

Análisis morfométrico de variables en núcleos de células ductales normales y neoplásicas de la glándula mamaria. Informe preliminar.

David Parada-D., Rosa M. Farías-C. y Jorge García-Tamayo.

Unidad de Investigación, Instituto Anatomopatológico Dr. Jose O' Daly, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 50647, Sabana Grande, Caracas 1050, Venezuela.
E-mail: parada@cantv.net

Palabras clave: Morfometría, núcleo, células ductales, carcinoma de mama, área nuclear

Resumen. La morfometría es un método que permite conocer las variaciones que pueden ocurrir en los diferentes tejidos, en sus componentes y su organización, por medio de la evaluación de elementos cuantitativos. El objetivo del presente trabajo fue examinar diferentes características morfológicas nucleares en células ductales normales y neoplásicas del tejido mamario, por medio de la expresión de los receptores de estrógenos a través de técnicas inmunohistoquímicas. Un total de 1879 núcleos se examinaron utilizando un sistema computarizado, previa a la demostración de receptores de estrógenos. Los valores del área nuclear, perímetro, diámetro, radios máximo y mínimo se obtuvieron en 439 núcleos normales, la media del área nuclear fue de 14,45 con rangos entre 10,88 y 17,90. Las variables estudiadas mostraron adecuada correlación estadística ($r > 0,5$). Un total de 1440 núcleos ductales neoplásicos se clasificaron como grados I, II y III, con diferencias significativas entre estos grupos. Podemos concluir que el área nuclear es una variable adecuada para su correlación estadística y que los núcleos ductales son elementos anisotrópicos.

Morphometric analysis in normal and neoplastic mammary ductal cells.

Invest Clín 1999; 40(4):233-244.

Key words: Morphometry, nucleus, ductal cells, mammary carcinoma, nuclear area.

Abstract. Morphometry is a method to detect changes in a variety of tissues through quantitative elements. The purpose of this study was to examine several nuclear morphologic characteristics in normal and neoplastic mammary ductal cells using a multivariable method and expression of estrogen receptors by immunohistochemical techniques. A total of 1879 nuclei were examined by a computerized program, following the detection of estrogen receptors. Nuclear area, perimeter, diameter, maximal and minimal radio were obtained in 439 normal ductal nuclei. The mean nuclear area was 14.45 with a range between 10.88 and 17.90. Variables showed adequate statistical correlation ($r > 0.5$). A total of 1440 neoplastic nuclei were classified as grades I, II and III, and a statistical significative difference was found between these three groups. We conclude that the nuclear area is a reliable variable for statistical correlation being the ductal nuclei anisotropic objects.

Recibido: 27-4-99. Aceptado: 28-12-99.

INTRODUCCIÓN

La morfometría es un método que permite la cuantificación de las variaciones que pueden ocurrir en los diferentes tejidos, en sus componentes y su organización, por medio de la evaluación de elementos cuantitativos (1). Este método ofrece resultados objetivos y reproducibles en el análisis histológico; por ello, el uso de la morfometría se aplica con éxito al estudio de diferentes neoplasias (2-9). En el caso del examen morfométrico en la glándula mamaria, es necesario utilizar parámetros específicos que nos permitan en primer lugar, conocer lo que significa la normalidad de las estructuras

histológicas, con suficiente confianza en la reproducción de datos, para tener puntos de referencia si se quiere homogeneizar criterios para futuras interpretaciones morfológicas.

Este método tiene numerosas aplicaciones en el campo de la Biomedicina (1). Una de las principales utilidades, es la medición de la variabilidad en la cuantificación de diferentes cambios celulares, tales como la disminución de la variabilidad interobservador en la gradación histológica del carcinoma de la vejiga urinaria (3) y de la glándula mamaria (4). Esta fuente de variación puede deberse al uso de diferentes caracteres visuales, dentro de los

