



11201
4
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
SECRETARIA DE SALUD**

**COMPORTAMIENTO DE LOS ORGANIZADORES
NUCLEOLARES EN TUMOR PHYLLODES, FIBROADENOMA
Y GLANDULA MAMARIA NORMAL**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO ANATOMOPATOLOGO
P R E S E N T A :
DR. MARCO ANTONIO DURAN PADILLA**

México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DIRECCION DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACION CIENTIFICA

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
SUBDIRECCION DE INVESTIGACION

PROYECTO:

**Comportamiento de los Organizadores Nucleolares
en Glándula Mamaria Normal, Fibroadenoma y Tumor Phyllodes.**

RESPONSABLE DEL PROYECTO

Dr. Marco Antonio Durán Padilla MEDICO RESIDENTE DE IV AÑO EN LA
ESPECIALIDAD DE ANATOMIA PATOLOGIA.

PARTICIPANTES DEL PROYECTO

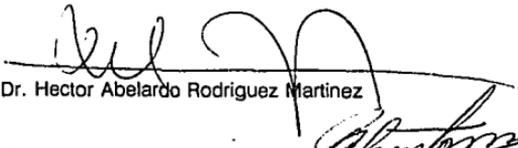
Dr. Avissai Alcántara Vázquez JEFE DE LA UNIDAD DE PATOLOGIA QUIRURGICA
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO SS.

Dra. Minerva Lazos Ochoa MEDICO ADSCRITO DE LA UNIDAD DE PATOLOGIA
POSTMORTEM DEL HOSPITAL GENERAL DE
MEXICO SS.

Dr. Octavio Amancio Chassín MEDICO ADSCRITO DE LA UNIDAD DE
EPIDEMIOLOGIA CLINICA DEL HOSPITAL GENERAL
DE MEXICO SS.

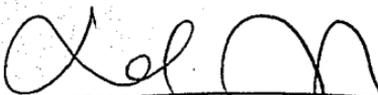
APROBACION DEL SERVICIO

JEFE DE SERVICIO:


Dr. Hector Abelardo Rodríguez Martínez

TUTOR DE TESIS:

Dr. Avissai Alcántara Vázquez 


~~Dr. HECTOR ABELARDO RODRIGUEZ MARTINEZ~~

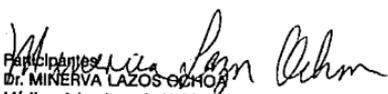
Jefe del Servicio de Anatomía Patológica
del Hospital General de México S. S. A.



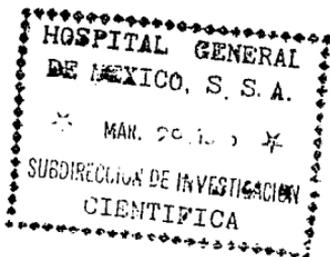

DR. AMISSAI ALCANTARA VAZQUEZ

ASESOR DE TESIS

Jefe de la Unidad de Patología Quirúrgica
del Hospital General de México


Participantes
Dr. MINERVA LAZOS OCHOA
Médico Adscrito a la Unidad de Patología Posmortem
del Hospital General de México

Dr. OCTAVIO AMANCIO CHASSIN
Médico Adscrito a la Unidad de Epidemiología Clínica
del Hospital General de México



El protocolo de este estudio de tesis
fué aprobado por la Subdirección de
Investigación del Hospital General de
México con el número de registro:
DIC/93/310/02/123.

Mi más encomiable agradecimiento a los que colaboraron con su trabajo e ideas en la realización de esta tesis.

Dr. Avissai Alcántara Vázquez
Dra. Minerva Lazos Ochoa
Dra. Laura G. Chavez Macias
Dr. Octavio Amancio Chassin

CONTENIDO

I	Resumen	1
II	Introducción	2
	Características clinicopatológicas de los tumores phyllodes	4
	Valoración microscópica	6
	Función de los organizadores nucleolares	7
	Proteínas asociadas a los organizadores nucleolares	8
III	Justificación, objetivos e hipótesis	10
IV	Material y métodos	11
V	Resultados	14
VI	Discusión	19
VII	Bibliografía	21

RESUMEN

El Tumor Phyllodes es una neoplasia cuyo pronóstico es incierto y actualmente existen controversias clínicas y morfológicas que dificultan predecir su comportamiento biológico. Se han propuesto criterios histológicos que en conjunto valoran el grado de malignidad del TP entre ellos se ha enfatizado principalmente la actividad mitótica, en base a este fundamento nos propusimos valorar el grado de certeza de este criterio histológico aplicando una técnica histoquímica de plata coloidal modificada de Crookes que permite separar lesiones benignas de malignas. Se seleccionaron 5 grupos de estudio de la siguiente forma: 5 casos de glándula mamaria normal, 10 casos de fibroadenoma, 10 casos de TP de bajo grado de malignidad, 10 casos de TP de grado intermedio de malignidad y 10 casos de TP de alto grado de malignidad. Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre la glándula mamaria normal (grupo control) fibroadenomas y tumores phyllodes. Asimismo se identificaron diferencias estadísticamente significativas p menor de 0.001 entre los diversos grados de tumor phyllodes por lo que la actividad mitótica constituye en los tumores phyllodes de mama, un valioso criterio histológico de malignidad y también de gran utilidad para separar fibroadenomas de tumores phyllodes de bajo grado de malignidad.

INTRODUCCION

Antecedentes

El Tumor Phylloides (TP) es una lesión patológica de la glándula mamaria poco común, su frecuencia en la literatura mundial con respecto a los tumores mamarios varía de 0,5 a 1% (1,2) En nuestro medio, la incidencia alcanza el 2.7% de los tumores mamarios y ocupa el 8o. lugar de frecuencia de todas las lesiones de la glándula mamaria (3) (Fig.1).

Etimológicamente el término de Cystosarcoma Phylloides proviene del griego cuyo prefijo *cysto* significa quiste, *sarco* carne, *oma* tumor. La palabra Phylloides se forma del prefijo griego *filon* que indica una relación con hoja u hojas y *eidós* significa forma, aunque este concepto se usa para describir tumores de aspecto lobulado.

