



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA
NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

**“FACTORES PRONÓSTICOS SUBCELULARES
DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE
EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO”**

TESIS DE POSTGRADO

*QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LA ESPECIALIDAD EN:
ONCOLOGÍA MÉDICA
PRESENTA:
DRA. ALEJANDRA ARMENGOL ALONSO*

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”

MÉXICO, D F.

Agosto 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA
NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

**“FACTORES PRONÓSTICOS SUBCELULARES
DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE
EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO”**

**DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
POSTGRADO DE ONCOLOGÍA MÉDICA
TUTOR DE TESIS**

**DR. ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
TUTOR DE TESIS**

**DR. FEDERICO USCANGA DOMÍNGUEZ
JEFE DE ENSEÑANZA**

Agradecimientos:

Al invaluable trabajo técnico de Sharon Ortiz y Gabriela Cedillo que hicieron posible la realización de las diversas reacciones de inmunohistoquímicas descritas en el presente estudio.

A “Unidos”.Asociación pro-transplante de médula ósea Francisco Casares Cortina. A.C. por su apoyo económico para el material de inmunohistoquímica.

A la Dra. Andrea Castro Sánchez residente del 1er año de Medicina Interna por su colaboración en la revisión de los expedientes clínicos

A la Dra, Jazmin Arteaga Vázquez y a la Dra. Claudia Arce Salinas por su apoyo para la realización del análisis estadístico.

Dedicatoria:
A Isabella

Índice

I. Abreviaturas.....	6
II. Resumen.....	7
III. Antecedentes	10
IV. Justificación.....	23
V. Hipótesis.....	24
VI. Objetivo general y específicos.....	25
VII. Pacientes y métodos.....	26
VIII. Resultados.....	29
IX. Discusión.....	36
X. Tablas y Figuras.....	42
XI. Bibliografía.....	62

I. Abreviaturas.

CMTN: Cáncer de mama triple negativo

CMNTN: Cáncer de mama no triple negativo

IHQ: Inmunohistoquímica

RE: Receptores de estrógeno

RP: Receptores de progesterona

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

CK5: Citoqueratina 5

CK6: Citoqueratina 6

TNM: Tumor, ganglios, metástasis

RPC: Respuesta patológica completa

RCC: Respuesta clínica completa

SBR: Scarff-Bloom-Richardson

SLR: Supervivencia libre de recurrencia

SG: Supervivencia global

QT Neoadyuvante: Quimioterapia administrada antes del procedimiento quirúrgico.

QT Adyuvante: Quimioterapia administrada posterior al procedimiento quirúrgico del tumor primario conocido.

II. Resumen

Antecedentes

El cáncer de mama es un grupo heterogéneo de neoplasias malignas con distinto comportamiento biológico, respuesta a quimioterapia y desenlace. Los llamados cánceres de mama receptores negativos o triples negativos (CMTN) constituyen el 10-15%, se caracterizan por la ausencia de la expresión de tres proteínas (estrógeno, progesterona y her2), clínicamente son más agresivos con una menor supervivencia libre de recaída y global, con patrón de recaída distante generalmente en pulmón y SNC. Las vías de señalización implicadas en la proliferación de esta variedad de cáncer de mama están pobremente comprendidas. Las pacientes con CMTN que alcanzan respuesta patológica completa (RPC) posterior a quimioterapia neoadyuvante tienen el mismo buen pronóstico que el grupo de CMNTN, sin embargo no se conocen con precisión los factores que predigan en CMTN RPC.

Objetivos

Evaluar el papel de Ki-67, p53, c-kit y EGF-R como marcadores predictivos de respuesta clínica y patológica a quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo.

Material y métodos

Entre enero 1998 y enero 2008 se identificaron 103 pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de mama tratadas por el departamento de Oncología médica en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Dr. Salvador Zubirán. Se obtuvo el tejido tumoral de 30 pacientes: 15 pacientes expresaron el inmunofenotipo triple negativo (Receptores hormonales negativos, her2 negativo) y 15 pacientes que expresaron el inmunofenotipo RE positivos y/o RP positivos y Her2neu negativo (luminal) que recibieron quimioterapia neoadyuvante a base de -antraciclenos y/o taxanos. Se revisaron sus expedientes clínicos para obtener variables clínicas. En el grupo de CMTN se repitió la inmunohistoquímica para RE, RP, her2neu, Ki-67, p53, c-kit, EGFR, marcadores del subtipo basal (AEA1/CK 5 y AEA2/CK 6) en tejido tumoral pre y post-quimioterapia neoadyuvante. Se identificaron además sus

variables morfológicas en la re-revisión por un patólogo. En el grupo de CMNTN se re-revisaron las laminillas del diagnóstico e IHQ para RE , RP y Her2 previamente realizadas en el departamento de Patología.

Resultados

El ag Ki-67 y p53 se encontraron con una mayor frecuencia de positividad y en un mayor porcentaje (>30%) en pacientes con CMTN en comparación con el grupo de CMNTN. ($p<.0001$) y ($p=0.020$). La negativización de Ki 67 post quimioterapia neoadyuvante se asocio con RPC ($p=0.039$). Los niveles de p53 >30% pre neoadyuvancia se relacionaron con RPC ($p=.006$). C.kit y EGFR no se relacionaron con RPC. La frecuencia de CMTN fue del 33.9% En el grupo CMTN se presentaron estadios clínicos mas avanzados ($p=0.002$). Se observo mayores respuestas clínicas completas 33.3% en el grupo CMTN contra el 6.7% en el CMNTN. ($p=0.055$). En el grupo CMTN se observaron recaídas a distancia 33.3% contra 0% del grupo CMNTN ($p=0.001$). Los sitios de recaída más frecuentes fueron pulmón e hígado. La mediana de SLP para el grupo CMTN fue de 24 meses contra 34 meses del grupo control ($p=0.023$). La mediana de supervivencia posterior a recaída en el grupo de CMTN fue de 3 meses. La mediana de supervivencia global fue de en el grupo CMTN de 25 meses y 39 meses en el grupo control ($p=.007$). En el grupo de CMTN desarrollaron RPC de 33.3% y de 0% en el grupo control. La variable histológica más frecuente en el grupo CMTN fue la basal ($p=0.012$). Se observaron SBR altos (73.3%) en el grupo CMTN vs (0%) en el grupo control ($p=<.0001$).