cuales pueden encontrarse el pleomorfismo nuclear, el tamaño nucleolar o la textura de la cromatina, entre otros (5). También la morfometría, proporciona escalas cuantitativas diferentes a las obtenidas por caracterizaciones sobre los grados de alteración producidas en ciertas estructuras; así las clasificaciones histológicas pudieran ser expresión de cambios en las células o en los tejidos, a los cuales se les pudiera asignar un valor o elemento ordinal, para cada variación (6). Esta utilidad morfométrica para evaluar los cambios en los tejidos parece ser más reproducible debido principalmente a su cuantificación. Además, los métodos cuantitativos pueden ser usados para proveer valores de referencia estandarizados tanto para el diagnóstico como para la enseñanza (1). Así los nucléolos observados en las neoplasias intraepiteliales prostáticas cuyo diámetro es superior a 1,6 micras se encuentran exclusivamente en los carcinomas de próstata y no en condiciones benignas, sirviendo este valor como una referencia en la caracterización diagnóstica de tales lesiones neoplásicas (7).

El presente estudio tiene como finalidad, examinar diferentes características morfológicas nucleares en las células ductales normales y neoplásicas del tejido mamario, utilizando un método de análisis de multivariadas y la expresión de receptores de estrógenos, por medio de la técnica de inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras representativas de tejido mamario obtenido de 3 pacientes (con edades comprendidas entre 24 y 30 años) a quienes se les practicó mastectomías parciales por excisión estética y de 21 mastectomías radicales por carcinomas de glándula mamaria de pacientes cuya edad promedio fue de 55,18 años (rango 35-81); de estas últimas se tomaron muestras provenientes de regiones no tumorales y de áreas tumorales. Todas las muestras fueron fijadas en formol tamponado a pH 7,2. El material fue deshidratado en alcoholes de concentración creciente (50%, 70%, 80% y 100%) y finalmente incluido en parafina. Se obtuvieron secciones de 3 μm , las cuales fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina, observándose con atención la presencia de ductos o acinos glandulares normales y patológicos.

En las muestras con tejido mamario sin alteraciones histológicas se obtuvieron cortes adicionales de 4 a 6 μm del material incluido de parafina y se procesaron para inmunohistoquímica por el método de Avidina-Estreptavidina (10), con recuperación antigénica con la solución S1700 de Dako. La incubación fue realizada con un anticuerpo primario monoclonal para receptores de estrógenos (ER, PR KIT Dako, prediluido) durante 30 min a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo con Diaminobencidina y contrastados con hematoxilina de Meyer. Finalmente las secciones fueron

examinadas con un microscopio de luz con aumentos directos que oscilaron entre 35 X y 400 X.

La captura de imágenes se llevó a cabo utilizando una computadora personal compatible Pentium 233 MHz, de 64 MByte de memoria Ram, con un monitor super VGA y una tarjeta de vídeo T Seng Labs ET 4000/w32 PCI, Microscopio Olympus BX40, cámara de vídeo Sony modelo XC-9999 adaptada al microscopio y un disco duro de 4Gbyte de memoria. El aumento utilizado para la toma de captura de los núcleos fue de 400x, previo ensayo con aumentos de 100X y 200X, los cuales no fueron utilizados debido a la poca resolución al momento de la digitalización de las diferentes imágenes. Se utilizó el programa Image-Pro Plus de Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, para la toma y análisis de las imágenes, previa calibración con un objetivo milimetrado Olympus para el aumento de adquisición de la imagen. Las imágenes obtenidas, se analizaron previamente con filtros morfológicos cerrados de 11 x 11 pases y posteriormente se contaron los núcleos de las células ductales con marcaje positivo (nuclear) a los receptores de estrógenos, tomándose como variables nucleares para su análisis, las siguientes: Área, Diámetro, Radio máximo, Radio mínimo y Perímetro nuclear. Todos los núcleos estudiados fueron examinados por el método morfométrico de interacción con el observador (1). Como criterio de inclusión se seleccionaron todos los núcleos que no pre-

sentaran sobreposición en las diferentes secciones. Este criterio fue aplicado para evitar problemas en la determinación de los parámetros a cuantificar. Esta consideración se repitió para cada una de las diferentes variables posteriormente analizadas. Las capturas y los datos obtenidos de las mismas, se procesaron tres veces para evitar problemas innatos con las técnicas histológicas y/o inmunohistoquímicas.

