



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



**PERFIL INMUNOHISTOQUIMICO Y EL REFINAMIENTO DE LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA
EN UNA POBLACIÓN VENEZOLANA”**

Autor (a) Vilma E Rebolledo Pulido

Tutor: Dr. Nino Ferri Nicassio

Valencia, Noviembre 2014



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



**“PERFIL INMUNOHISTOQUIMICO Y EL REFINAMIENTO DE LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA
EN UNA POBLACIÓN VENEZOLANA”**

Autor (a) Vilma E Rebolledo Pulido

Tutor: Dr. Nino Ferri Nicassio

Trabajo que se presenta ante la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo para su aprobación como Tesis Doctoral para optar al Título de

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Valencia, Noviembre 2014

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

VEREDICTO

Nosotros, Miembros del Jurado designado para la Evaluación del Trabajo de Grado Titulado **“PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO Y EL REFINAMIENTO DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA EN UNA POBLACIÓN VENEZOLANA”**, presentado por la Ciudadana *Vilma E., Rebolledo P., C.I. N° 7.102.821* para optar al título de **DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS**, acordamos que el mismo reúne los requisitos para ser considerado:

APROBADO CON MENCIÓN HONORÍFICA

<i>Nombre y Apellido</i>	<i>C.I.</i>	<i>Firma del Jurado</i>
Dra. Carmen Cecilia Malpica	3.206.895	
Dra. Mariely Ramos	7.002.320	
Dr. Mario Palacios	6.129.612	



En Valencia a los Diez (10) días del mes de Noviembre Dos Mil Catorce

DEDICATORIA

A mi padre, por haber sido siempre ejemplo de rectitud y de quien aprendí que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo...

A mi madre, verdadera fuente de amor, luz y calor para todas mis actividades, quien me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita fortaleza, coraje e inteligencia para vencer las dificultades....

A mis hermanos por el apoyo siempre incondicional...

A mí amada familia, manantial inagotable de motivación que me recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de alcanzar esta meta.

A mis padres, por haberme dado una sólida formación y haberme apoyado a seguir mis sueños, sin importar si eran rentables.

A mi Tutor, el Dr. Nino Ferri por ser ejemplo de tolerancia, amabilidad, solidaridad, apertura y solvencia profesional.

Al Doctor Herbert Espig Barros, por sus oportunos aportes desde el punto de vista metodológico...

A los Doctores Aldo Reigosa Yaníz y Eduardo Caleiras Pires, por sus valiosas y sustantivas sugerencias para afrontar las dificultades de inicio y los avances.

Al Dr. Aldo Reigosa Yaniz, por acompañarme en la lectura del estudio inmunohistoquímico del panel de marcadores propuestos.

A la licenciada May Ling Hung jefe del laboratorio del Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo, por su apoyo para la técnica inmunohistoquímica.

Al Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte. Valencia, por ser siempre un espacio abierto para conseguir soluciones.

Al Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo, mi espacio de investigación para crecer y desarrollar mi trabajo.

A todas las instituciones por permitir el acceso a la información necesaria de forma oportuna.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Abreviaturas.....	xiv
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	4
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Objetivos de la investigación.....	10
1.3. Justificación.....	11
1.4. Alcances y productos.....	12
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1. Antecedentes.....	14
2.2. Bases teóricas.....	22
2.2.1. Definición de carcinoma de mama.....	22
2.2.2. Epidemiología.....	22
2.3. Generalidades de la glándula mamaria.....	25
2.3.1. Embriología.....	25
2.3.2. Anatomía.....	26
2.3.3. Histología.....	27
2.4. Clasificación del carcinoma de mama.....	31
2.4.1. Clasificación clínica.....	31
2.4.2. Clasificación patológica.....	35

2.4.3. Clasificación molecular.....	36
2.5. Bases moleculares del carcinoma de mama.....	39
2.5.1. Biología molecular del carcinoma de mama.....	39
2.5.2. Receptores y proteínas. Marcadores moleculares.....	45
2.5.3. Inmunohistoquímica. Expresión de marcadores moleculares.....	59
2.5.4. Micromatrices de tejido.....	63
2.6. Definición de términos.....	65
2.7. Operacionalización de las variables.....	67
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	70
3.1. Tipo de investigación.....	70
3.2. Material y métodos.....	71
3.2.1. Población y muestra.....	71
3.2.1.1. Criterios de inclusión.....	72
3.2.1.2. Criterios de exclusión.....	72
3.2.2. Técnica de recolección y procesamiento.....	73
3.3. Construcción de las micromatrices de tejidos.....	75
3.4. Técnica inmunohistoquímica e interpretación de resultados.....	78
3.5. Técnica de análisis de resultados.....	81
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	83
4.1. Análisis y relaciones.....	83
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	107
5.1. Consideraciones y reflexiones.....	107
5.2. Conclusiones.....	120
CAPITULO VI. TEORIA DERIVADA.....	121
Referencias bibliográficas.....	124

Anexos	141
Anexo 1. Autorización Centro de Investigación	143
Anexo 2. Consentimiento Institucional.....	145
Anexo 3. Oficio Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH).....	147
Anexo 4. Instrumento de recolección de datos.....	149

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Patrón de expresión génica del carcinoma de mama por análisis de agrupamiento jerárquico.....	16
Figura 2. Patrón de expresión génica del carcinoma de mama por análisis de agrupamiento jerárquico.....	17
Figura 3. Esquema del componente epitelial de la mama modificado por KorsCking 2005.....	29
Figura 4. Origen y desarrollo del carcinoma de mama.....	40
Figura 5. Receptor de estrógeno.....	42
Figura 6. Proceso de construcción de las micromatrices de tejido.....	77
Figura 7. Imágenes microscópicas correspondientes a la expresión de los marcadores moleculares en estudio por inmunohistoquímica en las micromatrices de tejido.....	88
Figura 8. Imágenes microscópicas correspondientes a la expresión de los marcadores moleculares en estudio por inmunohistoquímica en las micromatrices de tejido.....	89
Figura 9. Imágenes microscópicas de la expresión inmunohistoquímica del tumor con inmunofenotipo TNB.....	90
Figura 10. Supervivencia global de la población en estudio.....	96
Figura 11. Supervivencia global de acuerdo al subtipo molecular.....	96
Figura 12. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador Ck5/6.....	100
Figura 13. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador Ck5/6.....	100
Figura 14. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador Ck8.....	101

Figura 15. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador Ck8.....	101
Figura 16. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador Ck18.....	102
Figura 17. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador Ck18.....	102
Figura 18. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador p73.....	103
Figura 19. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador p73.....	103
Figura 20. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador CD10.....	104
Figura 21. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador CD10.....	104
Figura 22. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador EGFR.....	105
Figura 23. Características del fenotipo tumoral de la población de estudio.....	120

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Agrupamiento por estadio del carcinoma de mama.....	35
Cuadro 2. Clasificación molecular del carcinoma de mama de acuerdo a diversos estudios realizados.....	38
Cuadro 3. Anticuerpos monoclonales, clon, dilución, fuente e inmunomarcaje.....	79
Cuadro 4. Hallazgos clínico-patológicos en la población de estudio.....	84
Cuadro 5. Distribución de los tumores de acuerdo al subtipo molecular según la expresión de RE, RP, Her-2.....	85
Cuadro 6. Distribución de los tumores según subtipo molecular y expresión de Ki-67, p53, Bcl2.....	86
Cuadro 7. Expresión de los marcadores Ck5/6, Ck8, Ck18, CD10, EGFR por inmunohistoquímica.....	92
Cuadro 8. Expresión de marcadores en estudio según subtipo molecular.....	93
Cuadro 9. Distribución de los tumores según el subtipo molecular y la edad....	94
Cuadro 10. Análisis conjunto de las características de interés de acuerdo al subtipo molecular.....	97
Cuadro 11. Análisis del patrón de recurrencia de la enfermedad según el subtipo molecular.....	98
Cuadro 12. Supervivencia global de acuerdo a la expresión de los marcadores en estudio y subtipo molecular.....	99

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

CD10: Antígeno común de la leucemia linoblástica aguda.

Ck: Citoqueratina.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico 1.

GH: Grado histológico.

Her-2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2.

IHQ: Inmunohistoquímica.

RE: Receptor de estrógeno.

RP: Receptor de progesterona.

TN: Triple negativo.

TNB: Triple negativo basal.

TNnB: Triple negativo no basal.

TMA: Micromatrices de tejido o tissue microarrays.

TNM: Sistema de estadificación del cáncer basado en el tamaño del tumor (T), ganglios linfáticos (N) y las metástasis (M).

µm: micra.

TEM: transición epitelio mesenquima.

SG = Supervivencia global.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



“PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO Y EL REFINAMIENTO DE LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA
EN UNA POBLACIÓN VENEZOLANA”

Autor: Vilma E Rebolledo Pulido
Tutor: Dr. Nino Ferri Nicassio
Valencia, Noviembre 2014

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer. Identificar el arreglo molecular del tumor se justifica para concluir un diagnóstico más completo e información más cercana al comportamiento biológico de la neoplasia. **Objetivo:** Establecer un perfil inmunohistoquímico del carcinoma de mama que contribuya en la caracterización y el refinamiento de la clasificación molecular partiendo del estudio de marcadores biológicos comúnmente determinados (estrógeno, progesterona, Her2, Ki67, p53 y Bcl2) y realizando citoqueratinas 5, 6, 8, y 18, EGFR, p73 y CD10 en una población Venezolana con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante. **Material y métodos:** Bajo la matriz epistémica positivista y el paradigma cuantitativo, se realizó el presente estudio de diseño no experimental, descriptivo, correlacional. De acuerdo criterios definidos, se seleccionaron 149 muestras de tejido tumoral de la mama en parafina y su estudio inmunohistoquímico para RE, RP, Her-2, Ki67, p53 y Bcl2. Se analizó la expresión de 12 biomarcadores moleculares, 6 realizados previamente y 6 por micromatrices de tejido, se compararon los resultados con los subtipos moleculares definidos de acuerdo a la expresión de RE, RP y Her-2 y con las características de interés clínico. **Resultados:** Los tumores eran 34,22% luminal A, 27,51% luminal B, 14,76% Her-2+ y 23,48% triple negativo (TN). Los luminal A, expresaron RE, RP, Bcl-2, Ck8, Ck18, p73, 47% p53 y 31% alto índice de Ki-67. Los luminal B, expresaron RE o RP, Ck8, Ck18, p73, 54% Her-2 y p53, 44% índice alto de Ki-67, 17% Bcl2. Los Her-2+ inmunomarcaron Her-2, índice de Ki-67 alto, 77% Bcl2, 59% p53, 95% p73, CD10 32% y 15% Ck5/6. Los TN expresaron alto índice de Ki-67, 44% p53, 71% Bcl2, 91% p73 y 52 y 61% Ck8 y Ck18. La expresión de Ck5/6 y CD10 distinguió un fenotipo distinto. **Conclusión:** La expresión de los biomarcadores moleculares en este estudio proporcionó una mejor definición del tumor para completar el diagnóstico de la neoplasia por el perfil de moléculas proteicas expresadas y la caracterización molecular resultante, lo expuesto posibilita conocer aún mejor la agresividad tumoral y el riesgo individual.

Palabras claves: Cáncer de mama. Marcadores moleculares, Perfil inmunohistoquímico, Caracterización molecular.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



“PERFIL INMUNOHISTOQUIMICO Y EL REFINAMIENTO DE LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA
EN UNA POBLACIÓN VENEZOLANA” □

Autor: Vilma E Rebolledo Pulido

Tutor: Dr. Nino Ferri Nicassio

Valencia, Noviembre 2014

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy in women. You identify the molecular basis of the tumor is justified to conclude a closest to the biological behavior of the neoplasm most comprehensive and diagnostic information. **Objective:** To establish an immunohistochemical profile of breast cancer that contributes to the characterization and refinement of the molecular classification commonly from the study of biological markers (estrogen, progesterone, HER2, Ki67, p53 and Bcl2) and performing cytokeratins 5, 6, 8 and 18, EGFR, p73 and CD10 in a Venezuelan population diagnosed with infiltrating ductal carcinoma. **Methods:** Under the positivist epistemic matrix and the quantitative paradigm, the present study non-experimental, descriptive, correlational design was performed. According defined criteria, 149 samples of breast tumor tissue in paraffin and immunohistochemistry for ER, PR, Her-2, Ki67, p53 and Bcl2 were selected. 12 expression was analyzed molecular biomarkers, 6 and 6 made previously for tissue microarrays, the results were compared to molecular subtypes defined according to the expression of ER, PR and Her-2 and with the features of clinical interest. **Results:** The tumors were 34.22% luminal A, luminal B 27.51%, 14.76% and Her-2 + 23.48% triple negative (TN). The luminal A, expressed ER, PR, Bcl-2, Ck8, CK18, p73, p53 47% and 31% higher Ki-67 index. The luminal B, expressed ER or PR, Ck8, CK18, p73, 54% Her-2 and p53, 44% higher Ki-67 index, 17% Bcl2. The Her-2 + immunostained Her-2, Ki-67 index high, 77% Bcl2, p53 59%, p73 95%, CD10 32% and 15% Ck5 / 6. The TN expressed high levels of Ki-67, p53 44%, 71% Bcl2, p73 and 91% 52 and 61% Ck8 and CK18. Expression of Ck5 / 6 and CD10 saw a distinct phenotype. **Conclusion:** The expression of molecular biomarkers in this study provided a better definition of the tumor to complete the diagnosis of neoplasia by the profile of protein molecules expressed and the resulting molecular characterization, the above possible to know even better tumor aggressiveness and individual risk .

Keywords: Breast cancer. Molecular markers, Immunohistochemical profile, Molecular characterization.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de la glándula mamaria en la mujer representa un problema de salud pública para la mayoría de los países de todo el mundo, por su frecuencia, mortalidad y los recursos sanitarios implicados para su asistencia. De su comportamiento se ha desprendido que una de cada nueve mujeres desarrolla la neoplasia a lo largo de su vida y la tercera parte de ellas muere por su causa. En Venezuela, en las últimas décadas se ha observado un aumento del número de casos que se diagnostican diariamente, donde la mitad lamentablemente fallece por la enfermedad.

Paralelamente, no es menos cierto que en la literatura médica son numerosos los artículos que sobre el carcinoma de mama podemos localizar desde su descripción por primera vez. El interés no decreciente por conocer de su origen, desarrollo y biología ha logrado en las últimas tres décadas progresos importantes en la comprensión de algunos de los mecanismos implicados en su génesis, progresión y evolución. Sin embargo, en relación a este último punto, el curso clínico tan heterogéneo en pacientes con idénticas características tumorales y homogéneos factores pronósticos ha sugerido que esa variabilidad evolutiva es producto de rasgos propios del tumor que le distinguen más allá de su morfología o histología, en relación a la identidad de las células que conforman el mismo.

Al respecto fuera de nuestras fronteras, investigaciones en tumores de mama histológicamente idénticos con técnicas de microarrays para el análisis masivo de genes, que en definitiva son proteínas celulares, más el cruce de datos clínicos, señalan que existen diferencias tumorales basadas en la diversidad del patrón de expresión génica o diferencias moleculares, lo que ha proporcionado las bases para hablar de heterogeneidad tumoral y de la evolución, como también de una nueva clasificación de esta neoplasia, la molecular, la cual distingue cuatro clases (luminal A, luminal B, Her-2 positivo y basal) hasta el momento y que ha sugerido considerar al carcinoma de mama como una familia de enfermedades, cuya totalidad de miembros no está clara. Al respecto, el análisis de expresión de proteica por técnica inmunohistoquímica que traduce igualmente información del perfil genético de la neoplasia ha contribuido también a la identificación de dichas firmas moleculares en investigaciones que determinaron otros marcadores moleculares, distintos a los usuales solicitados en la práctica estándar de su manejo actualmente (RE, RP, Her-2, Ki-67), como son citoqueratinas y p63 entre otros. La clasificación molecular del carcinoma de mama, se ha desarrollado con microarrays de expresión genética, y aunque ésta es una técnica prometedora, es sumamente costosa por la infraestructura y la técnica en si, lo que significa que no está disponible ni al alcance de todas las pacientes.

En ese particular, el análisis de la expresión proteica por inmunohistoquímica sobre micromatrices de tejidos para la caracterización molecular de la neoplasia, es más factible, incluso para nuestras pacientes hoy en

día, más aún por los posibles beneficios que ello puede significar para una medicina personalizada.

El siguiente estudio bajo la matriz epistémica positivista, aborda al carcinoma de la glándula mamaria desde una temática poco conocida y explorada en nuestras pacientes afectadas por la neoplasia, con el objetivo de establecer un perfil inmunohistoquímico de la misma que contribuya en la caracterización y el refinamiento de su clasificación molecular, en una población venezolana con carcinoma ductal infiltrante.

Para tales efectos se presenta el mismo organizado en capítulos: En el Capítulo I, se expone el problema de estudio, presentando una contextualización de la situación, los objetivos, así como los alcances de la investigación. El Capítulo II, compendia el marco teórico referencial del proyecto, destacando los antecedentes, y las bases teóricas. En el Capítulo III, se describe el marco metodológico de la investigación, desarrollándose el método, las técnicas de recolección, procesamiento, y análisis de la información. En el Capítulo IV, se detallan los resultados como en V, la discusión y en el Capítulo VI, la teoría derivada.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento y formulación del problema

El carcinoma de mama es el tumor maligno más frecuente de la población femenina a nivel mundial (1-8). De las estadísticas internacionales se desprende que es la primera causa de mortalidad oncológica para la mujer en países desarrollados y en vías de desarrollo.

En un recorrido por aquellos países, una de cada nueve mujeres desarrolla la neoplasia a lo largo de su vida y la tercera parte de ellas muere a consecuencia de la misma. El marcado incremento del número de casos nuevos, aunque fue dos veces mayor en los países desarrollados, no dejó de ser alarmante por las cifras observadas en los países en desarrollo (9-10).

Tal situación ha llevado a considerar al carcinoma de mama un problema de salud generalmente prioritario para las administraciones sanitarias en muchos

países, debido a su frecuencia, mortalidad, cantidad de recursos que consume y la alarma social que genera (1-11).

En Venezuela, en las últimas décadas se ha observado un aumento del número de casos que se diagnostican diariamente, donde de nueve pacientes aproximadamente la mitad fallece por la enfermedad. A pesar de los adelantos técnicos y las campañas para la detección temprana de la neoplasia, la situación del diagnóstico se presenta de forma inversa a lo observado en otros países. Alrededor del 70% de los casos al momento del diagnóstico se clasifican superior al estadio III. Sin embargo, la evolución de las pacientes con un estadio inferior e idénticas características clínicas e histológicas no siempre es la más favorable en todas, lo que sumado a un desenlace desafortunado en la mayoría con un estadio clínico superior (1-7), sostienen la necesidad de un diagnóstico más completo e información más cercana al comportamiento biológico de la enfermedad en nuestras pacientes.

La valoración estándar de un paciente con la neoplasia incluye la evaluación del estadio clínico o TNM (tamaño tumoral, afectación ganglionar y a distancia), la evaluación histopatológica (tipo, subtipo, grado histológico, número de ganglios infiltrados, émbolos linfáticos y hemáticos entre otros) y desde hace más de dos décadas, la inmunohistoquímica que clásicamente incluye la determinación de los receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y el Her-2

(12,13). En conjunto ciertamente las anteriores herramientas permiten diferenciar y agrupar a los pacientes de acuerdo a las probabilidades de respuesta a la terapéutica, recidiva y sobrevida (13-14).

De una paciente a otra, el curso clínico del carcinoma de mama infiltrante es muy heterogéneo, en relación a las alteraciones que implican su origen, desarrollo y la gran diversidad genética y fenotípica (15-17).

Para predecir el curso clínico de la enfermedad es fundamental conocer los elementos del tumor que implican la capacidad o el potencial de invasión del mismo, como las características morfológicas, biológicas y aquellas de carácter clínico, en relación a factores pronósticos y también predictivos para cada paciente (14-16,18,19).

Al respecto las clasificaciones clínicas, patológicas y sus modificaciones, ya no son suficientes para tratar de predecir y explicar su comportamiento e independientemente del modelo predictivo utilizado existe una gran variabilidad en la evolución de la enfermedad que escapa de las aproximaciones hechas a la fecha. (14,20-25).

En tal sentido son numerosos los trabajos que se han desarrollado y publicado en la última década, aceptándose de acuerdo a la literatura, que los cursos clínicos variados de pacientes con tumores histológicamente idénticos, son

el resultado de diferencias moleculares, basados en la diversidad del patrón de expresión génica, por lo cual el análisis molecular suma información no solo de carácter pronóstico (23,26-32).

A propósito, las investigaciones iniciales sobre la secuencia y organización del genoma humano con métodos de alto rendimiento (High-throughput Analysis) o técnica de microarrays para el análisis masivo de múltiples moléculas de ADN, ARN o proteínas como marcadores genéticos, permitieron identificar perfiles de expresión de esta neoplasia, proporcionando las bases para un sistema de clasificación molecular basado en un agrupamiento jerárquico de clases para mejorar no solo su taxonomía, sino también la comprensión de los diferentes resultados clínicos (31,33-35).

Por los hallazgos genómicos y la convergencia de datos clínicos en pacientes con carcinoma de mama, se considera hoy en día que ésta neoplasia es una familia de enfermedades y aunque no está claro por cuantos miembros está conformada, se conocen al menos: el tipo luminal, basal, el Her-2 positivo y se ha mencionado el parecido a la mama normal, el cual aunque no aceptado por todos se considera podría representar solamente una extensión del perfil de expresión entre el Her-2 positivo y el tipo basal (27,28,32,33).

Sobre la distinción de clases o subtipos del carcinoma de mama, otras investigaciones posteriores con técnicas de microarrays y análisis de expresión

proteica por inmunohistoquímica han contribuido también en su caracterización y clasificación, definiendo incluso las subclases, como **luminal A** expresan el RE y RP positivo, **luminal B** expresan RE o RP positivo con independencia del marcaje de Her-2, **Her-2 positivo**, RE y RP negativos y Her-2 positivo y el **basal** que no expresa ni receptores hormonales (RE, RP) ni Her-2 (28,30,34-36).

Por estudios de inmunohistoquímica algunas clases moleculares han demostrado la expresión de otros marcadores como queratinas o citoqueratinas (Ck) de alto o bajo peso molecular y la proteína p63, observándose en particular que la expresión de Ck7, Ck8, Ck17 y Ck18 se han identificado en los carcinomas de mama **luminales**, los cuales tienen una mejor evolución y las Ck5, Ck6, Ck14 y p63 en los **basales**, los cuales son más agresivos y de peor pronóstico, mientras en el tipo **Her-2 positivo** no está clara la expresión de Ck y como el anterior, es más agresivo (33,36-38).

Los resultados de casi todos los estudios a la fecha sobre la clasificación molecular del carcinoma de mama están realizados con técnica de microarrays génica, que permiten el estudio de la expresión de un gran número de genes, basados en poblaciones con una estructura poblacional distinta a la nuestra por las mezclas raciales (30,31,34-39). Los estudios realizados con técnica de microarrays génica, representan un alto costo por la infraestructura requerida y técnica misma. Los tissue microarrays, microarrays de tejidos o micromatrices de tejido (TMAs) han probado ser una herramienta eficiente en diversos estudios.

Empleados para el análisis de la expresión proteica por técnica de inmunohistoquímica de varios marcadores moleculares en diversos tejidos tumorales como de mama, riñon o próstata, han ofrecido buenos resultados para conocer aún más a los mismos, incluso para la clasificación molecular de algunos, revelando con ello la diversidad proteica y genética de los tumores de estudio (30,40).

Si partimos de la diversidad genotípica como origen de la variabilidad tumoral del carcinoma de mama y su comportamiento, el reto en su estudio y tratamiento se basa en la resolución de la heterogeneidad molecular (31,34-37,39-48).

Basados en el significado de la expresión proteica de marcadores moleculares por método inmunohistoquímico, que expone las proteínas presentes de las células tumorales y que indirectamente proporciona información relativa de las alteraciones para su producción y los genes de la neoplasia. Se plantean la siguiente interrogante: ¿Será que la expresión inmunohistoquímica de los marcadores moleculares Ck5, Ck6, Ck8, Ck18, EGRF, p73 y CD10 en conjunto al RE, RP, Her-2, Ki67, p53 y Bcl2 permitirá identificar características que distinguen diferencias en los subtipos moleculares de la neoplasia en una población venezolana con cáncer de mama?

1.2 Objetivos de la investigación

General

Establecer un perfil inmunohistoquímico del carcinoma de mama que contribuya en la caracterización y el refinamiento de la clasificación molecular partiendo del estudio de marcadores biológicos comúnmente determinados (estrógeno, progesterona, Her2, Ki-67, p53 y Bcl2) y realizando citoqueratinas 5, 6, 8, y 18, p73, CD10 y EGFR, en una población Venezolana con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante.

Específicos

- Clasificar los tumores de mama de acuerdo a los subtipos moleculares según la expresión de los marcadores RE, RP, Her-2.
- Evaluar la expresión de los marcadores Ki-67, p53 y Bcl2 de acuerdo a los subtipos tipos moleculares del carcinoma de mama.
- Establecer la expresión de Ck5, Ck6, Ck8, Ck18, p73, EGFR y CD10 de acuerdo a los subtipos moleculares.
- Relacionar la expresión del subtipo molecular y las características de interés clínico edad, estadio y grado histológico.
- Relacionar la expresión del subtipo molecular y la evolución clínica considerando la recidiva tumoral y la supervivencia global.
- Relacionar la expresión de los marcadores del panel con la supervivencia global de cada subtipo.

1.3 Justificación

El conocimiento reciente sobre el carcinoma de mama ha permitido identificar subgrupos tumorales con características moleculares y clínicas particulares, como el desarrollo de nuevas herramientas de predicción de riesgo y tratamiento de las pacientes afectadas en otras latitudes (26,35-39-42).

Conocer el perfil de expresión genética en el carcinoma de mama, ha abierto la puerta a un nuevo mundo al acercarnos a la comprensión del comportamiento de la enfermedad, conocer el mismo en nuestras pacientes impone un reto, para entender en ellas la evolución de neoplasia, y planificar su tratamiento de forma más individual con base al futuro y la nuevas dianas terapéuticas. El análisis molecular de los tumores de mama por microarrays de expresión génica, aunque presenta una prometedora proyección en su utilidad clínica futura, en la actualidad su aplicación como tal no es factible dada la infraestructura que se requiere, la cual no se dispone en ninguno de los centros de salud en Venezuela. La infraestructura, además de la complejidad y el alto costo de la técnica por el momento nos alejan de la posibilidad de clasificar la neoplasia en las mujeres afectadas. El estudio inmunohistoquímico por el contrario, es un método realmente mucho más asequible y viable que los anteriores para conocer la caracterización molecular del carcinoma de mama en nuestras pacientes enfermas. De hecho en la rutina actual para su manejo terapéutico adecuado, se

solicitan desde hace un tiempo marcadores moleculares hormonales (RE, RP) y Her-2.

Ahora, se plantea conocer por dicho método la determinación de otros biomarcadores moleculares que pueden identificar la expresión de proteínas de las células tumorales, que reflejan información codificada del ADN de sus genes, empleando micromatrices de tejidos que posibilitan el análisis inmunohistoquímico simultáneo de varias muestras tumorales lo que favorece menor tiempo para el estudio y la maximización de la muestra y reactivos. Ciertamente lo anterior es de gran importancia porque ofrece una alternativa real que posibilita conocer el arreglo molecular del tumor para concluir un diagnóstico más completo e información más cercana al comportamiento biológico de la neoplasia que afecta a cada paciente. El presente estudio aborda el carcinoma de mama desde una nueva temática no explorada en nuestras pacientes que merece ser valorada.

Alcances y productos

Agrupar a las pacientes con carcinoma de mama en función de las características tumorales del perfil de expresión proteica de acuerdo a los tipos moleculares y sus variantes posibles, como herramienta de valor para un adecuado diagnóstico en la práctica estándar de su manejo. Así, como también, con el panel

de biomarcadores del estudio contribuir a comprender la evolución clínica de la enfermedad en nuestras pacientes.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Son numerosos los trabajos que se han publicado sobre el carcinoma de mama en estas últimas dos décadas. Se conocen apropiado factores pronósticos y predictivos, como características morfológicas, receptores hormonales y otros marcadores moleculares, algunas alteraciones genéticas de la secuencia de su desarrollo y progresión (15-18), y más recientemente perfiles o patrones de expresión genética que distinguen subclases tumorales (24,26,28,31,33,34,36,37).

En relación a ese último aspecto, los primeros estudios que dieron a conocer que los tumores de mama podían agruparse o subdividirse en base al análisis de expresión genética, se publicaron iniciando la década del 2000 por Perou, Sorlie y su grupo (27,28). En dichos estudios inicialmente utilizando 1753 genes y en base a algoritmo de agrupamiento jerárquico, se mostraron dos ramas principales de grupos de tumores de acuerdo a la expresión genética del receptor de estrógeno y grupos adicionales secundarios en las ramas más largas del agrupamiento (dendograma). Esos datos llevaron a la clasificación de cuatro subtipos moleculares que expresaban igualmente otros genes:

subtipo luminal (estrógeno positivo, citoqueratinas 8/18 positivas), subtipo basal (estrógeno negativo, amplificación Her-2, citoqueratinas 5/17 positivas), subtipo Her-2 positivo (estrógeno negativo con amplificación Her-2) y subtipo parecido a mama normal.

Modificando la lista de genes empleados de forma inicial, Sorlie y sus colaboradores, utilizando 476 genes denominados “set de genes intrínsecos”, (Figura 1,2) expusieron en su siguiente artículo publicado, subgrupos adicionales en la categoría del tipo luminal (luminal A, B, C) o en la rama izquierda del agrupamiento jerárquico, como también, la expresión de la mutación del gen p53 en menor porcentaje en los tumores luminales que en los basales (26,27). Un tercer estudio del mismo grupo de investigadores, con una versión modificada del “set de genes intrínsecos”, utilizando en este caso 534 genes, observó nuevamente a los subtipos basal, parecido a mama normal, Her-2 y dos categorías de tipo luminal (28).

Estudios posteriores mostraron esas misma diferencias de gran magnitud en la expresión génica entre los tumores receptor de estrógeno positivo (principalmente de tipo luminal) y los tumores receptor de estrógeno negativo (predominantemente de tipo basal) confirmando la existencia de los subtipos moleculares identificados inicialmente (28,34,41).

Otras investigaciones se han realizado con el propósito de definir apropiada y suficientemente los subtipos moleculares, empleando técnicas distintas en tumores

previamente clasificados por microarrays (31,34,37,38,42-44). Bajo técnica de inmunohistoquímica con el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa, se ha intentado caracterizar en particular algunos de los subtipos definidos previamente con los análisis masivos de ADN de tejidos tumorales de mama (microarrays) en función del comportamiento biológico de cada uno (31,33,37,42-44).