Conclusiones

Nuestro estudio identifica como potenciales marcadores de respuesta patológica completa la expresión de Ki-67 y p53 en los carcinomas mamarios triple negativos de fenotipo basaloide.

En esta población se confirman las características clínicas y patológicas descritas en otras series de casos, con respecto a la mayor agresividad, diseminación a distancia, menor SLR, SG y mayor respuesta clínica y patológica completa a quimioterapia neoadyuvante.

Es indispensable la realización de más estudios en población mexicana con mayor número de pacientes y diseños prospectivos, multi-institucionales que permitan aumentar el nivel de evidencia de este trabajo.

III. Antecedentes

El cáncer de mama comprende un grupo heterogéneo de neoplasias malignas con distinto comportamiento biológico, respuesta a quimioterapia y desenlace, por lo que tumores histológicamente similares pueden tener un pronóstico distinto.

Durante las últimas tres décadas la tasa de mortalidad por cáncer de mama ha disminuido en los países desarrollados, como resultado del escrutinio, mejor control local en cáncer de mama temprano y la introducción del tratamiento sistémico adyuvante observándose un decremento en la mortalidad a partir de 1990 de 3.3% por año en menores de 50 años y de 2% por año en mayores de 50 años.^{1, 2}

Los cánceres de mama que expresan receptores de estrógeno o progesterona y/o her2 positivos representan el 75-80% y el 15-20% respectivamente. Los restantes 10-15% son los llamados cánceres de mama receptores negativos o triples negativos (CMTN), que se caracterizan por la ausencia de la expresión de estas tres proteínas (estrógeno, progesterona y her2neu), dando como resultado que esta entidad sea resistente a los tratamientos dirigidos como trastuzumab y hormonales.

Anteriormente se había subclasificado el cáncer de mama en base a su morfología celular y la presencia de receptores (estrógenos, progesterona y her2) por inmunohistoquímica. Esta clasificación ha mostrado ser útil en términos de predecir pronóstico y guiar el tratamiento. Recientemente los perfiles de expresión genética han permitido analizar la expresión de genes o la también llamada firma genética del cáncer de mama.

En base a esto, el grupo de Stanford ha demostrado que la heterogeneidad del cáncer de mama puede ser clasificada a nivel transcripcional y se ha propuesto una clasificación molecular por medio de microarreglos de cDNA que identifica perfiles de expresión génica y los divide en 5 grupos: el grupo con RE positivos comprende los subtipos luminales A y B, otro grupo es el que expresa her2, el cuarto grupo es el normal de expresión de genes de mama y el quinto grupo denominado basal. Este último grupo debe su nombre a que tiene características de células del epitelio basal de mama, expresa tinción positiva para citoqueratinas del epitelio basal (mioepitelio) CK 5,6, 14 y 17 y ausencia de expresión de RE, RP y her2.^{3, 4, 5} Además de la expresión de estas citoqueratinas en el tipo basal se ha reportado expresión para vimentina, p caderina, $\alpha\beta$ cristalina, fascina y caveolinas 1 y 2.^{6, 7, 8, 9}

No existe una definición internacionalmente aceptada para el grupo basal, por lo tanto no hay un consenso sobre como caracterizarlos (microarreglos, PCR en tiempo real o inmunohistoquímica). La mayoría del grupo basal tiene el fenotipo triple negativo y en algunos estudios se toman como similares,¹⁰ sin embargo no son equiparables.¹¹ Así en un estudio se demuestra que aproximadamente el 60% de los cánceres triple negativos expresan marcadores basales, y por otra parte un 15% de los basales expresan algún receptor ER, PR o her2neu.¹² En otro reporte reciente se señala en 66 pacientes con CMTN se demostró una expresión del fenotipo basal (CK 5/6, CK 14 y 17) en el 60.1%.¹³

La inestabilidad genética es una marca del cáncer de mama y también es frecuentemente observado en el CMTN. Regiones específicas de pérdida y ganancia de genes se han asociado al CMTN. Estas incluyen pérdida de 3q12, 4p15-p32, 4q31-q35, 5q11-q31 y 14q22-q23 y ganancia de 1q12-q41, 6p12-p25, 7q22-q36, 10p12-p15, 17q25 y 21q22. El mecanismo subyacente y el impacto funcional de estos cambios genómicos todavía no son claros pero puede definir un fenotipo único que puede ser blanco de terapias dirigidas.¹⁴

Morfológicamente el CMTN se caracteriza por ser de alto grado, con un índice mitótico elevado, presencia de necrosis central, borde desplazante e infiltrado de linfocitos. La presencia de elementos metaplásicos, medulares o formas medulares atípicas son significativamente más prevalentes en el grupo basaloide.¹⁵

Fisiopatología

Las vías de señalización implicadas en la proliferación de esta variedad de cáncer de mama están pobremente comprendidas. Los potenciales blancos del tratamiento de estos tumores incluyen receptores de membrana como el factor de crecimiento epidérmico EGFR, C-kit, la vía de las protein kinasas con actividad mitogénicas MAP-kinasas ó vía kinasa B- Akt inducción de daño al DNA por agentes específicos que causen daño a la doble cadena de DNA y/o inhibición de vías defectuosas de reparación como polimerasa 1 ribosa ADP (PARP1) ¹**Fig 1**

BRCA 1 y Cáncer de mama triple negativo

Existen muchas similitudes fenotípicas y moleculares entre tumores con mutaciones de BRCA I y CMTN, entre estas se encuentran: RE negativo, alto grado nuclear, alta expresión de Ki 67, expresión de CK 5 y 6 y expresión de EGFR. Existe evidencia creciente de que los defectos de reparación del ADN característicos de cánceres relacionados a BCRA 1 contienen recombinaciones homólogas defectuosas que confieren sensibilidad a ciertos agentes sistémicos, lo cual sería relevante en el tratamiento de CMTN^{16, 17,18}

Tabla 1

Comportamiento clínico y diferencias raciales

El tipo basal es el subgrupo con menor periodo libre de enfermedad y supervivencia global. La historia natural de este subgrupo se caracteriza por una menor frecuencia de metástasis axilares a pesar de ser de alto grado, menor supervivencia libre de enfermedad, mayor capacidad de desarrollo de metástasis pulmonares tempranas y menor supervivencia posterior a una recaída.¹⁹ Se ha observado que no existe correlación entre el tamaño tumoral y la presencia de metástasis ganglionar. En cuanto a la frecuencia de metástasis ganglionares, en un estudio se encontró una mayor prevalencia de metástasis ganglionar comparado con controles, en otro estudio no existieron diferencias y en un tercero se observó una asociación inversa entre el CMTN y las metástasis ganglionares.^{20, 21, 22, 23.} Se cree que produce metástasis de forma hematogena por la observación de que el patrón metastático es generalmente a distancia: pulmón y a sistema nervioso central.^{24, 25}