El estudio de los núcleos de los carcinomas ductales infiltrantes se llevó a cabo, previo a la clasificación, de acuerdo a la escala de Scarff-Bloom-Richardson (11) de los diferentes tumores, con énfasis en el pleomorfismo nuclear. Una vez obtenido el dato anterior para cada tumor, se realizó tanto la reacción inmunohistoquímica, como la adquisición y análisis de las variables nucleares, utilizando el método y los equipos anteriormente especificados para el estudio morfométrico de los núcleos de las células ductales normales.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el Programa STATISTICA para Windows 95 versión 4.3. Los datos fueron procesados por métodos estadísticos descriptivos, tomando como medidas de dispersión la media, la mediana, la desviación estándar, el error estándar y la determinación de los percentiles superior e inferior para cada variable evaluada, con un Intervalo de Confianza de 95 % y un Nivel de Significancia igual a 0,05. Para el análisis

de distribución de frecuencia del área nuclear para cada grupo investigado se utilizó la prueba no paramétrica de Kolgomorov-Smirnoff, en vista que los datos obtenidos no seguían una curva de distribución normal.

Se utilizó Análisis de Regresión Simple con Coeficiente de Correlación para determinar el grado de asociación entre las variables correlacionables.

RESULTADOS

Estudio morfométrico en núcleos de células ductales normales

Se evaluó un total de 439 núcleos de células ductales normales,

todos con positividad para los receptores de estrógenos (Fig. 1), con diferentes intensidades de reacción. La Tabla I muestra los resultados obtenidos para cada variable estadística. Se observa que la media del área nuclear fue de 14,91 micras cuadradas, mientras que para el perímetro nuclear se obtuvo un valor de 14,42 micras. Posteriormente, se procedió a comparar cada variable nuclear para determinar si las mismas se correlacionaban entre sí; esto permitiría establecer qué parámetro pudiera ser el más objetivo para su evaluación y comparación posterior con núcleos de carcinomas ductales. Se encontró correlación entre los valores del área, perímetro, diámetro y

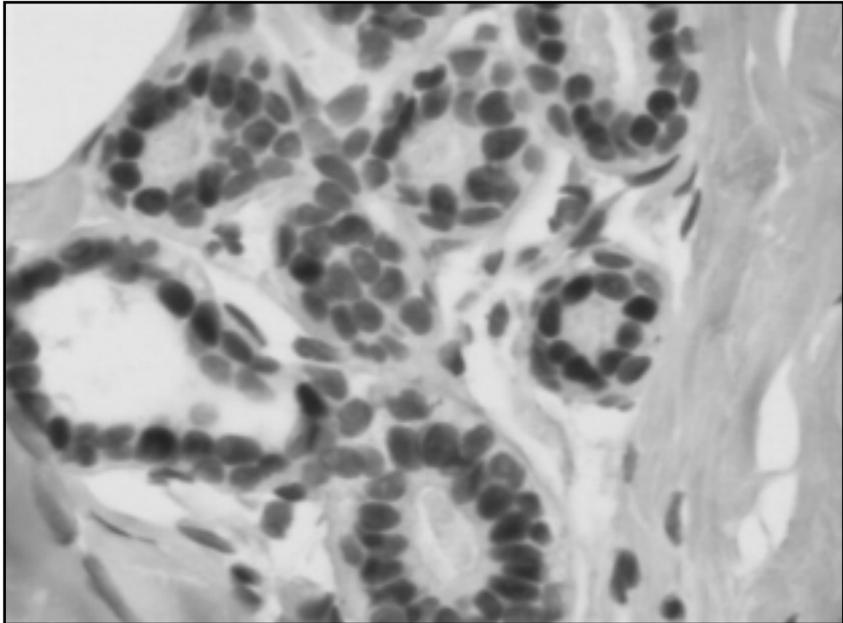


Fig. 1. Sección histológica del tejido mamario donde se evidencian núcleos de células ductales no neoplásicas positivas a los receptores de estrógenos posterior a su digitalización y la aplicación de filtros morfométricos de 11 x 11 pases. (Inmunohistoquímica, revelador DAB. Aumento directo 400x).