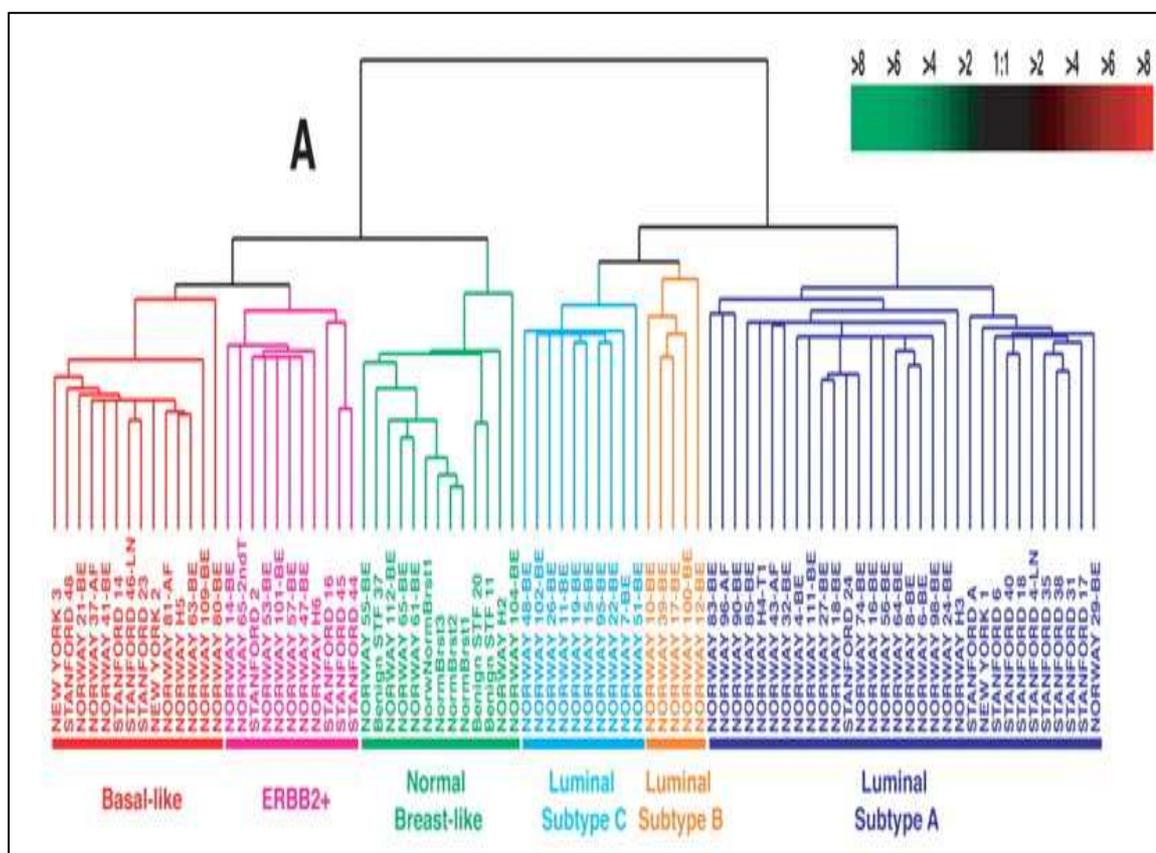


Figura 1. Patrón de expresión génica del carcinoma de mama por análisis de agrupamiento jerárquico de 476 genes del “set de genes intrínsecos” por Sorlie. Proc Natl Acad Sci USA (26).

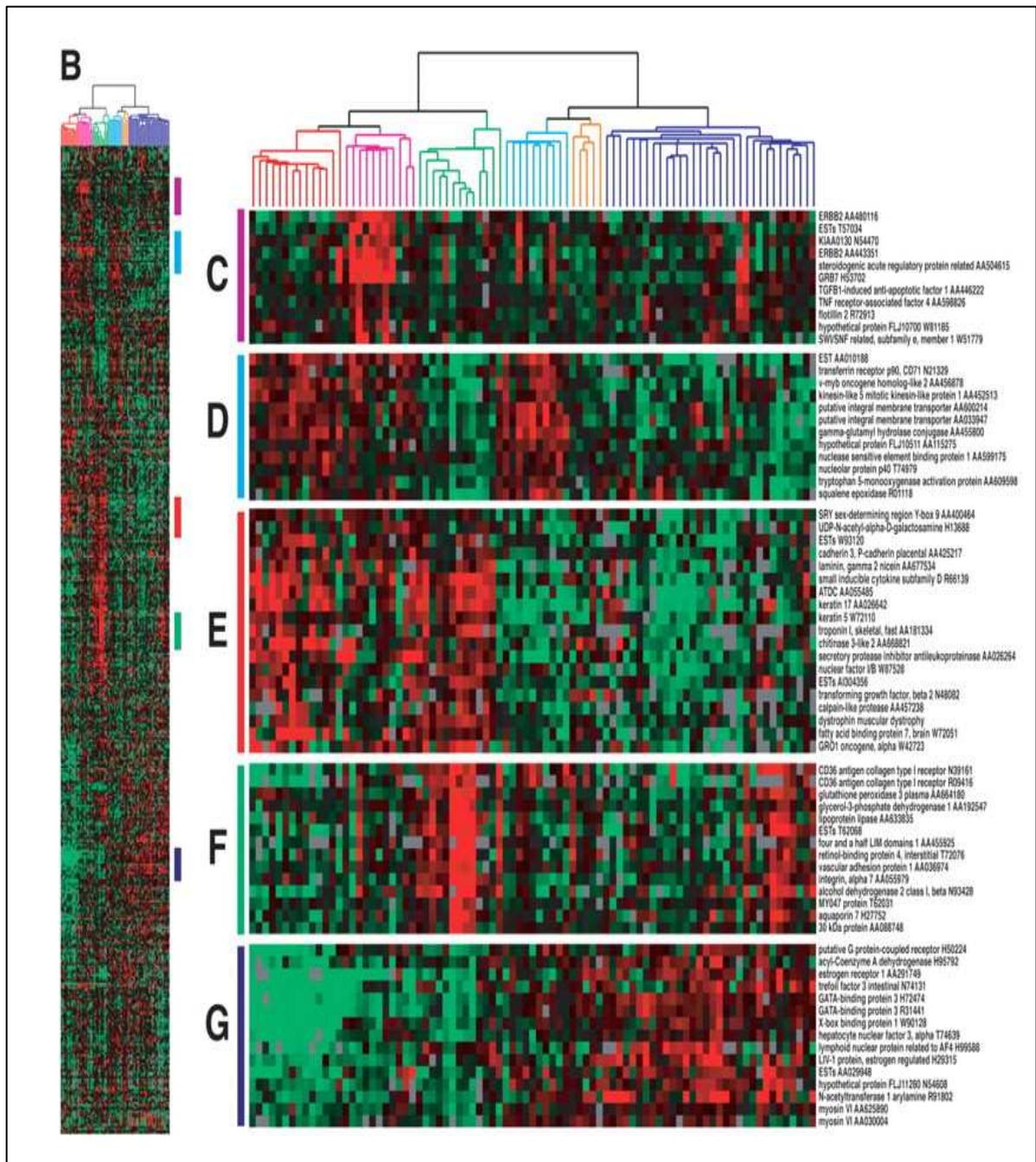


Figura 2. Patrón de expresión génica del carcinoma de mama por análisis de agrupamiento jerárquico de 476 genes del “set de genes intrínsecos” por Sorlie. Proc Natl Acad Sci USA (26).

Uno de los trabajos que inicialmente incluyó ambas técnicas anteriores, correlacionó los resultados del perfil molecular del análisis por microarrays de ADN y el resultante por inmunohistoquímica con la intención de caracterizar mejor tanto clínica como inmunohistoquímicamente al subtipo basal validando el significado de la expresión. De 2475 muestras de tumores de mama provenientes de pacientes con estadio I a III, incluidos en un ensayo clínico, se seleccionaron 930 por la disponibilidad del bloque de parafina y se distribuyeron en grupos de acuerdo al perfil molecular por el primer estudio de Sorlie y colaboradores, se identificaron los subtipos luminal A, B, basal, Her-2 y parecido a mama normal. En el subtipo en particular investigado, no solo se demostró por inmunohistoquímica altos niveles de expresión de citoqueratina 5, 6, 17, CD-117, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la negatividad del receptor de estrógeno y el Her-2, como los marcadores que definen el tumor y se correlacionaron mejor con su perfil de expresión génica. Por otra parte en relación a la clínica, ésta resultó distinta a conocida en los tumores distinguidos por la expresión del receptor de estrógeno, con peor pronóstico y menor supervivencia muy similar a los tumores Her-2. Resultados que coincidieron con otros estudios (23,27,28), validando aún más el significado clínico de la identificación del cáncer de mama del subtipo basal y la aplicabilidad en muestras incluidas en parafina (33).

Otros se han publicado utilizando esos y distintos marcadores moleculares por dicha técnica (33,37,42-44). En un estudio de 46 tumores de mama ductal infiltrante clasificados previamente por análisis de microarrays génico en 18 basales, 16 luminales y 12 Her-2, empleando tinción inmunohistoquímica para los marcadores RE, Her-2, EGFR, actina del músculo liso (SMA), citoqueratinas 5, 6, 8 y 18, p63, CD10 y vimentina, se observó que la expresión en los basales exhibía además del marcaje conocido y de

citoqueratinas 5 y 6, también inmunotinción significativa para EGFR y vimentina y menos significativa para SMA, p63, citoqueratina 8, 18 y CD10. Entretanto en los luminales sin discriminar en sus categorías (A, B, C), se observó que además de la expresión conocida de estos había marcaje significativo para citoqueratinas 8 y 18, mientras en los Her-2 se apreció menor expresión de EGFR y p63 (37).

Posteriormente, otro estudio con dicho método de inmunohistoquímica utilizando en particular p-cadherina (P-CD), citoqueratina 5, p63, Bcl2 y Ki67 en 118 muestras tumorales de carcinoma de mama ductal infiltrante previamente separados en grupos de acuerdo al perfil genético por técnica de microarrays, demostró que los tumores basales y Her-2 podían ser definidos también por la inmunoexpresión de marcadores como p63, citoqueratina 5 y p-cadherina, aparte de una mayor tasa de proliferación (mayor nivel expresión de Ki67), mientras que los luminales A mostraron además de la expresión al RE, la del marcador Bcl2 en mayor frecuencia que los luminal B (42).

Otras publicaciones dieron a conocer la asociación entre el subtipo molecular, el pronóstico, sensibilidad y respuesta a la quimioterapia, exponiendo diferencias entre las clases moleculares (27,33,35,36,38). Las investigaciones iniciales de Sorlie y sus colaboradores, como de otros grupos posteriores, expusieron la distinción del perfil genético y sus implicaciones clínicas, donde los tumores basales y Her-2 presentaban peor pronóstico que los otros subtipos (27,35), lo cual de acuerdo a otras investigaciones sucesivas, estaría relacionado a la fuerte asociación entre las clases definidas y las variables histopatológicas clásicas. Así en un estudio de 82 muestras tumorales estratificadas en subtipos moleculares por el perfil genético, se demostró que los

luminales eran de grado histológico bajo o intermedio es decir tumores mejor diferenciados y que los basales eran de alto grado histológico o peor diferenciados, como los primeros de mejor evolución que los últimos (35), aunque de menor sensibilidad a la quimioterapia que los basales (36).

En otra serie de 194 muestras de carcinoma de mama ductal infiltrante, esta vez clasificados por inmunohistoquímica como luminal A, B, C, basal y Her-2 se estudió la asociación con variables clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas. En ésta se destacó también la relación entre los grupos basal y Her-2 con formas histológicas peor diferenciadas (62% y el 60%, respectivamente) y características clínicas asociadas de mal pronóstico como del grupo luminal A con tumores bien diferenciados y mejor pronóstico, además de una expresión mayor de Ki67 y p53 en el grupo basal y Her-2 (55,5%) respecto a los otros grupos (43).

En relación a la predicción de la respuesta a la quimioterapia, hay ejemplos de investigaciones exitosas en este sentido. Un modelo predictor de pronóstico se desarrolló en base a 70 genes en 78 cánceres de mama, seleccionados en dos grupos iguales, con o sin recaída tumoral en 5 años (23). Este predictor del pronóstico general, funcionó bien en la validación con casos independientes (45,46). Otros investigadores tomaron una aproximación diferente e identificaron genes que fueron asociados con la recaída, separadamente para los subgrupos de pacientes receptor de estrógeno negativo y positivo. Los marcadores que fueron seleccionados para cada grupo fueron entonces combinados para formar una señal pronostica de 76 genes (47) lo cual también funcionó cuando fue probado en 180 casos independientes (48).

Varios análisis evaluaron la relación entre subtipos moleculares del cáncer de mama, estado hormonal, raza y supervivencia (31,39,49). Uno de ellos con 496 muestras tumorales de mujeres menores y mayores a 50 años de edad, afroamericanas y no afroamericanas clasificados de acuerdo a la expresión del perfil por microarreglos de ADN y por inmunohistoquímica; demostró que los tumores luminales exhiban positividad para el receptor de estrógeno o progesterona diferenciándose en la expresión del Her-2, el cual es positivo en el subtipo B, entretanto los basales no expresan receptor de estrógeno, progesterona ni Her-2 pero si citoqueratinas 5, 6 y EGFR y p53, además de exhibir un alto índice mitótico. Igualmente señalaron que el subtipo basal es más frecuente en las mujeres afroamericanas pre-menopáusicas que en las post-menopáusicas, como el luminal en las no afroamericanas de cualquier edad, a diferencia del Her- 2 que no varia con el estatus hormonal o la raza.

Uno de los trabajos más reciente acerca de ésta clasificación molecular del cáncer de mama se publicó en el año 2009 (49). En éste a 242 pacientes con carcinoma ductal infiltrante y un seguimiento de 5 años aplicando la clasificación simplificada de Carey y colaboradores (32) a las muestras tumorales de los mismos, se observó la asociación significativa de la sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global con el subtipo molecular, lo que otorgó como otros estudios (35,39,44,45,47) significado clínico al patrón biológico de cada uno y la utilidad de dicha clasificación para la predicción del pronóstico (47-49).

Es evidente que con las nuevas tecnologías es posible que otros estudios en el futuro logren definir nuevos agrupamientos y mejoren la clasificación molecular de la neoplasia (50).

2.2 BASES TEÓRICAS

2.1 Definición de carcinoma de mama

El carcinoma de mama representa una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios.

2.2 Epidemiología

El carcinoma de mama es el tumor maligno más frecuente de la población femenina a nivel mundial. De 6 millones de tumores malignos que se diagnosticaron en las mujeres en el año 2007, el carcinoma de mama se ubicó en primer lugar con 1,3 millones, 27% de ellos en países desarrollados y 19% en países en desarrollo. El incremento del número de casos nuevos entre el 2002 y 2007 en los países desarrollados fue dos veces mayor que el observado en los países en desarrollo (8,9,51,52).

En un recorrido por los países industrializados, una de cada nueve mujeres desarrolla esta neoplasia a lo largo de su vida y la tercera parte de ellas, muere a consecuencia de ésta. En España la incidencia del carcinoma de mama varía entre 40 y 75 por 100.000 mujeres, según datos obtenidos por los distintos registros españoles de cáncer de base poblacional. En lo que respecta a la tasa de mortalidad, en dicho país, se ha detectado una fluctuación entre 26,7 por 100.000 mujeres a 22 por 100.000 en

las últimas dos décadas. Sin embargo en el año 2008 ésta se sitúa en 28 por 100.000 mujeres lo que revela una tendencia al incremento según los registros publicados (3,4,9).

De acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer, la incidencia en los Estados Unidos, ha experimentado un incremento del 2% anual desde 1980, estimándose que alrededor del 3,5% de sus mujeres morirán de dicha enfermedad en los próximos años (10,53).

Cifras recientes muestran que la mortalidad por ésta neoplasia en países del Caribe Inglés y el Cono Sur es la más alta de Latinoamérica y del Caribe, en contraste con la que se registra en Centroamérica. Sin embargo, varios estudios confirman que la mortalidad en la mayoría de los países latinoamericanos va en aumento en particular en los países que hace unos años contaban con mortalidad relativamente baja, como Colombia, Costa Rica, Ecuador, México y Venezuela (9,51,52).

En México según datos del registro histopatológico de neoplasias y el sistema nacional de información en salud, su incremento en las estadísticas de morbilidad y mortalidad es cada vez más parecido al de los países del primer mundo (8,51-54).

Así mismo desde el 2001 al 2006 en Colombia, ésta representaba la segunda neoplasia maligna más frecuente en mujeres, después del carcinoma de cuello uterino; siendo además, la mayor causa de muerte en mujeres entre los 15 a 54 años, mientras que

en Chile pasó de ser la tercera causa de muerte, con una tasa de 13 por 100.000 mujeres para el 2001, a la segunda causa con una tasa superior de 25 por 100.000 mujeres para el año 2006 (9,11,52,55-60).

En Venezuela en las últimas décadas, diariamente en la población femenina, se diagnostican nuevos casos de carcinoma de mama, donde aproximadamente la mitad fallece por la enfermedad, engrosando las estadísticas de morbi-mortalidad. Así tenemos que durante el período 1998 al 2000, según datos disponibles del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, ésta neoplasia representaba la segunda causa de muerte por enfermedad maligna en las mujeres, con una tasa de mortalidad de 11 por 100.000. A partir del año 2001 al 2003, la tasa de mortalidad experimentó un aumento significativo de 14 por 100.000 mujeres y en los siguientes años, 2004 y 2005, según la misma fuente la situación se modificó de forma notable, pasando a ocupar la primera causa de muerte, desplazando a un segundo lugar al carcinoma de cuello uterino desde ese año.

Al revisar los registros disponibles de las fuentes autorizadas, se puede apreciar un aumento del número de casos nuevos y defunciones por esta patología. En el año 2005, se registraron 3408 casos y 1.441 defunciones, en tanto en el 2007, se totalizaron 3549 casos y 1.465 defunciones y en el año 2010, 4073 nuevos casos y 1.723 defunciones (5,60,61,62).

Si lo anterior es preocupante, lo es aún más que del 70% de los casos que se diagnostican en nuestro país a diferencia de lo que ocurre en otros desarrollados se realiza

en estadios localmente avanzados (estadios IIB, IIIA y IIIB, IIIC) y metastásicos (IV) (3-5,63).

2.3 GENERALIDADES DE GLÁNDULA MAMARIA

2.3.1 Embriología

Hacia la cuarta semana de la gestación, la primera manifestación de las glándulas mamarias se observa en forma de una invaginación nodular a lo largo de un engrosamiento a manera de banda en la epidermis, la línea mamaria o pliegue mamario. En el embrión de siete semanas, ésta línea se extiende a ambos lados del cuerpo, desde la base de la extremidad superior (axila) hasta la región de la extremidad inferior (ingle). Aún cuando la parte principal de la línea mamaria desaparece poco después de formarse, persiste un pequeño segmento en la región torácica que se introduce en el mesodermo subyacente. En este sitio se forman 15 a 20 brotes, los cuales a su vez dan origen a pequeñas evaginaciones macizas. Al final de la vida intrauterina los brotes epiteliales se canalizan y forman los conductos galactóforos, mientras que las evaginaciones constituyen los conductos de menor calibre y los alveolos de la glándula (64).

En un principio los conductos galactóforos desembocan en un pequeño hundimiento epitelial, poco después del nacimiento éste hundimiento se convierte en pezón por proliferación del mesodermo subyacente (64,65).

2.3.2 Anatomía

La mama descansa sobre el músculo pectoral mayor, extendiéndose verticalmente desde el nivel de la segunda a la sexta o séptima costilla y en sentido horizontal desde el borde lateral del esternón hasta la línea anterior o media de la axila. A nivel del extremo anterior más distal del tórax, a la altura del tercer espacio intercostal, la piel se especializa para formar la areola y el pezón (64,65).

Cada mama se ubica dentro de la aponeurosis superficial de la pared torácica anterior, por lo que la superficie anterior de la glándula está limitada por la capa superficial y la superficie posterior por la capa profunda de dicha aponeurosis, a través de la cual descansa sobre la aponeurosis profunda que reviste el músculo pectoral mayor, serrato anterior, y oblicuo externo del abdomen y la parte superior de la vaina de los rectos (aponeurosis profunda de la pared torácica). Entre la capa profunda de la aponeurosis superficial y la aponeurosis del pectoral mayor y los músculos contiguos se encuentra la bolsa retromamaria la cual contribuye a la movilidad de la mama sobre la pared torácica. La cola de la mama o cola de Spencer se extiende en el interior del pliegue axilar anterior (65). Bandas fibrosas de tejido conectivo (ligamento de Cooper) se extienden entre el tejido parenquimatoso de la glándula desde la capa profunda de la aponeurosis superficial a la dermis de la piel que cubre la mama brindando sostén y movilidad. La glándula mamaria recibe su irrigación sanguínea de ramas perforantes de la arteria mamaria interna (torácica interna), ramas de la arteria axilar como las torácicas (torácicas altas y laterales) y el tronco toracoacromial (64,65).

El drenaje venoso es realizado principalmente por la vena axilar, aunque también pueden participar las venas torácica interna e intercostales.

Los linfáticos tienen su origen en redes cutáneas, glandular y en los linfáticos de los conductos galactóforos. La inervación es dada por las ramas anteriores y laterales de los cinco nervios intercostales correspondientes, del supraclavicular y del plexo cervical superficial. El pezón es inervado por la distribución dermatómica del nervio torácico T4 (64,65).

2.3.3 Histología

La mama en el ser humano, es una glándula exocrina, en la cual existe tejido epitelial, conjuntivo y adiposo. En la mujer adulta, ésta se encuentra constituida por 15 a 20 lóbulos de tejido glandular de tipo tubuloalveolar (sistema independiente de conductos muy ramificados).

En cada lóbulo mamario se pueden diferenciar las siguientes estructuras: conducto galactóforo, conducto segmentario, conducto subsegmentario, conducto terminal y acinos (Figura 3) (64). El tejido epitelial está formando los acinos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche y los ductos o conductos, un conjunto de estructuras tubulares y huecas, cuyas luces confluyen progresivamente en canalículos progresivamente más gruesos hasta terminar en uno de las doce a dieciocho dilaciones excretoras denominadas conductos galactóforos o lactíferos situados

inmediatamente detrás del pezón. Cerca de su desembocadura los senos lactíferos están revestidos por un epitelio escamoso estratificado no queratinizado (64,65).

El revestimiento epitelial de los conductos mamarios principales es columnar pseudoestratificado y muestra una transición gradual hasta que se convierte en un epitelio de dos capas de células cubicas en seno galactóforo. Las células mioepiteliales (células aplanadas) se localizan dentro del epitelio y entre sus células y las de la lámina basal. Estas células que contienen miofilamentos se encuentran dispuestas en forma similar a una malla en la porción secretora de la glándula pero más claramente en los conductos de mayor calibre.

La lámina o membrana basal constituida por un conglomerado de fibras colágenas y elásticas en proporción diferente, es una capa de sostén sobre la cual descansan las células parenquimatosas de las glándulas tubuloalveolares, así como las epiteliales y mioepiteliales siguiendo a los conductos (64,65). Los lobulillos están incluidos en un estroma laxo, delicado, mixomatoso que contiene linfocitos dispersos (tejido conectivo intralobulillar), y cada uno de los lobulillos está incluido en un estroma interlobulillar más denso, colágeno y fibroso (Figura 3).

Desde la semana 28 del desarrollo embrionario, el epitelio de la mama humana normal está formado por dos capas de células, una capa interna o luminal y una capa externa, junto a la membrana basal, denominada capa basal (Figura 3). Esta capa basal es morfológicamente heterogénea en cuanto a que las células pueden ser fusiformes o

cuboidales, dependiendo de su localización en la estructura ramificada de los ductos mamarios y del estado hormonal o menopáusico del tejido. Estas células pueden distinguirse de las células basales del epitelio escamoso estratificado porque presentan características de células musculares lisas, incluyendo expresión de actina de músculo liso (SMA), miosina y endopeptidasa neutral (CD10). El término de célula mioepitelial se impuso para describir células con características tanto epiteliales como con proteínas contráctiles (66,67).

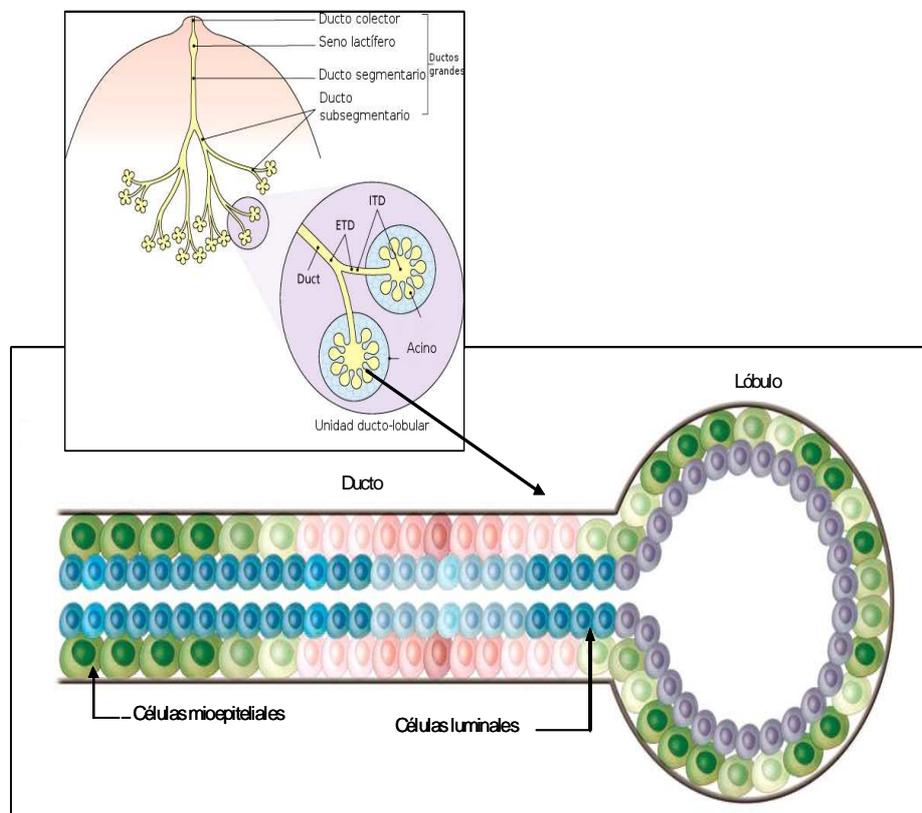


Figura 3. Esquema del componente epitelial de la mama modificado por KorsCking. Anticancer Res 2001 (77).

2.4 CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA DE MAMA

Dentro de la patología mamaria en general y del carcinoma de mama en particular existen dos tipos de clasificación que es imprescindible conocer: una es la clasificación clínica en base al TNM clínico y la otra es la clasificación patológica de los tumores (histopatológica) (14,24).

2.4.1 Clasificación clínica

La clasificación clínica del carcinoma de mama se fundamenta en el sistema TNM clínico, el cual se basa en la evaluación del tumor primario y los sitios de diseminación frecuente de la neoplasia (ganglios linfáticos regionales y órganos como pulmón, hígado y hueso) (14,24).

Cada letra del sistema de clasificación tiene un significado, así la letra **T** acompañada de un número entre 0 y 4 indica el tamaño tumoral y la extensión a la pared torácica incluso su piel. Al aumentar el número, mayor es el tamaño del tumor y/o extensión a tejidos circundantes. La letra **N**, acompañada de un número de 0 a 3 indica si el tumor se ha extendido a ganglios linfáticos regionales. La letra **M** acompañada de un número de 0 a 1 indica si el tumor se ha extendido a órganos distantes. Valorada así las características del carcinoma de mama se establece el estadio clínico o extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico, el cual comprende desde el estadio 0 al IV (Tabla 1) (14,68).

Estadio 0: Indica que el tumor no es infiltrante (intraductal, lobular in situ, Enfermedad de Paget del Pezón), por lo que no habrán metástasis ni regionales ni a distancia.

Estadio I: Indica que el tumor es menor de 2 cm (T1) y no hay metástasis en ganglios linfáticos regionales ni a distancia.

Estadio II: Comprende dos situaciones que dan lugar a la subdivisión del estadio, así observamos: 1. El tumor que mide menos o igual a 2 cm (T0-1) pero los ganglios linfáticos de la axila están afectados (N1) o el tumor que mide entre 2 y 5 cm (T2) y no tiene extensión regionalmente (N0), lo cual corresponde al IIA. 2. El tumor que mide entre 2 y 5 cm (T2) y presenta extensión regional (N1) y el tumor que mide más de 5 cm (T3) pero los ganglios linfáticos axilares no están afectados (N0), lo que corresponde al IIB.

Estadio III: comprende varias formas que dan lugar a la división del estadio, así observamos: 1. El tumor mide menos de 5 cm (T0-2) y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares, los cuales están unidos entre sí o a otras estructuras (N2) o el tumor que mide más de 5 cm (T3) y los ganglios linfáticos axilares están afectados (N1-2), lo que corresponde al IIIA. 2. El tumor que se ha extendido a otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax) (T4) y puede o no presentar extensión a

ganglios linfáticos regionales (N0-2), lo que representa el IIIB. 3. El tumor que puede tener cualquier tamaño (cualquier T) pero se ha diseminado a los ganglios linfáticos infraclaviculares homolaterales o de la cadena mamaria interna o supraclaviculares homolaterales, correspondiendo al IIIC.

Estadio IV: Indica que el tumor se ha extendido a distancia en el organismo. Las zonas donde aparece con mayor frecuencia la metástasis es en los huesos, pulmones, hígado o cerebro. También puede suceder que el tumor haya afectado localmente a la piel.

El sistema de clasificación TNM ha sufrido reiteradas modificaciones dirigidas a una más completa y significativa estadificación de los pacientes. La versión vigente desde el año 2003 y propuesta por la American Joint Committee (AJCC) ha introducido cambios en razón de las nuevas técnicas diagnósticas de mamografía (alta resolución y digital), ganglio centinela, de biología molecular (PCR) e inmunohistoquímica utilizadas para valorar el tamaño tumoral y el estado ganglionar.

La nueva versión del TNM tiene la ventaja de corresponder exactamente con la edición actual del sistema de gradación de la International Union Against Cancer (UICC) (Tabla 1), lo cual resulta muy práctico para el intercambio de información entre centros oncológicos (14,67).