En otro estudio de 930 pacientes en el cual se utilizó análisis por microarreglos con una mediana de seguimiento 17.4 años, la expresión basal de citoqueratinas se asoció a menor periodo libre de enfermedad. La expresión de HER1 se observó en 54% de los casos positivos para citoqueratinas basales, y esto fue asociado a pobre supervivencia independientemente del estatus ganglionar y tamaño.²⁶

En un reporte realizado por Haffty y cols se analizaron 482 pacientes con CMTN tratadas con manejo quirúrgico conservador y radioterapia con un seguimiento de 7.9 años, la cohorte triple negativa presentó una menor supervivencia libre de metástasis a 5 años vs los otros subtipos (67% vs 82% respectivamente $p = .0002$). En el análisis multivariado el fenotipo triple negativo fue un factor predictor independiente para metástasis distantes ($p = 0.002$) y pobre supervivencia causa específica $p = 0.047$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al control local.²¹

En un estudio retrospectivo Canadiense en dos centros, se analizaron 293 pacientes y se encontró una frecuencia de CMTN de 14%. Con un seguimiento a 10 años se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia entre el grupo de CMTN vs CMNTN, la cual fue más marcada a los 3 años (76.8% vs 93.5%, $p < .0001$). Esta diferencia se redujo con el tiempo lo que sugiere que la supervivencia se iguala a largo plazo en el CMTN y el CMNTN.²³

En cuanto a variaciones raciales, existen 2 estudios publicados. El estudio basado en los datos del registro de cáncer de California identificó 6370 mujeres con CMTN de una base de 44,701 mujeres con cáncer de mama. Las mujeres con CMTN fueron significativamente más jóvenes (menores de 40 años OR 1.53) y fueron de raza negra no hispanas (OR 1.77) o hispanas de nivel socioeconómico bajo (OR 1.23). Independientemente del estadio el grupo con CMTN presentó la supervivencia más baja.²⁷ El otro estudio de casos y controles realizado en el estado de Carolina, EUA por Carey y cols., en 496 pacientes con cáncer de mama, se encontró que el tipo basal es más frecuente en mujeres afro americanas premenopáusicas (39%) comparado con las afro americanas postmenopáusicas (14%) y que las no afro americanas de cualquier edad (15%) ($p=0.001$). La supervivencia específica por cáncer fue diferente por subtipo, siendo el de menor supervivencia el tipo basal ($p<0.001$).²⁸ Si estas diferencias raciales se relacionan con factores genéticos, exposición a factores ambientales o una combinación de ambos aún permanecen desconocidos.

Existe un estudio retrospectivo en pacientes mexicanas ($n= 110$) con cáncer de mama en etapa I a IIB, el 15.4% (17 pacientes) expresó el inmunofenotipo triple negativo. El fenotipo triple negativo se asoció con proliferación celular aumentada ($p <0.0001$), menor edad (mediana de 43 años), mayor tamaño tumoral (mediana= 2.5 cms), menor proporción de pacientes en etapa 1, así como mayor frecuencia de expresión positiva de la proteína p 53 (78.5%). Se observó mayor frecuencia de recurrencia y muerte en este grupo.²⁹

Otro estudio retrospectivo en población mexicana, tema de una tesis de postgrado, es el del Instituto Nacional de Cancerología donde se evaluó el inmunofenotipo de 242 pacientes. Solo contaron con re-determinación de her2 el 25% de los casos y no se hicieron citoqueratinas para corroborar su origen basal. Se encontró una incidencia de CMTN del (21.9%), de estas 33(27%) fueron premenopáusicas y 20 (17%) postmenopáusicas. Presentaron RPC el 19.4% del grupo total y el 23% del grupo de CMTN.³⁰

Respuesta a Quimioterapia

En teoría el CMTN tiene vías de proliferación incrementadas por lo cual sería más susceptible a la quimioterapia; sin embargo tiene un peor pronóstico que los demás grupos.

En cuanto a quimioterapia adyuvante existe un estudio donde se analizaron 49 pacientes con marcadores positivos para el subgrupo basal y se encontró que la quimioterapia adyuvante basada en antraciclenos parece ser menos efectiva en este subgrupo.³¹ En un estudio retrospectivo se observó que en CMTN la expresión de protein-kinasas con actividad mitogénica (MAPK) se asoció a resistencia a antraciclenos ($p=0.0008$)³²

Se ha observado que con el tratamiento de quimioterapia basada en antraciclenos a dosis convencionales, los resultados son peores en el subgrupo basal y el triple negativo.³³

Existe evidencia que se obtiene una mayor respuesta patológica con quimioterapia neoadyuvante en el tipo basal en comparación con los luminales. En un estudio que incluyó 82 pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia preoperatoria con paclitaxel seguida de FAC (5 FU, doxorubicina

y ciclofosfamida), el subtipo basal se asoció con una respuesta patológica completa (RPC) de 45%, mientras que en los tumores luminales fue del 7%.³⁴

Tabla 2

Carey y cols analizaron los patrones de IHQ y la respuesta a quimioterapia con 4 ciclos de quimioterapia neoadyuvante AC; de 107 pacientes, 32% expresaron marcadores para el tipo basal. La respuesta clínica fue mayor en el grupo basal 85% que en el tipo luminal 41% ($p=0.00001$), con una respuesta patológica completa de 27% en grupo basal. A pesar de la sensibilidad inicial a quimioterapia en el grupo basal, este tuvo un menor intervalo de supervivencia libre de metástasis ($p =0.04$) y supervivencia global ($p =0.02$). Hay que señalar que solo 2 de las 17 pacientes que desarrollaron RPC recayeron.³⁵

Se han evaluado otras combinaciones de drogas como ECF (epirubicina, cisplatino y 5 fluorouracilo) en infusión continua seguida de 3 cursos de paclitaxel semanal en 30 pacientes con CMTN localmente avanzado. Se obtuvo una respuesta patológica completa en el 40% de los casos. En base a este resultado se ha planteado que los regimenes basados en platino seguidos por paclitaxel pueden tener una alta RPC en CMTN³⁶