TABLA I
VALORES MORFOMÉTRICOS PARA LOS NÚCLEOS DE LAS CÉLULAS DUCTALES NO NEOPLÁSICAS CON EXPRESIÓN PARA LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (n = 439)

	AREA (μ^2)	DIÁMETRO (μ)	RAD MAX. (μ)	RAD MIN. (μ)	PERÍMETRO (μ)
Media	14,91	4,15	2,60	1,56	14,42
Conf< 95 %	14,45	4,08	2,54	1,53	14,09
Conf> 95 %	15,36	4,22	2,65	1,59	14,74
Mediana	14,57	4,15	2,56	1,55	14,07
Val. Max.	27,66	6,37	5,28	2,57	38,94
Val. Min.	7,03	2,78	1,55	0,04	8,99
Percentil 25	10,88	3,59	2,17	1,35	12,25
Percentil 75	17,97	4,63	2,93	1,81	16,04
Desv. Std.	4,86	0,72	0,61	0,35	3,49
Error Std.	0,23	0,03	0,03	0,02	0,17

Rad Max: radio máximo; Rad Min: radio mínimo; Val. Max.: valor máximo;
Val. Min.: valor mínimo.

TABLA II
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS PARA LOS NÚCLEOS NORMALES DE LAS CÉLULAS DUCTALES (n = 439)

VARIABLES	CORRELACIÓN ESTADÍSTICA (R)
Area - Diámetro	r = 0,97
Area - Radio máximo	r = 0,78
Area - Radio mínimo	r = 0,65
Area - Perímetro	r = 0,75
Perímetro - Diámetro	r = 0,81

radios máximos y mínimos (Tabla II); siendo $r = 0,97$ para Area-Diámetro y $r = 0,81$ para Perímetro-Diámetro. De las variables morfológicas nucleares se seleccionó el área como variable independiente para el estudio morfométrico del núcleo de las células ductales (Figs. 2, 3 y 4).

Estudio morfométrico en núcleos ductales neoplásicos

De un total de 1440 núcleos tumorales (Fig. 5), 480 fueron clasificados como grado nuclear I, 477 como grado nuclear II y 483 como grado III (Tabla III). Para el grado I la media del área fue de 31,02, para el grado II se encontró una media de 41,17 y para el grado III fue de