El TP es una neoplasia fibroepitelial de la glándula mamaria de comportamiento clínico impredecible y de aspecto histológico desconcertante. Las primeras descripciones se atribuyen a Cumin y Chelius(4) pero fué Johannes Müller en 1838 quien introdujo el término (2). En su descripción original, Muller caracterizó 3 variantes morfológicas: cystosarcoma simple, cystosarcoma proliferativo y cystosarcoma con excrescencias verrucosas y foliáceas dentro de quistes (5).

A principios de este siglo se empezaron a realizar revisiones que agrupaban numerosos casos. Así en 1931 Lee y Pack (6) recopilaron de la literatura 105 tumores e hicieron especial énfasis en su aspecto macroscópico y que se podían desarrollar a partir de fibroadenomas preexistentes que inicialmente crecen lentamente y más tarde desarrollan una fase de crecimiento rápido. Estos autores enfatizaron las características macro y microscópicas del tumor y lo describieron como benigno y de buen pronóstico, el tratamiento recomendado por ellos fue la mastectomía simple o la escisión local.

Más tarde Treves y Sunderland en 1951 realizaron un estudio detallado de 77 pacientes tratados en el Hospital Memorial en Estados Unidos entre 1930 y 1949 (7) en dicho estudio 9 de sus casos tuvieron metástasis, por lo que concluyeron que el TP era una neoplasia potencialmente maligna.

Poco después, en 1954, Lester y Stout informaron 58 TP recopilados en un período de 40 años. Posteriormente Norris y Taylor en su publicación clásica en 1967, (8) propusieron los criterios histológicos y morfológicos más importantes en un estudio de 94 casos para predecir la evolución clínica del tumor (tamaño, bordes quirúrgicos, actividad mitótica, atipia celular e hiperplasia del componente estromal), además enfatizaron que no es posible diagnosticar al TP como maligno cuando se aplica un sólo de estos parámetros.

En la serie publicada por Pietruzca y Barnes en 1978 (9) se incluye una nueva metodología para la clasificación morfológica del TP separándolos en benignos, limítrofes y malignos en base a la actividad mitótica, atipia y márgenes de invasión. En ese mismo año Hart y colaboradores (10) mostraron que los TP pueden evidentemente ser separados en malignos y benignos y destacaron que el sobrecrecimiento del estroma en relación con el epitelio es un importante indicador de comportamiento maligno como ya había sido descrito inicialmente por Oberman (11), este mismo concepto también fue sostenido por Ward y Evans en 1986 (12). Otra característica de malignidad fue encontrar elementos heterólogos como liposarcoma, rhabdomyosarcoma u otros elementos sarcomatosos diferentes a fibrosarcoma en los TP como fue descrito por Grigioni en 1982.

Durante décadas y hasta nuestros días, se ha utilizado en la literatura el término de Cistosarcoma Phylloides, que implica una neoplasia maligna quística de origen mesenquimatoso y con aspecto lobulado. Sin embargo, en 1981 la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de Tumores de Mama (13) ha propuesto la designación de *Tumor Phylloides*, debido a que este nombre no hace referencia a la connotación biológica del tumor, designando su grado de malignidad, y sólo una tercera parte de los casos muestra degeneración quística.

ENFERMEDADES MAMARIAS FRECUENCIA EN 15 AÑOS (Análisis de 7628 Casos)

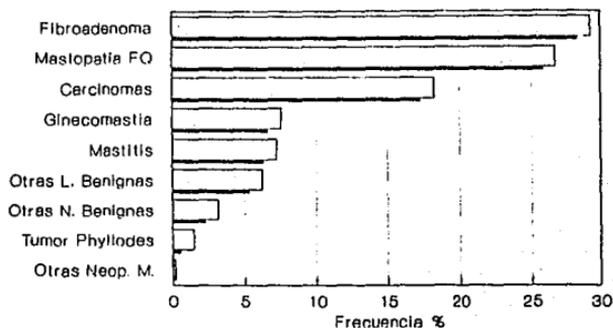


Fig.1 Distribución y frecuencia de las lesiones mamarias. El TP ocupa el 8o. lugar en nuestro medio.

Características Clinicopatológicas de los Tumores Phyllodes

El análisis clinicopatológico del TP demuestra que la edad de presentación habitual es en la cuarta década de la vida, en particular, con una media a los 42 años. Sin embargo, también puede presentarse en adolescentes y en mujeres ancianas, aunque su frecuencia no es comparable a la observada en carcinomas mamarios.

Se ha reconocido la falta de correlación entre el tamaño del tumor y el grado de agresividad y potencial metastásico (7,12) por lo que el aspecto macróscopico no constituye un criterio de malignidad. Macroscópicamente el tamaño varía desde 3 hasta 40 cm de eje mayor (fig.2), sin embargo más de la mitad de los TP miden menos de 5 cm.

Los tumores en su mayoría son sólidos, homogéneos, gris blanquecinos y de bordes bien delimitados, los tumores de mayor volumen frecuentemente muestran cambios necrohemorrágicos y degeneración quística. No hay predominio de lateralidad derecha o izquierda y excepcionalmente el tumor es bilateral (8,14).

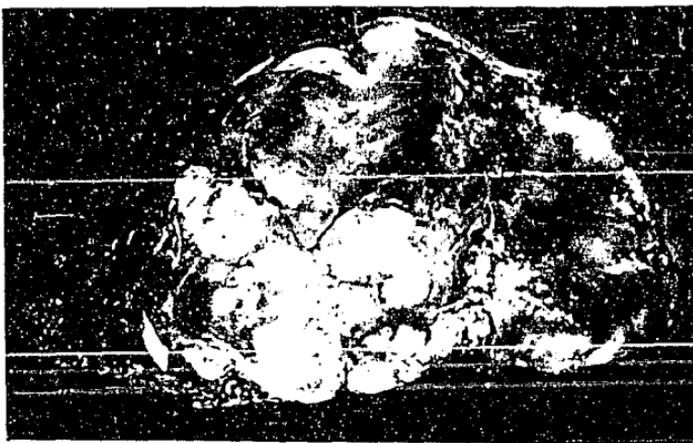


Fig.2 Aspecto macróscopico característico de un tumor phyllodes de gran tamaño que midió 40 cm. de eje mayor.