Los principales cambios introducidos con la última modificación consisten:

- En la separación de las micrometástasis y células tumorales aisladas en base al tamaño y evidencia histológica de actividad maligna.
- El uso de la disección del ganglio centinela y de técnicas inmunohistoquímicas y moleculares.
- La clasificación del estado ganglionar de acuerdo al número de ganglios con metástasis, identificados con hematoxilina eosina (HE) o con inmunohistoquímica.
- La reclasificación de las metástasis en los ganglios de la mamaria interna basados en el método de detección y ante la presencia o ausencia de afectación de los axilares. La metástasis microscópica hallada con la técnica del ganglio centinela se clasifica como N1. Si la metástasis se detecta por imagen (excepto por linfocintigrafía) o examen físico como N2. Si hay además presencia de metasatasis axilares es N3.
- La metástasis supra e infraclaviculares clasifican como N3.

Cuadro 1. Agrupamiento por estadio del carcinoma de mama

AJCC 1997-2002		UICC 2002
Estadio 0	Tis, N0, M0	Estadio 0
Estadio I	T1, N0, M0	Estadio I
Estadio IIA	T0, N1, M0	Estadio IIA
	T1, N1, M0	
	T2, N0, M0	
Estadio IIB	T2, N1, M0	Estadio IIB
	T3, N0, M0	
Estadio IIIA	T0, N2, M0	Estadio IIIA
	T1, N2, M0	
	T2, N2, M0	
	T3, N1, M0	
	T3, N2, M0	
Estadio IIIB	T4, N0, M0	Estadio IIIB
	T4, N1, M0	
	T4, N2, M0	
	Cualquier T, N3, M0	Estadio IIIC
Estadio IV	Cualquier T, cualquier N, M1	Estadio IV

American Joint Committee (AJCC) e International Union Against Cancer (UICC), International Union Against Cancer (UICC). González. Rev Esp Patología 2004(67).

2.4.2 Clasificación patológica

Se basa en el origen de la neoplasia, distinguiendo tumores epiteliales, mioepiteliales, mesenquimales, fibroepiteliales, del pezón, linfoma maligno,

metastáticos y de la mama masculina. Los más frecuentes son los de origen epitelial (carcinomas), los cuales se dividen en infiltrantes y no infiltrantes (24).

- **No infiltrantes:** Carcinoma intraductal y carcinoma lobular in situ.
- **Infiltrantes:** Carcinoma ductal infiltrante sin otra especificación, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma tubular, carcinoma cribiforme, carcinoma medular, carcinomas con abundante mucina, carcinomas neuroendocrinos, carcinoma papilar infiltrante y otros 11 subtipos menos frecuentes.

2.4.3 Clasificación molecular

El cáncer de mama se divide en dos grupos principales basados en la presencia de expresión genética del receptor de estrógeno (RE), el cual se ha observado como el mayor factor discriminador del subtipo molecular. De acuerdo a lo anterior y la expresión de otros genes los diversos subtipos moleculares se diferencian, situación también observable con la combinación de la expresión de un patrón de marcadores moleculares por inmunohistoquímica (24,26,28,31,33,34,36,38,68-70). Así se distinguieron los tumores receptor de estrógeno positivo (RE +), que comprendieron los subtipos luminales A, B y C, este último de estabilidad no muy clara y los tumores receptor de estrógeno negativo (RE -), que incluye los subtipos Her-2, basal (Tabla 2) y parecido a la mama normal, caracterizado por expresar un gran número de genes del epitelio mamario normal, motivo que llevó a su eliminación de la clasificación molecular actual (26-29,34-38).

Suptipo luminales: Tiene un patrón que concuerda con el componente epitelial de la glándula mamaria y expresan el receptor de estrógeno (RE) o el receptor de progesterona (RP) o ambos receptores hormonales y citoqueratinas 7, 8, 18 (Ck7, Ck8,

Ck18), menos del 20% expresan p53 y pueden o no expresar Her-2. Diferenciándose en A, B según la expresión de los receptores hormonales y el Her-2 de acuerdo principalmente a los estudios de Perou, Sorlie, Nielsen, Livasy, Carey y sus colaboradores (26-29,33,34,36-38,42,43,68).

Subtipo Her-2: No expresan receptores hormonales, pero si Her-2, así como otros genes localizados en el amplicon ERBB2 tal como el GBR7, además 40 a 80% expresan mutación del p53 de acuerdo a lo señalado por Perou, Sorlie, Nielsen, Carey, Livasy, Matos, Muños y otros en sus trabajos (26,28,31,33,37,42,68-70).

Subtipo basal: Tienen un patrón semejante al de las células basales y a las células mioepiteliales de la mama, expresan en particular citoqueratinas 5, 6, 14 y 17 (Ck5, Ck6, Ck14, Ck17), marcadores de proliferación celular como el Ki67, EGRF y mutación de p63 y p53, pero no expresan receptores hormonales ni Her-2, es decir, son triple negativos en relación a los estudios de Carey, Matos, Jorge, Muñoz y otros (31,42-44).

En el análisis solo por técnica inmunohistoquímica, se han admitido los subtipos moleculares: Luminal A y B, Her-2 y Triple negativo (TN), que

se ha subdividido en basal (TNB) y no basal (TNnB), de acuerdo a la expresión de marcadores característicos de células basales como la CK5 Ck6, p63, EGFR y otros.

Cuadro 2. Clasificación molecular del carcinoma de mama por diversos estudios

Análisis por expresión génica e inmunohistoquímica

RE(+)	Luminal A:	RE(+) RP(+) Her-2(-) ¹ RE(+) RP(+) Her-2(-) Ck8(+) Ck18(+) ²
	Luminal B:	RE o RP(+) Her-2(+) ¹ RE o RP(+) Her-2(-) Ck8(+) Ck18(+) ² RE(+) RP(+) Her(+) ²
RE(-)	Her-2:	RE(-) RP(-) Her-2(+) ¹ RE(-) RP(-) Her-2(+) EGRF(+) ² RE (-) RP(-) Her-2(+) ⁴
	Basal:	RE(-) RP(-) Her-2(-) Ck5(+) Ck6(+) p53(+) ⁵ RE(-) RP(-) Her-2 (-) Ck5(+) Ck6(+) ¹ Ck14 ⁶ RE(-) RP(-) Her-2 (-) Ck5(+) Ck6(+) EGRF(+) CD10 (+) ² RE(-) RP(-) Her(-) EGRF (+) ⁴ RE(-) RP(-) Her-2(-) C5(+) Ck6(+) p63(+) EGRF (+) CD117 ⁷ RE (-) RP(-) Her-2(-) p53 (+) EGFR(+) ³

Análisis por expression inmunohistoquímica

RE(+)	Luminal A:	RE(+) RP(+) Her-2(-) ¹
	Luminal B:	RE o RP(+) Her-2(+) ¹ RE(+) RP(+) Her(+) ²
RE(-)	Her-2:	RE(-) RP(-) Her-2(+) ¹
	Triple negativo:	No basal: RE(-) RP(-) Her-2(-) ^{1,2,4} Basal: RE(-) RP(-) Her-2(-) Ck5(+) Ck6(+) p63(+) EGFR(+) ^{1,2,4,7}

Definición de la clasificación molecular del carcinoma de mama de acuerdo a distintos estudios: 1-Nielsen y col 2004, 2- Livasy col 2006, 3-Piñero y col 2008, 4-Carey y col 2006/2007, 5-Sorlie y col 2001/2003, 6-Gusterson y col 2005, 7-Jorge y col 2008. Creación del autor.

2.5 BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA DE MAMA

2.5.1 Biología molecular del carcinoma de mama

El carcinoma de mama considerado una enfermedad clonal, sugiere que su origen, es resultado de la acumulación de mutaciones somáticas o germinales, como su desarrollo, probablemente, un proceso secuencial de múltiples etapas que se inicia con las alteraciones en el epitelio de la unidad ductolobular normal, pasando por los trastornos hiperplásicos y el carcinoma intraductal hasta llegar al carcinoma infiltrante (Figura 4). Se ha propuesto que las principales anormalidades en la expresión de su perfil genético, hasta ahora poco conocidas, ocurren en la transición de lo normal a premaligno y la progresión de lo maligno no invasor a infiltrante (71-74). Es interesante subrayar que dichas alteraciones implican, la secuencia, la progresión y la integridad del linaje celular por parte de las células alteradas, las cuales sobreviven y se adaptan al medio para su desarrollo, cuyo resultado final es la perpetuación tumoral, la invasión neoplásica y finalmente, la capacidad de producir metástasis (72).

En su desarrollo, una de las primeras alteraciones que ocurre, es la respuesta anormal del receptor de estrógeno, en la cual la modulación puede llevarse a cabo sin la unión directa al ADN, culminando en la transcripción de proteínas esenciales (Figura 5) para la multiplicación celular (ciclina D1, c-fos, c-jun, c-myc y c-myb), e inhibiendo la transcripción de otras con efecto contrario

(p21^{cipl/waf1} p27^{kipl} y TGF- β), resultando finalmente en un aumento de la capacidad de mitosis de la célula estimulada. Hallazgo demostrado en cada una de las lesiones precursoras, como también la expresión variable del receptor y sus isoformas, en relación, probablemente, con una mayor sensibilidad y estabilidad de los mismos receptores, alterados en las células neoplásicas, producto de los trastornos de la regulación proteica intracelular, como de las mutaciones en los genes encargados de su síntesis (72,73,75).

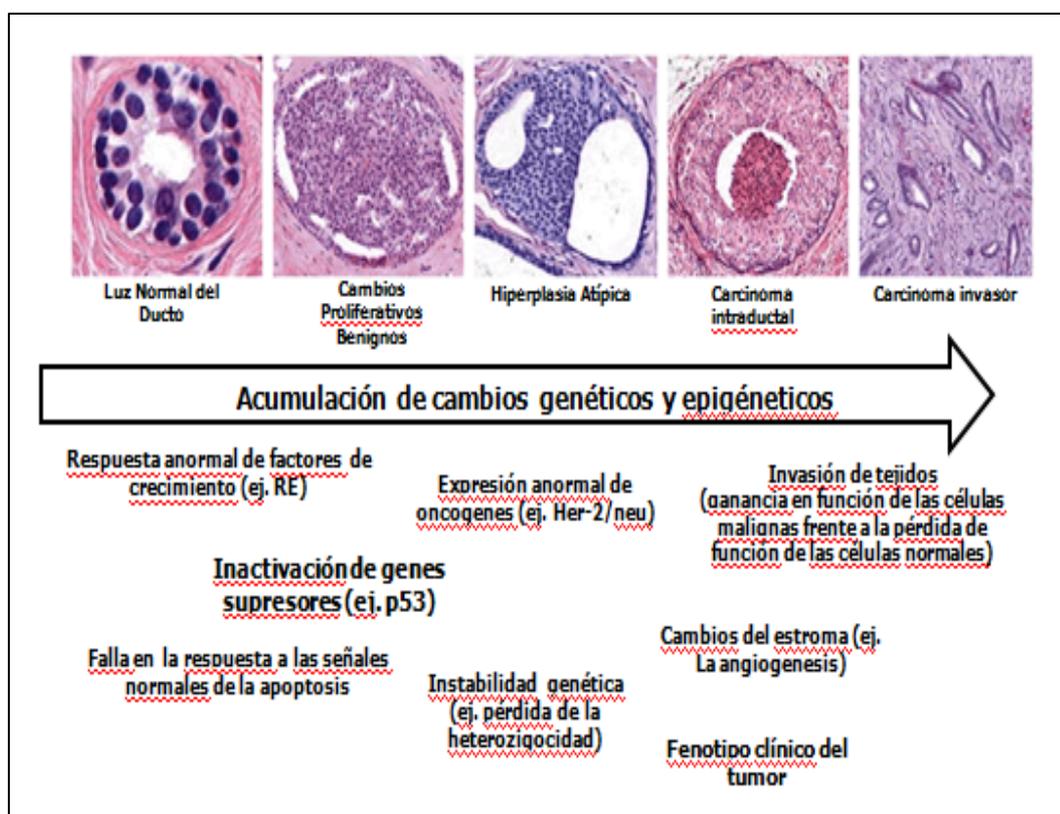


Figura 4. Origen y desarrollo del cáncer de mama. Imagen tomada de patogénesis del carcinoma mamario. Van De Vijver. Rev Esp Patol 1999 (71).

El receptor de progesterona que media los efectos de la hormona progesterona y desempeña un papel crucial en el desarrollo de la glándula mamaria y la génesis del carcinoma, presenta un aumento significativo en la progresión a la malignidad, predominantemente de la isoforma α en el carcinoma intraductal e infiltrante (76). Al mismo tiempo que ocurren las anteriores, se producen otros diferentes trastornos en la respuesta normal a la apoptosis, como consecuencia del aumento del número de anomalías cromosómicas en los genes inhibidores del ciclo celular y otros oncogenes. Se ha evidenciado durante el proceso evolutivo, la pérdida o ganancia de material cromosómico en locus específicos (pérdida de la heterogenicidad), la amplificación de ciclina D1, Her-2 y c-myc, así como la inactivación del gen p53 (72,77,78).

El resultado de esas alteraciones se han descrito tanto en la hiperplasia ductal típica, atípica y en el carcinoma intraductal, como más tempranamente en las células de apariencia normal, destacándose sin embargo, la rareza de la amplificación del gen c-myc en las lesiones intraductales a diferencia de lo evidenciado en las infiltrantes (72).

En este proceso de interrelaciones, la mutación del p53 y su producto, provoca la pérdida de la regulación de la progresión del ciclo celular, debido a la incapacidad para reparar el ADN o inhibir la diferenciación celular o inducir la apoptosis (77,79).

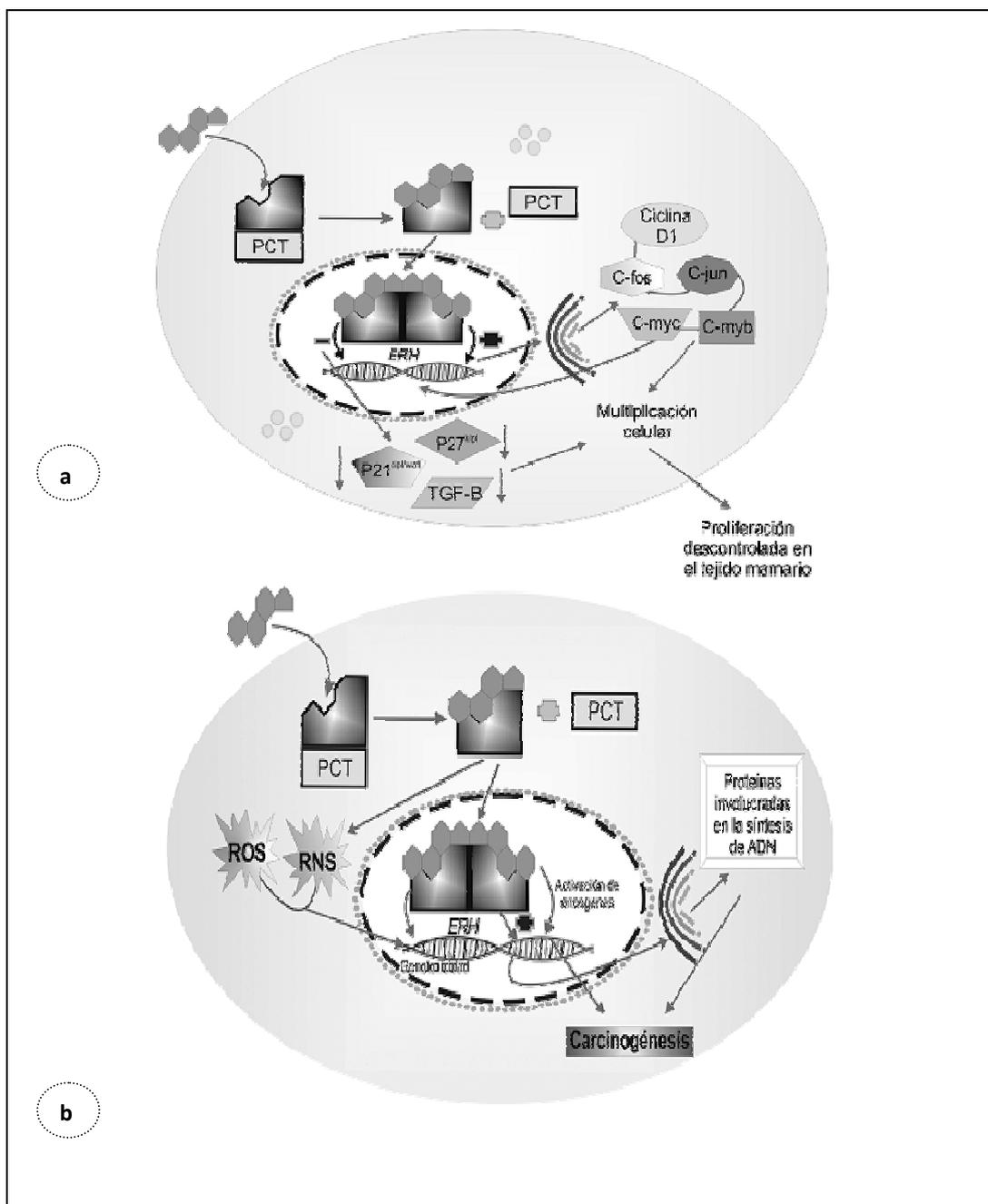


Figura 5. Receptor de estrógeno. a. El complejo hormona-receptor dimerizado viaja al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a hormonas regulando la expresión de genes específicos, en particular, factores de transcripción. b. Mecanismo de transformación y multiplicación de las células del epitelio mamario por activación del RE por la hormona. Chen. J Natl Cancer Inst 2000 (75).

Por otra parte los genes p63 y p73 miembros de la familia de genes p53 y sus proteínas se han relacionado también al proceso neoplásico. El alto grado de similitud de las proteínas p63 y p73 a regiones evolutivamente conservada de la estructura de la proteína p53 sugiere que aquellas tienen un papel importante y potencialmente redundante en la regulación de la detección ciclo celular y la apoptosis. Las isoformas de las proteínas transactivadas del p73 y p63 (que poseen el dominio transactivador N- terminal) muestran propiedades similares al p53 las cuales pueden además unirse a la secuencia de unión del ADN de este último tras activar los genes promotores del mismo, mientras las isoformas no transactivadas (carentes del dominio transactivador N- terminal) actúan sobrepasando el arresto del ciclo celular propiciando la multiplicación de células defectuosas (80-82).

La ciclina D1 interviene en la iniciación del ciclo celular en la fase G1. La amplificación y su sobreexpresión relacionada también con el p53 mutado, inhibe igualmente la apoptosis, provocando en conjunto la replicación y división de células genómicamente alteradas (77,79).

El Bcl2 y la relación entre los miembros de su familia, interviene también en el control del ciclo celular, regulando la apoptosis a través del predominio de sus miembros antiapoptóticos (bcl2, bclxl) sobre aquellos de acción proapoptótica (bax, bad, bclxs). La pérdida de la región reguladora negativa (Delta 32-68) entre estos miembros, limita el efecto conjunto del p53-Bcl2 en la muerte de las células

con daño del ADN a favor de la función de este último y la supervivencia de las clonas alteradas (83,84). El más tardío evento en el desarrollo del carcinoma de mama, es la alteración de la activación que sufre el receptor Her-2 (amplificación y/o sobreexpresión), la cual ocasiona una proteína mutada que ofrece a las células neoplásicas, el aumento en la capacidad de crecimiento, la adhesión, la diferenciación y la migración celular, proporcionando la oportunidad a las mismas de alcanzar mayor volumen y de originar metástasis. La expresión de dicha proteína se ha mostrado que tiene una mayor incidencia en los carcinomas intraductales tipo comedocarcinoma, en contraste con los intraductales de bajo grado o los carcinomas infiltrantes (lobulillar o ductal) (72,85).

Además se producen otras alteraciones en la activación de varios receptores del factor de crecimiento, como en el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor de factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFR) y el receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) (86). La activación del EGFR provoca proliferación, diferenciación, adhesión celular y protección frente a la apoptosis e igualmente se ha relacionado con la angiogénesis, la motilidad y migración celular, y por tanto con la capacidad invasora tumoral. (87).

En el crecimiento y la adhesión celular, como en la resistencia a la apoptosis, actúa el factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I), el cual contribuye en sinergismo con los receptores hormonales al desarrollo y la

perpetuación de la neoplasia (72,88). Por su parte el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que regula la angiogénesis y linfaangiogenesis induce la expresión de proteínas proapópticas, evitando la muerte de las células endoteliales de los vasos sanguíneos inmaduros, proporcionando la posibilidad de migración, invasión y metástasis, además de aumento de volumen tumoral por activación de la vía de la proteína p44/42 mitogen-activada kinase (MAPK) (72,89,90).

Aunque se ha comprobado que las citoqueratinas actúan como reguladores de la fisiología celular en las vías de señalización intracelular, la protección de la apoptosis y la cicatrización su papel en la carcinogénesis de la mama no se conoce todavía muy bien, lo que si se sabe es que intervienen en el comportamiento biológico tumoral (91). Finalmente, es interesante señalar que estos y otros elementos moleculares, intervienen constituyendo diferentes vías interrelacionadas para la génesis, perpetuación, progresión y comportamiento biológico del carcinoma de mama.

2.5.2 Receptores y proteínas. Marcadores moleculares

Receptor de estrógeno

El gen del receptor de estrógeno humano (RE) que actúa como un traductor de señal hormonal, se localiza en los cromosomas 6 (6q25.1) y 14 (14q22-24) bajo las

isoformas alfa (α) y beta (β) respectivamente (91-94). La isoforma alfa codifica una proteína de 65 kDa formada por 595 aminoácidos y la beta codifica dos, una de 55 kDa y otra de 60 kDa de 485 y 530 aminoácidos respectivamente. La isoforma α se expresa principalmente en la mama, útero, hipotálamo hipófisis y ovario y la β principalmente en riñón, timo, pulmón, bazo, hipotálamo, hipófisis, próstata, testículo, sistema digestivo, vejiga y ovario. Ambas isoformas pueden ser coexpresadas en varios tejidos y formar heterodímeros funcionales entre ellos, como presentar en total 45% de homología y la misma regionalización funcional, pero sólo 96% de homología en el dominio de unión al ADN (DBD) y 56% en el dominio de unión a la hormona (HBD) (95-97). La estructura funcional del receptor, constituida por cuatro dominios (transcripcional 1 y 2, de unión a ADN y de unión a la hormona), es la que permite unirse al estrógeno y sufrir un cambio en su conformación espacial que posibilita la formación de homodímeros (REa-Rea, Reb-Reb) o heterodímeros (REa-REb). De esa manera el complejo hormona-receptor se une de forma directa a las secuencias de ADN conocidos como elementos de respuesta a estrógeno (ERE) y de forma indirecta a otros factores de transcripción (95-97).

La modulación del receptor de estrógeno mediada por la unión al ligando con el ADN como sin la unión directa a este (fosforilación e inducción de terceros mensajeros), resulta finalmente en un potente efecto sobre la síntesis de ADN y por ende en la capacidad de mitosis de la célula estimulada (96-98).

Receptor de progesterona

El gen del receptor de progesterona humano (RP) se localiza en el cromosoma 11 (11q22-23), el cual codifica tres isoformas de proteína denominadas alfa (α), beta (β) y gamma (γ), las cuales comparten una estructura similar pero de ubicación espacial diferente dentro de la célula, donde la primera de las isoformas es nuclear y las otras dos citoplasmáticas. La mayoría de las células pueden coexpresar el receptor alfa y beta pero en la mama se ha encontrado la particularidad que la alfa esta restringida a las células del epitelio luminal y la beta a las mioepiteliales (99-103).

Los cambios que ocurren en el receptor de progesterona, tras el complejo formado hormona-receptor (receptor de progesterona-progesterona) y más por su unión al ligando con el ADN modulan su función como factor de transcripción que resulta en un potente efecto sobre la síntesis de ADN y progresión del ciclo celular (104,105). Sin embargo la progresión del ciclo celular también puede ser mediada por la activación de quinasas citoplasmáticas independientemente de la regulación directa de la transcripción mediada por la unión con el ligando (103-105).

La expresión heterogénea de estos receptores (estrógeno/progesterona) como el predominio de una o más de las isoformas puede ser causada por mecanismos genéticos completamente diferentes y su estado determinado por métodos bioquímicos o inmunohistoquímicos (72,105,106).

p53, familia de transcritores relacionados y proteínas

Sobre la base de homologías de secuencias de genes, el gen p53 pertenece a una familia de factores de transcripción formada por al menos dos miembros adicionales, los genes p73 y p63, de los cuales difiere en su constitución, funciones y regulación (80,81).

El gen p53, constituido por 11 exones, es un gen supresor de tumores o antioncogen que se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y sintetiza una proteína del mismo nombre de 53 kDa (77,79,107).

El gen p53 no mutado sintetiza una pequeña cantidad de la proteína p53 normal (proteína salvaje), la cual incrementa su volumen ante agentes genotóxicos para actuar como factor de transcripción nuclear (77,79,107) uniéndose al ADN para regular la transcripción de determinados genes, jugando un papel en el control del ciclo celular, a través de la detección de la célula en la fase G1, G2 o M, la iniciación de la reparación del ADN o la activación de la muerte celular por apoptosis. Esta respuesta se pierde ante el gen inactivado por mutación, el cual produce una proteína defectuosa que ejerce un efecto contrario provocando la multiplicación de células genómicamente alteradas y el crecimiento tumoral (72,108).

La proteína p53 salvaje está constituida por 393 aminoácidos con tres dominios funcionales: un dominio amino-terminal (N-), implicado en la activación transcripcional,

un dominio central que contiene la zona de unión al ADN específica de secuencia y que es la región más conservada de la proteína y el dominio carboxilo-terminal (C-).

La vida media de la proteína salvaje es corta (6-30 min.), por lo cual no alcanza niveles suficientemente elevados para ser detectable, por el contrario, la proteína mutada tiene una extensa vida media (4-12 horas) lo que permite su identificación. El gen p53 y su proteína pueden estudiarse mediante técnicas moleculares o de inmunohistoquímica (72,108).

El gen p73 está constituido 14 exones y se localiza en el cromosoma 1 (1p36.3) (80). Al igual que su homólogo el gen p53 es capaz de influir en el ciclo celular y la apoptosis en varios tipos de células. Sin embargo en contraste con el p53, este gen tiene dos distintos promotores para la codificación de dos isoformas de la proteína con acciones opuestas, la TAp73 de efectos pro-apoptóticos y la DeltaNp73 con acción anti-apoptotica por lo que la proporción entre ambas regula la sensibilidad entre la muerte y la proliferación celular actuando como antioncogen u oncogen según domine una u otra (109-112).

Se conoce que entre estas isoformas de la proteína, la TAp73 presenta un dominio N-terminal transactivador (TA) el cual está ausente en la DeltaNp73. Aunque no esta muy claro el mecanismo de control diferencial de actividad y estabilidad de las isoformas, se sabe que ambas están reguladas por una serie compleja de modificaciones post-traslacionales que incluyen ubiquitinación,

fosforilación secuencial, prolil-isomerización, la contratación en el cuerpo nuclear de LMP (PML-NB) y la acetilación (110-114).

La p73 se expresa en niveles bajos en todos los tejidos normales y su sobreexpresión no siempre debida a mutaciones del gen se ha observado en diversas neoplasias (pulmón, estómago, próstata, riñón, ovario y mama), la cual se puede determinar por técnicas moleculares o de inmunohistoquímica.

El gen p63 consta de 15 exones y se ubica en el cromosoma 29 (29.3q27). Este gen codifica seis isoformas de proteína, tres con un dominio N-terminal transactivador (TA) y tres isoformas dominantes negativas (δ N) sin el dominio TA N-terminal. En donde las isoformas N-p63 inhiben la activación transcripcional por p53 sobrepasando el arresto del ciclo celular y la apoptosis, mientras las isoformas transactivadas tienen acciones similares a la proteína p53 (114,115).

La proteína p63 se expresa principalmente en las células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado y del epitelio de transición. El marcaje se observa intenso en el núcleo de las células basales de la epidermis, cuello uterino, vagina, urotelio, mucosa bronquial, glándula prostática y células mioepiteliales de la mama (114,115).

Las secuencias de la proteína p73 y p63 divergen de la proteína p53 fundamentalmente en sus extremos carboxilo-terminales, sin embargo las isoformas proteicas tienen en común el dominio N-terminal transactivador y el dominio central de unión al ADN. Las señales implicadas en la activación de p63 y p73 difieren de las implicadas en la activación de p53, aunque las dos últimas (p73 y p53) son reguladas negativamente por el producto del proto-oncogen MDM2 (81,82,116). Rara vez se observa coexpresión del p53 y p63 lo que sugiere que éste último podría actuar como un oncogen indirectamente mediante inhibición de aquel (82), lo que si se ha observado es la expresión y aumento del p73 durante la progresión maligna. La sobre expresión además de p73 puede activar los genes que normalmente responden a p53). (81,82,114,115).

Bcl2

El gen bcl2 ubicado en el cromosoma 18 y documentado en una variedad de tejidos humanos es miembro de una familia de genes cuya función es regular la apoptosis. El producto de estos genes puede tener una acción proapoptótica (bax, bad, bclxs) o antiapoptótica (bcl2, bclxl) mediante la formación de homodímeros o heterodímeros, siendo la proporción entre los diferentes miembros la determinante del resultado final, supervivencia o muerte celular, en este sentido el bcl2 confiere longevidad a las células en la fase G0 (84,116-120). La oncoproteína bcl2 codificada por este gen de 26 kDa, se localiza principalmente en la membrana externa de la mitocondria, aunque también en la membrana nuclear y en el citosol a nivel del retículo endoplásmico liso. La expresión de esta

oncoproteína puede ser demostrada a través técnica de inmunohistoquímica (116-120).

Her-2

El Her-2 es un oncogen que se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q), el cual forma parte de la superfamilia de los receptores tirosín kinasa y de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, designados de Her-1 al Her-4 (121). En ésta familia, los receptores, además de recibir también otras denominaciones (Her-1 o factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Her-2 o CerB2 o ErbB2 o Her-2/neu, Her-3 o ErbB3 y Her-4 o ErbB4) comparten algunas características en la estructura molecular de sus proteínas, conformada por tres dominios (extracelular, transmembrana e intracelular) (122).

La unión de los diferentes ligandos al dominio extracelular en estos receptores induce la homodimerización o heterodimerización de los mismos, iniciando una serie de señales en cascada que influyen en muchos aspectos de la biología de la célula tumoral, incluyendo la proliferación, apoptosis, adhesión, migración y diferenciación de la misma (121). La unión del ligando con el homodimero o heterodimero, del receptor Her-2, resulta en la activación de la tirosin-kinasa con la consecuente activación de múltiples vías intracelulares que incluyen la mitogen-activated protein kinase (MAPK) y AKT/P13K que resulta en un incremento de la proliferación celular, resistencia a la apoptosis y aumento de la angiogenesis (121-124). La amplificación del gen17q desencadena una

producción excesiva o sobreexpresión de su proteína transmembrana de 185 kDa (oncoproteína p185 Her-2) (125,126) la cual puede ser determinada mediante técnicas de inmunohistoquímica, mientras que la amplificación génica requiere de técnicas de patología molecular (127-129).

EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano es un proto-oncogen que se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7p12) (87,129,130) el cual codifica una glicoproteína transmembrana de 170 kDa, homologa a otros miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento. La proteína codificada está compuesta por tres dominios: uno extracelular de unión al ligando y responsable de dimerización y la iniciación de señales, uno transmembrana lipofílico y uno intracelular o citoplasmático con actividad tirosinkinasa, que interviene en la activación de la cascada de señalización involucrada en proliferación, división y diferenciación celular.

Este receptor al igual que los otros receptores de la superfamilia tirosin kinasa, traduce señales tanto del exterior como del interior de la célula implicados en el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y supervivencia de las células (129-132).

El EGFR tiene la propiedad única de unirse a seis ligandos, incluyendo entre otros, al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y al factor de crecimiento

tumoral alfa (TGF α). La activación del receptor formará homo o heterodimeros con otra molécula de EGRF u otros miembros de su familia con el Her-2 (preferencialmente), Her-3 o Her-4.

La alteración en su fisiología: expresión aberrante y los eventos de señalización que esta sobreexpresión produce inducen un desarrollo celular equivocado y una proliferación no restringida que puede llevar a la génesis y/o progresión de varios tipos de tumores humanos, incluyendo pulmón, ovario, cerebro, páncreas, próstata y mama.

La actividad amplificada del EGRF eventualmente desencadenara los mecanismos que incrementan la proliferación celular no controlada. En consecuencia, las células que sobreexpresan el EGFR o muestran una activación anómala pueden tener una apoptosis reducida, así como una capacidad de metástasis y angiogénesis aumentada (87,129-132). La sobreexpresión del EGFR está presente en carcinomas de mama con mal pronóstico (132).

Este receptor se encuentra distribuido en varios tipos de células incluyendo las de linaje epitelial y mesenquimal (87) y su expresión puede ser determinada por técnica inmunohistoquímica.

Citoqueratinas

Se conocen alrededor de 37 genes implicados en la expresión de citoqueratinas (Ck) las cuales se encuentran codificadas en los cromosomas 12 y 17.

Las Ck son proteínas fibrosas que constituyen filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales. Estas proteínas principalmente proporcionan la estructura tridimensional interna a la célula y constituyen una barrera rígida que evita la pérdida de agua y la entrada de microorganismos. Al formar parte en las uniones intercelulares (desmosomas) además del citoesqueleto, también sirven como medio de comunicación entre los componentes intracelulares como entre las células adyacentes. Igualmente también actúan como reguladores de la fisiología celular en las vías de señalización intracelular, la protección de la apoptosis y la cicatrización (114).

Estas proteínas componen una familia de veinte polipeptidos diferentes de queratinas los cuales se han clasificado de acuerdo a su comportamiento bioquímico y peso molecular en 2 subfamilias, las que comprenden proteínas de punto isoeléctrico ácido ($< 5,5$) o tipo I, relativamente pequeñas, de bajo peso molecular (40 - 54 kDa) y las proteínas de punto isoeléctrico básico- neutro ($> 6,6$) o tipo II, más grandes, de alto peso molecular (56 - 67 kDa) (114,133).

Los dos grupos de Ck se comportan como heteropolímeros obligados, formando pares con un miembro de cada grupo (heterodímeros entre una queratina de tipo I y una queratina de tipo II) (133).

Todas estas queratinas que pertenecen a la familia de las proteínas de filamentos intermedios comparten características proteico-estructurales comunes, el dominio central de 310 aminoácidos (α -helicoidal) el cual tiene a los lados los dominios laterales (no-helicoidales) de longitud variable (133).

Los subgrupos de Ck que expresa una célula epitelial dependen principalmente del tipo de epitelio, del momento de diferenciación terminal y de la fase de desarrollo, algunas forman complejos in vivo (Ck 5/6 y 14) y otras se coexpresan típicamente (Ck 8 y 18). En particular las Ck 8 y 18 constituyen las queratinas primarias de los epitelios y son las que aparecen más tempranamente en la embriogénesis (65,134).

Las Ck de elevado peso molecular (5/6, 10, 14, 15, 17), se expresan en la mayoría de los epitelios complejos o estratificados y las de bajo peso molecular (7, 8, 18, 19, 20) por el contrario, son específicas de los epitelios simples y glandulares, lo cual tienden a permanecer constante cuando el tejido sufre una transformación maligna, excepto en algunos carcinomas cutáneos no melanomas (133, 134). En el epitelio mamario la expresión de la Ck 8 y 18 es difusa en las células luminales y focal en las células basales/mioepiteliales y la 7 y 19 se expresan

exclusivamente en las células luminales de los ductos y lobulillos mamarios, solo unas células expresan 5/6, 14 y 17. La expresión de un grupo u otro de dichas queratinas ha permitido clasificar a los tumores malignos de la mama (65,91, 133,134).

El perfil de citoqueratinas puede determinarse mediante técnicas de inmunohistoquímica (134).

CD10

El gen que codifica CD10 se ubica en el cromosoma 3. El CD10 es una proteína con peso molecular de 110 kDa que pertenece a una familia de metaloproteasas transmembrana tipo II (135,136) entre las que también se encuentran los antígenos leucocitarios CD13, CD26 y la amimopeptidasa A.

El CD10 denominado Antígeno Común de Leucemia Linfoblástica Aguda también es conocido con el nombre de endopeptidasa neutral y neprilisina. Este marcador es una peptidasa (endopeptidasa) zin dependiente que tiene como función inactivar péptidos bioactivos y vasoactivos que se expresa en una variedad de tejidos normales linfoides y no linfoides (135,136) como endometrio, hígado, riñón, vejiga, pulmón, próstata, intestino delgado, colon y la mama, como en tejidos neoplásicos. El CD10 se ha identificado en las células mioepiteliales de la mama pero además en las células del estroma de las lesiones malignas infiltrantes de ésta glándula, por lo que se ha relacionado con la agresividad biológica del tipo de lesión en la misma (137,138). La expresión de CD10

disminuye en el carcinoma intraductal y se pierde normalmente en el carcinoma infiltrante de mama de tipo luminal, observándose con mayor frecuencia asociado a los carcinomas de tipo basal y por tanto a un peor pronóstico (139). La expresión se puede determinar por estudios de inmunohistoquímica.

Ki-67

El gen que codifica el Ki-67 se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25). El Ki-67 es una proteína nuclear no histona, cuya síntesis se inicia en la fase G1 del ciclo celular y aumenta durante la fase de síntesis (fase S), alcanzando su máxima expresión al final de la misma.

El Ki-67 constituye una proteína que mantiene la proliferación celular y se ha convertido en un marcador para dicho análisis. Su expresión se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, invasión vascular, metástasis linfática y de forma inversa con receptores hormonales (140-142).

2.5.3 Inmunohistoquímica. Expresión de marcadores moleculares

El principio básico en la inmunohistoquímica es una reacción complejo específica entre los inmunoreactantes antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), que ocurre por una interacción de complementariedad espacial entre los sitios de unión respectivos del antígeno (epítipo) y el anticuerpo (parátipo).

La inmunohistoquímica, es una metodología que agrupa diversas técnicas de inmunotinción que aplicando anticuerpos específicos marcados, sobre muestras citológicas o tisulares (frescas o fijadas e incluidas en parafina), permite identificar y localizar a nivel microanatómico intracelular (membrana celular, citoplasma, núcleo) o extracelular (membrana basal), la expresión de los determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular (143).

Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permiten una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable y puede contrastarse y ser evaluada con microscopio de luz. El material así estudiado puede archivarse por tiempo indefinido, sin pérdida de la intensidad de la reacción. Los anticuerpos monoclonales han permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica (143).

En la técnica inmunohistoquímica enzimática por inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse o conjugarse directamente al anticuerpo primario o indirectamente a otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como la biotina. La técnica necesita de controles internos (paralelos), usualmente positivos y negativos. El control

negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario.

En particular la técnica inmunoenzimática por el método avidina o estreptavidina biotina-peroxidasa se fundamenta en la alta afinidad que tiene la glicoproteína (avidina o estreptavidina) por la vitamina biotina, propiedad que mejora la intensidad del marcaje al amplificar la reacción. Después de la incubación del tejido con el anticuerpo primario, se aplica un anticuerpo secundario ligado a una molécula de biotina y posteriormente, se incuba con un complejo constituido por moléculas de la glicoproteína empleada conjugadas con peroxidasa. Finalmente para el revelado de la reacción peroxidásica, se añade una sustancia cromógena, que expondrá el complejo formado y su ubicación por un color pardo. La lectura de los resultados se realiza valorando la positividad de la tinción por lo general en una escala semicuantitativa, considerando el grado de intensidad (informado en número de cruces) y la magnitud (informado en porcentaje) de células que expresan la misma.

En el estudio inmunohistoquímico del carcinoma de mama, los receptores hormonales (RE, RP), p53, p73 y Ki67, se identifican específicamente por un patrón de tinción a nivel del núcleo celular, la proteína Bcl2 CD10 y citoqueratina a nivel citoplasmático (76,120,136,137), el Her-2 y EGFR a nivel de la membrana citoplásmática.

RE, RP, p53 y p73 son considerados negativos y se expresan como cero (0) cuando no se observa coloración nuclear, o ésta se aprecia en menos de 5 % de

las células tumorales. Son positivos, leve (1+) si entre 5 a 29% de las células tumorales presenta tinción nuclear; moderada (2+) si se observa tinción entre 30 y 69% de las células o intensa (3+) cuando marca entre 70 a 100% de los núcleos en células neoplásicas (79,82).

El Ki-67 se evalúa como positivo cuando hay tinción nuclear, baja (1+) si se observa menor del 14% de los núcleos con tinción, intermedio (2+) con marcaje nuclear ≥ 15 y $\leq 24\%$ y alto (3+) $>$ al 25% (141,142).

Bcl2 y CD10 son considerados negativos y se expresan como cero (0) cuando no se observa coloración citoplasmática, o ésta se aprecia en menos de 5% de las células tumorales. Son positivos, leve (1+) si entre 5 a 29% de las células tumorales presenta tinción citoplasmática; moderada (2+) si se observa tinción entre 30 y 69% de las células o intensa (3+) cuando marca entre 70 a 100% de la células de la población tumoral (138-142).

La citoqueratina se evalúa como positiva, focal si las células que muestran la tinción citoplasmática están aisladas o en pequeños grupos, dispersa si la tinción es menor o igual al 50% y difusa si más del 50% de las células neoplásicas presentan tinción (134,144).

Her-2 y EGFR son considerados negativos y se expresan como cero (0) y una cruz (+) y positivos dos cruces (2+) y tres cruces (3+) (126,127-129). Cero

significa ausencia total de tinción de membrana, una cruz (1+) se interpreta como una débil e incompleta tinción de membrana. Dos cruces (2+) se interpreta como positivo débil de intensidad de tinción y completa en toda la membrana en menos del 30% de células tumorales y tres cruces (3+) como positivo fuerte y una tinción intensa y completa en más del 30% las células neoplásicas (124,127-129,131).

2.5.4 Micromatrices de tejido

Una micromatriz o microarrays de tejido (TMA) es una innovación del campo de la patología que ha demostrado ser una herramienta útil para el diagnóstico y la investigación en el campo de la biomedicina (145-146). Desde la idea original descrita hace más de dos décadas y varias modificaciones posteriores, esencialmente consiste en un bloque compuesto que se centra en la organización por un patrón predeterminado de pequeños cortes tisulares en un soporte sólido (145). Cada micromatriz de tejido hace posible agrupar un número de muestras tisulares que puede variar de centenares a miles según el diseño y la técnica empleada.

Generalmente para la construcción, las muestras de tejidos proceden de bloques convencionales de parafina archivados, donde las zonas de interés son tomadas por un dispositivo especial o manual que realiza cortes cilíndricos de pequeño diámetro (0,6-2 mm), que son reparafinados al ser incluidos en un nuevo y simple bloque de parafina previamente troquelado. De las preparaciones

histológicas resultantes una variedad de estudios (histopatológicos, inmunohistoquímica, FISH,) pueden ser realizados de acuerdo a fines de la investigación (145-149).

La utilización de la técnica permite obtener resultados de alto rendimiento al permitir procesar, evaluar y analizar de forma idéntica, simultánea y en menor tiempo gran número de casos.

2.6 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Anticuerpo: Son proteínas producidas por las células del sistema inmune en presencia de una sustancia extraña, llamada antígeno. Es el reactivo principal en las técnicas de inmunohistoquímica. Todos los anticuerpos o inmunoglobulinas comparten algunas características comunes. Cada una se compone de dos cadenas pesadas que difieren estructuralmente y antigénicamente y determinan la clase y la subclase de la molécula y dos cadenas ligeras (denominadas Kappa o Lamda) diferentes en todas las clases y subclases (150).

Anticuerpos monoclonales: Son anticuerpos idénticos producidos inmunohistoquímicamente por un clon de células plasmáticas que reaccionan con un epítipo específico en un antígeno dado. Se producen comercialmente (150).

Antígeno: Son sustancias que inoculadas a un nivel son capaces de desencadenar una respuesta inmune (150).

Antioncogen: Gen supresor de tumores (151).

Carcinoma de mama: Proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios (24).

Dendograma: Representación gráfica en forma de árbol de datos agrupados en categorías y subcategorías que permite apreciar las relaciones entre los datos organizados (26,27,28).

Dímero: Proteína compuesta por dos subunidades.

Epitope: Es la parte estructural específica de un antígeno que reacciona con un anticuerpo para la unión, el cual está constituido por agrupaciones de aminoácidos en proteínas globulares y cadenas laterales de azúcar en polisacáridos (150).

Heterodímeros: Proteína compuesta por subunidades diferentes (75).

Homodímero: Proteína compuesta por dos unidades idénticas (75).

Inmunohistoquímica: Grupo de técnicas de inmunotinción que permite demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o en los tejidos utilizando anticuerpos marcados (143).

Isoformas: Diferentes formas de una proteína producto de diferentes genes o un único gen por uniones alternativas (96,99).

Marcadores moleculares: Son productos proteicos intracelulares, que al reaccionar con otros que se adicionan, son reconocidos permitiendo identificar patrones de expresión característicos en los tejidos donde son estudiados (150).

Métodos de alto rendimiento: Análisis masivo de múltiples marcadores genéticos de forma simultánea basados en estudio de ADN, ARN o proteínas (152-154).

Microarrays: Micromatriz o microarreglos. Existen distintos tipos de microarrays, como de ácidos nucleicos, oligonucleótidos, de proteínas y de tejidos (153-155).

Microarrays génico: Micromatriz de distribución ordenada de un conjunto de puntos (10.000 muestras/cm²) que contienen genes en una superficie (membrana o vidrio) (153-155).

Micromatiz de tejidos: Distribución ordenada de cientos de muestras de tejidos de biopsias de corte cilíndrico en un bloque de parafina para sección y estudio por una técnica de análisis específica (154).

Parátopo: Lugar específico de reconocimiento y unión del anticuerpo al epítipo de su antígeno correspondiente, el cual esta constituido por un grupo de 15 a 20 aminoácidos. Pertenece a la región variable de la molécula del anticuerpo (150)

Oncogenes: Son formas mutadas de genes causantes de crecimiento celular descontrolado que conllevan a células neoplásicas”. Codifican proteínas denominadas oncoproteínas, las cuales carecen de elementos reguladores y cuya producción por las células transformadas no depende de factores de crecimiento u otras señales extrañas (156).

Protooncogenes: Son genes que normalmente controlan la división celular y el grado de diferenciación o especialización de éstas (156).

Progresión tumoral: Una neoplasia maligna definida que puede presentar sucesivamente características de mayor agresividad, tales como la adquisición de capacidad metastásica o de resistencia farmacológica (156).

2.7 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES E INDICADORES

VARIABLE	DEFINICIÓN NOMINAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR
Receptor de estrógeno RE	Nivel de expresión a nivel del núcleo de las células tumorales de receptores de estrógeno. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0 : < 5% + : 5 a 29% ++ : 30 a 69% +++ : 70 a 100%	0 : Negativo + : Leve ++ : Moderada +++ : Intensa
Receptor de progesterona RP	Nivel de expresión a nivel del núcleo de las células tumorales, de receptores de progesterona. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0 : < 5% + : 5 a 29% ++ : 30 a 69% +++ : 70 a 100%	0 : Negativo + : Leve ++ : Moderada +++ : Intensa
p53	Nivel de expresión a nivel del núcleo de las células tumorales. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0 : < 5% + : 5 a 29% ++ : 30 a 69% +++ : 70 a 100%	0 : Negativo + : Leve ++ : Moderada +++ : Intensa
Bcl2	Nivel de expresión del oncogen en el citoplasma de las células tumorales. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica.	0 : < 5% + : 5 a 29% ++ : 30 a 69% +++ : 70 a 100%	0 : Negativo + : Leve ++ : Moderada +++ : Intensa
Her-2	Nivel de expresión del oncogen en la membrana citoplasmática de las células tumorales. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0 : Negativo + : Negativo ++ : < 30% +++ : $\geq 30\%$	0 : Negativo + : Negativo ++ : Positivo débil +++ : Positivo fuerte
Ki-67	Nivel de expresión de la proteína en el núcleo de las células tumorales. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0 : Negativo + : 1-14% ++ : $\geq 15 \leq 24\%$ +++ : $\geq 25\%$	0 : Negativo + : Bajo ++ : Intermedio +++ : Alto

VARIABLE	DEFINICIÓN NOMINAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR
Ck 5,6,8,18	Nivel de expresión de la proteína en el citoplasma de las células tumorales. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0: Negativo +: 10% ++: < 50% +++ : ≥ 50%	0: Negativo +: Positivo focal ++: Positivo disperso +++ : Positivo difusa
p73	Nivel de expresión de la proteína en el núcleo de las células tumorales. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0: < 5% +: 5 a 29% ++: 30 a 69% +++ : 70 a 100%	0: Negativo +: Leve ++: Moderada +++ : Intensa
EGFR	Nivel de expresión de la proteína en la membrana citoplasmática de las células tumorales. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0: Negativo +: Negativo ++: < 30% +++ : ≥ 30%	0: Negativo +: Negativo ++: Positivo débil +++ : Positivo fuerte
CD10	Nivel de expresión de la proteína en el citoplasma de las células tumorales. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica.	0: < 5% +: 5 a 29% ++: 30 a 69% +++ : 70 a 100%	0: Negativo + : Leve ++: Moderada +++ : Intensa
Clasificación molecular	Luminal A Luminal B Her-2 TN	Luminal A Luminal B Her-2 TN no basal TN basal	RE/RP(+) Her-2(-) RE o RP(+) Her-2(-)/(+) RE/RP(+) Her-2(+) RE/RP(-) Her-2(+) RE/RP/Her-2(-) RE/RP/Her-2(-) Ck5/6(+) p63(+) EGFR (+)
Edad	Expresa el periodo de tiempo en años que ha pasado desde el nacimiento hasta el momento del diagnóstico.	Edad en años	Grupo etario ≤ 40 41-50 51-65 ≥ 66 Corte: ≤ 50 > 50

VARIABLE	DEFINICIÓN NOMINAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR
Estadio clínico	Definición de la extensión tumoral local, regional y a distancia a través del sistema TNM.	Estadio: 0 Estadio: I Estadio: II Estadio: III Estadio: IV	Tis, N0, M0 T1, N0, M0 T0, N1, M0 T1, N1, M0 T2, N0/N1, M0 T3, N0, M0 T0, N2, M0 T1/T2, N2, M0 T3, N1/N2, M0 T4, N0/N1/N2, M0 Cualquier T, N3, M0 Cualquier T, N, M1
Grado Histológico	Diferenciación morfológica de la neoplasia descrito en categorías de Bloom-Richardson con las modificaciones de Elston y Ellis (Elston 1991).	Grado: I Grado: II Grado: III	Bien diferenciados Moderadamente diferenciados Pobremente diferenciados
Evolución clínica	Expresión clínica del comportamiento de la neoplasia en el tiempo expresado en recidiva y supervivencia.	Recidiva: reaparición del tumor posterior a tratamiento. Supervivencia global: Tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la fecha de la muerte en caso de haber ocurrido antes del punto de corte o límite de seguimiento.	Situación: Local Regional Sistémica Seguimiento: 72 meses (6 años), mínimo 18 meses (1½ año).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Bajo una matriz epistémica positivista se realizó el siguiente estudio de diseño no experimental, transeccional, descriptivo, correlacional, donde las muestras y datos a evaluar corresponden a casos con diagnóstico de carcinoma de mama.

La investigación no experimental define aquel estudio donde no se manipulan intencionalmente las variables, se observan fenómenos en su contexto natural y luego se analizan (157).

Transeccional porque se recolectan los datos en un solo momento, en un tiempo único, describiendo las variables y analizando su incidencia e interrelación en un momento dado (ibid).

Descriptivo ya que describe un fenómeno dado, analizando su estructura y explorando las asociaciones (157-159).

Correlacional porque se describe la relación entre varias variables en un momento dado (157).

Se evaluó la expresión de los marcadores moleculares señalados de acuerdo a la clasificación molecular de la neoplasia y se correlacionaron con la una serie de factores clínicos.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Población y muestra

El presente estudio, se realizó con 149 muestras de tejido tumoral de carcinoma de mama embebido en parafina de pacientes con el diagnóstico, a los que se les practicó estudio inmunohistoquímico previo para RE, RP, Her-2, Ki67, p53 y Bcl2 en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte (HMN), durante el periodo 1999-2008.

Se analizó la expresión de un conjunto de 12 biomarcadores moleculares, 6 realizados inicialmente y 6 por micromatrices de tejido y se compararon los resultados obtenidos con los subtipos moleculares definidos por inmunohistoquímica, de acuerdo a la expresión de RE, RP y Her-2 y con las

características clínicas tumorales de interés (edad, estadio clínico, grado histológico, recurrencia, supervivencia global). La población fue seleccionada de forma intencional y estuvo integrada por los casos que cumplieron los criterios indicados.

3.2.1.1 Criterios de inclusión

- Casos con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de mama ductal infiltrante sin otra especificación o mixto con componente ductal predominante, a las cuales se les realizó estudio inmunohistoquímico para RE, RP, Her-2, Ki67, p53 y Bcl2 en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte en el periodo señalado.
- Estudio inmunohistoquímico previo de todos los marcadores moleculares, realizado antes del tratamiento neoadyuvante
- Sexo femenino.
- Biopsia incisional o excisional del tumor primario.
- Bloques de parafina en buen estado.

3.2.1.2 Criterios de exclusión:

- Casos con el diagnóstico anatomopatológico especificado y estudio inmunohistoquímico señalado, realizado en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte fuera del periodo indicado.

- Casos con diagnóstico anatomopatológico distinto al especificado y estudio inmunohistoquímico realizado en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte en el periodo señalado.
- Estudio inmunohistoquímico previo posterior al tratamiento neoadyuvante o incompleto.
- Sexo masculino.
- Bloques de parafina en mal estado.

Se contó con la aprobación del Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC) (anexo 1) para el acceso y utilización de los bloques de parafina convencional pertenecientes al mismo, y de relevante valor científico para la investigación y consecución de los objetivos, de acuerdo a las normas para la investigación en muestras biológicas humanas según el Código de ética para la vida 2011 (160), y centros asistenciales (anexo 2). La investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC) (anexo 3).

3.2.2 Técnica de recolección y procesamiento

El estudio se realizó con material preservado, procedente del Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte de Valencia y archivado en el Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC), correspondientes a bloques de parafina

convencional con tejido de carcinoma de mama ductal infiltrante sin otra especificación o mixto, de pacientes con dicho diagnóstico de los años 1999 al 2008, que se realizaron el estudio inmunohistoquímico señalado. Las muestras tumorales en su momento fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina y procesadas de forma rutinaria. Inicialmente del archivo general de resultados de estudios inmunohistoquímico se construyó una base de datos relacional creada al efecto en Microsoft Excel. De la revisión de la anterior, se identificaron 1146 casos de carcinoma de mama, seleccionando 149 de acuerdo a los criterios de inclusión. Del archivo anterior, verificando el número de análisis inmunohistoquímico e histopatológico, se procedió a retirar las láminas de hematoxilina eosina (HE) respectivas como a ubicar y separar del archivo de bloques de parafina convencionales los correspondientes. Posteriormente, se revisaron las historias clínicas, evaluándose las características de interés y recolectando la información pertinente.

De los resultados del estudio inmunohistoquímico previo de los casos seleccionados se evaluó el inmunomarcaje del RE, RP y Her-2, clasificándose a los tumores de acuerdo a la caracterización molecular empleando de la literatura para ello los criterios expuestos en los trabajos de Nielsen (33), Livasy (37), Piñero (43) y Wiechmann (160) para los luminales A, B y de Nielsen (33), Carey (31,33), Livasy (37), Jorge (44) y Wiechmann (161) para los Her-2 y triple negativo. De esa forma se definió como:

Luminal A:	RE(+) RP(+) Her-2(-)
Luminal B:	RE o RP(+) Her-2(+) o Her-2(-)
Her-2:	RE(-) RP(-) Her-2(+) / RE(+) RP(+) Her(+)
Triple negativo:	RE(-) RP(-) Her-2 (-)

Establecidos los anteriores y de acuerdo a los mismos, seguidamente se valoró el inmunomarcaje del resto de los biomarcadores del estudio inmunohistoquímico previo Ki-67, p53, Bcl2, como del panel de biomarcadores propuesto Ck5, Ck6, Ck8, Ck18, p73, EGFR y CD10, considerando la expresión una características de rasgo distintivo de la caracterización molecular.

3.3 Construcción de las micromatrices de tejido

La construcción de las micromatrices de tejido (TMAs) se realizó de forma manual. Inicialmente bajo el microscopio de luz con tres objetivos (10, 20, 40x) se examinó la lámina de HE de cada caso y se identificó y marcó la zona representativa del tumor. A continuación contraponiendo la lámina de HE en igual sentido al bloque de parafina convencional correspondiente, se delimitó y marcó el tumor en el mismo (bloque donante). Seguidamente se diseño y construyó en papel una plantilla o topograma de localización para el orden y distribución de los tumores en cada bloque receptor, anotándose la posición de cada uno para su identificación posterior y la lectura del resultado inmunohistoquímico de panel propuestos (40).

El bloque receptor de parafina, se construyó con la guía de una laminilla multifenestrada (superficie con orificios ordenados por filas y columnas de diámetro y distancia entre los mismo de 2 mm) y un trocar cilíndrico de igual medida de diámetro. Se realizó una sección de cortes cilíndricos hasta un número de 30 (sección 1), duplicando a 5 mm de distancia del anterior todos los cortes (sección 2), para asegurar la zona de tejido tumoral con dos cilindros para el estudio.

Seguidamente con un trocar cilíndrico de 1mm diámetro, se realizaron de forma separada y sucesiva dos cortes en la zona marcada de cada bloque donante, insertando en el bloque receptor, el primer corte en la sección 1 y el segundo en la sección 2 con la ayuda de un guiador metálico de acuerdo a la posición de la plantilla o topograma de localización. Al culminar el proceso de inclusión de las muestras en todos los nuevos bloques que constituyen las micromatrices, la consolidación y homogenización se realizó mediante calor al introducir los mismos en la estufa a una temperatura de 45 grados centígrados durante 3 minutos (40). Finalmente se construyeron 5 TMAs.

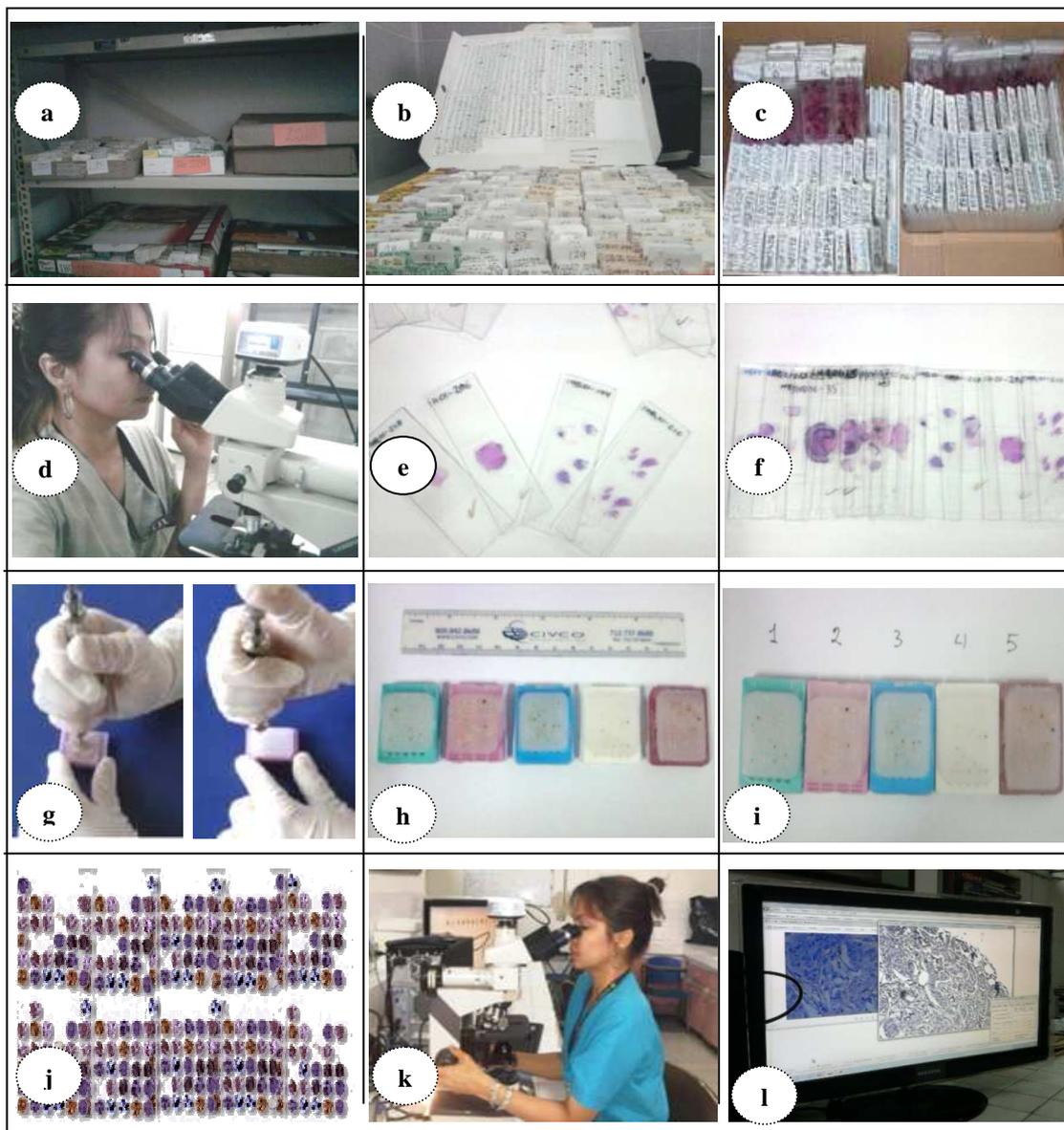


Figura 6. Proceso de construcción de las micromatrices de tejido (TMAs). a. Ubicación de especímenes en archivo. b. Selección de bloque de parafina con tejido tumoral de mama. c. Separación de láminas HE y bloques de parafina. d. Evaluación de las láminas HE. e.f. Identificación y marcaje de zona tumoral en la lamina HE. g. Troquelado de bloque receptor e inserción de cilindros tumorales. h.i. Micromatrices de tejido. j. Secciones histológicas de las TMAs. k.l. Evaluación de la representación tisular en cortes histológicos de las TMAs. Fuente. Imágenes de la investigación.