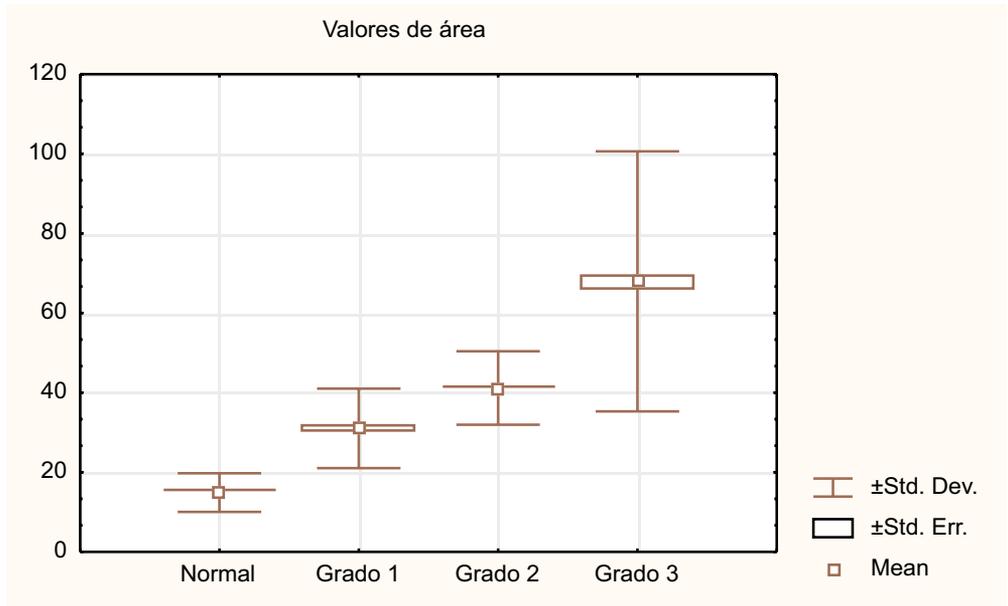
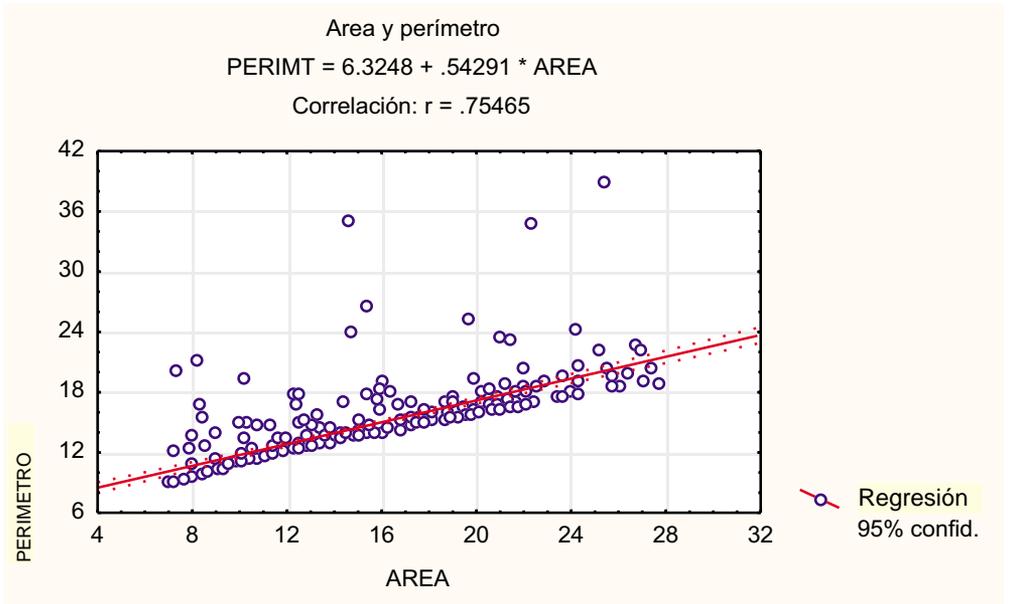
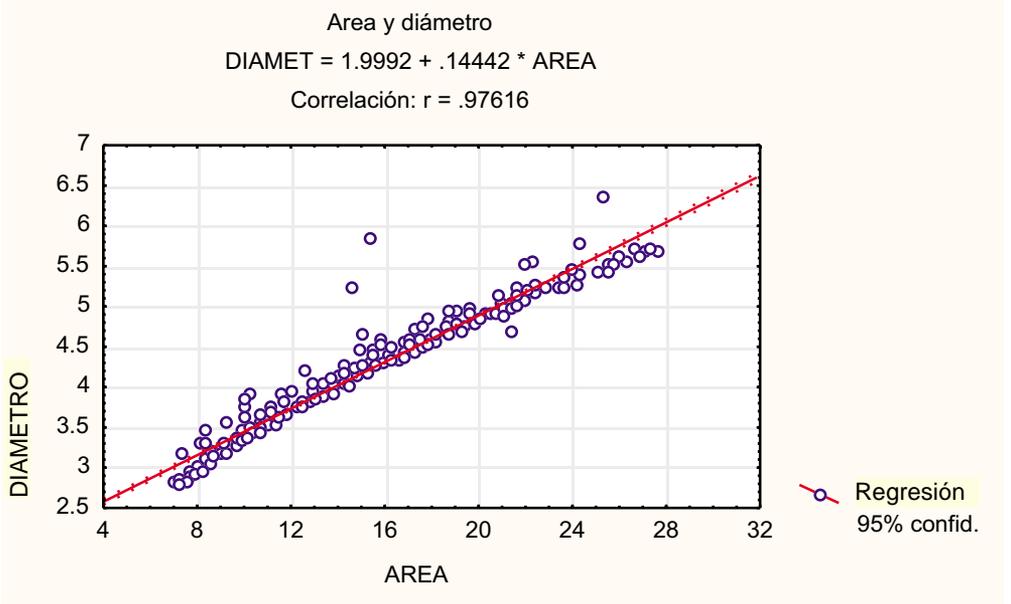


Fig. 2. Representación gráfica de los valores de la media, desviación y error estándar, del área nuclear en las células ductales no neoplásicas y neoplásicas.