Las manifestaciones clínicas del TP son las de una lesión unilateral de crecimiento lento y a veces con una fase de crecimiento rápido no dolorosa y de consistencia dura que alterna con áreas blandas, generalmente es móvil, y no está fija a la piel o a la pared costal. En algunas ocasiones pueden existir dificultades en el diagnóstico clínico debido a que las manifestaciones no son características. El porcentaje de enfermedades mamarias asociadas al TP es muy bajo, las lesiones más frecuentemente relacionadas son la mastopatía fibrosa quística y el fibroadenoma (3) (Cuadro 1).

Se ha discutido durante muchos años cuál es el tipo de tratamiento quirúrgico de elección ante los diversos estadios del tumor (15, 16, 17, 18), según la mayoría de los autores, el tratamiento más frecuentemente realizado es la mastectomía simple y la escisión local, aunque en un estudio informado por Benitez y colaboradores de TP maligno (19) en una población de mujeres mexicanas, el procedimiento quirúrgico fué la mastectomía radical con un porcentaje de recurrencias de 13.3%, comparativamente menor que al de otras series (3,8,9,12).

Cuadro I. *Enfermedades mamarias asociadas*

<i>Enfermedad</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Mastopatía Fibrosa Quística	7	6.5
Fibroadenoma	2	1.8
Mastitis	2	1.8
Adenoma Tubular	1	0.9
Ninguna	96	88.9
Total	108	100.0

Valoración Microscópica.

Treves y Sunderland en su estudio clinicopatológico de 77 casos ya denominaron al TP en variedades benignas y malignas, Lester y Stout en 1954, intentaron determinar la benignidad y malignidad del TP en base a atipia y mitosis (18). Oberman en 1965 consideró la importancia del *sobrecrecimiento estromal o sarcomatoso* con respecto al componente epitelial y en 1965 fue ratificado por Hart, Bauer y Oberman y lo definieron como la presencia de elementos sarcomatosos en ausencia de un componente epitelial en un campo 40x.

Posteriormente Norris y Taylor en su artículo clásico propusieron las bases microscópicas de acuerdo a los siguientes criterios: actividad mitótica, bordes tumorales y atipia. Demostraron que 3 o más mitosis/10 cga son indicadores potenciales de malignidad, por lo que 2 de los 15 casos mortales tuvieron menos de 5 mitosis/10 cga; así el grado de actividad mitótica fue una importante característica para valorar el estado tumoral y su potencial para metastatizar.

En 1978 Pietruska y Barnes confirmaron los hallazgos patológicos de Norris y Taylor y clasificaron a los TP en 3 grupos Benignos: 0-4 mitosis/10 campos de gran aumento (cga), Limitrofes: 5-9 mitosis/10 cga, Malignos: más de 10 mitosis/10 cga. En la actualidad no hay una cuenta mitótica que claramente determine el grado de malignidad del TP y teóricamente para algunos autores se ha considerado que los TP llamados benignos o limitrofes en realidad corresponden a fibroadenomas celulares o TP de bajo grado y el grupo de los tumores malignos pertenece a los TP de alto grado (20).

Por inmunohistoquímica las células estromales del TP tienen reacción positiva para vimentina, pero también pueden ser inmunoreactivas para desmina y proteína S-100, no se han encontrado marcadores para estrógenos y progesterona (2), inmunohistoquímicamente y ultra estructuralmente la mayoría de las células tumorales son fibroblastos y ocasionalmente tienen propiedades de miofibroblastos (20).

El origen del TP no se ha determinado y no se ha demostrado asociación con fibroadenomas. Acorde con Lee y Pack el tumor deriva del tejido conjuntivo subepitelial como el fibroadenoma intracanalicular. Para que pueda desarrollarse una lesión mamaria de este tipo se requiere la formación lobulillar, los raros fibroadenomas y TP de la mama masculina siempre están precedidos de ginecomastia con desarrollo ductoacinar (21).

En el desarrollo normal de la mama se ha demostrado que el epitelio induce a la matriz estromal a sintetizar DNA, esta influencia se extiende hasta las 250 micras de distancia (22). Las células epiteliales promueven la síntesis de DNA por estimulación de fibroblastos, por intermedio de estrógenos, factores de crecimiento fibroblástico incluyendo el factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento insulínico (22).

En los tumores como el TP y el fibroadenoma que muestran estroma mesenquimatoso, hay una pérdida progresiva de la dependencia del estroma a los factores epiteliales, lo que favorece el desarrollo del tumor.

Función de los Organizadores Nucleolares

El nucléolo es un subcomponente altamente organizado del núcleo, y ha sido estudiado desde el siglo pasado por citólogos,(23). En 1940 los investigadores demostraron que el nucléolo contiene altas concentraciones de RNA y proteínas, posteriormente se encontró que los organizadores nucleolares (ON), se encuentran en el nucléolo y están constituidos por asas de DNA las que codifican la producción de RNA ribosomal (RNAr) y este a su vez es importante en la síntesis de proteínas.

Por microscopía electrónica se ha demostrado que el nucléolo no está envuelto por una membrana, sino mas bien está constituido por precursores ribosomales que forman una gran red, así mismo se han identificado 3 regiones: 1 centro fibrilar pálido que contiene DNA que no ha sido transcrito, 2 Componente fibrilar denso que contiene moléculas de RNA en proceso de transcripción y 3 un componente granular que contiene partículas precursoras ribosomales (Fig.3).

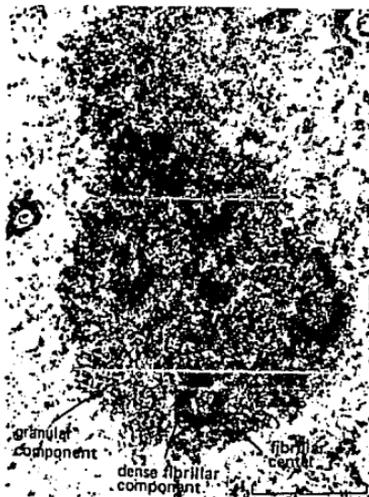


Fig.3 Micrografía electrónica del acercamiento de un nucléolo de fibroblasto humano mostrando sus 3 distintos componentes.