3.4 Técnica inmunohistoquímica e interpretación de resultados

De las micromatrices de tejido se realizaron un total de 35 secciones histológicas de 4 micras. De las secciones histológicas se emplearon 5 para la tinción con HE y 30 para el estudio de los biomarcadores moleculares propuestos. La determinación de los marcadores previamente realizados y en estudio, se realizó por el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa bajo el sistema de la casa comercial respectiva (Dako[®]/ Invitogen) con los anticuerpos, clones, dilución y punto de corte detallados (Tabla 3).

Previamente las láminas portaobjetos, fueron tratadas con la solución adherente poly-L-lysina (Sigma, St. Louis[®]), colocando un corte por cada una se llevaron a la estufa a 60°C por 2 horas. Seguidamente se desparafinaron con 3 pases por xilol y deshidrataron con igual número de pases por alcohol isopropilico en forma decreciente (100, 95, 70% respectivamente). La recuperación antigénica se realizó en la solución Retrieval precalentada y en baño María por 40 minutos a 95-99°C, lavando posteriormente con solución PBS. El bloqueo de la peroxidasa endógena, se realizó colocando 1 gota de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 minutos, seguidamente lavando 3 veces con buffer PBS a pH 7,4. Posteriormente se agregó el anticuerpo primario el cual se incubo por una hora en la cámara húmeda a temperatura ambiente.

Cuadro 3. Anticuerpos monoclonales previos y en estudio (clon, dilución, fuente e inmunomarcaje)

Biomarcador	Clon	Dilución	Fuente	Localización del marcaje
RE	1D5	1:100	Dako	Nuclear
RP	PgR 636	1:100	Dako	Nuclear
Her-2	CerbB2	1:250	Dako	Membrana
Ki67	MIB-1	1:100	Dako	Nuclear
p53	D07	1:100	Dako	Nuclear
Bcl2	124	1:100	Dako	Membrana
Ck5/6	D5/16B4	Prediluido	Invitrogen	Citoplasma
Ck8	35 β H11	1:50	Dako	Citoplasma
Ck18	DC10	1:50	Dako	Citoplasma
p73	p73-9F7	1:25	Invitrogen	Nuclear
CD10	56C6	1:80	Dako	Nuclear
EGFR	H11	1:200	Dako	Membrana

Se colocó 1 gota del anticuerpo secundario marcado (Envision) por 30 minutos y se reveló la reacción enzimática con 3' 5'-diaminobencidina, agregando 1 gota del cromógeno entre 5 a 10 minutos. Seguidamente se lavó con agua destilada para darle la coloración de fondo con HE y a continuación se lavó nuevamente con agua destilada y se pasó por alcohol isopropílico en concentración creciente (70, 95, 100%), aclarándose con 3 pases por xilol realizando el montaje con flotex. Cada cilindro de los TMA se evaluó en dos

oportunidades, una por el investigador y otra por el patólogo experto en inmunohistoquímica (Dr. Aldo Reigosa), los datos recogidos se anotaron respectivamente en el topograma y el instrumento diseñado (anexo 4). Se consideró como valor definitivo el promedio de las observaciones.

Para la mayoría de los marcadores moleculares del panel propuesto se consideró la inmunotinción distinguiendo el resultado como positivo o negativo para efectos del análisis. La valoración del inmunomarcaje se realizó considerando la coloración marrón dorada y su localización en las células neoplásicas malignas:

- Proteína p73: Coloración en el núcleo, superior al 5% de los núcleos teñidos (112-114).
- Citoqueratinas (Ck5, Ck6, Ck8, Ck18): Coloración en el citoplasma de acuerdo al patrón conocido, focal si las células que muestran la tinción están aisladas o en pequeños grupos, dispersa si es menor o igual al 50% y difusa si más del 50% de las células tumorales presentan tinción (31,36,134,144,153).
- CD10: Coloración en el citoplasma, superior al 10% de las células tumorales (138-142).
- El EGFR: Membrana, de acuerdo a lo habitual (136,137).

Se consideraran negativas las reacciones: cuando no se aprecie la tinción en las células neoplásicas en presencia de marcaje en los ductos normales (control positivo interno).

3.5 Técnica de análisis de resultados

El análisis de los datos se realizó empleando el programa SPSS/PC versión 17. Los resultados se representan en tablas. El estudio descriptivo, se realizó utilizando para las variables cuantitativas las llamadas tendencias centrales (media) y medidas de dispersión (desviación standard) como para las cualitativas el número absoluto y frecuencia (porcentaje). La asociación entre variables se analizó con la prueba de Chi cuadrado (X^2) y el test exacto de Fisher para las muestras con menos de 5 sujetos.

La evolución clínica se valoró mediante la recurrencia tumoral y la supervivencia global. La primera comprende la reaparición del tumor posterior a tratamiento en cualquiera de las situaciones clásicas, local si ocurre en la vecindad del sitio quirúrgico, regional en los de drenaje linfático y sistémica si presenta con metástasis en pulmón, hígado o hueso. En todo caso el tiempo que media entre la erradicación clínica del tumor por tratamiento y su reaparición concierne al intervalo libre de enfermedad. La segunda corresponde a los casos vivos al corte del estudio y se expresó en meses y la censura se definió en forma dicotómica como viva o fallecida por el carcinoma de mama. El estudio de la supervivencia se

realizó mediante el método de Kaplan-Meier y el ajuste de modelos de regresión de Cox. Las curvas de supervivencia se compararon con el test log-rank. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Análisis descriptivo y relaciones

La edad media de las mujeres para el momento del diagnóstico fue de 51,32 años, con un rango de 24-89 años y una desviación estándar de 11,34 años. De la totalidad de las mismas más de 59% tenían edad menor o igual a 50 años y funcionalidad ovárica conservada, evidente por la presencia de periodos menstruales. Clínicamente más del 70% de los tumores se hallaron con un tamaño entre 2 y 5 cm. En la mayoría de los casos se palpó un plastrón axilar. El estadio clínico de acuerdo al TNM resultó variable, 87,24% de los tumores se clasificaron II y III, predominando el estadio II (Cuadro 4), 60,40% resultaron localmente avanzado. El grado histológico de la mayoría de los tumores fue moderadamente diferenciados (grado II). Al evaluar en los tumores la expresión inmunohistoquímica de los marcadores RE, RP y Her-2 se observó que más del 50% expresan el RE, menos del 50% RP y más del 28% Her-2. El tiempo de seguimiento varió de 18 a 72 meses para las pacientes no fallecidas (vivas).

Cuadro 4. Hallazgos clínico-patológicos en la población de estudio

Características		n	%
Grupo etario (años)	≤ 40	16	10,73
	41-50	73	48,99
	51-65	43	28,85
	≥ 66	17	42,29
Punto de corte de la edad (años)	≤ 50	89	59,73
	> 50	60	40,26
Tamaño tumoral (cm)	< 2	17	11,44
	2-5	105	70,46
	> 5	27	18,12
Estatus de la axila	Sin plastrón	25	16,77
	Plastrón	124	83,22
Estadio	I	19	12,75
	IIa	40	26,84
	IIb	53	35,57
	IIIa	8	5,36
	IIIb	26	17,44
	IIIc	3	2,03
Grado histológico	I	12	8,05
	II	94	63,08
	III	43	28,85
Expresión inmunohistoquímica	RE	81	54,36
	RP	73	48,99
	Her-2	43	28,85
	Ki-67	134	89,93
	p53	71	47,65
	Bcl2	84	56,37
Recurrencia	Si	29	19,46
Estatus	Vivas	131	87,91
	Fallecidas	18	12,08
Media supervivencia global (meses)	40,34		-

Fuente. Datos de la investigación. n=149.

La recurrencia de la enfermedad que se presentó en un 19,46% de los casos se observó en promedio a los 11,05 meses con rango de 19 (16-35). La supervivencia global (SG) media fue de 40,34 meses, con rango de 54 (18-72) y una desviación típica de $\pm 12,44$ meses. Un 12% fallecieron a lo largo del seguimiento por la neoplasia (Cuadro 4). De la evaluación de la expresión del RE, RP y Her-2 de acuerdo a la clasificación molecular del carcinoma de mama, se estableció que los tumores eran 61,74% (92/149) luminal y 38,25% no luminal. Así mismo de los primeros 34,22% (51/149) luminal A y 27,51% (41/149) luminal B y de los últimos 14,76% (22/149) Her-2+ y 23,48% (35/149) TN. La expresión de receptores androgénicos fue notablemente mayor en tumores luminal A. Los tumores luminal (A y B), predominaron seguido de los TN (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de los tumores de acuerdo al subtipo molecular según la expresión de RE, RP, Her-2

Inmunomarcaje		Luminal A	Luminal B	Her-2+	TN	p
		n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	
RE	Negativo	-	-	-	-	
	Positivo	51 (100)	30 (100)	-	-	
	Total	51 (62,96)	30 (37,03)	-	-	0,037
RP	Negativo	-	19 (46,34)	22 (100)	35 (100)	
	Positivo	51 (100)	22 (53,65)	-	-	
	Total	51 (34,22)	41 (27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)	0,103
Her-2	Negativo	-	20 (48,78)	-	-	
	Positivo	-	21 (53,65)	22 (100)	-	

Fuente. Datos de la investigación.

De acuerdo a la clasificación molecular del carcinoma de mama, la expresión del Ki-67, p53 y Bcl2, se observó en todos los subtipos de forma variable. El marcaje del Ki-67 se apreció en un 92,15 % de los tumores luminal A, 82,92% de los luminal B, 94,28

Cuadro 6. Distribución de los tumores según subtipo molecular y expresión de Ki-67, p53, Bcl2

Inmunomarcaje		Luminal A	Luminal B	Her-2+	TN	p	
		n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)		
Ki-67	Negativo	4 (7,84)	7 (17,07)	2 (9,09)	2 (5,71)		
	Positivo	Bajo	16 (31,37)	8 (19,51)	2 (9,09)	6 (17,14)	
		Intermedio	15 (29,41)	8 (19,51)	5 (22,72)	10 (28,57)	
		Alto	16 (31,37)	18 (43,90)	13 (59,09)	17 (48,57)	<0,001
	Total	51 (34,22)	41 (27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)		
p53	Negativo	27 (52,94)	19 (46,34)	13 (59,09)	19 (54,28)		
	Positivo	24 (47,05)	22 (53,65)	9 (40,90)	16 (45,71)	0,451	
	Total	51 (34,22)	41 (27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)		
Bcl2	Negativo	4 (7,58)	34 (82,92)	17 (77,27)	25 (71,48)		
	Positivo	47 (92,15)	7 (17,07)	5 (22,72)	10 (28,57)	0,041	
	Total	51 (34,22)	41 (27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)		

Fuente. Datos de la investigación.

De acuerdo al porcentaje de núcleos teñidos con el Ki-67, se observó que en los tumores luminal A y B un 60,78% (31/51) y 39,02% (16/41) respectivamente expresaron índices de proliferación bajos o intermedios, mientras que un índice de proliferación alto se observó en mayor número de casos en los luminal B, como también en los subtipos Her-2+ y TN en un 43,90% (18/41), 31,81% (7/22) y 45,71

significativa entre el subtipo molecular luminal A y B con índices de proliferación bajo/intermedio, entretanto si hubo evidencia estadística significativa que demostró la asociación entre los subtipos luminal B y Her-2+ con índices de proliferación alto más que con TN (Cuadro 6).

La proteína p53 se expresó en casi la mitad de los tumores luminal A y en más de la mitad de los luminal B. No obstante menos de la mitad de los tumores Her-2+ y TN expresaron la misma. Así mismo se observó que la proteína Bcl2 se expresó en la mayoría de los tumores luminal A, mientras que en el resto de los subtipos el porcentaje de casos que inmunomarcaron la misma fue menor. No se apreció significancia estadística de la expresión de p53 con los subtipos, pero si de la expresión Bcl2 entre los subtipos luminal A y B (Cuadro 6).

Al valorar la inmunotinción de los marcadores moleculares en estudio (Figura 7 y 8) en las secciones histológicas de los TMAs, se observó un porcentaje de casos con positividad de expresión variable entre 9,77 a 92,12% como un porcentaje de casos no valorables por la falta de representación tisular por desgaste del bloque de TMAs que oscilo entre 1,34 y 14,76% correspondientes al EGFR y la p73 respectivamente (Cuadro 7). Se encontró que la expresión de los marcadores en estudio de acuerdo al subtipo molecular fue variable. La Ck5/6 se observó en todos los subtipos, particularmente en los tumores TN el porcentaje de casos fue mayor que en el resto. Sin embargo no todos los tumores TN expresaron dicha citoqueratina, hallazgo que estableció

diferencias entre los mismo y distinguió a TNnB por falta de su expresión de TNB (Figura 8) por exhibir la misma. Al respecto se observó que en los luminal A, B, y tumores Her-2+ el marcaje fue focal en las células neoplásicas y nunca tan extenso como en los TNB. Además en estos últimos se apreció también una elevada expresión de la proteína p53.

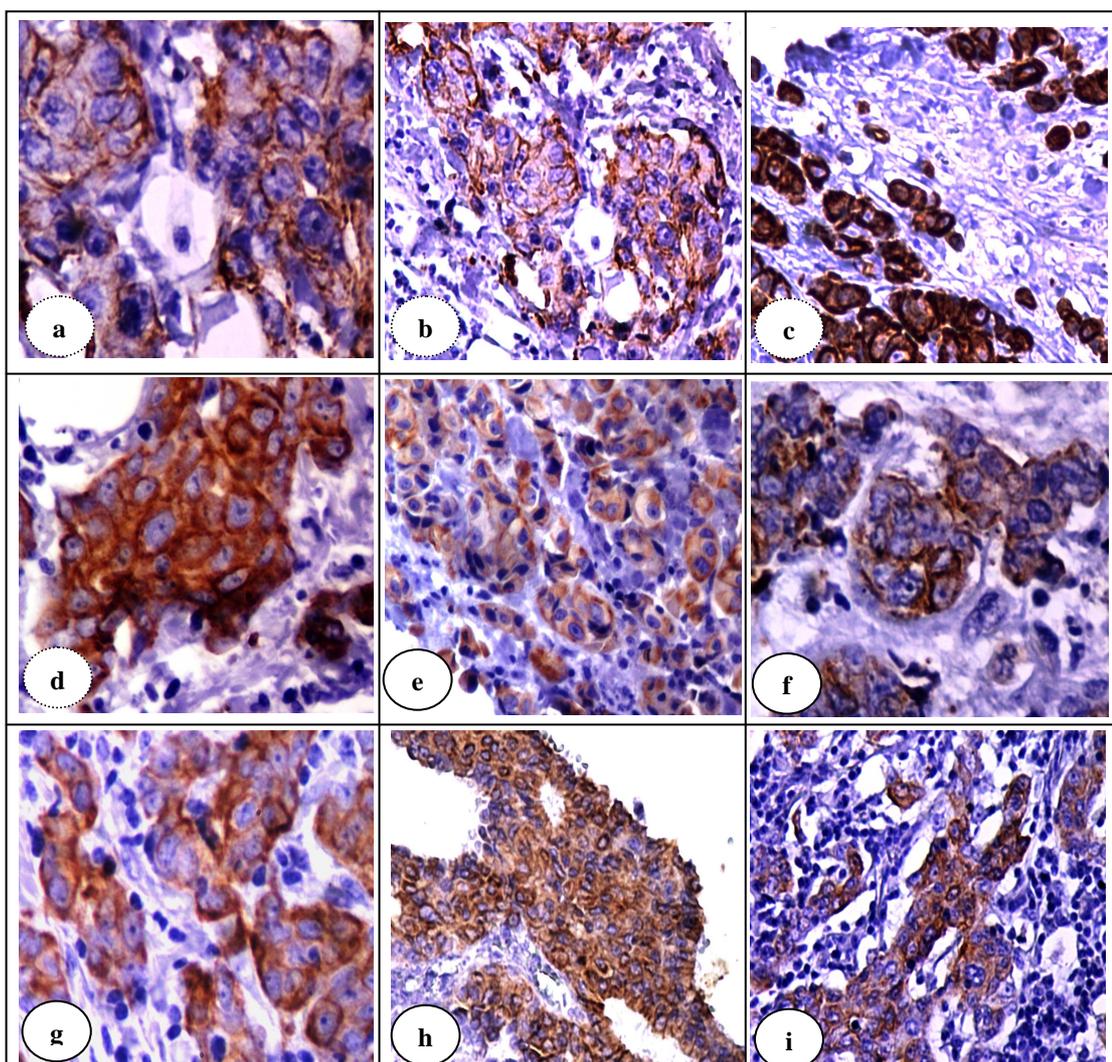


Figura 7: Imágenes microscópicas correspondientes a la expresión de los marcadores moleculares en estudio por inmunohistoquímica en las micromatrices de tejido. a. Ck5/6 (200x). b. Ck5/6 (100x). c. Ck5/6 (100x). d. Ck8 (200x). e. Ck8 (100x). f. Ck8 (100x). g. Ck18 (200x). h. Ck18 (100x). i. Ck18 (100x). Fuente. Imágenes de la investigación.

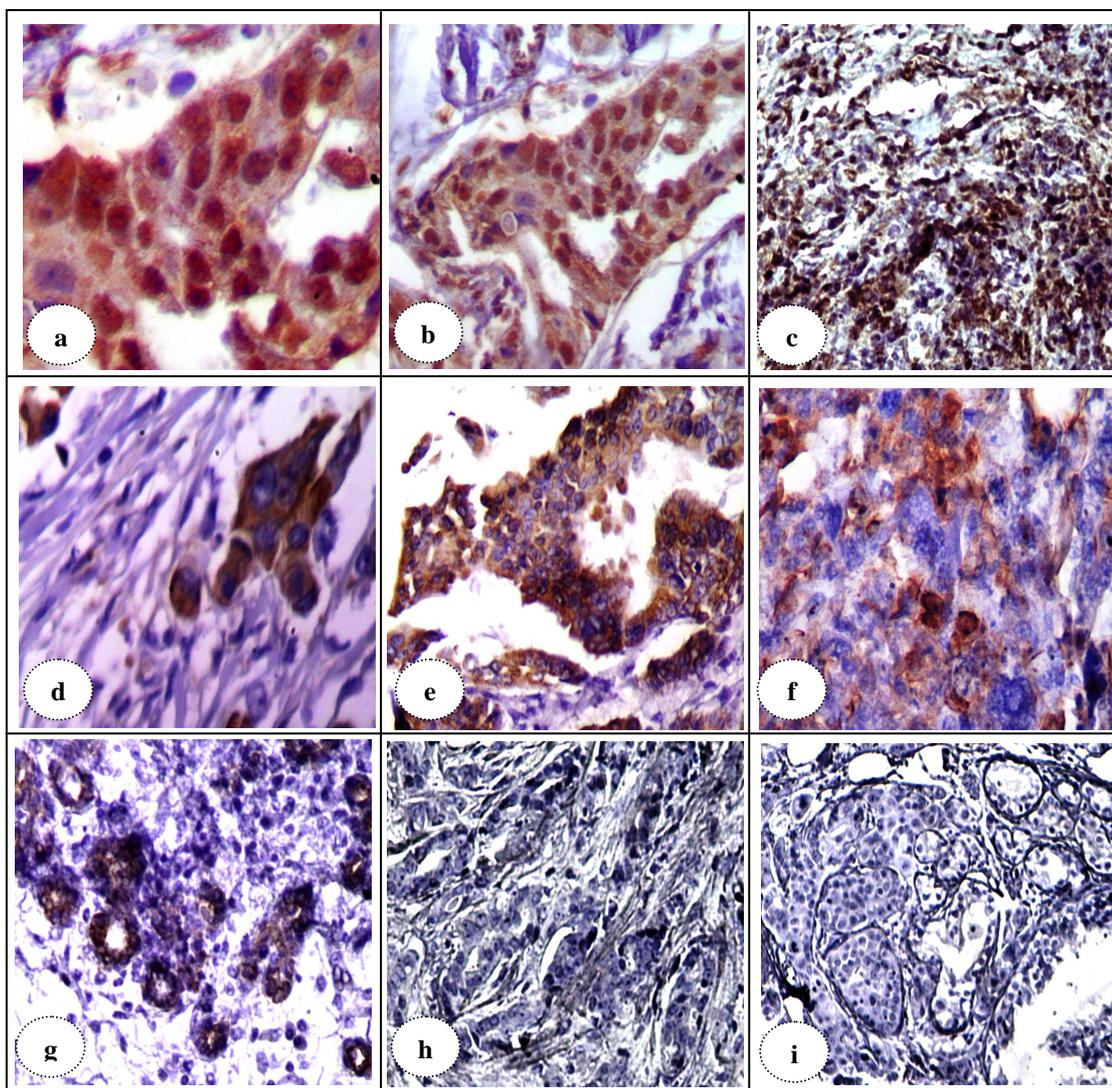


Figura 8. Imágenes microscópicas correspondientes a la expresión de los marcadores moleculares en estudio por inmunohistoquímica en las micromatrices de tejido. a. p73 (200x). b. p73 (100x). c. p73 (100x). d. CD10 (200x). e. CD10 (100x). f. CD10 (100x). g. EGFR control interno positivo. h e i. EGFR negativo. Fuente. Imágenes de la investigación.

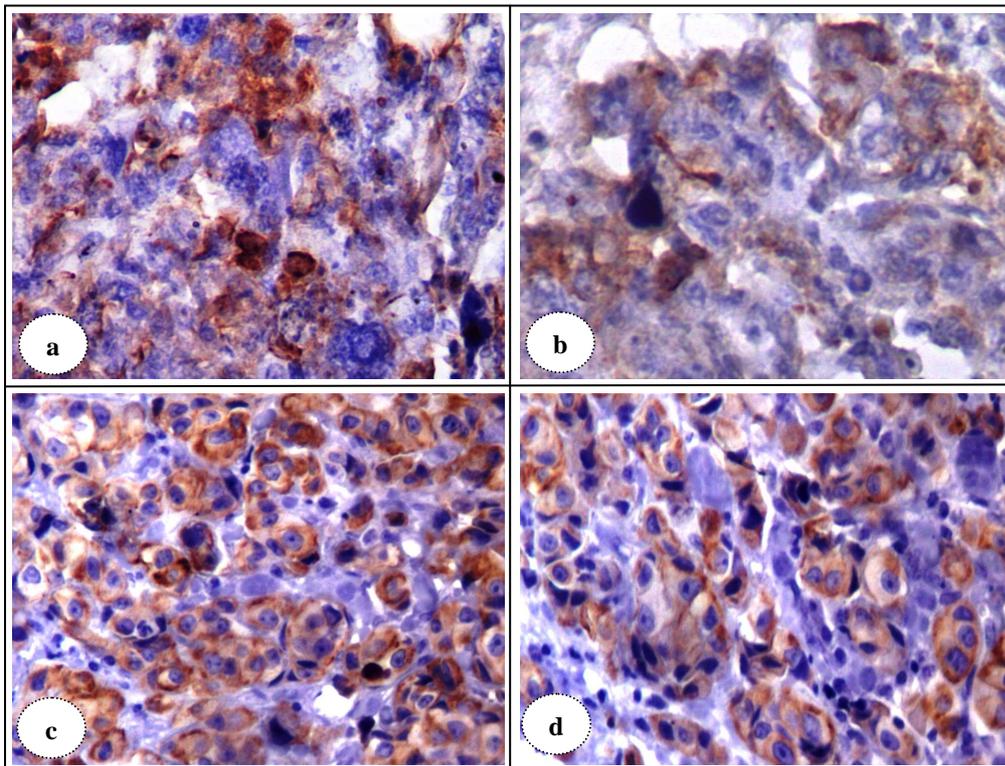


Figura 9. Imágenes microscópicas de la expresión inmunohistoquímica del tumor con inmunofenotipo TNB. a y b. CD10 (100x y 200x). c y d. Ck5/6 (100x y 200x). Fuente. Imágenes de la investigación.

Por otra parte la expresión de la Ck8 se observó en todos los luminal A, 97% de los luminal B, 94% de los Her-2, y 60% de los TN. Así mismo se observó marcaje de Ck18 en la totalidad de los luminal A, 86% de los luminal B, y en un 67 al 51% en los Her-2+ y TN respectivamente.

La proteína p73 se expresó en todos los subtipos en un porcentaje de casos variable entre 91 a 95%, correspondiendo porcentajes alto a los subtipo luminal A y Her-2+. La expresión del CD10 que también se observó en todos los subtipos

ocurrió en menor proporción de casos, oscilando entre 9 a 19%. No se observó expresión del EGRF en ningún subtipo (Cuadro 8).

Se observó asociación significativa en la expresión de Ck5/6 con los tumores TN y de la Ck8 y Ck18 con los luminal A y B como de la CD10 con el subtipo luminal A. Entretanto la expresión de la proteína p73 no presentó asociación significativa con los subtipos.

En principio en el análisis del subtipo molecular con la edad, se observó que las pacientes con tumores triple negativos son más jóvenes, así mismo la edad media es inferior a 50 años en relación a los otros subtipos, mientras que en aquellas con tumores luminal A, la edad media fue obviamente superior, encontrando diferencia significativa entre los tumores luminal A con los Her-2 y triple negativos, y entre los tumores luminal B y triple negativo en relación a la edad media (Cuadro 10). Igualmente se halló que más de la mitad de los casos clasificados estadio II correspondieron a tumores luminal (A, B) y los estadio III a Her-2+ y TN, encontrando asociación significativa entre los estadios II y III respectivamente con los subtipos luminal (A, B) y Her-2+ y TN.

En cuanto al grado de diferenciación del tumor se observó que los grado histológico I (bien diferenciados) y la mayoría de los grado II (moderadamente diferenciados) correspondieron a tumores luminal A y B, mientras que los grado

III (poco diferenciados) a tumores Her-2+ y TN. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el subtipo y el grado histológico.

Cuadro 7. Expresión de los marcadores Ck5/6, Ck8, Ck18, CD10, EGFR por inmunohistoquímica

Inmunomarcaje		Valorable		No valorable	
		n	%	n	%
Ck5/6	Positivo	13	9,77		
	Negativo	120	90,22		
	Total	133	89,26	16	10,73
Ck8	Positivo	119	89,47		
	Negativo	14	10,52		
	Total	133	89,26	16	10,73
Ck18	Positivo	103	76,26		
	Negativo	32	23,70		
	Total	135	90,60	14	9,39
p73	Positivo	117	92,12		
	Negativo	10	7,87		
	Total	127	85,23	22	14,76
CD10	Positivo	22	16,92		
	Negativo	108	83,07		
	Total	130	87,24	19	12,75
EGFR	Positivo	-	-		
	Negativo	147	100		
	Total	147	98,65	2	1,34

Fuente. Datos de la investigación. n=149

Cuadro 8. Expresión de marcadores en estudio según subtipo molecular

Inmunomarcaje		Luminal A	Luminal B	Her-2+	TN	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Ck5/6	Positivo	3 (6,52)	2 (5,71)	3 (15)	5 (15,62)	0,0189
	Negativo	43 (93,47)	33 (94,28)	17 (85)	27 (84,37)	
	Total	46 (34,58)	35 (26,31)	20 (14,49)	32 (23,18)	
Ck8	Positivo	45 (100)	37 (97,36)	18 (94,73)	19 (61,29)	0,0001
	Negativo	-	1 (2,63)	1 (5,26)	12 (38,70)	
	Total	45 (33,83)	38 (28,57)	19 (14,28)	31 (23,30)	
Ck18	Positivo	42 (100)	31 (86,11)	13 (61,90)	17 (51,51)	0,0001
	Negativo	-	5 (13,88)	8 (38,09)	16 (48,48)	
	Total	42 (31,11)	36 (26,66)	21 (15,55)	33 (24,44)	
p73	Positivo	39 (92,85)	31 (91,17)	18 (94,73)	29 (90,62)	0,7286
	Negativo	3 (7,14)	3 (8,82)	1 (5,26)	3 (9,37)	
	Total	42 (33,07)	34 (26,77)	19 (14,96)	32 (25,19)	
CD10	Positivo	8 (19,04)	5 (14,70)	6 (31,57)	3 (9,09)	0,0004
	Negativo	36 (85,71)	29 (85,29)	13 (68,42)	30 (90,90)	
	Total	42 (32,30)	34 (26,15)	19 (14,61)	33 (25,38)	
EGFR	Positivo	-	-	-	-	-
	Negativo	51 (100)	41 (100)	41 (100)	33 (100)	
	Total	51 (34,69)	41 (27,89)	41 (27,89)	33 (22,44)	

Fuente. Datos de la investigación. TN= triple negativo.

En el análisis se encontró asociación estadísticamente significativa de los subtipos con las media de edad, grupo etario, estadio clínico y el grado histológico. Sin embargo con el punto de corte de la edad ligado al estatus hormonal no se halló diferencia significativa (Cuadro 10).

Cuadro 9. Distribución de los tumores según el subtipo molecular y la edad

Subtipo	Edad media (años)	±DS	P		
			Luminal B	Her-2	TN
Luminal A	52,55	10,97	0,097	0,018	0,047
Luminal B	51,00	8,35	-	0,144	0,033
Her-2+	51,95	12,86	-	-	0,298
TN	49,51	13,87	-	-	-

Fuente. Datos de la investigación. n=149. TN= Triple negativo.