TABLA III
VALORES ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ÁREA NUCLEAR TANTO EN CÉLULAS DUCTALES NORMALES Y NEOPLÁSICAS
(n = número de núcleos estudiados para cada caso)

VARIABLE	NÚCLEO NORMAL	NÚCLEO GRADO I	NÚCLEO GRADO II	NÚCLEO GRADO III
N	439	480	477	483
Media	14,91	31,02	41,17	67,03
Valor mínimo	7,03	15,99	22,05	29,19
Valor máximo	27,66	59,07	64,79	154,14
Mediana	14,57	29,62	41,44	54,87
Desv. Std.	4,8565	9,9869	9,2314	32,6596
Error Std.	0,2318	0,4558	0,4227	1,4861
Percentil 25	10,88	23,64	36,11	47,39
Percentil 75	17,97	35,76	47,34	78,,85



Figs. 3 y 4. Correlaciones estadísticas entre el área, diámetro y perímetro para los núcleos de las células ductales no neoplásicas (n = 439). (Para valores de r ver texto)

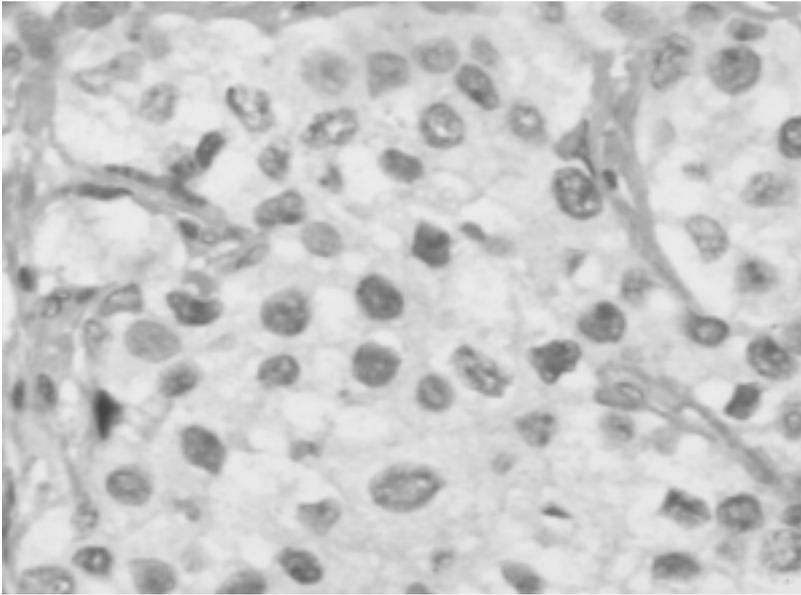


Fig. 5. Carcinoma ductal infiltrante poco diferenciado con marcaje nuclear focal para los receptores de estrógenos. (Inmunohistoquímica, revelador DAB, aumento directo 400x).

67,03 (Tabla III). Cuando se realizó la comparación estadística hubo diferencia significativa entre cada uno de los grupos neoplásicos así como entre los núcleos tumorales y los no tumorales (normales) (Fig. 2). Sin embargo, se evidenció que el grado nuclear III incluyó los valores del área nuclear correspondientes a los valores obtenidos del grado nuclear II. Los valores que representaron intervalos más confiables para la posible clasificación y comparación con el área nuclear, fueron los correspondientes a los percentiles 25 y 75, los cuales representaron los rangos entre los diferentes grupos nucleares (Tabla III). No se encontró diferencia significativa entre las curvas de distribución para cada uno de los grupos estudiados.