El tamaño del nucléolo refleja su actividad y por lo tanto varía en diferentes células, las diferencias en el tamaño son debidas principalmente a variaciones en la cantidad del componente granular, el cual es probablemente controlado a nivel de la transcripción de genes ribosomales.

La forma del nucléolo cambia dramáticamente durante el ciclo celular, al comienzo de la mitosis el nucléolo disminuye de tamaño y después desaparece en tanto que los cromosomas se condensan y toda la síntesis de RNA se detiene, por lo que generalmente no hay nucléolo en una célula en metafase. Cuando la síntesis de RNA ribosomal se restaura al final de la mitosis es decir en la telofase reaparece un nucléolo poco aparente y los genes RNA ribosomales aparecen en los cromosomas.

La naturaleza química de los componentes nucleolares puede determinarse por colorantes específicos (24), con microscopía óptica y de fluorescencia, la cromatina nucleolar se distingue por su color magenta después de teñirse con la técnica de Feulgen o por fluorescencia verde pálido o amarilla después de la coloración con anaranjado de acridina.

También por citoquímica ultraestructural controlada, la cual utiliza DNA asa y proteasas para observar la digestión de DNA, RNA y proteínas en cortes delgados. Por autorradiografía con la incorporación de precursores marcados durante la síntesis macromolecular.

El nucléolo es una estructura que contiene ribonucleoproteínas, tiene afinidad por los colorantes básicos y está constituido por el nucleolonema, que es una red tridimensional de asas anastomosadas de 60 a 80 nm de espesor, así el nucleolonema está constituido por gránulos densos de 12 nm y filamentos finos. En células en interfase los ON están localizados en el componente fibrilar del nucléolo y están asociados con proteínas ácidas argirofílicas tales como: B23, nucleolina (C23), RNA polimerasa I, y fosfoproteínas pp135 y pp105 (24).

Proteínas asociadas a los Organizadores Nucleolares

Los ON están localizados en los brazos cortos de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. El hecho de que varios cromosomas tengan ON explica la razón de que existan varios nucleolos en el mismo núcleo, sin embargo los nucléolos son propensos a fusionarse y convertirse en un cuerpo único.

La evidencia molecular sobre la existencia y localización de los genes responsables de la síntesis de RNAr se ha realizado mediante la técnica de hibridación con cadenas de DNA que pueden homologarse con RNAr marcado con uridina radioactiva.

Con este procedimiento se comprobó que el porcentaje de híbridos, DNA-RNAr, son paralelos al número de ON por cepa. Los ON tienen proteínas asociadas, éstas son de dos tipos: ácidas e histonas, la función de estas proteínas no está bien determinada pero probablemente actúan como marcadores de la reproducción celular.

La reproducción celular es característica de los tumores y en un intento por caracterizar criterios de malignidad, se han aplicado técnicas ultrasonográficas, mamográficas (26), termográficas (27), de citometría de flujo (28,29,30,31) y recientemente una técnica histoquímica con plata coloidal, la cual reacciona con la proteínas asociadas a los ON, estos aumentan en número y se altera su morfología en tumores malignos.

Este procedimiento se ha aplicado a cortes en parafina en una serie de lesiones como: linfomas de Hodgkin, nevos y melanomas, lesiones mamarias benignas y malignas, proliferaciones fibrosas y lesiones de células pequeñas en niños, lesiones neoplásicas y no neoplásicas del estómago, tumores de células transicionales de vejiga, tumores de próstata y en la neoplasia cervical intraepitelial entre otras muchas (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40). Estos estudios han mostrado que el número de ON en células benignas son diferentes en número y morfología a los on de las células malignas, por lo que ésta últimas tienen mayor cantidad de ON que su contraparte benigna.

Existen 2 parámetros de gran valor para el análisis microscópico de los ON y son el número de puntos de plata por núcleo y el área total de los puntos de plata por núcleo, estos parámetros reflejan la distribución de los ON dentro del nucléolo y constituye un instrumento para evaluar los cambios morfológicos nucleares. Pero el parámetro más importante parece ser el área total representado por los puntos de plata por núcleo, lo cual fue originalmente descubierto por Ruschoff usando análisis de imagen microscópico (25).

La aplicación de la técnica de plata coloidal se ha empleado en un gran número de tumores benignos, malignos y limítrofes y en la glándula mamaria se ha enfocado su estudio principalmente para determinar el pronóstico en carcinomas mamarios, en la actualidad en la literatura dispuesta a nuestro alcance no se han informado estudios que analicen las diferencias entre glándula mamaria normal, fibroadenomas y tumores phyllodes.

JUSTIFICACION

El TP de la glándula mamaria es una neoplasia de comportamiento biológico impredecible con capacidad de recurrencia y metastasis. Hasta el momento no se han determinado claramente los criterios que separan al TP como benigno, limitrofe o maligno, ni tampoco se conocen estudios que apliquen técnicas de plata para valorar a los ON de este tumor en relación a la glándula mamaria normal y fibroadenoma.

OBJETIVOS

1. Evaluar si el aumento en el número de ON se correlaciona con el grado de malignidad del TP.
2. Identificar diferencias con el número de ON entre mama normal, fibroadenoma y tumor phyllodes.
3. Evaluar la diferencia entre fibroadenoma y tumor phyllodes de bajo grado de malignidad.

HIPOTESIS

Si el número de los ON aumentan de acuerdo a la actividad mitótica y por ende al grado de transformación tumoral de las células, entonces permitirán establecer diferencias en los diferentes grados de malignidad entre tumores phyllodes y fibroadenomas.

MATERIAL Y METODOS

Los casos seleccionados fueron obtenidos de los archivos de la Unidad de Patología del Hospital General de México SS y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y los casos de glándula mamaria normal se obtuvieron de cadáveres de mujeres menores de 30 años sin patología mamaria cuyo fallecimiento no estaba relacionada con la glándula mamaria.

El estudio se realizó en 45 casos repartidos de la siguiente manera: Cinco casos correspondieron a glándula mamaria normal, 10 a fibroadenomas, 10 a TP de bajo grado, 10 a TP de grado intermedio y 10 a TP de alto grado de malignidad.