En un estudio de 145 pacientes en estadios II y III en el que se utilizó quimioterapia neoadyuvante con docetaxel y doxorubicina. Las pacientes con fenotipo triple negativo (32.4%) mostraron mayor RPC (17% vs 3%) que el grupo de cáncer de mama no triple negativo (CMNTN). Sin embargo la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global fue significativamente menor en el subgrupo triple negativo.³⁷

En cuanto a quimioterapia a dosis altas, en un estudio fase III en cáncer de mama de alto riesgo que comparó 5 cursos de FEC (fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida) con 4 cursos del mismo régimen seguido por una sola dosis de quimioterapia a dosis altas con ciclofosfamida (6 g/m²), tiotepa (480 mg/m²) y carboplatino (1600 mg/m²). Se observó que el grupo con her2 negativo se benefició en cuanto a supervivencia. Se analizó el grupo de her2 negativo con receptores hormonales negativos (cáncer de mama triple negativo) demostrando que la ventaja es igual que el grupo her2 negativo con receptores hormonales positivos, donde el efecto endocrino pudo haber contribuido más al beneficio en el brazo de quimioterapia a altas dosis. Los autores concluyen que el subgrupo triple negativo es específicamente sensible a altas dosis de agentes alquilantes.³⁸

En un análisis de subgrupo del estudio fase III WSG AM 01 se investigó cuales pacientes tenían el máximo beneficio de quimioterapia a dosis altas. El estudio comparó en pacientes con más de 9 ganglios afectados, 2 cursos de quimioterapia acelerada con EC (epirrubicina y ciclofosfamida) seguido por dos cursos de quimioterapia a dosis altas que consistió en dosis estándar de epirrubicina (90 mg/m²) y dosis altas de ciclofosfamida (3 grs/m²) y tiotepa (400 mg/m²) contra 4 ciclos de EC seguidos por 3 ciclos acelerados de CMF (ciclofosfamida, fluorouracilo y metotrexate). Con un seguimiento medio de 61.7 meses, la supervivencia global fue mayor en el grupo de dosis altas (76% vs 61% p=0.007). El mayor beneficio fue para las mujeres jóvenes con tumores triple negativos.³⁹

A pesar de ser análisis retrospectivos de subgrupos, ambos estudios muestran la eficacia de la quimioterapia a altas dosis basada en ciclofosfamida

y tiotepa en el cáncer de mama triple negativo. Sin embargo el uso de quimioterapia a dosis altas basadas en agentes alquilantes no puede considerarse estándar y se requieren de estudios fase III en cáncer de mama triple negativo.

Cáncer de mama triple negativo y respuesta patológica

En una publicación reciente que analizó a 255 pacientes con cáncer de mama. Los pacientes con CMTN (23%) comparado con pacientes con cáncer de mama no triple negativo (CMNTN) tuvieron una mayor tasa de RPC (22% vs 11%; $p=.034$) pero una supervivencia libre de progresión y supervivencia global a 3 años menor que los CMNTN ($p < 0.0001$). Por otro lado se observó que si se lograba respuesta patológica completa, los pacientes con CMTN y CMNTN tienen la misma supervivencia. En contraste los pacientes con CMTN con enfermedad residual tienen peor supervivencia comparados con los CMNTN ($p<0.001$) particularmente en los 3 primeros años.⁴⁰

Los CMTN pueden responder mejor a quimioterapia por su alto índice de proliferación, esto observado por la alta expresión de ki-67. Las pacientes que fallan en alcanzar una respuesta patológica completa tienen a recaer de forma temprana y tener peor desenlace.⁴¹

Marcadores moleculares pronósticos.

Los marcadores moleculares han sido extensamente estudiados en cáncer de mama temprano con el propósito de obtener información pronóstica temprana exacta y a largo plazo.

En CMTN se ha descrito en una cohorte de 47 pacientes contra 98 pacientes con CMNTN como factores pronósticos, mayor RPC, mayor grado nuclear o histológico, menor proporción de expresión de bcl-2 y ki-67 alto.³⁷

La proliferación celular es clave para la progresión tumoral y se puede medir con el antígeno nuclear de proliferación ki-67 determinado mediante inmunohistoquímica. La expresión de Ki-67 correlaciona con otras medidas de proliferación como fase S y captación de bromodeoxiuridina.⁴²

Una alta expresión de Ki-67 es un signo de pobre pronóstico a pesar de una buena respuesta clínica a quimioterapia pero su significado de forma independiente es modesto y no se mide en la mayor parte de los escenarios clínicos.

Existe evidencia de que la reducción en la concentración de Ki-67 posterior a tratamiento (quimioterapia y/o hormonoterapia) es un subrogado útil de respuesta a tratamiento y de beneficio en supervivencia..⁴³ Por lo tanto se cree que mediciones seriadas de Ki -67 pudieran ser útiles en la medición de actividad de nuevos agentes.^{44,45} En un estudio de 77 pacientes con cáncer de mama operable que recibieron quimioterapia neoadyuvante FEC (5-Fluorouracilo. Epirrubicina y ciclofosfamida) se realizó biopsia por trucut basal, a los 21 días de quimioterapia y en el día de la cirugía, con determinación de Ki-67 e índice de apoptosis. En el 31% de los casos se obtuvo una respuesta

patológica. Las pacientes que respondieron clínicamente presentaron un menor índice de Ki-67 en el día 21 (11.4% vs 27% $p=0.002$) y mayor porcentaje de reducción de Ki-67 que las no respondedoras (-50.6% vs -5.3). Las pacientes que tuvieron respuesta patológica completa el Ki-67 del día 21 fue mayor significativamente (30.3% vs 14% $p=0.046$). No se encontraron diferencias en la biopsia basal vs la quirúrgica. La utilidad clínica de estos cambios tempranos en los marcadores biológicos aun permanece desconocida y se requieren de estudios confirmatorios.⁴⁶

En un metaanálisis reciente se evaluaron los estudios que analizaron el impacto de Ki-67 y su anticuerpo MIB-1 sobre la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en cáncer de mama temprano. Se analizaron 46 estudios que incluyeron 12, 155 pacientes. La positividad para Ki-67 se asoció con mayor probabilidad de recaída en todos los pacientes ($p<0.001$), tanto en ganglios negativos ($p<0.001$) como en ganglios positivos ($p<0.001$). Además la positividad de Ki-67 se encontró relacionado con menor supervivencia en ganglios negativos y positivos. ($p<0.001$).⁴⁷

Específicamente en el cáncer de mama triple negativo no se conoce con precisión en población mexicana si Ki-67 es un factor pronóstico y/o de respuesta a tratamiento.