La media del seguimiento fue de 47, 45, 29,77 y 32 meses para cada subtipo respectivamente. Durante ese tiempo de seguimiento se identificaron 29 casos con recurrencia de la enfermedad, correspondiendo los mismos a aquellos con tumores del subtipo luminal A, Her-2+ y TN, el análisis demostró diferencia estadística significativa entre los subtipos ($p= 0,016$) (Cuadro10). El intervalo libre de enfermedad para dichos casos fue variable y oscilo entre 15 a 34 meses, encontrando que por subtipo fue de 34, 20 a 34 y 15 a 29 meses. El hallazgo clínico en un 41,37% consistió en nódulos (cutáneos o en la región axilar) y en un 27,58% fue la disnea. El sitio de recurrencia más frecuente fue pulmón seguido de la piel cercana a la cicatriz, la mayoría se observaron en los pacientes con tumores TN y Her-2+ (Cuadro 11). En los casos con reaparición de la enfermedad la muerte ocurrió a los 61 y 25 meses para los pacientes con tumores luminal A y B, como a los 24, 36, 48 y a los 24, 25 36 y 48 meses para aquellos con tumores Her-2+ y TN respectivamente. En el caso TN con inmunofenotipo basal o TNB (expresión Ck5/6 y CD10) la recurrencia ocurrió en ganglios axilares a los 22 meses.

La supervivencia global de la población en estudio a 50 meses fue estimada en más de 85% (Figura 10). No obstante se apreció que para el mismo periodo de tiempo para los pacientes con carcinomas luminal la supervivencia fue de 98 a 100%, presentando mejor supervivencia aquellos con tumores luminal A que B, mientras que para los pacientes con tumores Her-2+ y TN la misma fue de 60%. En el caso del tumor TNB con expresión de CK5/6 y CD10, la supervivencia global fue aún más corta y falleció a los 36 meses del diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte la supervivencia global media fue de 70 ± 2 meses para los luminal A; de 71 ± 1 meses para los luminal B; de 46 ± 2 meses para la clase Her-2+ y 41 ± 2 meses para los TN ($p < 0,000$).

Al final del periodo de seguimiento la supervivencia global disminuyó de forma importante para los pacientes con tumores TN que para el resto con otros subtipos tumorales. Los casos con subtipo luminal A presentaron menor supervivencia global que aquellos con tumores luminal B, los cuales claramente presentaron mejor supervivencia que el resto de los casos (TN, Her-2+ y luminal A) (Figura 11). Al evaluar la supervivencia de los pacientes según el subtipo molecular y la expresión de los marcadores del panel de estudio, se advirtió que la misma fue notablemente mayor en aquellos con tumores luminal A y B y perceptiblemente menor para aquellos con tumores Her-2+ y TN sensibles a la expresión de algunas proteínas en las células tumorales.

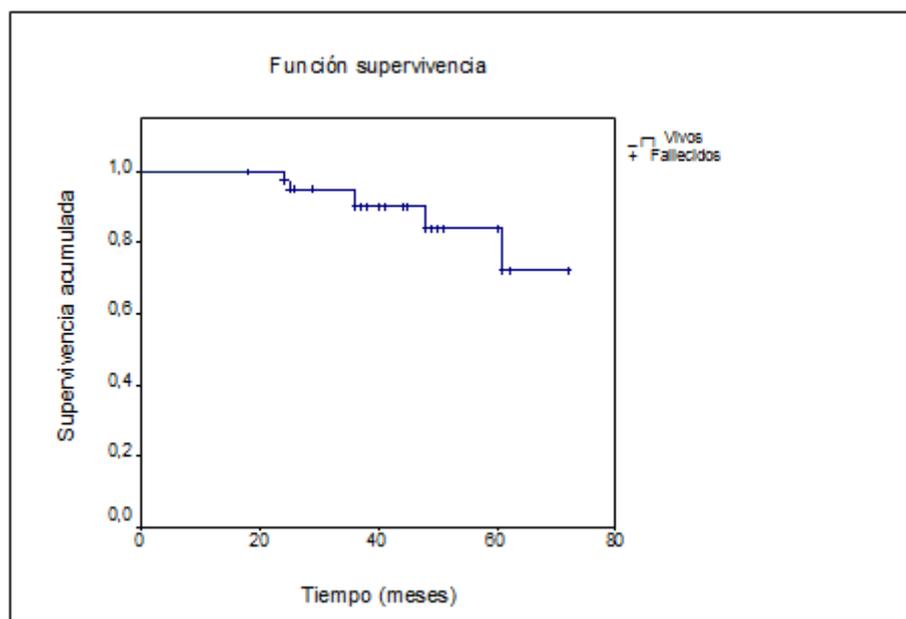


Figura 10. Supervivencia global de la población en estudio. Al final del período de seguimiento la supervivencia global disminuye al 73%. Fuente. Datos de la investigación.

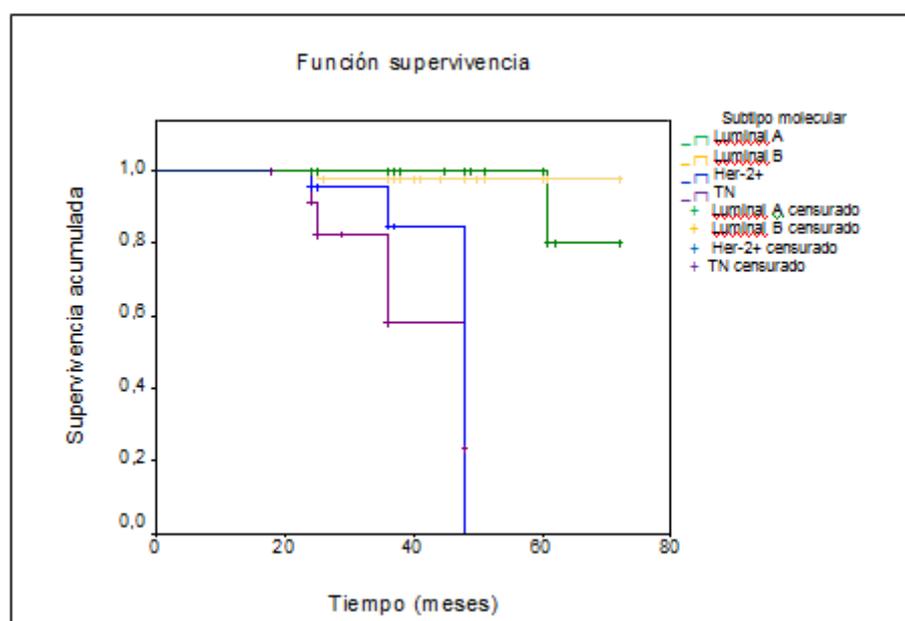


Figura 11. Supervivencia global de acuerdo al subtipo molecular. A los 72 meses la supervivencia global es menor para los pacientes con tumores TN que para aquellos con otros subtipos. Se observa mejor supervivencia global para los casos con tumores luminal B. Fuente. Datos de la investigación.

Cuadro 10. Análisis conjunto de las características de interés de acuerdo al subtipo molecular

Característica		Luminal A	Luminal B	Her-2+	TN	p
		n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	
Edad	Media	52,55	51,00	51,95	49,51	0,0010
	Rango	24-85	37-72	33-79	31-89	
Grupo etario	≤ 40	2 (3,92)	3 (7,31)	2 (9,09)	9 (25,71)	0,0310
	41-50	27 (52,94)	20 (48,78)	10 (45,45)	16 (45,71)	
	51-65	15 (29,41)	16 (39,02)	8 (36,36)	4 (11,42)	
	≥ 66	7 (13,72)	2 (4,87)	2 (9,09)	6 (17,14)	
	Total	51 (34,22)	41 (27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)	
Punto de corte	≤ 50	29 (56,86)	23 (56,09)	12 (54,54)	25 (71,42)	0,4511
	> 50	22 (43,13)	18 (43,90)	10 (45,45)	10 (28,57)	
	Total	51 (34,22)	41 (27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)	
Estadio	I	13 (25,49)	5 (12,19)	-	1 (2,85)	0,0580
	II	36 (70,58)	33 (80,48)	7 (31,81)	17 (48,57)	
	III	2 (3,92)	3 (7,31)	15 (68,18)	17 (48,57)	
	Total	51 (34,22)	41(27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)	
Grado histológico	I	6 (11,76)	4 (9,75)	-	-	0,0010
	II	38 (74,50)	34 (82,92)	11 (50)	11 (31,42)	
	III	7 (13,72)	3 (7,31)	11 (50)	24 (68,57)	
	Total	51 (34,22)	41 (27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)	
Recurrencia	Local	-	-	5 (62,5)	4 (20)	0,0160
	Regional	-	-	-	3 (15)	
	Sistema	1 (100)	-	3 (37,5)	13 (65)	
	Total	1(3,44)	-	8 (27,58)	20 (68,96)	
Estatus	Vivas	50(98,04)	40(97,56)	19(86,369)	22(62,86)	0,0000
	Fallecidas	1(1,96)	1 (2,43)	3(13,63)	13(37,14)	
	Total	51(34,22)	41(27,51)	22 (14,76)	35 (23,48)	
SG	Media	70	71	46	41	0,0000

Fuente. Datos de la investigación. TN: Triple negativo

Cuadro 11. Análisis del patrón de recurrencia de la enfermedad según el subtipo molecular

Recurrencia		Luminal A	Luminal B	Her-2+	TN	p
		n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	
Aparición*	Media	35	-	24,11	21,75	0,0160
	Rango	-	-	21-35	16-30	
Síntomatología	Nódulos	-	-	5(62,5)	7(35)	0,0000
	Disnea	1(100)	-	2(25)	6(30)	
	Tos	-	-	1(12,5)	3(15)	
	Dolor	-	-	-	2(10)	
	Ninguna	-	-	-	2(10)	
	Total	1(3,44)	-	8(27,58)	20(68,96)	
Ubicación	Piel	-	-	5(62,5)	4(20)	0,0000
	G. axila	-	-	-	3(15)	
	Pulmón	1 (100)	-	3(37,5)	9(45)	
	Hígado	-	-	-	2(10)	
	Hueso	-	-	-	2(10)	
	Total	1(3,44)	-	8(27,58)	20(68,96)	

Fuente. Datos de la investigación. *Expresado en meses.

Así se observó una mejor supervivencia global en los casos con expresión de la Ck8 y Ck18, curiosamente más en pacientes con tumores del subtipo luminal B que luminal A. En tanto que la ausencia de expresión parece no incidir negativamente incluso en todos. Igualmente se observó una menor supervivencia global ante la expresión de CD10 en los casos con tumores luminal B, Her-2+ y TN como ante el inmunomarcaje de p73 y Ck5/6 en aquellos con TN y luminal A respectivamente (Figura 12 a 22). Se encontró asociación del inmunomarcaje de Ck8 y Ck18 en el subtipo luminal B con una supervivencia global y supervivencia media significativamente mayor, como de la Ck5/6 y p73 en el subtipo TN y luminal A con una supervivencia global y supervivencia global media significativamente menor (Cuadro

Cuadro 12. Supervivencia global de acuerdo a la expresión de los marcadores en estudio y subtipo molecular

Inmunomarcaje		Luminal A	Luminal B	Her-2+	TN
Media en meses \pm DS de la supervivencia global					
Ck5/6	Positivo	-	-	-	40 \pm 2
	Negativo	68 \pm 3	-	45 \pm 2	45 \pm 4
	p	-	-	-	0,020
Ck8	Positivo	69 \pm 2	-	45 \pm 2	39 \pm 3
	Negativo	-	25	-	44 \pm 3
	p	-	-	-	0,000
Ck18	Positivo	69 \pm 2	-	46 \pm 3	41 \pm 3
	Negativo	-	-	37	42 \pm 3
	p	-	-	0,88	0,001
p73	Positivo	69 \pm 2	-	45 \pm 2	41 \pm 2
	Negativo	-	-	-	36
	p	-	-	-	0,010
CD10	Positivo	-	54 \pm 6	35 \pm 2	36
	Negativo	68 \pm 3	-	47 \pm 2	41 \pm 2
	p	-	-	0,24	0,428
EGFR	Positivo	-	-	-	-
	Negativo	70 \pm 2	71 \pm 1	46 \pm 2	41 \pm 2
	p	-	-	-	-

Fuente. Datos de la investigación. TN= Triple negativo.

El análisis multivariante de regresión de Cox de las variables clínico-patológicas y de la expresión de las moléculas de Ki-67, p53, Bcl2, Ck5/6, Ck8 y Ck18, p73, CD10 y EGFR, mostró valor pronóstico independiente para los subtipos moleculares, la edad, el estadio clínico, la expresión de Ki-67, BCL2 y la expresión de Ck5/6 con cocientes de riesgos (hazard ratio) de 0,7; 0,6; 3,5; 2,5, 2,2 y 3,1 respectivamente.

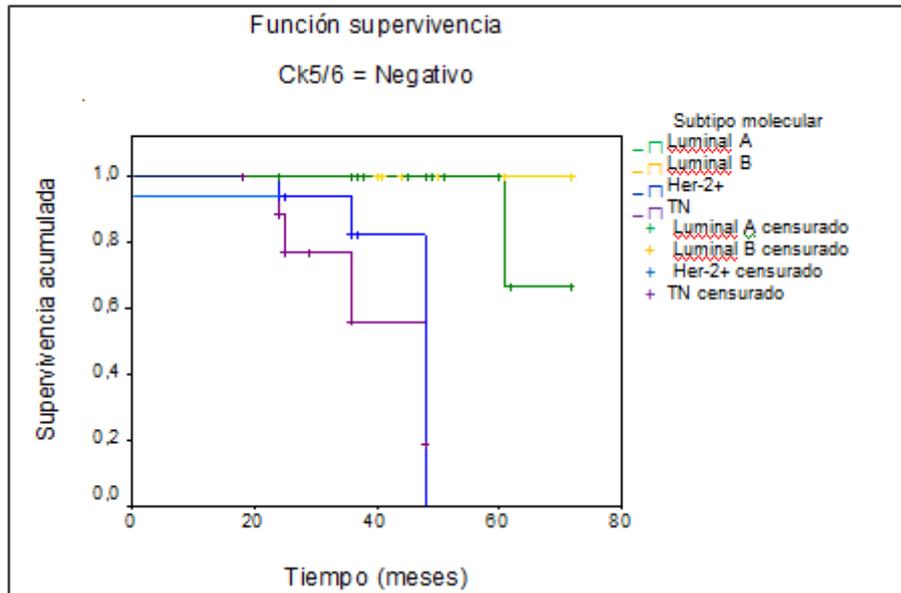


Figura 12. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador Ck5/6. Se observa mejor supervivencia global para los subtipos luminal B y A que para Her-2+ y TN ante la ausencia de inmunomarcaje de la Ck5/6. Fuente. Datos de la investigación.

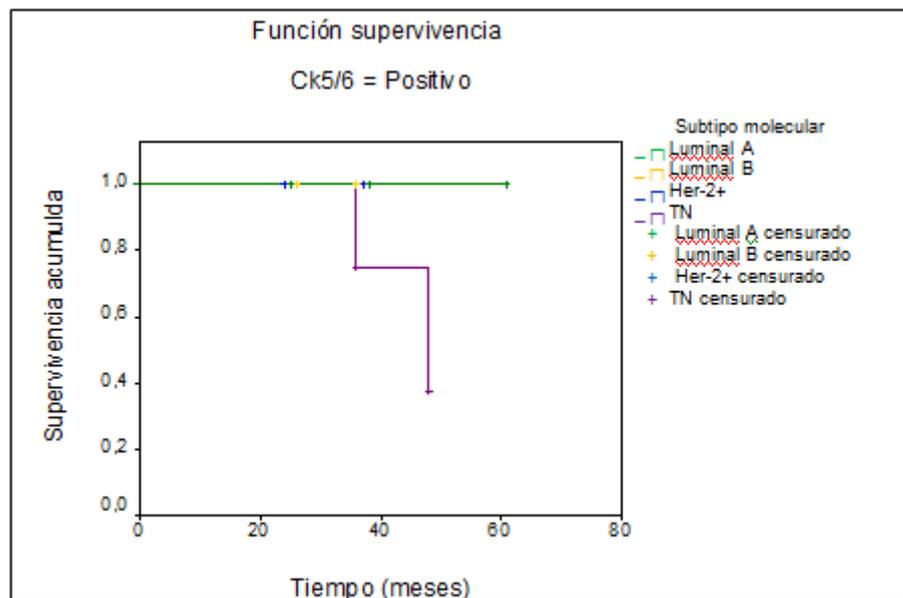


Figura 13. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador Ck5/6. Es evidente la disminución de la supervivencia global para el subtipo TN ante el inmunomarcaje de Ck5/6. Fuente. Datos de la investigación.

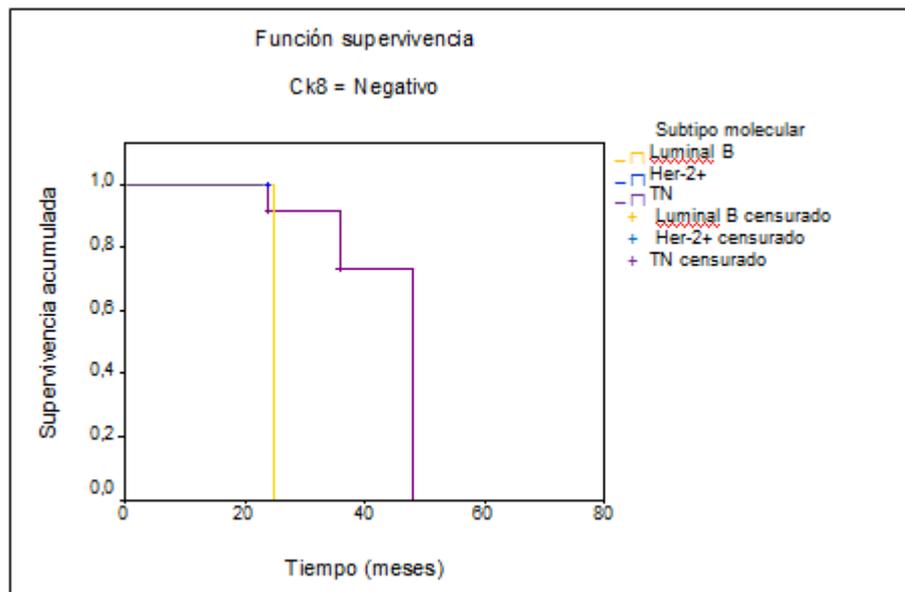


Figura 14. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador Ck8. La supervivencia global disminuye en los casos con subtipos luminal B, TN, Her-2+ sin relación con el marcaje de la Ck8. Fuente. Datos de la investigación.

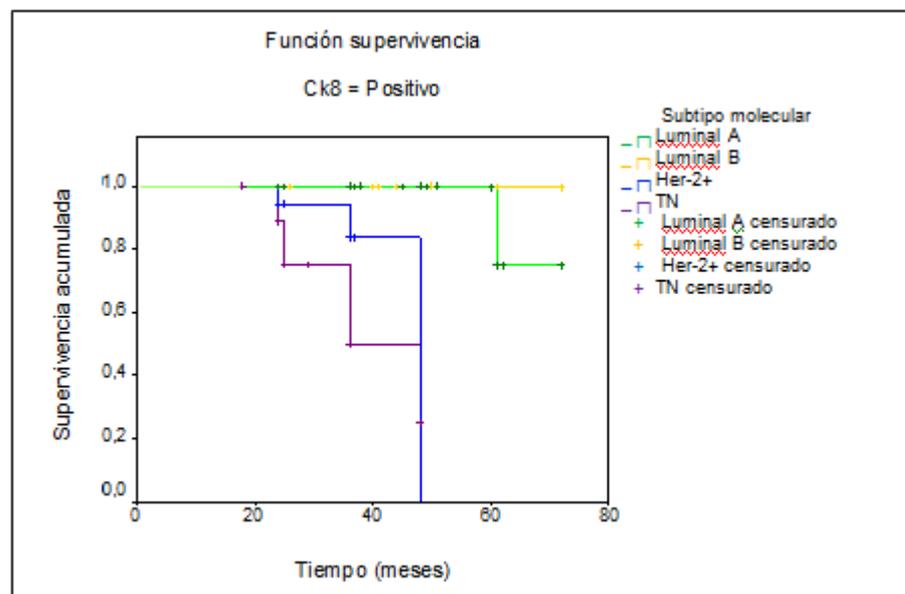


Figura 15. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador Ck8. Se aprecia mayor supervivencia de los casos con subtipo luminal B y luminal A que en el resto de los subtipos con inmunomarcaje de Ck8. Fuente. Datos de la investigación.

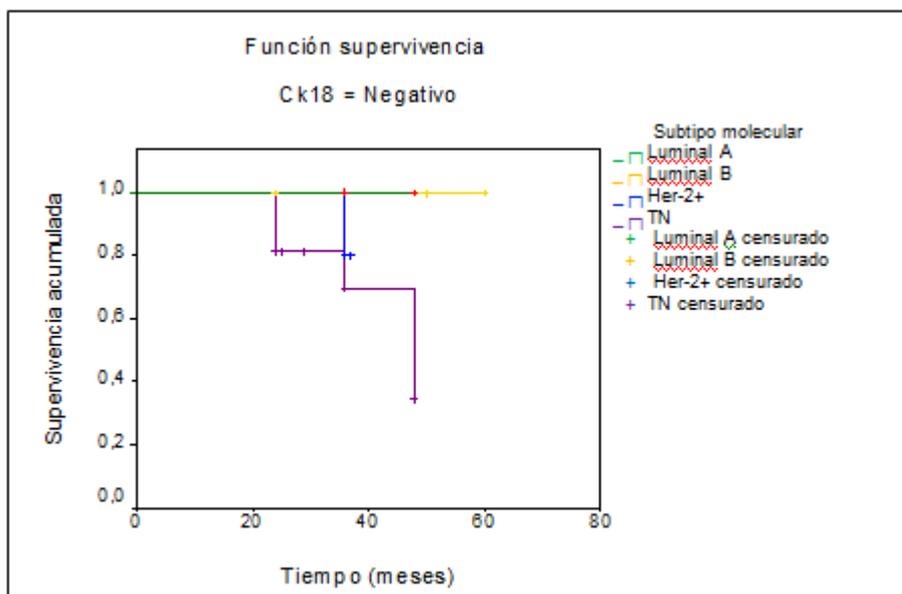


Figura 16. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador Ck18. La supervivencia global disminuye sensiblemente en los subtipos Her-2+ y TN. Fuente. Datos de la investigación.

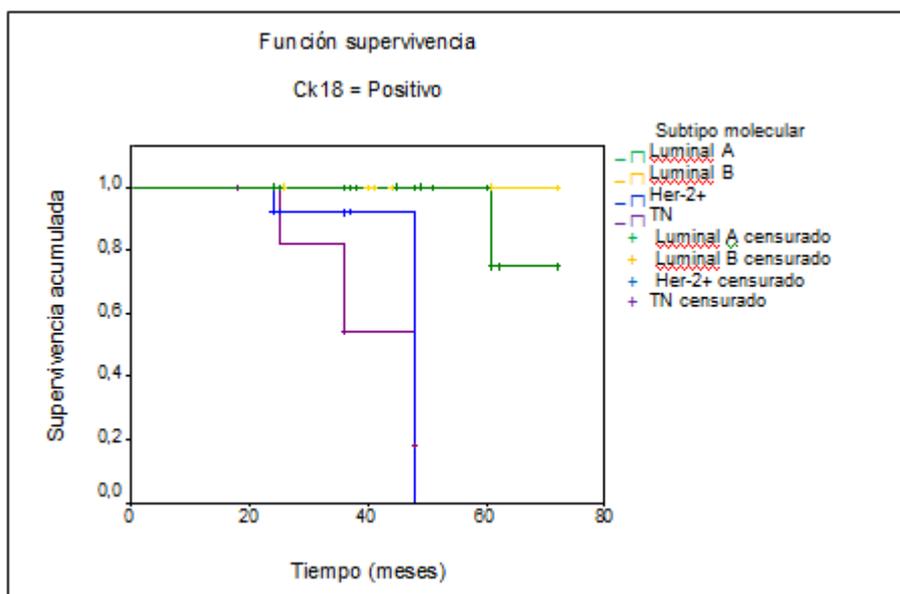


Figura 17. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador Ck18. Se observa mayor supervivencia global de los subtipos luminal B y luminal A que en el resto de los subtipos con inmunomarcaje de Ck18. Fuente. Datos de la investigación.

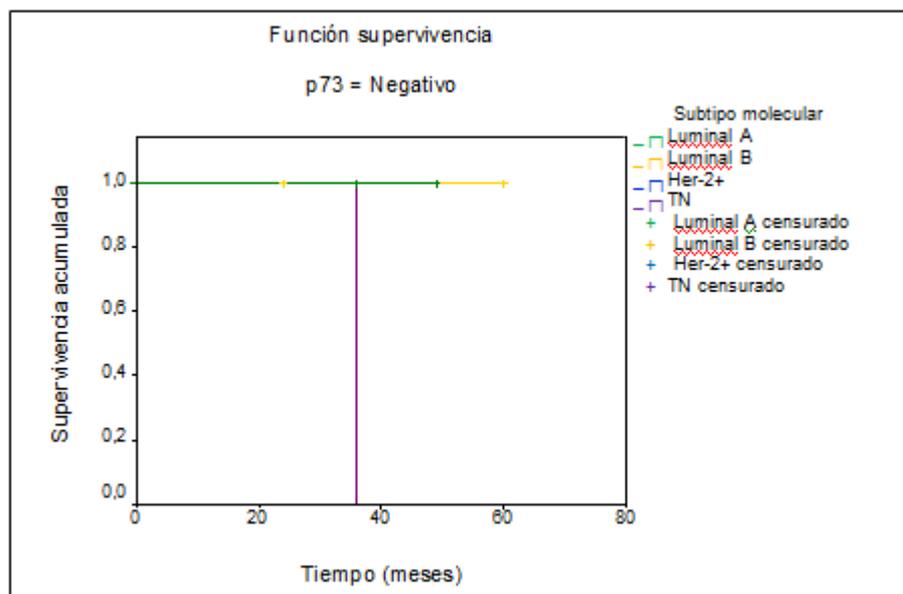


Figura 18. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador p73. La supervivencia global disminuye más en los casos con subtipo TN que en el resto de los subtipos en ausencia de marcaje de la proteína p73. Fuente. Datos de la investigación.

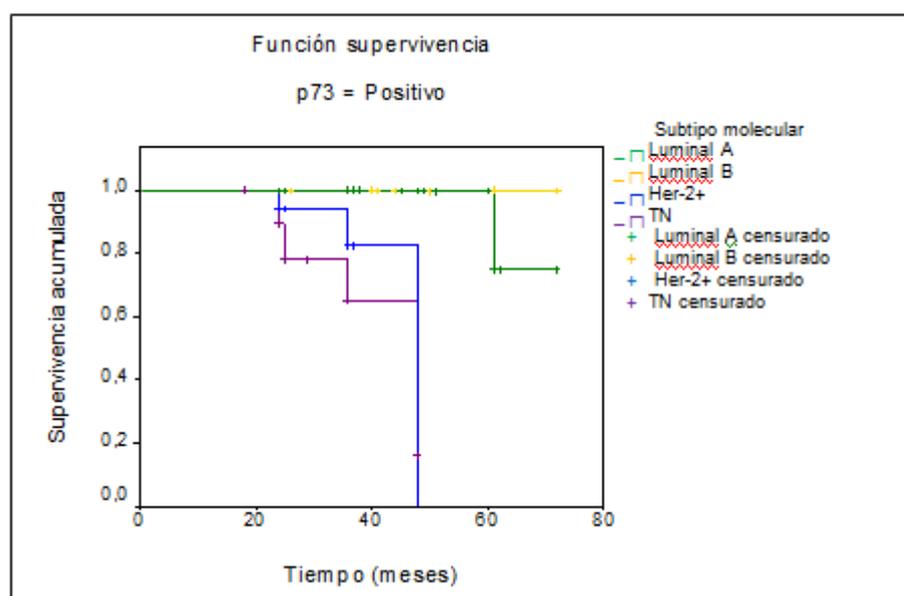


Figura 19. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador p73. Es perceptible la mejor supervivencia global para los casos con subtipos luminal B y luminal A que para los subtipos Her+2 y TN con inmunomarcaje de p73. Fuente. Datos de la investigación.

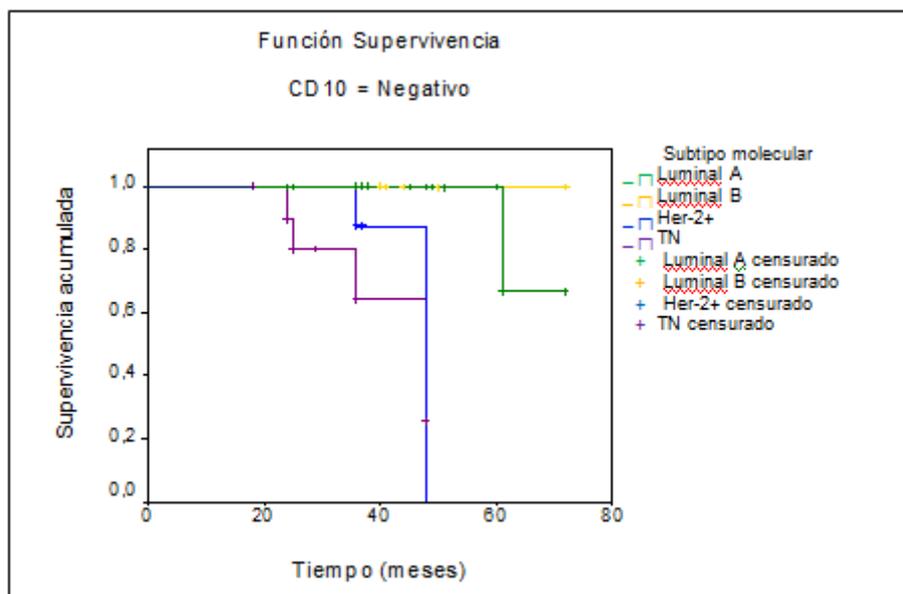


Figura 20. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador CD10. La supervivencia global es menor para los casos con subtipo luminal Her-2+ y TN que para aquellos con luminal A en ausencia de marcaje de CD10. Fuente. Datos de la investigación.