Los 40 casos correspondientes a fibroadenomas y tumores phyllodes fueron clasificados de acuerdo al siguiente procedimiento y datos histológicos encontrados: Primero se obtuvieron del archivo de la Unidad de Patología del Hospital General de México SS todos los cortes histológicos existentes de cada caso, aquellos casos que no tenían cortes, se procedió a realizarlos, obteniéndolos de los bloques de parafina existentes.

Todos los cortes se tiñeron o estaban teñidos con hematoxilina y eosina, el número promedio de cortes por caso fue de cinco. En cada uno de los cortes se estudió microscópicamente el componente fusocelular, buscando las zonas con mayor celularidad, realizando la cuenta de mitosis por 10 campos a seco fuerte y tomando en consideración el número de mitosis, los tumores fueron clasificados de acuerdo a los siguientes criterios histológicos: glándula mamaria normal sin evidencia de tumor ni actividad mitótica en el componente estromal. Fibroadenoma: tumor fibroglandular sin actividad mitótica en el estroma. TP de bajo grado: tumor fibroglandular con 1-4 mitosis/10 cga en el estroma. TP de grado intermedio: tumor fibroglandular con 5-9 mitosis/10 cga en el estroma. TP de alto grado de malignidad: tumor fibroglandular con 10 ó más mitosis/10 cga en el estroma (Figs. 4, 5, 6, 7, 8).

Una vez identificados los cortes con mayor celularidad y clasificados los tumores se obtuvieron los bloques de parafina y se realizaron 45 cortes histológicos los que se tiñeron con la técnica de Crocker y Nar (13) de plata coloidal para la identificación de los ON, estos se presentan en los cortes como puntos café oscuro dentro del núcleo.

La técnica histoquímica de Crocker y Nar se realiza mediante el siguiente procedimiento: se preparan 3 soluciones, la solución "A" está constituida por 2 g., de gelatina en 100 ml de agua destilada y 1 g., de ácido fórmico al 2%. La solución "B" consta de 25 g., de nitrato de plata en 50 ml., de agua destilada y la solución "C" se prepara con una parte de la solución "A" y dos partes de la solución "B", con la solución "C" se cubren los cortes histológicos, previamente desparafinados, durante 30 min., a la temperatura ambiente y al abrigo de la luz, posteriormente los cortes se lavan con agua desionizada, se deshidratan con xilol y se montan en medio sintético.

Los cortes histológicos teñidos con plata coloidal se estudiaron con microscopio de luz, con objetivo de inmersión y bajo el siguiente procedimiento: en cada uno de los 45 cortes histológicos, se seleccionaron al azar 100 células (total 4500 células) y en los núcleos de cada célula se contaron los puntos negros que representan las proteínas asociadas a los ON.



Fig.4 Glándula mamaria normal muestra lobulillos y conductos rodeados por estroma.

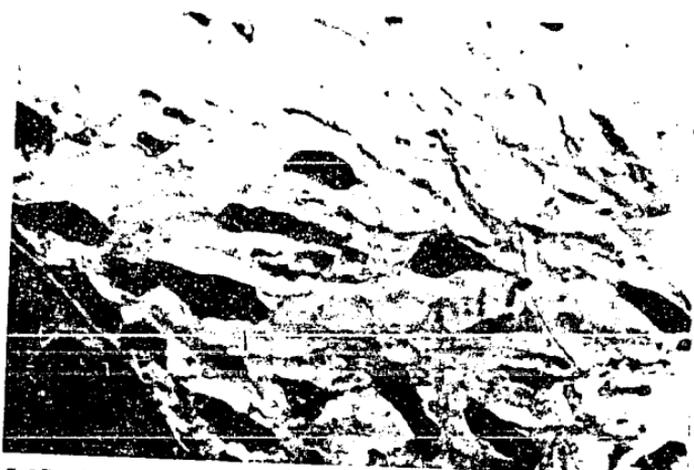


Fig.5 Fibroadenoma con componente intraductal y estroma sin actividad mitótica

FALLA DE ORIGEN



Fig.6 Tumor Phyllodes de bajo grado. El estroma demuestra leve hiper celularidad con ocasionales mitosis (1-4x10 cga).



Fig.7 Tumor Phyllodes de grado intermedio. El número de mitosis promedio en cada 10 campos hiper celulares es de 5-10.

FALLA DE ORIGEN



Fig.8 Tumor Phyllodes de alto grado. Hay gran hiper celularidad y atipia del estroma y escaso componente ductal.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de las 4500 células se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), y para establecer diferencias entre grupos cuando la ANOVA rechaza la hipótesis nula se utilizó la prueba de rangos múltiples de Newman Kevls.

RESULTADOS

En los 5 casos de glándula mamaria normal (Fig.9), se contaron los ON de un total de 500 células y se encontraron un promedio de 1.3 ON por célula. En las 1000 células que corresponden a 10 casos de fibroadenoma (Fig.10), se encontraron 2.47 ON por célula y en los 30 casos de TP se estudiaron 3000 células divididas de la siguiente manera: 1000 correspondieron a TP de bajo grado (Fig.11), 1000 a TP de grado intermedio (Fig.12) y 1000 células correspondieron a TP de alto grado de malignidad (Fig.13), con un promedio de ON por célula de 2.67 en el TP de bajo grado, 3.40 ON por célula en TP de grado intermedio y 5.22 ON por célula de TP de alto grado (Tabla II). Como se observa hay un aumento gradual en el número promedio de ON desde glándula mamaria normal hasta TP de alto grado de malignidad.

FALLA DE ORIGEN

Al comparar el número de ON encontrados en las glándulas mamarias normales con los fibroadenomas y con los TP de diversos grados de malignidad se encontraron diferencias evidentes con un nivel de significancia p menor de 0.001 (tabla III); así mismo al comparar entre sí fibroadenomas y TP también se encontraron diferencias con un nivel de significación p menor de 0.001 (Tabla IV) lo que faculta a decir que mediante la cuantificación de los ON es posible separar fibroadenomas y TP de bajo grado de malignidad, también denominados TP benignos por algunos autores (9), así como TP de diferentes grados de malignidad y dado que estas diferencias en los ON provienen de una cuenta de mitosis, podemos señalar que la actividad mitótica es un parámetro fundamental en el diagnóstico diferencial de los TP y el fibroadenoma.