El cáncer de mama tipo basal tiene una alta expresión de la proteína p53 esta se activa al detectar daño en el DNA llevando a la célula a apoptosis o reparación.⁴⁸ En una serie se encontraron mutaciones de p53 en la región codificante, en el 82% del subtipo basal. ($p=0.0001$)⁴⁹

Existe una publicación en donde se analiza su valor predictivo para respuesta en cáncer de mama con regimenes basados en antraciclenos o

alquilantes. Se analizaron varios marcadores entre ellos p53 por inmunohistoquímica en 293 biopsias, la tinción para p53 (54%) estuvo asociado con alto grado ($p=0.0002$), receptores estrogénicos negativos ($p=0.04$). El p53 fue detectado en 59% de los cánceres triple negativos ($n=120$ pacientes). En la población global la respuesta patológica completa (9.6%) fue independientemente predicha por grado tumoral alto ($p=0.002$) y ser triple negativo ($p=0.00004$). La inmunotinción positiva para p53 se asoció con una tendencia a una alta tasa de respuesta en tumores triple negativos (riesgo relativo de 2.5. $p=0.009$) pero no en tumores no triples negativos (riesgo relativo de 0.73 $p=0.069$).⁵⁰

Los estudios de microarreglos han mostrado una alta tasa de sobreexpresión de EGFR en el grupo basal. En un estudio en el cual se define el subtipo basal por medio de ensayos de expresión génica, el 57% . La expresión de c-KIT se presentó en el 31% del subgrupo basal.⁵¹ En otro estudio se encontró una alta expresión de EGFR (64%)⁵²

No existe información en CMTN si EGF-R y C-kit son marcadores pronósticos o predictores de respuesta a quimioterapia neoadyuvante.

IV. Justificación.

El cáncer de mama en México constituye un problema de salud pública. Se ha reportado en Estados Unidos una mayor incidencia de cáncer de mama triple negativo (CMTN) en mujeres premenopausicas de minorías étnicas áfrico-americanas e hispanas. Existe escasa información en población mexicana.

El CMTN se asocia con menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Sin embargo la respuesta patológica completa (no evidencia de tumor en mama y axila al examen patológico ó/y cáncer in situ) en posterior a quimioterapia neoadyuvante en estas pacientes confiere buen pronóstico a largo plazo. No se conocen con exactitud factores que permitan predecir respuesta clínica ó patológica completa en cáncer de mama triple negativo.

V. Hipótesis

Los elevados índices de proliferación celular determinados por Ki-67, así como las mutaciones de p53, c-kit y sobre-expresión EGF-R son marcadores predictivos de respuesta clínica y patológica a quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama localmente avanzado triple negativo.

Hipótesis alterna

Los elevados índices de proliferación celular determinados por Ki-67, así como las mutaciones de p53, c-kit y sobre-expresión EGF-R no son marcadores predictivos de respuesta clínica y patológica a quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama localmente avanzado triple negativo.

VI .Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el papel de Ki-67, p53, c-kit y EGF-R como marcadores predictivos de respuesta clínica y patológica a quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo.

Objetivos secundarios

- Conocer la frecuencia de pacientes con cáncer de mama triple negativo que presentan respuesta clínica y patológica completa con quimioterapia neoadyuvante.
- Comparar en población mexicana el comportamiento clínico/patológico de cáncer de mama triple negativo contra cáncer de mama no triple negativo (luminal)
- Describir las variables morfológicas de cáncer de mama triple negativo

VII. Pacientes y Métodos

Diseño del estudio

Retrospectivo, comparativo y ambilectivo.

En el periodo comprendido de enero de 1998 a enero del 2008 se identificaron 103 pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de mama tratadas por el departamento de Oncología Médica en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Dr. Salvador Zubirán. Acorde con los resultados del expediente 39 pacientes tuvieron IHQ de la biopsia basal con inmunofenotipo triple negativo, 20 pacientes recibieron tratamiento con quimioterapia adyuvante y 19 pacientes recibieron tratamiento con quimioterapia neoadyuvante. En este último grupo se repitió el panel de IHQ para RE, RP y her2. Se confirmó el inmunofenotipo triple negativo en 15 pacientes y se excluyeron 4 por las siguientes razones: 1 paciente no contaba con las laminillas y bloque de parafina de tejido tumoral y en 3 se confirmaron RE positivos. Se observaron 15 pacientes para el grupo de CMNTN que contaban con tejido evaluable en el departamento de patología con IHQ basal para RE y/o RP positivos, Her2 negativo, ki67 y p53 y que habían recibido quimioterapia neoadyuvante. Finalmente se obtuvo el tejido tumoral de 30 pacientes: 15 pacientes expresaron el inmunofenotipo triple negativo: Receptores hormonales negativos y her2 negativo y 15 pacientes controles que expresaron el inmunofenotipo luminal: RE positivos y/o RP positivos y Her2 negativo que recibieron quimioterapia neoadyuvante a base de antraciclenos y/o taxanos. **Algoritmo 1** Se revisaron sus expedientes clínicos para obtener las siguientes variables clínicas: Edad, antecedentes heredofamiliares para cáncer de mama u otro tipo de cáncer, tabaquismo, menarca, paridad, edad

primer embarazo, obesidad, uso de anticonceptivos hormonales, uso de terapia sustitutiva hormonal, TNM clínico, esquema y número de ciclos de quimioterapia neoadyuvante y respuesta clínica.

En el grupo de CMTN se realizó nueva inmunohistoquímica para RE, RP, her2, Ki-67, p53, c-kit , EGFR, marcadores del subtipo basal (AEA1/CK 5 y AEA2/CK 6) en tejido tumoral pre y post-quimioterapia. Se identificaron además sus variables morfológicas en la re-revisión por un patólogo. En el grupo de CMNTN se re-revisaron las laminillas del diagnóstico e IHQ para RE , RP y Her2 previamente realizada de rutina en el servicio de patología. Las variables morfológicas analizadas fueron en ambos grupos la histología, el TNM patológico, la respuesta patológica post quimioterapia neoadyuvante y SBR. En el grupo de CMNTN se revaloró la diferenciación, la infiltración linfo-vascular, la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear, la cuenta mitótica, la necrosis, los bordes desplazantes, la respuesta linfoide, las células apoptóticas y la presencia de elementos metaplásicos.