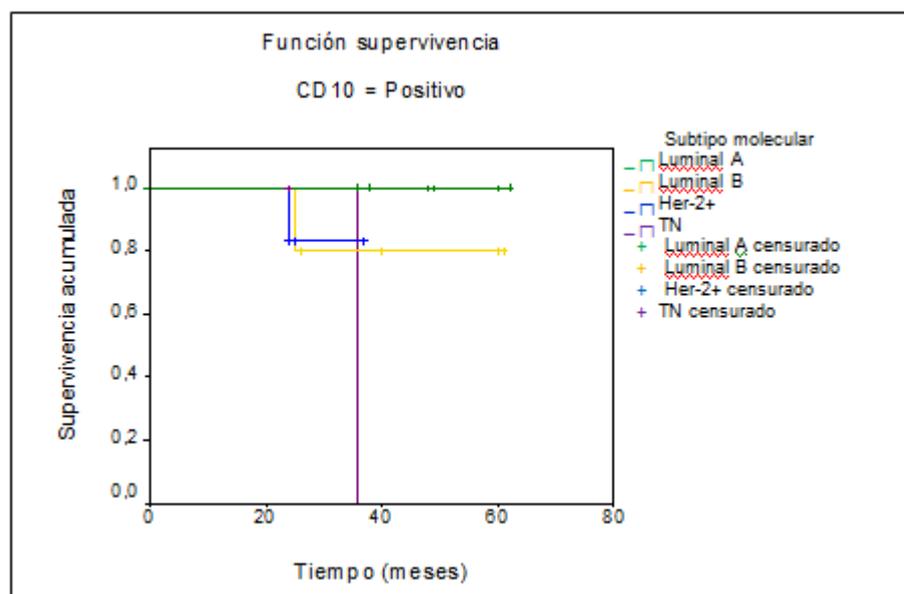


Figura 21. Supervivencia global según el subtipo molecular y la expresión positiva del marcador CD10. La supervivencia global disminuyó más en los casos con subtipo TN que luminal B con marcaje de CD10. Fuente. Datos de la investigación.

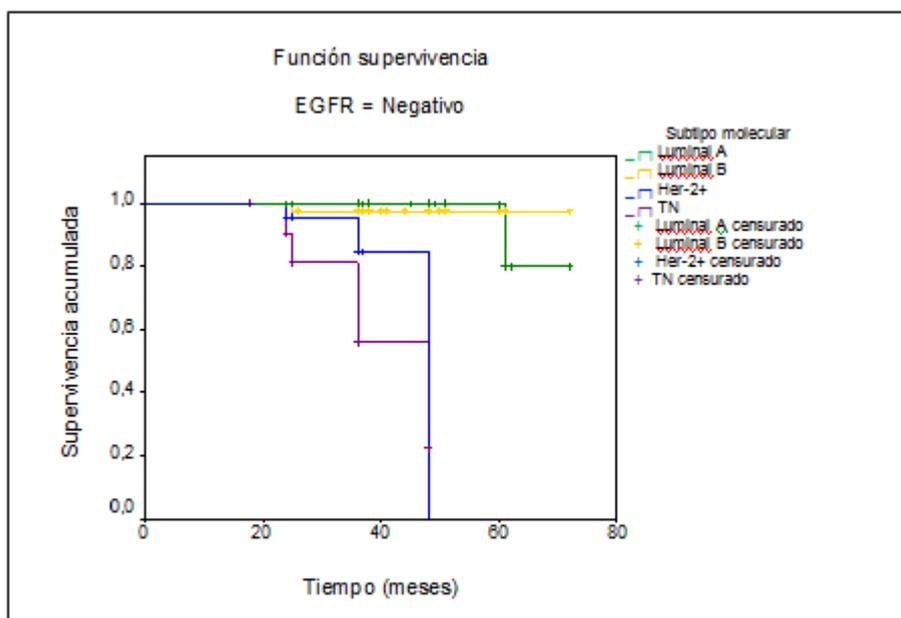


Figura 22. Supervivencia global según el subtipo molecular y la ausencia de expresión del marcador EGFR. Fuente. Datos de la investigación.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

5.1 Consideraciones y reflexiones

Es innegable que a más de una década que fue revela la taxonomía molecular del carcinoma de mama sobre la base de la expresión génica, el uso generalizado de la clasificación en subgrupos es aún restringida e imposible en la mayoría de centros asistenciales de muchos países (19,70,162-164). Así mismo, otros estudios multigénicos también son limitados y en algunas regiones son solo accesibles para quienes cuentan con algún sistema de seguridad social o recursos económicos suficientes (51,165).

En nuestro medio los casos en la práctica habitual son evaluados con el perfil de tinción del estudio inmunohistoquímico, y diferenciar los subtipos conocidos con el mismo parece una alternativa mucho más factible que con los otros estudios referidos en la literatura (27,30,33,34,41), considerando la importante población en la que acontece la neoplasia (8,9,60,165) y que el procedimiento para el análisis requerido debe ser fácil, reproducible y

relativamente económico (38) con el poder de caracterizar los subtipos moleculares como lo señalan algunos artículos (31,37,43,44,161,163,166-168).

En este estudio de acuerdo a la clasificación molecular del carcinoma de mama empleando inmunohistoquímica, se apreció un número importante de tumores que expresaron el receptor de estrógeno, el cual se ha reconocido indiscutiblemente como el mayor factor discriminador del subtipo molecular (23,26,27,31,41,169,170). En relación con lo anterior y la expresión del RP y Her-2, se observó predominio de los tumores del subtipo luminal, con una mayor proporción a favor de los luminal A, hallazgo que si bien es similar en la distribución a lo descrito en los estudios de Carey, Ihemelandu, Matos, Piñero, Salhia y sus grupos de trabajo (31,39,42,43,171) difiere con los mismos en la proporción de la totalidad de casos luminal y de sus subtipos.

En los estudios citados se han comunicado frecuencias que oscilan para los carcinomas luminal entre 64,5 y 75,6%, como para el subtipo A entre 47,9 al 57,6% y para el subtipo B entre 6,9 al 11,6%, diferencias que se acentúan aún más por el porcentaje obtenido de 27,5% para los últimos en el presente, aunque al respecto con los análisis de Muñoz, Muñoz, O'Brien y sus colaboradores se encontró similitud con este hallazgo (49,68,172).

Es posible que las disimilitudes con dichos análisis entre otras razones pueden atribuirse al diseño de los mismos, número de casos, al método de

clasificación molecular según los distintos criterios empleados por cuanto en algunos se consideran exclusivamente tumores luminal B y en otros tumores mixtos a aquellos que expresan RE/RP/Her-2, a características de base poblacional como raza (caucásica, afroamericana, hispanica, o mestiza), componente ancestral, edad y estrato, o al estatus hormonal o estadio clínico.

En el estudio de Reigosa y colaboradores (168), contrario a lo descrito en el presente, se encontró predominio de tumores TN con inmunofenotipo basal o TNB, hallazgo con el cual obviamente se difiere. Por otra parte el porcentaje de tumores Her-2+ que fue de 14,8%, resultó similar a lo descrito en otras publicaciones (68,171-173). Sin embargo, con otros estudios, se observó disparidad por un porcentaje menor y variable entre 5,6 y 13,3% (31,39,43,170,171).

En relación a los tumores TN la proporción de 23,5% difiere notablemente del 3 al 15% de lo reportado en la literatura y encontrado en países desarrollados. No obstante, el hallazgo en el presente, es comparable con lo señalado en los estudios por Carey, Blows y O'Brien, (31,170,172), aunque es de resaltar que las poblaciones abordadas en las citadas investigaciones estaban conformadas por mujeres afroamericanas e hispanicas, que si bien son consideradas por separado parecidas a nuestra población en la literatura, hay que admitir que el mestizaje es lo más común en la misma.

El inmunomarcaje del Ki-67 fue predominante no solo para los carcinomas TN, sino también para los Her-2+, hallazgo que difiere de lo reportado en la literatura (43,44). Sin embargo, la expresión del Ki-67 en un porcentaje importante de tumores del subtipo luminal A que llamó la atención no difirió de otra publicación (174). No obstante en el presente al evaluar en las células tumorales con inmunomarcaje, el porcentaje de núcleos teñidos, se coincide en que los tumores luminal B expresan más bien un índice de proliferación celular más alto ($\geq 25\%$) que los luminal A, hallazgo también presente en los subtipos Her-2+, TNnB y TNB, como se ha señalado con anterioridad (34,42,44,176,177).

Por otra parte análisis como los de Cheng y Bhargava (178, 179) dieron a conocer que el índice de expresión de Ki-67 es un marcador que diferencia mejor a los subtipos luminal y sugirieron que aquellos tumores con un índice $> 14\%$ deberían ser clasificados como tumores luminal B y no luminal A. No obstante una limitante con el mismo para clasificar a dichos subgrupos e incluso comparar resultados con otros estudios, es en la práctica un punto de corte muy variable y una técnica no estandarizada para su evaluación e interpretación. Aún así, lo cierto es que, mientras más elevado es el índice de Ki-67, mayor es la fracción de células tumorales en proliferación y la agresividad del tumor, que se relaciona entre otros con un tiempo de SG e ILE menores y contradictoriamente mejor respuesta a la quimioterapia, lo que da valor pronóstico y predictivo al mismo (12,13,15,28,126,176-179).

La expresión de p53 en los tumores luminal A y B en una proporción de casos nada despreciable en cada subtipo fue comunicado en un estudio previo (179). En el presente, tanto los luminal A como B registraron mayor número de tumores que inmunomarcaron la proteína, resultados que difieren del análisis de Piñero y colaboradores (43). No obstante, el inmunomarcaje de la proteína en los tumores TN y Her-2+ no fue distinto de los resultados en otras publicaciones (27,28,43,44) y al respecto se concuerda en que los TN más que los Her-2+ muestran una elevada expresión de la proteína p53 (27,31).

En este estudio el porcentaje de casos que expresó la proteína Bcl2 fue menor a lo reportado en otro (56,37% vs 69,27) (175). Considerando la expresión por subtipo, el marcaje en los luminal A y B fue similar a lo señalado en la literatura (45,175,181), mientras que en los Her-2+ y TN la proporción de casos que inmunomarcaron la misma fue relativamente bajo comparado con los otros subtipos, resultado que difieren de lo publicado en algunos análisis (43,47). La expresión de la proteína p53, Bcl2 o ambas en un tumor, se sabe se encuentran ligadas con los mecanismos frecuentes de evasión de la apoptosis, e influyen en un comportamiento tumoral más agresivo, y por tanto en un pronóstico menos favorable para los casos con inmunomarcaje (26,27,83,84).

Las proteínas marcadores de células epiteliales luminales como la Ck8 y Ck18 se co-expresaron en un importante número de tumores. En los luminal A característicamente se observó en todos, y en los luminal B en la mayoría como

era de esperar, y aunque también se apreció en los Her-2+ y TN, la explicación pudiese tener fundamento en el origen de las células primitivas con potencial de diferenciación dual, aunque con evidente predominio de un linaje celular (65,178) (182). Por otra parte la Ck5/6, marcador de células epiteliales de origen basal, se expresó en muy pocos tumores del subtipo luminal A, B y Her-2+, similar a lo reportado por algunos autores (33,37,166), pero en un 15,62% en los tumores TN, hallazgo que difiere notablemente del rango entre 50 a 80% de lo encontrado en algunas publicaciones (33,37,69,169,183).

Así mismo el CD10 marcador de las células mioepiteliales de la mama se expresó en pocos tumores de todos los subtipos. En los TN el número de casos que innumarcaron la proteína fue aún más bajo que en el resto, resultado consistente con lo comunicado en el estudio de Livasy y colaboradores (37), no obstante, se reconoce son limitadas las investigaciones que han abordado el análisis de su expresión (37,184). Al respecto pocos análisis han revelado que su marcaje en las células define pérdida de características epiteliales hacia un inmunofenotipo mesenquimal y ha sido considerado un indicador de la transición epitelio mesenquima (TEM) lo que pudiera estar en relación con mayor agresividad del tumor que le expresa (184,185).

La expresión de Ck5/6 y CD10 en algunos carcinomas TN permitió distinguir entre los mismos tumores con inmunofenotipo basal o tumores TNB de acuerdo a la definición conocida en la literatura (37,42,65,136,144,178,186,187).

En particular un caso TNB expresó ambas proteínas, hallazgo que se sabe tiene implicaciones clínicas de acuerdo a algunas publicaciones (37,169).

Por otra parte la proteína p73 se expresó en un alto porcentaje de tumores en todos los subtipos, no obstante en los luminal A y Her-2+ se observó mayor proporción de casos que le inmunomarcaron, resultados que difieren con lo publicado por Zhou, Zhou y su grupo de trabajo (187,188).

En este estudio el análisis de la expresión de los anticuerpos inicialmente realizados y del panel abordado en la investigación, mostró en conjunto un retrato molecular de cada tumor no conocido hasta presente de ninguno, como heterogeneidad en los subtipos moleculares al observar porcentajes de expresión muy variados para los 12 marcadores moleculares analizados. La heterogeneidad en los subtipos tumorales se ha señalado en otros estudios (31-33,137,144,162,171,190) lo de destacar en el presente, es la evidencia de un patrón de expresión proteica en las muestras tumorales que difiere de lo publicado en la literatura hasta hoy (31,33,37,39,42-44,65,69), y que pudiese ser el punto de partida para explicar y/o comprender diversos hallazgos clínicos de la enfermedad en nuestras pacientes.

Es posible que dicha variabilidad en la neoplasia tenga sustento teórico en la carcinogénesis y progresión de las células madres neoplásicas malignas que poseen un importante número de alteraciones genéticas y diversos potenciales

evolutivos, que son traducidos en los variados patrones de expresión de moléculas proteicas que son revelados por el estudio inmunohistoquímico. (65,71,72,74, 174,190) aunque no se descarta la relación de base poblacional. Datos recientes indican que el grado de componente ancestral europeo y otros en la población no solo latina, se relaciona con un riesgo incrementado para la neoplasia y se vincula además con la presencia de diferencias genéticas de grupos tumorales (170-173,191).

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado como lo sugieren algunos referidos de la literatura (31,33,37,169) que el análisis de los patrones de expresión proteica por el perfil de tinción del estudio inmunohistoquímico del tumor puede ser un sustituto útil para catalogar en subtipos equivalentes a aquéllos basados en perfiles de expresión génica, aún cuando, se advierten obvias diferencia con dicha técnica y resultados que pueden ser muy variables con la misma. A los efectos se reconoce que los estudios por IHQ del tumor exponen determinadas proteínas moleculares presentes en la población de células tumorales, por lo que podrían considerarse un reflejo válido y aplicable de los estudios de biología molecular al develar información de aquellas y en consecuencia de la neoplasia (31,33,37,43,175) a lo que se adiciona la posibilidad de identificar el tipo celular que exprese la proteína (150,151) y su uso sin lugar a dudas sobre muestras tisulares preservadas únicas o múltiples y organizadas en TMAs en nuestro medio (63,149,152).

Clínicamente, se observó que la edad media de 51,32 años de las pacientes para el momento del diagnóstico de la enfermedad, es muy similar a lo registrado en otro estudio (179) y cercano a lo comunicado en distintas publicaciones que refirieron la edad media alrededor de los 50 años (172,174,192,193), hallazgo que difiere de otros trabajos como el de Reigosa, Arrechea y sus grupo de trabajo (168,174) donde la misma fue reportada en 49,62 y 59,8 años respectivamente. Diferencias que entre otras igualmente puede atribuirse al número de casos, el tipo de institución de donde provienen aquellos y/o características epidemiológicas y hasta sociales de las poblaciones incluidas en cada uno.

En este estudio llamó la atención, como en dos de carácter nacional (168,175), el porcentaje de la neoplasia en mujeres por debajo de 50 años. En tal sentido, la cifra más baja de la media de edad, se observó en las mujeres también con tumores del subtipo TN, lo cual coincide incluso con resultados de otros análisis (31,193).

En un número de los casos, el tamaño tumoral, estado de los ganglios linfáticos regionales, grado histológico y el estadio clínico registrado, se encontraron fuera de lo común comunicado en otras investigaciones, particularmente por los hallazgos de tumores localmente avanzados, con grado histológico de moderado a pobremente diferenciado (27,174,175).

Así mismos cuando ampliamente se evalúan dichas características en relación al subgrupo molecular, se observó como en los tumores del subtipo luminal A y B, es mayor la diferencia del estadio clínico y el grado histológico en sus escalas, II con el I a favor del primero, y aunque los tumores de ambos subtipos mostraron características favorables en relación al resto de los otros subtipos (Her-2+ y TN), como tamaño tumoral más pequeño, con bajo a moderado grado histológico, ganglios axilares negativos o menor número de ganglios con metástasis y en definitiva estadio menores en el momento del diagnóstico no es posible obviar el mayor porcentaje de casos con tumores luminal B que A que correspondieron con lo descrito. Al respecto es posible que el número de casos luminal A en estadio II, pudiese tener una explicación por la expresión en algunos de los mismos de las moléculas proteicas p53, Bcl2, alto índice de Ki-67, p73 y CD10 que entre otras actúan limitando la reparación del daño celular, la apoptosis y promueven la proliferación celular sin mayor arresto, lo que vincularía un tumor de un mejor fenotipo con un mayor estadio y no uno más bajo. No obstante el inmunomarcaje de dichas proteínas en algunos tumores de este subtipo ofrece sin dudas características de diferenciación entre los mismo.

En el presente, el número de casos con enfermedad en estadios localmente avanzados (IIb, IIIa, IIIb y IIIc) que concuerda con otros estudios nacionales (61,174), difiere de la literatura internacional por el diagnóstico de la enfermedad en estadios iniciales (0, I y IIa) (30,174,193). Sin embargo y aunque fue significativa la relación de tumores en estadios II con el subtipo luminal A y B y

del III con los subtipos Her-2+ y TN, fue obvio el escaso o negativo número de casos en estadios I para casi todos los subtipos. Así también aquellos últimos son tumores fundamentalmente indiferenciados (grado III) en comparación los del subtipo luminal.

Las diferencias entre los subtipos moleculares del cáncer de mama son claras, y aunque lo común es que los carcinomas de mama de tipo luminal A, seguido de los luminal B, sean los que presentan mayor SG y SG media, se puede decir que entre los mismos ocurrió lo contrario en el presente, sobre todo al final del periodo de seguimiento establecido. Probablemente y lo más razonado es que lo observado guarde relación con las características moleculares propias del tumor. Consecutivamente los carcinomas Her-2+ y TN se identificaron como los tumores de peor pronóstico y más agresivos en función del tiempo y tipo de recurrencia (mayor número de recurrencias locales en los Her-2+, y viscerales y óseas en los TN), la menor supervivencia y los decesos por la enfermedad en concordancia con algunos estudios previos (194,195). A propósito la literatura señala que el riesgo no solo de recurrencia sino también de muerte es mayor entre las mujeres con tumores de mama del subtipo TN que para otras con diferente subtipo, aunque al respecto aquellas con Her-2+ se consideran que tiene un riesgo intermedio (173,175,193,194).

Por otro lado cuando se valoró la SG en relación al subtipo y la expresión de proteínas del panel de estudio (Ck5/6, Ck8, Ck18, p73, CD10, EGFR), es claro

una menor SG en aquellos con tumores del subtipo TN y expresión de p73, Ck5/6 y CD10 como en aquellos con carcinomas luminal B y Her-2+ con inmunotinción para CD10, como con luminal A e inmunomarcaje de p73 y Ck5/6, encontrando asociación significativa con una SG y SG media, menor en TN y luminal A con expresión de Ck5/6 y p73 como una mayor SG y SG media en aquellos tumores luminal B y positividad de Ck8 y Ck18. Así es posible mencionar que los resultados obtenidos parecen confirmar que hay diferencias importantes entre los inmunofenotipos considerados de la literatura (25,26,30,31,32,36,41,42,69,161,186) de tal forma que la clasificación mediante los biomarcadores moleculares expuestos permitiría discernir formas con diferente pronóstico (Figura 23). A tal efecto se pueden exponer las principales características de fenotipo tumoral en la población de estudio:

Luminal A

Se caracterizaron por la expresión de RE, RP, Bcl-2, Ck8, Ck18 y p73, 68% exhibieron un índice bajo a intermedio de Ki-67 y un 31% alto índice de Ki-67, como 47% p53, 19% CD10 y solo 7% Ck5/6. Morfológicamente presentan un moderado grado histológico. Se observaron menos en mujeres más jóvenes, por lo general alrededor de los 53 años de acuerdo a la media de edad. Por otro lado, estos tumores presentan un mejor pronóstico con una menor incidencia de recurrencias y con una mayor SG y SG media que el resto de los subtipos aunque comparativamente con los luminal B, ambas son menores.

Luminal B

Se caracterizaron por la expresión de RE o RP, Ck8, Ck18, p73, 54% presentaron Her-2 y p53, 44% índice alto de Ki-67, CD10 15% y solo 17% Bcl2. Las afectadas son mujeres también menos jóvenes, y con una edad, uno o dos años menos que aquellas con tumores luminal A de acuerdo a la media de edad. Estos presentan un mejor pronóstico que los luminales A, sin recurrencias y mayor SG y SG media que los luminal A y el resto de los subtipos.

Her-2+

Se distinguieron por la expresión de la proteína Her-2, índice de Ki-67 alto, 77% Bcl2, 59% p53, 95% p73, como 62 a 95% expresión de citoqueratinas luminales (Ck8, Ck18). Son tumores en su mayoría mal diferenciados, con mal pronóstico en correspondencia con un menor tiempo para la recurrencia y un patrón visceral de la misma y una menor SG y SG media comparado con los luminal.

TN

Son tumores que no expresaron RE/RP/Her-2, pero si un alto índice de Ki-67, 44% p53, 71% Bcl2, 91% p73 y entre el 52 y 61% Ck8 y Ck18, e histológicamente son peor diferenciados. Estos tumores se observan en edades más tempranas y por debajo de los 50 años, por lo general tienen peor pronóstico por más recurrencias de predominio visceral y una SG y SG media menor que el resto. Por la ausencia de marcaje de proteínas de células basales estos son tumores

TNnB. A diferencia algunos tumores negativos al RE/RP/Her-2 expresan proteínas como Ck5/6 y CD10 exhibiendo un fenotipo distinto que permite reconocerlos como TNB. Estos últimos por tanto son también mal diferenciados y de peor pronóstico que el resto de los tumores.

5.2 Conclusiones

1. El análisis en conjunto de los biomarcadores moleculares en este estudio proporciona una mejor definición de cada tumor para completar el diagnóstico de la neoplasia por el perfil de moléculas proteicas expresadas y la caracterización molecular resultante.
2. Definitivamente se han expuesto otras moléculas proteicas claves en la naturaleza la maligna del tumor que influyen en la caracterización molecular y que no eran conocidas en nuestra población afectada.
3. El perfil inmunohistoquímico, la caracterización y refinamiento molecular de la neoplasia así expuesta posibilita conocer aún mejor la agresividad tumoral y el riesgo individual.
4. La utilidad clínica y la relevancia biológica de estos hallazgos exigen por tanto otros estudios que incorporen el uso de estos biomarcadores para transitar de lo clínico a lo biológico en los mecanismos de origen y progresión del carcinoma.

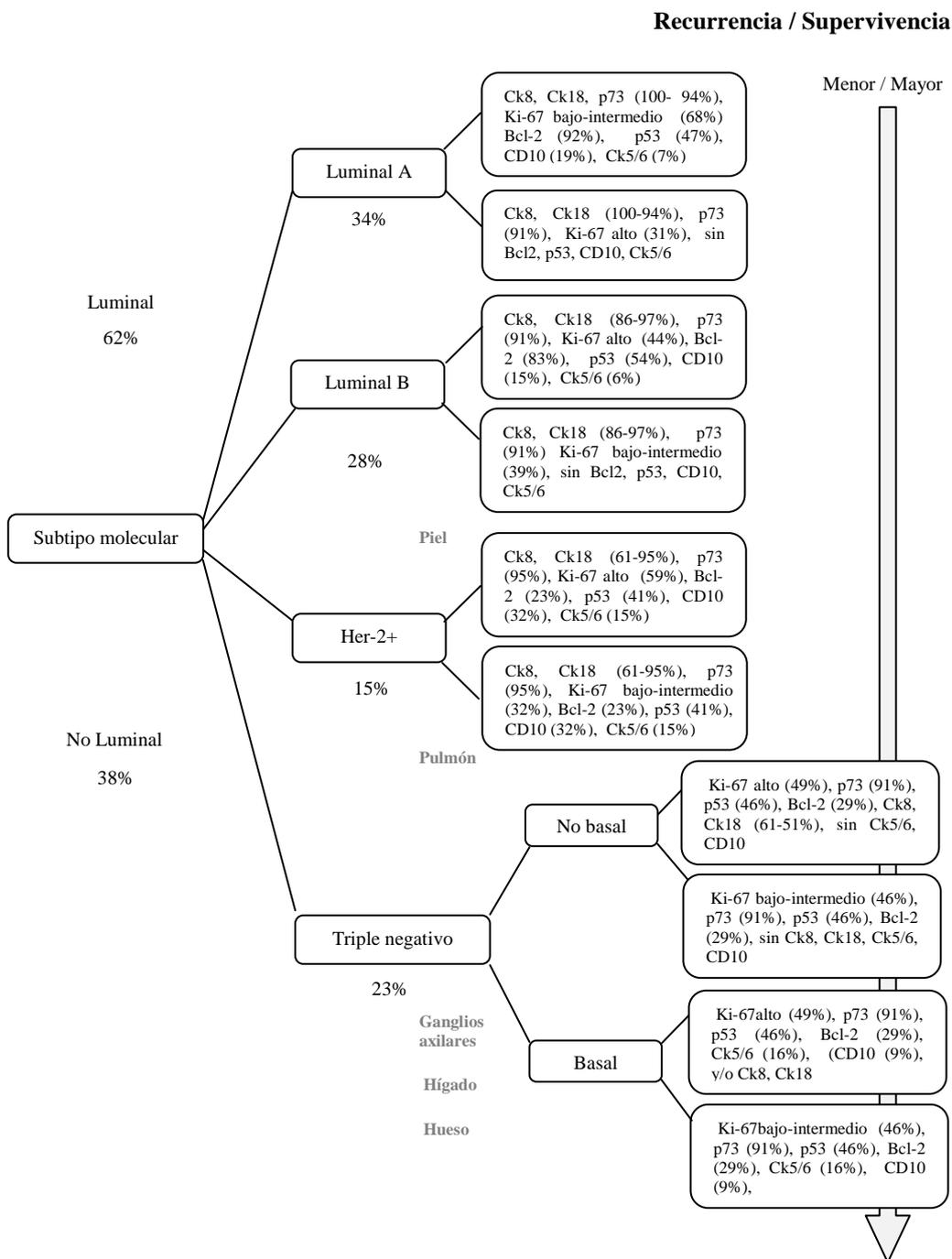


Figura 23. Características del fenotipo tumoral de la población de estudio.
Creación del autor.

CAPITULO VI

TEORÍA DERIVADA

Con sustento sobre los cuatro fenotipos moleculares del cáncer de mama (luminal A, luminal B, Her-2+ y basal) definidos inicialmente mediante genómica e inmunohistoquímica, con base en una metodología más accesible en nuestro medio y marcadores moleculares se ha identificado el fenotipo tumoral de la neoplasia en una población venezolana con un perfil inmunohistoquímico y una caracterización molecular hasta el presente no conocida.

La realidad de nuestras pacientes con la neoplasia no es del todo clara cuando se hace el diagnóstico histopatológico y/o se establece el estado de los clásicos marcadores utilizados de rutina para su manejo, o se analizan otros factores, ello exige por necesidad biológica y clínica proporcionar otras alternativas como herramienta de valor para reevaluar el tumor y documentar lo pertinente de cada uno.

La identificación del fenotipo tumoral referido como las características del tumor en términos de expresión de proteínas que define al subtipo, no solo

permite un diagnóstico más completo y cercano a la identidad del tumor, sino aún más importante, el reconocimiento de grupos de pacientes y diferencias entre los mismos de acuerdo a la lesión maligna así caracterizada. Cuando se conocen las diferencias de la neoplasia, es comprensible advertir que biológicamente el comportamiento de la misma puede ser muy variado según aquellas, y el reto de establecer el subtipo tumoral se vuelve clave para conocer que se puede aguardar de la enfermedad.

En nuestras pacientes comprender la biología del tumor significa partir del conocimiento adquirido, que el carcinoma de mama, es el resultado por una parte de múltiples alteraciones en el genoma de la célula de la unidad ductolobular que da origen a las células cancerosas, como por la otra del proceso secuencial de su desarrollo, lo que subyace en la complejidad de su fenotipo, con consecuencias en la desregulación de varias vías celulares de señalización que controlan el crecimiento y diferenciación de las mismas y que guardan relación con la expresión de algunos determinantes antigénicos o proteínas a nivel del microambiente celular que son expuestas con la técnica empleada en el estudio del perfil inmunohistoquímico.

La determinación de un panel de proteínas moleculares como: RE, RP, Ki-67, p53, p73, Bcl2, Her-2, EGFR, CD10, Ck5/6, Ck8/18, relacionadas con la iniciación y proliferación, evasión de la apoptosis, crecimiento, diferenciación, migración, adhesión, supervivencia, mayor agresividad y/o del linaje de la célula

permite a la luz de los conocimientos teóricos y la evidencia, la caracterización molecular del tumor y una aproximación bastante cercana al pronóstico y riesgo individual según el subtipo determinado.

Los argumentos así expuestos conducen a pensar que en lo práctico, el número de biomarcadores que se determinan actualmente en relación a la neoplasia será ampliado en función de la información de interés que se persigue, resta decir en función del beneficio para el paciente y apoyo para las decisiones a tomar.

Si se sabe que según el subtipo (luminal A y B, Her-2+ , TN con o sin inmunofenotipo basal) la supervivencia e intervalos libres de la enfermedad son distintas, se hace cada vez más oportuno ofrecer otras oportunidades que conduzcan a mejores perspectivas de calidad de vida para las afectadas por una práctica médica más personalizada. La estratificación por subtipos puede ser el inicio del camino para la introducción de mejores opciones de manejo del tumor en nuestras pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez QA, Domínguez MM, Ayala HV. Cáncer de mama femenina en el Hospital Universitario Dr. Luis Razetti de Barcelona Aspectos Epidemiológicos. *Rev Venez de Oncol* 2000; 12:171-178.
2. Kaufman C. Quimioprevención en cáncer de mama. 2000. [Artículo en línea]. Disponible: <http://www.tocogineconet.com.ar/revisiones/quimioprevencion1.htm#intro> [Consulta 2008, Diciembre 6].
3. Organización Panamericana de Salud (O.P.S.). Programa especial de análisis de salud. Iniciativa de datos básicos en salud. Proceso de actualización datos. 2002. [Artículo en línea]. Disponible: <http://www.ops-oms.org.ve/site/venezuela/ven-sit-salud-core.htm>. [Consulta 2008, Diciembre 6].
4. Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, Thun M. Trends in breast cancer by race and ethnicity: Update 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:168-183.
5. Anuario de mortalidad 2006. Ministerio del Poder Popular para la Salud [Artículo en línea]. Disponible: http://www.mpps.gob.ve/ms/direcciones_msds/epidemiologia/estadistica/index.htm. [Consulta 2008, Octubre 6].
6. Ravelo Celis JA. Avances en el diagnóstico del cáncer de la mama. Importancia de la pesquisa y diagnóstico precoz. Reflexiones sobre el problema en Venezuela. *Gac Méd Caracas* 2001; 109:389-417.
7. Gómez Rodríguez A. Cáncer de mama. 2002. [Artículo en línea]. Disponible: <http://www.ovepem.org.ve/paginas/infalmédico/html>.
8. Porter P. “Westernizing” women’s risk?. Breast cancer in lower-income countries. *N Engl J Med* 2008; 358:4.
9. Phillips AA, Jabcoson JS, Magai C, Consedine N, Horowicz-Meller NC, Neugut AI. Cancer incidence and mortality in the Caribbean. *Cancer Invest* 2007; 25:476-483.
10. Cifras de cáncer en España 2009. [Artículo en línea]. Disponible en http://www.redaccionmedica.com/~redaccion/cancer_cifras_seom.pdf. [Consulta 2009; Octubre 12].