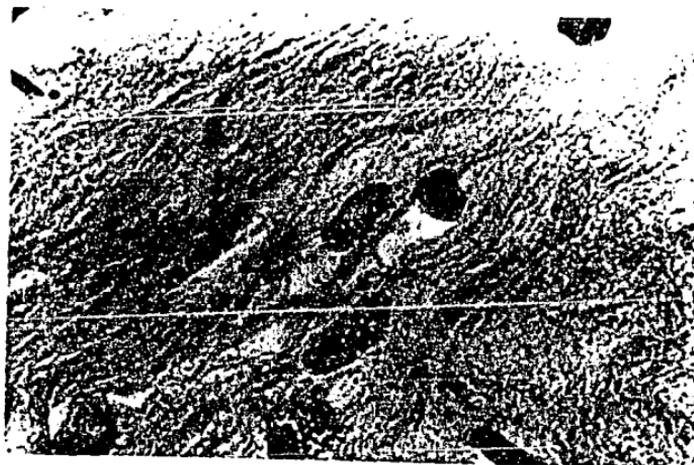


Fig.9 Glándula mamaria normal. Los organizadores nucleolares se condensan como puntos negros en cada núcleo.

FALLA DE ORIGEN

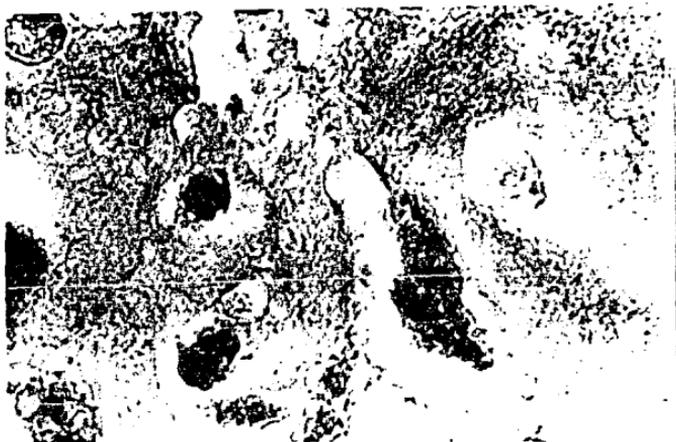


Fig.10 Fibroadenoma. Núcleos sin atipia que exhiben algunos organizadores nucleolares.

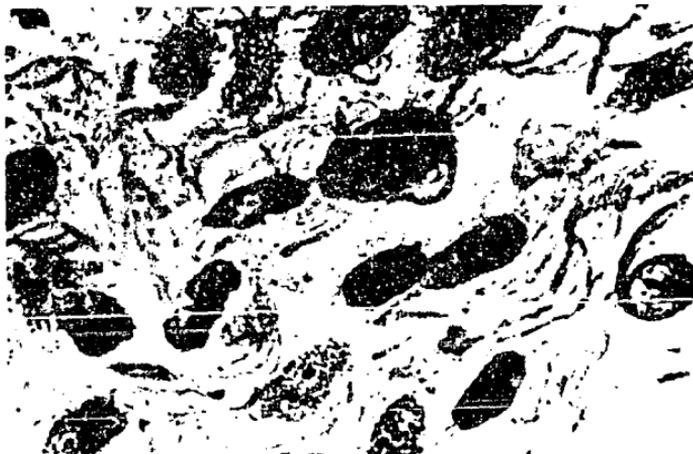


Fig.11 Tumor Phyllodes de bajo grado. Se observan varios organizadores nucleolares en núcleos atípicos del estroma.

FALLA DE ORIGEN

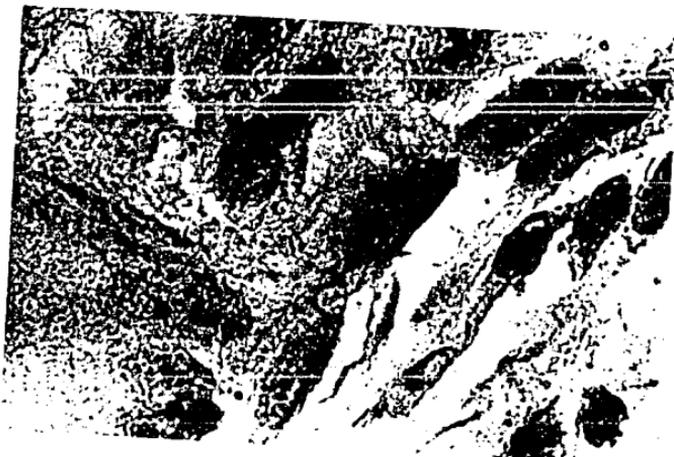


Fig.12 Tumor Phylloides de grado intermedio. Los organizadores nucleolares aumentan por cada núcleo.



Fig.13 Tumor Phylloides de Alto Grado. Hay pleomorfismo nuclear y numerosos organizadores nucleolares.

FALLA DE ORIGEN

Tabla II

Cuento Promedio de Organizadores Nucleolares		
Diagnóstico	No. de casos	Promedio de ON
Mama normal	5	1.36
Fibroadenoma	10	2.42
Tumor Phyllodes		
Bajo grado	10	2.65
Grado Intermedio	10	3.40
Alto grado	10	5.22

Tabla III

Diagnósticos Comparativos entre glándula mamaria normal y tumores					
Mama normal	SE	q	p	q	p 0.001
Mama normal vs Fibroadenoma	0.0978	177.9	2	2.829	s
Mama normal vs TP Grado Bajo	0.0978	203.4	3	3.442	s
Mama normal vs TP Grado Medio	0.078	278.1	4	3.792	s
Mama normal vs TP Grado Alto	0.978	464.2	5	4.039	s

Tabla IV

Diagnósticos Comparativos Entre Tumores					
	SE	q	P	q	p 0.001
Fibroadenoma Vs Tumor Phyllodes Bajo Grado	0.0799	31.2	2	2.829	s
Fibroadenoma Vs Tumor Phyllodes Grado Medio	0.0799	122.6	3	3.442	s
Fibroadenoma Vs Tumor Phyllodes Alto Grado	0.0799	350.4	4	3.791	s
Tumor Phyllodes Bajo Grado Vs. Tumor Phyllodes Grado Intermedio	0.0799	91.4	2	2.829	s
Tumor Phyllodes Bajo Grado Vs. Tumor Phyllodes Alto Grado	0.0799	319.1	3	3.442	s
Tumor Phyllodes Grado Intermedio Vs. Tumor Phyllodes Alto Grado	0.0799	227.7	2	2.829	s

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION

El TP es una neoplasia bifásica compuesta por elementos epiteliales benignos y estroma mesenquimatoso fusocelular. La incidencia del TP es de 0.3% de todos los tumores mamario (4) y el 25% de todos los tumores fibroepiteliales de la mama (7).