La respuesta patológica completa se definió como no evidencia de tumor residual o cáncer in situ en mama y axila al examen histopatológico.

Se consideraron valores positivos para RP la expresión >10% , de RE >10% de células marcadas en toda la preparación. Her2 negativo se definió como 1+ y /o 2+ con ampliación genética negativa por el método FISH.

La supervivencia libre de recaída se considero desde la fecha del diagnóstico histológico hasta la fecha de documentación de la recaída.

La supervivencia global se considero desde la fecha del diagnóstico histológico hasta la defunción.

Técnica de inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes en blanco para el estudio inmunohistoquímico contra receptores estrogénicos, progesterona, her2, citoqueratinas AEA1/CK5, AEA2/ 6, Ki-67, p53, c-kit y EGF-R. Los tejidos se colocaron en laminillas silanizadas que fueron desparafinadas en baños consecutivos de xilol y alcohol e hidratación con buffer tris. En las laminillas se incluyó tejido de carcinoma de mama triple negativo y control positivo conocido de Ki-67, p53, c-kit y EGF-R. Se realizó recuperación antigénica con EDTA 10 mM (pH 8) en olla de presión usando horno de microondas durante 12 minutos. Se utilizó equipo automatizado NexEs (Ventana Medical Systems) de acuerdo con el protocolo establecido y el contraste se realizó con hematoxilina.

Análisis estadístico

La captura se hizo en una base de datos SPSS versión 13. La población de estudio se caracterizó mediante el uso de estadística descriptiva. Para el análisis de las variables no paramétricas se empleo la prueba de χ^2 o exacta de Fisher. Se realizaron curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meyer que fueron contrastadas mediante log Rank. Las variables significativas fueron sometidas al modelo de riesgos proporcionales de Cox. Para todas las pruebas se empleo una significancia estadística de $p < 0.05$.

VIII. Resultados

Se analizaron 15 pacientes con cáncer de mama triple negativo (CMTN) y 15 pacientes con cáncer de mama no triple negativo (CMNTN). La frecuencia de CMTN en la población estudiada fue del 33.9%.

VARIABLES CLÍNICAS

En la **tabla 3** se muestran las características de los pacientes triple negativos y los controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en: edad, estado hormonal al diagnóstico, antecedentes heredo familiares para cáncer de mama, antecedentes heredo familiares para otros tipos de cáncer, tabaquismo, obesidad, edad de menarca, uso de anticonceptivos hormonales, mediana de utilización de anticonceptivos hormonales, terapia reemplazo hormonal, mediana de utilización de terapia de reemplazo hormonal, embarazos, edad del primer embarazo.

Al analizar el estadio clínico, se observó que en el grupo de CMTN hubo estadios patológicos más avanzados EIII (53.4%) y E IV (6.7%) en comparación con el grupo de CMNTN EIII (6.7%) y E IV 0%, ($p=0.002$) lo que se muestra en la **FIG 2**

La frecuencia de estadio clínico I y II en CMTN fue de 6 (40%) comparado con 14 (93.3%) en CMNTN estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=.0067$) OR .048 IC (0.001-0.523)

La frecuencia de T1 y T2 en el grupo de CMTN fue de 4 (36.3%) comparado con 10 (66.6%) en el grupo CMNTN, se encontró una diferencia que no fue estadísticamente significativa pero muestra una tendencia $p=0.067$ OR=0.18 IC (0.03-1.09).

Al comparar la frecuencia de enfermedad ganglionar negativa (N0) vs enfermedad ganglionar positiva (N1,N2,N3). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos $p=0.13$ OR=0.22 IC (.03-1.38). Específicamente en el grupo de CMTN se observó que en 6 pacientes (40%) presentaban T3 y T4 con axila negativa clínicamente.

Todas las pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante, el grupo CMTN basada en antraciclenos 6 (20%) y antraciclenos más taxanos 9 (60%), en el grupo CMNTN basada en antraciclenos 2 (13.3%) y antraciclenos más taxanos (86.6%) ($p=0.23$). La mediana de ciclos en ambos grupos fue de 6.

En el grupo CMTN recibieron quimioterapia adyuvante 8 pacientes (53%) con taxanos y en el grupo CMNTN 1(6.6%) ($p=0.72$) La mediana de ciclos en ambos grupos fue de 4.

Se obtuvo respuesta clínica completa en 5 pacientes del grupo de CMTN (33.3%), parcial en 5 (33.3%), enfermedad estable en 0 y progresión de enfermedad en 5 (33.3%). En el grupo de CMNTN se obtuvo respuesta clínica

completa en 1 paciente (6.7%), parcial en 10 (66.6%), enfermedad estable en 2 (13.3%) y progresión de la enfermedad en 2 (13.3%). ($p=0.055$)

Las pacientes del grupo de CMTN que fueron respondedoras clínicamente (respuestas completas y parciales) a quimioterapia neoadyuvante tuvieron un 50% de probabilidad de desarrollar RPC, por otro lado las pacientes que no fueron respondedoras (enfermedad estable y progresión de la enfermedad) no desarrollaron respuesta patológica. ($p=0.053$)

Todas las pacientes fueron sometidas a cirugía, no hubo diferencias en el tipo de procedimiento entre ambos grupos. En el grupo CMTN se realizaron mastectomía radical modificada (MRM) 11 (73.3%), cuadrantectomía 2 (13.3%) y lumpectomía 2 (13.3%). En el grupo control MRM 12 (80%), cuadrantectomía 2 (13.3%) y lumpectomía 1 (6.7%). ($p=0.63$)

Recibieron radioterapia posterior a la cirugía en el grupo CMTN 11 (73.3%) y en el grupo CMNTN 9 (60%). ($p=0.59$)

En el grupo de pacientes con CMTN presentaron recaída sistémica de la enfermedad 5 (33.3%) y solo 1 recaída local (6.7%) en el grupo de CMNTN ($p=0.068$). En el grupo de CMNTN se presentaron recaída local en 1 paciente (20%) y a distancia 5 (80%). Los sitios de recaída más frecuentes fueron pulmón e hígado. **TABLA 4**

La mediana de supervivencia libre de recurrencia de 24 meses para el grupo de CMTN y de 34 meses en el grupo CMNTN. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = .023$) **FIG 3**

Todas las pacientes que recayeron el grupo CMTN fallecieron por la enfermedad. La mediana de supervivencia posterior a recaída fue de 3 meses. La única paciente que recayó en el grupo de CMNTN lo hizo localmente se rescató con cirugía, la paciente continua viva libre de enfermedad a 39 meses después.