DISCUSIÓN

Desde los inicios del siglo XX se ha tratado de hacer mediciones en los hallazgos histológicos en las células normales, así como las alteraciones en las células enfermas, con la finalidad de predecir el posible curso de una patología determinada (1). Así en 1920 se observó que durante la mitosis el tamaño nuclear se incrementa tanto en las células neoplásicas como en las células no neoplásicas (2). En este estudio, se obtuvieron diferentes variables a partir de núcleos de células normales en los ductos mamarios, como paso previo al estudio comparativo con condiciones francamente tumorales malignas. Se encontró que de las variables obtenidas para el análisis

sis morfométrico, el área nuclear representa una de las medidas más reproducibles por lo cual puede ser utilizada como punto de referencia en condiciones normales con valor promedio de 14.91 micras cuadradas, y con intervalos comprendidos entre 10.88 y 17.97. Sin embargo, la combinación de innumerables variables morfométricas no incrementa la precisión estadística del análisis, ya que la mayoría de estas variables son correlacionables, tal y como fue evidenciado en nuestros resultados.

Otras utilidades de la morfometría son que permite conocer la distancia lineal, el conteo de objetos, tales como núcleos marcados positivamente para Ki-67, o determinar fracciones de áreas, formas, tamaños y realizar mediciones complejas de diferentes elementos, por ejemplo mitocondrias (8,9,12-16). Esto ha permitido, entre otras cosas, clasificar los objetos estudiados en isotrópicos, en los cuales sus medidas no son afectadas por la orientación espacial de los mismos, como sería el caso de las esferas (17) y los elementos anisotrópicos, los cuales son objetos en los que al pasar un plano de sección a través de ellos, pueden mostrar diferentes orientaciones y por ende diferentes medidas en dicho plano, como ocurre en las secciones histológicas (1). Muchas de las estructuras biológicas conocidas, pueden ser consideradas como objetos anisotrópicos y esto fue demostrado en el presente estudio; más aún se observaron amplios extremos de mediciones tanto para condiciones normales como para los diferen-

tes grados nucleares del carcinoma mamario. Se evidenció que a mayor grado nuclear, mayor grado de anisometría. El análisis de las curvas de distribución de los valores de los tumores con grados nucleares grado II y III plantea la posibilidad que dichos núcleos pudieran agruparse dentro de una misma clasificación, la cual pudiera denominarse como núcleos de alto grado, ya que la mayoría de los valores morfométricos del área para los grados nucleares II están contenidos en el grado III y por ende presentan pocas diferencias, las cuales son, además, las cuales son, además, muy sutiles para su apreciación histológica rutinaria.

Como toda técnica, el estudio morfométrico posee múltiples fuentes de error; en el presente trabajo tales errores fueron minimizados utilizando núcleos de células que inmunoreaccionaron para los receptores de estrógenos para la identificación de objetos. Una vez obtenidos estos núcleos, fueron digitalizados por medio de diferentes escalas de píxeles dentro de las gamas del marrón, debido a que el revelador utilizado fue la diaminobencidina, proporcionando de esta manera cierta variabilidad de uno a otro núcleo, con lo cual se evitó la confusión con otros elementos tisulares, como por ejemplo células estromales, endoteliales, mioepiteliales, etc. También se disminuyó la densidad de píxeles (unidad de digitalización de imágenes) con la captura de imágenes con aumentos de 40 x evitando de esta manera dimensiones fractal bajas

(18); así mismo, se utilizaron filtros morfométricos para asegurar contornos nucleares adecuados en aquellos casos donde sus límites estaban muy próximos o fueran imprecisos y pudieran generar confusión, aun cuando se intentó en cada caso evitar estos inconvenientes puntuales. La escala de cálculo utilizada para cada una de las variables estudiadas se realizó por medio de una calibración previa para cada aumento con el objetivo milimetrado y, antes de cada medición, la adquisición de dicha resolución espacial permitió un análisis preciso. Además, se mantuvo el aumento de los objetivos, con la subsecuente disminución del efecto de Costa Inglesa, lo cual implica que la resolución espacial de un objeto a la cual es analizada pueda afectar sus dimensiones (19); por lo tanto, a mayor grado de resolución espacial, mayores son las dimensiones lineales.