El predominio del estroma fibroso del TP lo hace semejante al fibroadenoma; sin embargo, el TP muestra mayor celularidad estromal, pero la distinción entre fibroadenomas y TP se basa en una valoración subjetiva del grado de celularidad estromal y la presencia de un patrón de crecimiento foliáceo; este último es más frecuente en los TP, sin embargo ocasionalmente se puede observar en los fibroadenomas (4).

El aumento en la celularidad y el número de figuras de mitosis en 10/cga, son índices que se han usado para predecir el comportamiento biológico de los TP. Estos parámetros de celularidad y actividad mitótica se han aplicado en otros tumores fusocelulares como son los tumores uterinos de células musculares lisas, así el número de mitosis mayor de 10 por 10 cga, son el número mágico que permite separar los leiomiomas de los leiomiomasarcomas (41).

Pietruszka y Barnes (9) utilizaron la actividad mitótica como uno de los parámetros para predecir el comportamiento biológico de los TP así vemos que los tumores de 0-4 mitosis en 10 cga los clasificaron como benignos, de 5-9 mitosis 10 cga los denominaron limítrofes y los tumores con 10 ó mas mitosis en 10 cga los denominaron malignos. De los tumores benignos el 22% recurrió localmente sin metástasis a distancia, este comportamiento similar se observa en la casuística de Mc Divitt (20) quien encontró que los TP benignos tenían hasta el 16.9% de recurrencia local. Los tumores limítrofes presentaron el 20% de recurrencia local sin metástasis a distancia y sólo el grupo de TP malignos presentaron metástasis a distancia en una proporción de 11.1% de los casos.

De acuerdo a lo expuesto podemos decir que los TP tienen un comportamiento agresivo local o a distancia por lo tanto no se justifica denominarlos benignos, por esa circunstancia los llamamos TP de bajo grado a los llamados benignos, de grado intermedio de malignidad a los limítrofes y por último los malignos les llamamos de alto grado de malignidad. Para el primer grupo o de bajo grado de malignidad el número de mitosis en 10 cga fue de 1-4, los TP de grado intermedio tuvieron un número de mitosis de 5-9 en 10 cga y los tumores de alto grado de malignidad presentaron 10 o más mitosis por 10 cga.

Para separar los TP de alto y bajo grado de malignidad se han utilizado diversos procedimientos; así Naggar y colaboradores (31) correlacionaron el aumento en el contenido de DNA con el grado de malignidad de los TP y recientemente se ha utilizado un procedimiento histoquímico con plata coloidal que permite identificar a las proteínas asociadas a los ON, este procedimiento ha probado su eficacia para separar lesiones malignas de benignas en diferentes tejidos (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40).

Los ON se identifican histológicamente como puntos café obscuro dentro del núcleo, representan parte del DNA de cromosomas acrocéntricos humanos de los grupos D (13, 14, 15) y G (21, 22), de esta forma corresponden a áreas que captan la plata y expresan los genes del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y revelan la actividad de transcripción de los genes del ARNr regulada por la ARN polimerasa I (24).

Al contar el número de ON estuvimos en posibilidad de separar, glándula mamaria normal de fibroadenomas y TP, también pudimos diferenciar fibroadenomas de TP y los TP en sus diferentes grados de malignidad. Para obtener estos resultados se usaron las pruebas de ANOVA aunada a la de rangos múltiples de Newman Kevls con lo que se demostraron diferencias estadísticamente significativas con una p menor de 0.001 (tablas III, IV).

Por tanto, ya que existe un método objetivo de cuantificación de fibroadenomas y TP en sus diversos grados de malignidad, podemos decir que el fibroadenoma requiere para su tratamiento de la extirpación del tumor y para los TP, la extirpación será tan amplia como lo requiera el tamaño del tumor para resecarlo completamente y con márgenes quirúrgicos libres de tumor, con lo cual se estará limitando las recurrencias locales; así mismo el poder determinar el grado de malignidad de los TP permitirá predecir la posibilidad de metástasis a distancia además de justificar el seguimiento clínico periódico de estas pacientes.