11. Instituto Nacional de Cancerología. El cáncer en cifras. [Artículo en línea]. Disponible: [http://www.cancer.gov.co/cancer en cifras](http://www.cancer.gov.co/cancer%20en%20cifras). [Consulta 2008, Octubre 12].
12. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-978.
13. Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6:147-59.
14. Hernández MG. La nueva clasificación TNM para el cáncer de mama. *Rev Venez Oncol* 2003; 15:59-61.
15. Clark GM. Prognostic and predictive factors. *Breast Cancer* 1995; 2:79-89.
16. Van De Vijver, M.J. Modelo multi-etapa de las alteraciones genéticas que conducen al carcinoma de mama. *Rev Esp Patol* 1999; 32:301. [Artículo en línea]. Disponible <http://www.conganant.org/seap/revista/v32-n3/28.pdf>. [Consulta 2008, Diciembre 6].
17. Warnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumor markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br. J Cancer* 2001; 85:869-874.
18. Colozza M, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Bringing molecular prognosis and prediction to the clinic. *Clin Breast Cancer* 2005; 6:61-76.
19. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-410.
20. Ruder AM, Lubin F, Wax Y, Geier A, Alfundary E, Chetrit A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. Epidemiologic characteristics and survival differences *Cancer* 1989; 64:196-202.
21. Bull SB, Ozelik H, Pinnaduwa D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, Tzontcheva AT, Sidlofsky S, Hanna WM, Qizilbash AH, Tweeddate ME, Fine S, Mccready DR, Andrulis IL. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification associated with poor survival in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:86-96.
22. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-536.

23. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARCpress, 2003.
24. D'Eredita' G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer* 2001; 37:591-596.
25. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-752.
26. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, AAS T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl. Acad Sci USA* 2001; 98:10869-10874.
27. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8418-8423.
28. Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, et al. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3:73-585.
29. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol* 2003; 12:27-34.
30. Carey L, Perou C, Livasy C, Dressler L, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* 2006; 295:2492-2502.
31. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:9212-9217.
32. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:5367-5374.
33. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10393-10398.
34. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5678-5685.

35. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2329-2334.
36. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19:264-271.
37. Eden P, Ritz C, Rose C, Fernon M, Peterson C. "Good old" clinical markers have similar power in breast cancer prognosis as microarray gene expression profilers. *Eur J Cancer* 2004; 40:1837-1841.
38. Ihemelandu CU, Leffall LD Jr, Dewitty RL, Naab TJ, Mezgebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *Surg Res.* 2007; 143:109-118.
39. Escobar SJ, Astudillo GA, Menéndez RP, Elena Belyakova E. Aplicación de los Tissue Microarrays en el estudio inmunohistoquímico de los tumores. *Rev Española de Patología* 2006; 39:11-17.
40. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2406-2415.
41. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. P63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* 2005; 447:688-694.
42. Piñero MA, Polo GL, Alonso RJ, Salinas RJ, Canteras JM, Sola PJ, et al. Características inmunohistoquímicas del cáncer de mama: ¿hacia una nueva clasificación? *Cir Esp.* 2008; 84:138-145.
43. Jorge BD, Zarate OA. Carcinoma mamario con inmunofenotipo similar al de células basales. Estudio morfológico y perfil de expresión inmunohistoquímico en 54 casos triple negativos. *Patol* 2008; 46:303-308.
44. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1999-2009.
45. Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B, et al. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative

- breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:3207-3214.
46. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365:671-679.
 47. Foekens JA, Atkins D, Zhang Y, Sweep FC, Harbeck N, Paradiso A, et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24:1665-1671.
 48. Muñoz-Díaz MM, Fernández-Aceñero MJ, Salvadores P, Schneider J. Utility of a simplified molecular classification of tumors for predicting survival of patients with invasive ductal breast carcinoma. *Anticancer Res* 2009; 29:4727-4730.
 49. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11:868-877.
 50. Robles S, Galanis E. El cáncer de mama en América Latina y el Caribe *Rev Panam Salud Pública* 2002; 12:141-143.
 51. Bossetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1977-2000. *Ann Oncol* 2005; 16:489-511.
 52. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *Cancer J Clin* 2000; 50:7-33.
 53. Sistema Nacional de Información en Salud. Mortalidad. Información 2000-2005. [Artículo en línea] Disponible: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>. [Consulta 2006, Febrero 12].
 54. Piñeros M, Hernández G, Bray F. Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: an emerging problem. *Cancer* 2004; 101:2285-2292.
 55. Piñeros M, Murillo R. Incidencia del cáncer en Colombia: Importancia de las fuentes de información en la obtención de cifras estimativas. *Revista Colombiana de Cancerología* 2004; 8:5-14.
 56. Piñeros M, Hernandez Bray F. Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: An emerging problem. *Cáncer*. En: *Detección temprana del cáncer de mama: Aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia*. *Revista Colombiana de Cancerología* 2005; 9:2.

57. Veronesi H, Boyle P, Goldhirsch O, Viale G. Breast cancer. En: Detección temprana del cáncer de mama: Aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia. Revista Colombiana de Cancerología 2005; 9:2.
58. Sociedad Chilena de Mastología. Consenso en cáncer de mama 2005. [Artículo en línea]. Disponible: <http://mastología.cl/portal/index.php>. [Consulta: 2008, Octubre 6].
59. Lozano AR, Gómez DH, Lewis S, Torres SL, López CL. Tendencias del cáncer de mama en América Latina y el Caribe. Salud pública en México 2009; 51:147-156.
60. Anuario de Mortalidad 2004. Venezuela. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. [Artículo en línea]. Disponible: http://www.mps.gob.ve/ms/direcciones_msds/epidemiología/estadística/archivos/anuarios.htm. [Consulta: 2008, Octubre 6]
61. Rebolledo V, Sucre L, Capocefallo M, Saldivia F. Cirugía de rescate en carcinoma de mama localmente avanzado. Salus online 2009; 13:29-38.
62. Anuario de Mortalidad 2010. Venezuela. Ministerio del Poder Popular para la Salud. [Artículo en línea]. Disponible: http://www.mps.gob.ve/ms/direcciones_msds/epidemiología/estadística/archivos/anuarios.htm. [Consulta: 2010, Septiembre 16].
63. Secretaria de la salud. Generalidades de la glándula mamaria. Compendio de anatomía patológica de la glándula mamaria. 1ra edición. Editorial Secretaria de la Salud. DF México. 2002:14-16.
64. Blank K, Copeland E. Anatomía y fisiopatología de la mama normal y durante la lactancia. Alvear MT editores. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2da edición. Editorial Médica Panamericana SA. Madrid España. 2000:19-21.
65. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. Breast Cancer Res 2005; 7:143-148.
66. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P, van Diest PJ, et al. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? J Pathol 2005; 206:451-457.

67. González P J. Una Nueva modificación en la clasificación TNM del cáncer mamario. *Rev Esp Patología* 2004; 37:247-251.
68. Muñoz M, Fernández-Aceñero MJ, Martín S, Schneider J. Prognostic significance of molecular classification of breast invasive ductal carcinoma. *Arch Gynecol Obstet.* 2009; 280:43-48.
69. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008. 14: 1368-1376.
70. Hidalgo MA, Jiménez SG. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Pública de México* 2009; 51:197-207.
71. Van De Vijver, M.J. Modelo multi-etapa de las alteraciones genéticas que conducen al carcinoma de mama. *Rev Esp Patol* 1999; 32:301. [Artículo en línea]. Disponible <http://www.conganant.org/seap/revista/v32-n3/28.pdf> [Consulta 2006, Abril 19].
72. Parada DD. Biología molecular en el cáncer de mama. *Rev Venez Oncol* 2004; 16:30-34.
73. Abba MC, Drake JA, Hawkins KA, Hu Y, Sun H, Notcovich C, et al. Gaddis S, Sahin A, Baggerly K, Aldaz CM.. Transcriptomic changes in human breast cancer progression as determined by serial analysis of gene expression. *Breast Cancer Res* 2004; 6:499-513.
74. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; 205:248-254.
75. Chen X, Danes C, Lowe M, Herliczek TW, Keyomarsi K. Activation of the Estrogen-Signaling Pathway by p21 (WAF1/CIP1) in Estrogen Receptor-negative breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst;* 2000; 92:1403-1413.
76. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 72:163-172.
77. Korkolis D, Ardavanis A, Yotis J, Kyroudi A, Gorgolis V, Kittas C. HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathologic parameters, p53 oncoprotein and cathepsin D. *Anticancer Res* 2001; 21:2207-2212.
78. Lattimore BS, Crabbe MJ. Expression profiles in the progression of ductal carcinoma in the breast. *Comput Biol Chem* 2003; 27:115-120.

79. Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res and Treat* 1998; 52:79-98.
80. Irwin MS, Kaelin WG Jr. 2001. Role of the newer p53 family proteins in malignancy. *Apoptosis*. 2001; 6:17-29.
81. Bénard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat*. 2003; 21:182-191.
82. Ribeiro-Silva A, Zambelli Ramalho LN, Britto Garcia S, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127:336-340.
83. Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, May WS. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 2006; 26:4421-4434.
84. Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 2006; 13:1351-1359.
85. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, Mcguire WI. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1992; 23:974-979.
86. Gao XP, Liu F. New agents in development for breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007; 19:68-74.
87. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999; 31:637-643.
88. Singer CF, Mogg M, Koestler W, Pacher M, Marton E, Kubista E, et al. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II serum concentrations in patients with benign and malignant breast lesions: free IGF-II is correlated with breast cancer size. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4003-4009.
89. Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE. Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10:283-290.
90. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18:143-152.
91. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129:705-733.

92. Enmark E, Pello-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M. Human estrogen receptor b gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4258-4265.
93. Menasce P, White R, Harrison J, Boyle M. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH technique. *Genomics* 1993; 17:263-265.
94. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors- an overview. *J Intern Med* 1999; 246:133-138.
95. Iwase H, Omoto Y, Iwata H, Hra Y, Ando Y, Kobayash S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human reast cancer. *Oncology* 1998; 55:11-16.
96. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 2003; 3:281-292.
97. Ratajczak T. Protein coregulators that mediate estrogen receptor function. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13:221-229.
98. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol* 2004; 33:387-410.
99. Aupperlee M, Smith KT, Kariagina A, Haslam S. Progesterone receptor isoforms and proliferation in the rat mammary gland during development. *Endocrinology* 2005; 146:3577-3588.
100. Wiebe JP. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:717-738.
101. Krietsch T, Fernandes MS, Kero J, Losel R, Heyens M, Lam EW, et al. Human homologs of the putative G protein-coupled membrane progestin receptors (mPRalpha, beta, and gamma) localize to the endoplasmic reticulum and are not activated by progesterone. *Mol Endocrinol* 2006; 20:3146-3164.
102. Leslie KK, Stein MP, Kumar NS, Dai D, Stephens J, Wandinger-Ness A, et al. Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96:32-41.
103. Gao X, Nawaz Z. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4:182-186.

104. Skildum A, Faivre E, Lange CA. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 2005; 19:327-339.
105. Maiorana A, Cavallari V, Bagni A, Ussia F, Maiorana C, Fano RA. Nuclear areas in breast cancer: relationship with estrogen and progesterone receptor expression. *Anal Cell Pathol* 1996; 11:199-209.
106. Haslam SZ, Woodward TL. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-cell-stromalcell interactions and steroid hormone action in normal and cancerous mammary gland. *Breast Cancer Res* 2003; 5:208-315.
107. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli MG, Marrano D. Quantitative p21 (waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer* 2001; 95:128-134.
108. Lange CA, Yee D. Progesterona y cáncer de mama. *Revista del climaterio* 2009; 12:153-165.
109. Ramadan S, Terrinoni A, Catani MV, Sayan AE, Knight RA, Mueller M, et al. p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 331:713-717.
110. Oberst A, Rossi M, Salomoni P, Pandolfi PP, Oren M, Melino G, et al. Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 331:707-712.
111. Fillippovich I, Sorokina N, Gatei M, Haupt Y, Hobson K, Moallem E, et al. Transactivation - deficient p73alpha (p73DeltaExon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogen* 2001; 20: 514-22.
112. Stiewe T, Pützer BM. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene?. *Cell Death Differ.* 2002; 9:237-245.
113. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* 2008; 22:2591-2595.
114. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2004; 2:371-386.

115. Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*. 2001; 20:3193-3205.
116. Blandino G, Strano S. BCL-2: the pendulum of the cell fate. *J Exp Clin Cancer Res* 1997; 16:3-10.
117. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. 1999; 59:1693-1700.
118. Rochaix P, Krajewski S, Reed JC, Bonnet F Voigt JJ, Brousset P. In vivo patterns of Bcl2 family protein expression in breast carcinoma in relation to apoptosis. *J Pathol* 1999; 187:410-415.
119. De Jong D, Prins F, Mason DY, Reed JC, Van Ommen GB, Kluin PM. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 1994; 54:256-260.
120. Park SH, Kim H, Song BJ. Down Regulation of Bcl2 Expression in Invasive Ductal Carcinomas Is Both Estrogen- and Progesterone-Receptor Dependent and Associated with Poor Prognostic Factors. *Patho Oncol Res* 2002; 8:26-30.
121. Jimeno A, Hidalgo M. Targeting the HER and VEGF pathways in the treatment of cancer. [Artículo en línea]. Disponible <http://www.medscape.com/hematology-oncologyhome> [Consulta 2008, Abril 23].
122. Grauss-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB2, the preferred heterodimerization partner of all erbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo j* 1997; 16:1647-1655.
123. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Garúa-Porta D, Ratzkin BJ, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J* 1996; 15:254-264.
124. Slichenmyer WJ, Fry DW. Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Semin oncol* 2001; 5:67-79.
125. Cirisano FD, Karlan BY. The role of the HER-2/neu oncogene in gynecologic cancers. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3:99-105.
126. Helal T, Nassiri M, Khalifa A. Immunohistochemical markers of tumor prognosis in breast cancer in Egypt. *Cancer Detect Prev* 1997; 21:201-206.

127. Singleton TP, Niehans GA, Gu F, Litz CE, Hagen K, Qiu Q, et al. Detection of c-erbB-2 activation in paraffin-embedded tissue by immunohistochemistry. *Hum Pathol* 1992; 23:1141-1150.
128. Battifora H, Gaffey M, Esteban J, Mehta P, Bailey A, Faucett C, et al. Immunohistochemical assay of neu/c-erbB-2 oncogene product in paraffin-embedded tissues in early breast cancer: retrospective follow-up study of 245 stage I and II cases. *Mod Pathol* 1991; 4:466-474.
129. Roșian A, Lazăr E, Dema A. C-erbB2 oncoprotein: prognostic marker in breast cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2005; 46:99-104.
130. Blume JP, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 28:16-79.
131. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006; 366:2-16.
132. Flynn JF, Wong C, Wu JM. Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. *J Oncol* 2009; 2009:526-963.
133. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 2006; 174:169-174.
134. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40:403-439.
135. Bilalovic N, Sandstad B, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Torlakovic EE. CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Mod Pathol*. 2004; 17:1251-1258.
136. Kalof AN, Tam D, Beatty B, Cooper K. Immunostaining patterns of myoepithelial cells in breast lesions: a comparison of CD10 and smooth muscle myosin heavy chain. *J Clin Pathol*. 2004; 57:625-629.
137. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, Kuroda M, Mukai K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch*. 2002; 440:589-593.
138. Bahadır B, Behzatoglu K, Bektas S, Bozkurt ER, Ozdamar SO. CD10 expression in urothelial carcinoma of the bladder. *Diagn Pathol*. 2009; 4:38.
139. Toussaint J, Durbecq V, Altintas S, Doriath V, Rouas G, Paesmans M, et al. Low CD10 mRNA expression identifies high-risk ductal carcinoma in situ (DCIS). *PLoS One* 2010; 5:1-7.

140. Smith FB, Zappi ME. Relationships between image cytometric DNA index, proliferation fraction and multiploidy and conventional nuclear grade in breast carcinoma. *Mod Pathol* 1993; 6:606-611.
141. Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, Kallioniemi OP. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer*. 1990; 65:1180-1184.
142. Martínez-Arribas F, Núñez MJ, Piqueras V, Lucas AR, Sánchez J, Tejerina A, et al. Flow cytometry vs. Ki67 labelling index in breast cancer: a prospective evaluation of 181 cases. *Anticancer Res*. 2002; 22:295-298.
143. Manual de patología general. [Libro en línea]. Disponible: http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/pat_125.html. [Consulta 2008, Marzo 6].
144. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol*. 2004; 203:661-671.
145. Avninder S, Ylaya K, Hewitt SM. Tissue microarray: a simple technology that has revolutionized research in pathology. *J Postgrad Med*. 2008; 54:158-162.
146. Nazar Jawhar MT. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi Medicine* 2009; 29:123-127.
147. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A y cols. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med* 1998; 4:844-847.
148. Meng PQ, Hou G, Zhou GY, Peng JP, Dong Q, Zheng S. Application of new tissue microarrayer-ZM-1 without recipient paraffin block. *Zhejiang Univ Sci B*. 2005; 6:853-858.
149. Escobar SJ, Astudillo GA, Menéndez RP, Belyakova E Aplicación de los Tissue Microarrays en el estudio inmunohistoquímico de los tumores. *Rev Española de Patología* 2006; 39:11-17.
150. Díaz D (sf). Algunos conceptos sobre técnicas de inmunohistoquímica [Artículo en línea]. Disponible: <http://www.alg%20conceptos%20inmuno.htm> [Consulta 2008, Marzo 6].
151. González BM, Ordoñez A, Feliu J, Zamora P, Espinosa E. Oncogenes en Oncología clínica fundamentos y patología general. 2da edición Mc Graw-Hill Madrid. España 1992; 63-69.

152. Mocellin S, Provenzano M, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Lise M. DNA array-based gene profiling: from surgical specimen to the molecular portrait of cancer. *Ann Surg* 2005; 241:16-26.
153. Grant GM, Fortney A, Gorreta F, Estep M, Del Giacco L, Van Meter A, et al. Microarrays in cancer research. *Anticancer Res.* 2004; 24(2A):441-448.
154. Kim WH, Rubin MA, Dunn RL. High-density tissue microarray. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:1236-1238.
155. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006; 354:2463-2472.
156. Morell A (sf). Marcadores tumorales y biología del cáncer de mama. [Artículo en línea]. Disponible: <http://usuarios.lycos.es/jonathancaruso/studie0.html>. [Consulta 2008, Diciembre 6].
157. Hernández R, Fernández C, Batista P. Metodología de la investigación. 2da edición. Mc Graw-Hill. Colombia 1998; 23.
158. Leal GJ. La autonomía del sujeto investigador y la metodología de investigación. Liturama. Mérida. Venezuela 2005.
159. Leal GJ. ¿Cómo nos obligan a hacer ciencia en el sistema educativo? en La autonomía del sujeto investigador y la metodología de investigación. Leal GJ. Valencia. Venezuela 2009; 79-98.
160. Código de ética para la vida 2011. [Artículo en línea]. Disponible: <http://www.coordinv.ciens.ucv.ve/investigacion/coordinv/index/CONCIENCIA/codigoe.pdf> [Consulta 2014, Noviembre 3].
161. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, Morrow M. Presenting feature of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:2705-2710.
162. Rodríguez-Cuevas SA, Luna-Arias JP. Impacto de las firmas genómicas en la decisión terapéutica del cáncer de mama. *Cir Ciruj* 2007; 75:415-417.
163. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo VE. Terapias moleculares dirigidas en los pacientes con cáncer: logros y perspectivas. *Gac Méd Méx.* 2008; 144:333-344.
164. Anderson BO. Situación de la salud mamaria en el mundo y en Latinoamérica en particular. *Rev. Med. Clin. Condes* 2006; 17:137-141.

165. Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir Ciruj* 2008; 76:87-93.
166. Jacquemier J, Ginestier C, Rougemont J, Bardou VJ, Charafe-Jauffret E, Geneix J, et al. Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. *Cancer Res* 2005; 65:767-779.
167. Uribe JR, Hernández CA, Menolascino F, Rodríguez JE, Istúriz LM, Márquez ME, et al. Jorge L Uribe. Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Rev Venez Oncol* 2010; 22:109-116.
168. Reigosa A, Fernández Á, Gutiérrez D, Caleiras E, Hardisson D, Espig H, et al. Expresión de p63 y citoqueratina 5/6 en los diferentes tipos moleculares del carcinoma de mama. *Rev Esp Patol.* 2010; 43:79-85.
169. Ramírez CA, Italo BG. Carcinoma de la mama triple negativo aspectos morfológicos y expresión de Ck 5/6. *Rev Venez Oncol* 2011; 23:2-13.
170. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010; 7:2-12.
171. Salhia B, Tapia C, Ishak EA, Gaber S, Berghuis B, Hussain KH, et al. Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology. *BMC Womens Health.* 2011; 11:1-9.
172. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res* 2010; 16:6100-6110.
173. Munirah M A, Siti-Aishah MA, Reena M Z, Sharifah N A, Rohaizak M, Norlia A, et al. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52:669-677.
174. Arrechea-Irigoyen M.A, Vicente-García F, Córdoba- Iturriagoitia A, Ibáñez Beroiz B, Santamaría-Martínez M, Guillén-Grima F. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2011; 34:219-233.
175. Rebolledo-P V, Ferri-N N, Reigosa-Y A, Caleiras-P E, Fernández-R Y. Perfil inmunohistoquímico y la caracterización molecular del carcinoma de mama en una población venezolana. *Rev Venez Oncol* 2012; 24:42-51.

176. Al Tamimi DM, Shawarby MA, Ahmed A, Hassan AK, AlOdaini AA. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer - a Saudi population based study. *BMC Cancer*. 2010; 10: 223-236.
177. Viale G, Giobbie-Hurder A, Reagan M, Coates A, Mastropasqua M, Dell'Orto P et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from breast international group trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 5569-5575.
178. Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 444-455.
179. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:736-750.
180. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:790-800.
181. Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif*. 2003; 36:73-84.
182. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* 2008; 26:2568-2581.
183. Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; 68:989-997.
184. Borgna S, Armellin M, di Gennaro A, Maestro R, Santarosa M. Mesenchymal traits are selected along with stem features in breast cancer cells grown as mammospheres. *Cell Cycle* 2012; 11:4242-4251.
185. Burness ML, Grushko T, Olopade OI. Epidermal Growth Factor Receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer* 2010; 16:23-32.
186. Venkitaraman R. Triple-negative/basal-like breast cancer: clinical, pathologic and molecular features. 2010; *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10:199-207.
187. Zhou X. p73 G4C14-to-A4T14 polymorphisms are positively correlated with triple-negative breast cancer in southwestern China. *Med Oncol* 2013; 30:515.

188. Zhou X, Wu C. p73 polymorphisms and clinicopathologic characteristics in breast cancer. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2012; 37:238-243.
189. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:876-887.
190. Park SY, Kwon HJ, Choi Y, Lee HE, Kim SW, Kim JH, et al. Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Mod Pathol* 2012; 25:185-196.
191. Fejerman L, John EM, Huntsman S, Beckman K, Choudhry S, Perez-Stable E, et al. Genetic ancestry and risk of breast cancer among U.S. Latinas. *Cancer Res* 2008; 68:9723-9728.
192. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 2009; 15:2302-2310.
193. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007; 109: 1721-1728.
194. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:439-443.
195. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol* 2009; 20:628-635.

ANEXOS

ANEXO 1

Autorización del Centro de Investigación



Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Postgrado
Doctorado en Ciencias Médicas



AUTORIZACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Ciudadano
Prof. Aarón Muñoz
Director
Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológica
Universidad de Carabobo

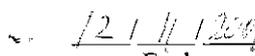
Se solicita de usted su consentimiento y autorización para el acceso y uso de bloques de parafina convencional con tejido tumoral maligno de la glándula mamaria de mujeres con el diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma ductal invasor sin otra especificación o mixto con componente invasor predominante que se encuentran en el centro para el desarrollo del proyecto de Tesis Doctoral titulado: "Perfil inmunohistoquímico y el refinamiento de la caracterización molecular del carcinoma de mama en una población venezolana" a efectuarse durante el período 2009-2012, cuya autora es la cirujano oncólogo Vilma E Rebolledo Pulido, titular de la cédula de identidad N° 7.102.821, Investigador Principal del centro y Doctorando en Ciencias Médicas de la Universidad de Carabobo. El proyecto tiene como propósito: Establecer un perfil inmunohistoquímico del carcinoma de mama que contribuya en la caracterización y el refinamiento de la clasificación molecular.

Las muestras requeridas son de relevante valor científico para la investigación y consecución de los objetivos de la misma, cuyo acceso y uso será acorde y únicamente para lo señalado, sin riesgo de deterioro ni ningún otro tipo para las mismas, el espacio físico y el personal que pueda intervenir para los efectos.

El acceso, suministro, y procesamiento de las anteriores no generará perjuicio alguno ni costo a la institución ni interferirá con las políticas de trabajo de la misma. Los resultados serán utilizados para fines estrictos de la investigación y de su eventual publicación en forma anónima, parcial o total, sin menoscabo de la dignidad humana o privacidad de quienes se tomen los datos de interés de las anteriores.

Se solicita su consentimiento, autorización y colaboración previa información suministrada en relación con el objetivo del estudio y con el uso de la información a obtener.


Nombre y Firma.


Fecha

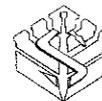
Sello de la Autoridad del Establecimiento de Salud

Se otorga el consentimiento y se autoriza ampliamente a la cirujano oncólogo Vilma E Rebolledo Pulido, responsable de la investigación y Doctorando en Ciencias Médicas de la Universidad de Carabobo.

ANEXO 2
Consentimiento Institucional



Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Postgrado
Doctorado en Ciencias Médicas



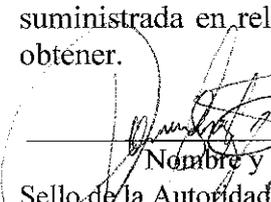
CONSENTIMIENTO INSTITUCIONAL

Ciudadanos
Dirección Médica
Gerencia General
Departamento de Administración
Clínica Docente Los Jarales

Se solicita de ustedes su consentimiento, autorización y colaboración para el desarrollo del proyecto de Tesis Doctoral titulado: "Perfil inmunohistoquímico y el refinamiento de la caracterización molecular del carcinoma de mama en una población venezolana" a desarrollar durante el período 2009-2012, cuya autora es la cirujano oncólogo Vilma E Rebolledo Pulido, titular de la cédula de identidad N° 7.102.821, Doctorando en Ciencias Médicas de la Universidad de Carabobo. El proyecto tiene como propósito: Establecer un perfil inmunohistoquímico del carcinoma de mama que contribuya en la caracterización y el refinamiento de la clasificación molecular, partiendo del estudio de marcadores biológicos por técnica inmunohistoquímica en una población venezolana con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante. Al Centro/Clinica/Hospital/Instituto/Unidad que decida y acepte consentir, autorizar y colaborar voluntariamente, únicamente se les solicitará información pertinente y específica de (los) caso(s) en lista, identificados adecuadamente.

El suministro, disponibilidad, acceso y registro de la información no generará ningún costo a la institución ni interferirá con las políticas de trabajo de la misma. Los resultados serán utilizados para fines estrictos de la investigación y de su eventual publicación en forma anónima, parcial o total, sin menoscabo de la dignidad humana o privacidad de quienes se tomen los datos de interés.

Se solicita su consentimiento, autorización y colaboración previa información suministrada en relación con el objetivo del estudio y con el uso de la información a obtener.





Nombre y P. N. _____ Fecha 19/10/2011

Sello de la Autoridad del Establecimiento de Salud
LOS JARALES
RIF: J-31179764-5
DPTO. DE ADMINISTRACIÓN

Se otorga el consentimiento y se autoriza ampliamente a la cirujano oncólogo Vilma E Rebolledo Pulido, responsable de la investigación y Doctorando en Ciencias Médicas de la Universidad de Carabobo.

ANEXO 3

Oficio Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico

Universidad de Carabobo (CDCH-UC)



No. CDCH-260-2011

Asunto: _____

Ref.: _____

Mayo 26, 2011

Ciudadana
Prof. Vilma Rebolledo
 Facultad de Ciencias de la Salud

El Consejo Directivo de este Organismo, en la Sesión Ordinaria **Nro. 300** del 26-05-2011, aprobó su solicitud de subvención para realizar el proyecto de investigación, **“Perfil Inmunoquímico y el Refinamiento de la Caracterización Molecular del Carcinoma de Mama en una Población”**

Monto Aprobado: **Bs. 118.140,21** (Materiales y Suministros)

Monto 1er. Año: Bs. 26.000,00

Duración: Tres (3) años

Atentamente,

Dra. Zulay Niño
 Directora Ejecutiva



NO DEBE TRATARSE MAS DE UN ASUNTO EN CADA OFICIO

Tamaud/marbe

Anexo 4

Instrumento de Recolección de Datos



Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Postgrado
Doctorado en Ciencias Médicas



INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Estudio previo IHQ N° _____ Fecha: _____

Resultado: RE _____ RP _____ p53 _____ Her-2 _____ Ki67 _____
Bcl2 _____

Bloque N° _____ Tipo de biopsia _____

Tipo
histológico _____

Grado Histológico _____ Grado nuclear _____ Ganglios
afectados _____

Historia N° _____

Año _____ Edad: _____ Sexo _____

Estadio TNM: _____ Tamaño tumoral: _____ Ganglios afectados: _____ Metástasis:

Evolución clínica:

Recurrencia: Local: _____ Regional. Distancia: _____ Tipo de recurrencia:

Intervalo libre de enfermedad (ILE): _____ meses. Sobrevida global: _____
meses. Estatus: Viva: _____ Muerte: _____

Panel de estudio inmunohistoquímico _____

p73 _____ EGFR _____
Ck5 _____ Ck6 _____

Ck8 _____ Ck18 _____ CD10 _____

Subtipo molecular considerando (RE, RP, Her-2):

Luminal A _____ Luminal B _____ Her-2 _____
TN _____