La mediana de supervivencia global fue de 25 meses para el grupo de CMTN y de 39 meses para el CMNTN. ($p = .007$) **FIG 4**

La SLR y la SG a 8 años fueron significativamente inferiores en el grupo de pacientes con CMTN (50% y 50% vs 90% y 100%) respectivamente. **FIG 3 y 4**

Variables Patológicas

En el grupo de CMTN existió positividad para citoqueratinas 5 y 6 en 9 pacientes (60%) y negatividad en 5 (40%). **FIG 16**. La positividad o negatividad pre o post neoadyuvancia no se relaciono al periodo libre de enfermedad o a supervivencia global. La negatividad de ck5 y ck6 se relacionó con respuesta patológica completa 26.6% vs 6.6% ($p = 0.025$). **FIG 5**

En el grupo de CMTN se encontraron 5 respuestas patológicas completas (33.3%). Todas las pacientes que presentaron respuesta patológica

completa permanecen vivas y libres de enfermedad. Sin embargo la SLR y SG en estas pacientes no fue estadísticamente superior a pacientes sin respuesta patológica. **FIG 6 y 7.** No existieron respuestas patológicas en el grupo de CMNTN.

La variable histológica más frecuente en el grupo de CMTN fue el basal 6 pacientes (40%), seguido de ductal 5 pacientes (33.3%), medular 2 pacientes (13.3%), lobulillar 1 paciente (6.7%) y mucinoso 1 paciente (6.7%). En el grupo CMNTN la histología más frecuente fue ductal 12 pacientes (80%) y 3 pacientes (20%) lobulillar. La diferencia entre los grupos fue significativa ($p=0.012$) **Fig 8**

El SBR del grupo de CMTN fue del alto grado 11 pacientes (73.3%), de grado intermedio 3 pacientes (20%) y bajo grado 1 paciente (6.7%). En el grupo CMNTN SBR de grado intermedio 8 pacientes (53%) y 7 pacientes (46.7%) de bajo grado. ($p<.0001$) **FIG 9**

Posterior a la quimioterapia neoadyuvante no hubo diferencias en el estadio patológico entre los grupos. ($p=0.58$). En el grupo de CMTN se presento menor número de T2, 2 pacientes (15.3%) comparado con el grupo de CMNTN T2, 9 pacientes (60%) ($p=0.023$).

El antígeno de proliferación Ki- 67 se encontró positivo en la biopsia inicial en todos los casos con CMTN y en 9 pacientes (60%) de los casos con CMNTN. ($p=.006$). El porcentaje de positividad $>30\%$ para ki67

preneoadyuvancia en el grupo CMTN fue de 86.6% (13 pacientes) y en el grupo CMNT 6.6% (1 paciente) ($p < 0.0001$) **FIG 10** Lo que indica un índice de proliferación mayor en las pacientes con CMTN.

En el grupo de CMTN se observó que las pacientes que desarrollan RPC, el 60% de ellas negativizaron el Ki67 post neoadyuvancia, por el contrario en los casos sin respuesta patológica el 90% continuo con Ki-67 positivo. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = .039$) **FIG 11**. Las pacientes con RPC que no negativizaron Ki-67 (40%) presentaron descenso del porcentaje de células positivas para el antígeno de proliferación Ki-67. **FIG 12**.

La positividad para p53 pre neoadyuvancia en el grupo CMTN fue de 86.6% (13 pacientes) y en el grupo de CMNT fue de 46% (7 pacientes) estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = .020$) **FIG 13**. El porcentaje de positividad $\geq 30\%$ de p53 en el grupo de CMTN fue 73.3% (11 pacientes) y en el grupo CMNTN fue de 6.6% (1 pacientes) ($p = 0.01$).

Solo las pacientes del grupo CMTN que presentaban porcentajes de p53 pre neoadyuvancia $> 30\%$ desarrollaron las 5 (100%) respuesta patológica completa. ($p = .006$) **FIG 14**. El comportamiento p53 pre y pos neoadyuvancia se observa en la **FIG 15**

En el grupo de CMTN el c kit en la biopsia inicial se encontró negativo en 93.3% (14 pacientes) y positivo en 6.7% (1 paciente). En el tejido posterior a

neoadyuvancia se encontró positivo en 3 casos (20%) y negativo en 12 casos (80%). Se encontró positivo en 2 pacientes que presentaron RPC ($p=0.43$). **Fig 16**

El Receptor del factor de crecimiento epidérmico ó Her1 se encontró positivo en la biopsia inicial en 5 casos (33.3%) y persistió positivo en tejido posterior a neoadyuvancia. **Fig 16**. En todas las pacientes que desarrollaron RPC se encontró negativo posterior a la neoadyuvancia ($p=0.53$).

Morfología CMTN

En el grupo CMTN se observó una diferenciación pobre en 12 pacientes (80%) y moderada en 3 (20%). Infiltración vascular y linfática en 8 pacientes (53.3%). Formación de túbulos < 10% en 14 pacientes (93.3%) y del 10-75% en una (6.7%). Pleomorfismo nuclear marcado en 11 pacientes (73.3%) y moderado en 4 (26.7%). Cuenta mitótica: <10 mitosis por campo en 8 pacientes (53.3%), 10-19 mitosis por campo en 3 pacientes (20%) y >19 mitosis por campo en 4 (26.7%). Necrosis ausente en 6 pacientes (40%), >30% en 5 (33.3%) y

<30% en 4 (26.7%). Borde desplazante en 5 pacientes (37.3%).

Infiltración linfoide: ausente en 2 pacientes (13.3%), <50% en 12 (80%) y >50% en 1 (6.7%). Células apoptóticas <10 en 15 pacientes (100%). Elementos metaplásicos ausentes en 11 pacientes (73.3%), presentes en 4 (26.7%).