Aun cuando no se planteó el estudio de densidad en las reacciones de inmunohistoquímica, es necesario resaltar que para el análisis de los núcleos positivos se necesita un máximo de contraste entre las diferentes zonas que se van a estudiar, es decir entre el objeto considerado como positivo; en nuestro caso, el o los núcleos y la tinción de fondo, necesitándose una máxima de señal del objeto inmunoteñido con alta diferencia de su tinción de fondo (relación tinción/fondo=elevada) (20). Este hecho es clave para el análisis morfométrico tanto de elementos como de densidades positivas, por lo cual tanto la especifici-

dad de los anticuerpos primarios utilizados, la saturación de los sitios antigénicos, y las condiciones de las reacciones enzima sustrato deberían ser optimizadas al máximo para minimizar los posibles errores que se puedan encontrar en este tipo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LAWRENCE T.D.: Morphometric applications in anatomic pathology. *Human Pathol* 1996; 27: 450-467.
2. HEIBERG KH, KEMP T.: Uber die zahl der cromosomen in karzinomzellen beim menschen. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1929; 273: 693-700.
3. OOMS E.C.M., ANDERSON W.A.D., ALONS C.L.: Morphometric grading bladder tumors in comparison with histologic grading by pathologists. *Human Pathol* 1983; 14: 144-150.
4. DELIDES G.S., GARAS G., GEORGOULI G.: Intralaboratory variations in the grading of breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 106: 126-128.
5. LANGLEY F.A.: Quality control in histopathology and diagnostic cytology. *Histopathology* 1978; 2: 3-18.
6. TOOGOOD J.G.: What do we mean by usually?. *Lancet* 1980; 1: 1094.
7. KRAMER C.E., EPSTEIN J.I.: Nucleoli in low-grade prostate adenocarcinoma and adenosis. *Hum Pathol* 1994; 24: 618-623.

8. MCNEAL J.E., VILLERS A.A., REDWINE F.A.: Capsular penetration in prostate cancer: significance for natural history and treatment. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 240-247.
9. BAAK J.P., VAN DIEST P.J., BENRAADT T.: The multicenter morphometric mammary carcinoma project (MMMCP) in the Netherlands: value of morphometrically assessed proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1993; Suppl 17: 220-225.
10. TAYLOR C.R., TANDON A.: A theoretical and practical aspects of the different immunoperoxidase techniques. In: COTE R.J., TAYLOR C.R. (eds) *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. Philadelphia, Saunders; 1994: 21-41.
11. BLOOM H.J., RICHARDSON W.W.: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11:359-377.
12. LADEKARL M.: Quantitative histopathology in ductal carcinoma of the breast: prognostic value of mean nuclear size and mitotic counts. *Cancer* 1995; 75: 2114-2122.
13. HUFFER W.E., RUEGG P., ZHU J.M.: Semiautomated methods for cancellous bone histomorphometry using a general-purpose video image analysis system. *J Microsc* 1994; 173: 53-66.
14. SHUM D.T., ROBERTS J.T., SMOUT M.S.: The value of nuclear contour index in the diagnosis of mycosis fungoides. *Cancer* 1986; 57: 298-304.
15. MEIJER C.J.L.M., LOO E.M., VAN DER VLOTEN W.A. *et al*: Early diagnosis of mycosis fungoides and Sezary's syndrome by morphometric analysis of lymphoid cells in the skin. *Cancer* 1980; 45: 2864-2871.
16. ERLR B.S., HSU L., TRUONG H.M.: Image analysis and diagnostic classification of hepatocellular carcinoma using neural networks and multivariate discriminant functions. *Lab Invest* 1994; 71: 446-451.
17. HENNIG A., ELIAS H.: A rapid method for the visual determination of size and distribution of spheres from the size distribution of their sections. *J Microsc* 1970; 93: 101-107.
18. CROSS S.S., COTTON D.W.K., UNDERWOOD J.C.E.: Measuring fractal dimensions: sensitivity to edge-processing functions. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; 16: 375-379.
19. MANDELBROT BB.: How long is the coastline of Britain?: statistical self-similarity and fractional dimension. *Science* 1967; 156: 636-638.
20. GROSS D.S., ROTHFELD J.M.: Quantitative immunocytochemistry of hypothalamic and pituitary hormones: validation of an automated, computerized image analysis system. *J Histochem Cytochem* 1985; 33: 11-20.