Bibliografía

- 1.- Reddick R, Shin T, Sawhney D, Siegal G. Stromal proliferations of the breast: An ultrastructural and immunohistochemical evaluation of cystosarcoma phyllodes, juvenile fibroadenoma and fibroadenoma. *Hum Pathol* 1987 18:45.
- 2.- Al Jurf A, Hawk W, Crile G. Cystosarcoma Phyllodes. *Surg Gynecol Obstet* 1978; 146:358.
- 3.- Durán MA, Lazos OM. Estudio clinicopatológico de los casos de tumor phyllodes en el Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen* 1992, 55:140-146.
- 4.- Tavassoli FA. Pathology of the breast en biphasic tumors. Elsevier Science Publishing Co., Inc New York 1992, pag 425-481.
- 5.- Stewart FW. Tumors of the breast. En: Atlas of tumor pathology second series fascicle 2. Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC. 1967; 117-123.
- 6.- Lee BJ, Pack GT. Giant intracanicular fibroadenomyxoma of the breast. The so-called cystosarcoma phyllodes mammae of Johannes Müller. *Am J Cancer* 1931 15:2583-2609.
- 7.- Treves N, Sunderland IA. Cystosarcoma phyllodes of the breast: a malignant and benign tumor; a clinico pathological study of seventy - seven cases. *Cancer* 1951 4:1286-1332.
- 8.- Norris JH, Taylor BH. Relationship of Histologic features to behavior of Cystosarcoma Phyllodes. Analisis of Ninetes-four cases. *Cancer* 1967 20:2090-2099.
- 9.- Pietruszka M, Barnes L. Cystosarcoma phyllodes. A clinicopathologic analisis of 42 cases. *Cancer* 1978 41:1974-1983.
- 10.- Hard WR, Bauer RC, Oberman HA. Cystosarcoma Phyllodes. A clinicopathologic study of twenty six hypercellular periductal stromal tumors of the breast. *Am J Clin Pathol* 1978 70:211-216.
- 11.- Oberman HA. Cystosarcoma phyllodes. A clinicopathologic study of hypercellular periductal stromal neoplasms of breast. *Cancer* 1965, 18: 697-710.
- 12.- Ward RM, Evans HL. Cystosarcoma Phyllodes. A clinicopathologic study of 26 cases. *Cancer* 1966 58:2282-2284.
- 13.- Page LS, Anderson TJ. Diagnostic histopathology of the breast. Phyllodes tumor (Cystosarcoma phyllodes). Churchill Livingstone, Edinburgo London, 1987,341-350.

- 14.- Bader E, Issacson C. Bilateral malignant cystosarcoma phyllodes. *Br J Surg* 1960;48:519-521.
- 15.- Vorherr H, Anderson TJ, Staut AP. Review, cystosarcoma phyllodes, epidemiology, pathohistology, diagnosis, therapy, and survival. *Arch Gynecol* 1985 236:172-181.
- 16.- Hines JR, Vrad TM, Beal JM. Pronostic indicators in cystosarcoma phyllodes. *Am J Surg* 1987 153:276-280.
- 17.- Serrano JA, Miranda H, Sandoval F, De la Garza J. Tumor Phyllodes comunicación de 110 casos. Revisión de la literatura. *Cancerología* 1988 34:523-531.
- 18.- Azzopardi JG, Ahmed A, Millis RR. Problems in Breast Pathology. W.B. Saunders Company Ltd. London, Philadelphia, Toronto, 1979.
- 19.- Benítez BL, Pacheco PM, Alonso VP. Cistosarcoma filoides. Estudio estadístico y correlación clinicopatológica. *Rev Inst Nal Cancerol* 1968 19:615-629.
- 20.- Rosen PP, Oberman HA. Atlas of tumours pathology. Tumors of the mammary gland. Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC 1993; 107-114.
- 21.- Nielsen VT, Andreassen C. Brief reports. Phyllodes tumour of the male breast. *Histopathology* 1987 11:761-762.
- 22.- Sawhney N, Garrahan N, Douglas AG, Path FC, Williams ED. Epithelial-stromal interactions in tumors. A morphologic study of fibroepithelial tumors of the breast. *Cancer* 1992 70:2115-2120.
- 23.- Bruce A, Bray D, Lewis J, Raff M, Keith R, Watson JD. Molecular biology of the cell. 1989 2a. Ed. Garland Publishing, Inc. New York.
- 24.- Aver ChJ. Biología celular. 2a. Ed. Belmont California. 1991 En organización nuclear 538-541.
- 25.- Guillaud P, Wozniak Z, Seigneurin D. Simultaneous quantitation of DNA and nucleolar organizer regions by image cytometry. *Analyt Quant Cytol Histo* 1993 15:351-357.
- 26.- Beuglet CC, Soxian R, Kurtz AB. Ultrasound, X-ray mammography and histopathology of cystosarcoma phyllodes. *Radiology* 1983 146:481-486.
- 27.- Pierart J, Burmeister R. Use of thermography in the differential diagnosis of phyllodes tumour. *Br J Surg* 1990 77:783-784.
- 28.- Grimes MM. Cystosarcoma phyllodes of the Breast: Histologic features, flow cytometric. Analysis and clinical correlations. *Modern Pathology* 1992 5:232-239.

- 29.- Palko JM, Wang SE. Flow cytometric S. Fraction an a predictor of clinical outcome in cystosarcoma phyllodes. Arch Pathol Lab Med 1990 114:949-952.
- 30.- Keelan AP, Myers LJ, Wold EL, Katzmann AJ, Gibney J. Phyllodes tumor: Clinicopathologic review of 60 patients and flow cytometric analysis in 30 patients. Hum Pathol 1992 23:1048-105.
- 31.- El Naggar KA, Ro YJ, McIemore D, Garnsy L. DNA content and proliferative activity of cystosarcoma phyllodes of the breast. Potential prognostic significance. Am J Clin Pathol 1990 93:480-485.
- 32.- Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. J Pathol 1987 151:111-118.
- 33.- Howat AJ, Giri DD, Wrigth AL, Underwood JCE. Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer regions counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. J Pathol 1988 156:227-232.
- 34.- Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, Dundas SAC, Underwood JCE. Limitations of the Ag-Nor technique in distinguishing between benign and malignant epithelial lesions of the breast. J Pathol 1988 154:44.
- 35.- Lloyd SN, Johnson CP. Nuclear organizer regions in benign and malignant prostatic disease. Histopathology 1991 18:449-452.
- 36.- Alcántara VA, Hernández GM, Amancio CHO, Lira GJ. Comportamiento de los organizadores nucleolares en el cervix normal, infección por virus del papiloma humano y cancer cervico uterino. Ginecología y Obstetricia de México 1992 60:286-289.
- 37.- Carns P, Suarez V, Newman J. Nucleolar organizer regions in transitional cell tumors of the bladder. Arch Pathol Lab Med 1989 113:1250-1252.
- 38.- Suarez V, Newman J, Hiley C. The value of NOR numbers in neoplastic epithelium of the stomach. Histopathology 1989 14:61-66.
- 39.- Fgan M, Raafar F, Crocker J. Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. J Clin Pathol 1988 41:31-33.
- 40.- Egan M, Raafar F, Smith K. Nucleolar organizer regions in small cell tumors of childhood. J Pathol 1987 153:275-280.
- 41.- Clement PB. Pathology of the uterine corpus. Hum Pathol 1991;22:776-791.