea de interés para la comunidad universitaria. Dicha colaboración no sólo hará posible la continuidad de nuestra revista, sino además, y lo que es más significativo, su elevación cualitativa que permitirá su calificación en el contexto nacional e internacional al cual se debe.

Hago propicia la ocasión para testimoniarle nuestro respeto, admiración y gratitud por la acogida que pueda dispensarnos.

Atentamente:

Florencio Sánchez.