Ninguna de las variables morfológicas anteriores se relaciono con respuesta patológica completa, SLR o SG. **FIG 17**

IX Discusión

Muchos estudios han investigado factores pronósticos de respuesta a quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama. Hasta el momento la RPC es una variable pronóstica independiente y las pacientes que desarrollan RPC demuestran mejor supervivencia comparadas con las que presentan tumor residual. Los marcadores moleculares como RE, RP, p53, ki-67 y Her2 se consideran factores pronósticos en el contexto neoadyuvante. Sin embargo estos marcadores en algunos casos son contradictorios o no concluyentes por la heterogeneidad de las poblaciones de pacientes, muestras pequeñas y distintos regímenes de quimioterapia.

Es importante mencionar que se encontró una mayor frecuencia de RPC en el grupo de CMTN sin embargo esto no se tradujo estadísticamente en una mayor SLE y SG probablemente por el número reducido de casos.

La prevalencia de positividad para citoqueratina 5 y 6 fue del 60% lo cual es similar en series extranjeras.^{12,13} Un hallazgo importante en nuestro estudio es que las citoqueratinas 5 y 6 parecen ser un factor predictivo de RPC, ya que las pacientes con citoqueratinas negativas tienen mayor probabilidad de RPC.

El fundamento fisiopatológico para plantear a las citoqueratinas como factor predictivo de RPC es que los tumores que expresan marcadores del mioepitelio podrían ser menos sensibles a la quimioterapia.

En cuanto a Ki67 se encontró una mayor frecuencia de positividad y en un mayor porcentaje (>30%) en pacientes con CMTN. Interesantemente se encontró una tendencia hacia el descenso o negativización posterior a la quimioterapia neoadyuvante, observándose un mayor porcentaje de respuesta patológica completa en pacientes que lo negativizan.

Se observó una mayor frecuencia y porcentaje de positividad en expresión de la proteína de P53 en el grupo de CMTN vs el grupo control. También se observó que en quienes tienen niveles pre neoadyuvancia >30% se relaciona con mayor índice de respuestas patológicas completas.

Solo se realizó C kit en el grupo CMTN. No encontramos correlación de C kit con RPC; SLE o SG. Un hallazgo interesante es que observamos positivización posterior a la neoadyuvancia en 3 pacientes lo cual no ha sido reportado previamente, y que podría explicarse por que se trate de una vía de señalización que el tumor utilice posteriormente a que otras vías de señalización han sido dañadas.

En cuanto a Her1 o EGFR se observó positividad en el 33.3% de los pacientes CMTN lo cual no se relacionó estadísticamente con RPC, aun cuando todas las pacientes que presentaron RPC hubo negativización de este marcador.

La respuesta clínica posterior a neoadyuvancia fue mejor en el grupo de CMTN (33.3%) contra CMNTN (6.7%), obteniéndose también un mayor porcentaje de respuesta patológica completa CMTN (33.3%) vs CMNTN (0)%

El obtener respuesta patológica como ya se ha demostrado previamente también confiere un buen pronóstico en las pacientes con CMTN,⁴⁰ así en nuestro estudio todas las pacientes con respuesta patológica completa se encuentran vivas y sin evidencia de recaída. Por otro lado las pacientes que no obtuvieron RPC tienen una supervivencia libre de progresión y global de 35% a 8 años. De las pacientes que recayeron el tiempo a la recaída fue muy corto (mediana de 3 meses)

En el análisis multivariado para respuesta clínica ó patológica de las variables clínicas y patológicas que fueron predictivas para RPC (estadio clínico, tipo de recaída, SLP, SG. citoqueratinas negativas, variable histológica, SBR, Ki67 basal, Ki67>30% basal, Ki67 postneoadyuvancia, p53 basal, p53>30%) no tuvieron significancia estadística esto se debe a que el modelo de Cox no es útil para analizar una muestra tan pequeña.

La frecuencia de CMTN en esta serie fue del 33.9% mayor a lo reportado a la serie en pacientes mexicanas del 21.9%.³⁰ En nuestro estudio se demostró que las pacientes con CMTN muestran una tendencia a cursar con una edad menor y un estado premenopáusico comparado con controles históricos, lo que

concuerta con lo reportado en la literatura^{4,20} En cuanto a los factores de riesgo conocidos no encontramos diferencias en comparación al CMNTN.

En cuanto a los antecedentes heredo familiares para cáncer de mama no encontramos mayor prevalencia en el grupo de CMTN, esto no concuerda con la literatura donde se describen asociaciones de BRCA1 con tipo basal y o receptores negativos hasta de un 80%.⁴¹ Por otra parte todavía no se conoce en la población mexicana cual es la frecuencia y las mutaciones más frecuentes y si estas específicamente se podrían relacionar con CMTN.

Nuestros datos demuestran que el CMTN se presenta en etapas mas avanzadas con respecto al CMNTN y que no existen diferencias en cuanto a la frecuencia de metástasis ganglionares entre los dos grupos, este hallazgo concuerda con varios estudios que demuestran resultados contradictorios en cuanto a la existencia de involucro ganglionar.^{20,21,22,23} Interesantemente se observó que no existe correlación entre el tamaño tumoral y la presencia de enfermedad ganglionar como indican estudios previos.

No encontramos diferencias en respuestas, SLR y SG según el tipo de quimioterapia recibida, aun cuando existen algunos estudios que muestran resistencia a antraciclenos en las pacientes con CMTN.³¹

Se ha planteado que la vía de diseminación del CMTN es más hematógena que linfática^{24,25}, en nuestra serie todas las recaídas (5

pacientes) fueron a distancia lo cuál va a favor de esta teoría y confiere un peor pronóstico que los CMNTN ya que en estos un porcentaje de las recaídas son locoregionales que son potencialmente rescatables. Los sitios metastásicos mas frecuentes fueron pulmón, hueso e hígado. No encontramos recaída en SNC el cual se ha reportado como un sitio metastásico frecuente,^{24,25} aunque no se busco intencionadamente por los clínicos.

En relación a la supervivencia global se corrobora que este subtipo es de mal pronóstico en relación al subtipo luminal contra el que se comparo.

En nuestra experiencia la variable morfológica más frecuente en CMTN fue el tipo basal o basaloide lo cual va de acuerdo a lo publicado en la literatura. Por otra parte prácticamente no se encontraron tumores en el grupo de CMTN con SBR bajo predominando el alto grado lo cual explica en parte la naturaleza agresiva y el pobre pronóstico de estas pacientes.

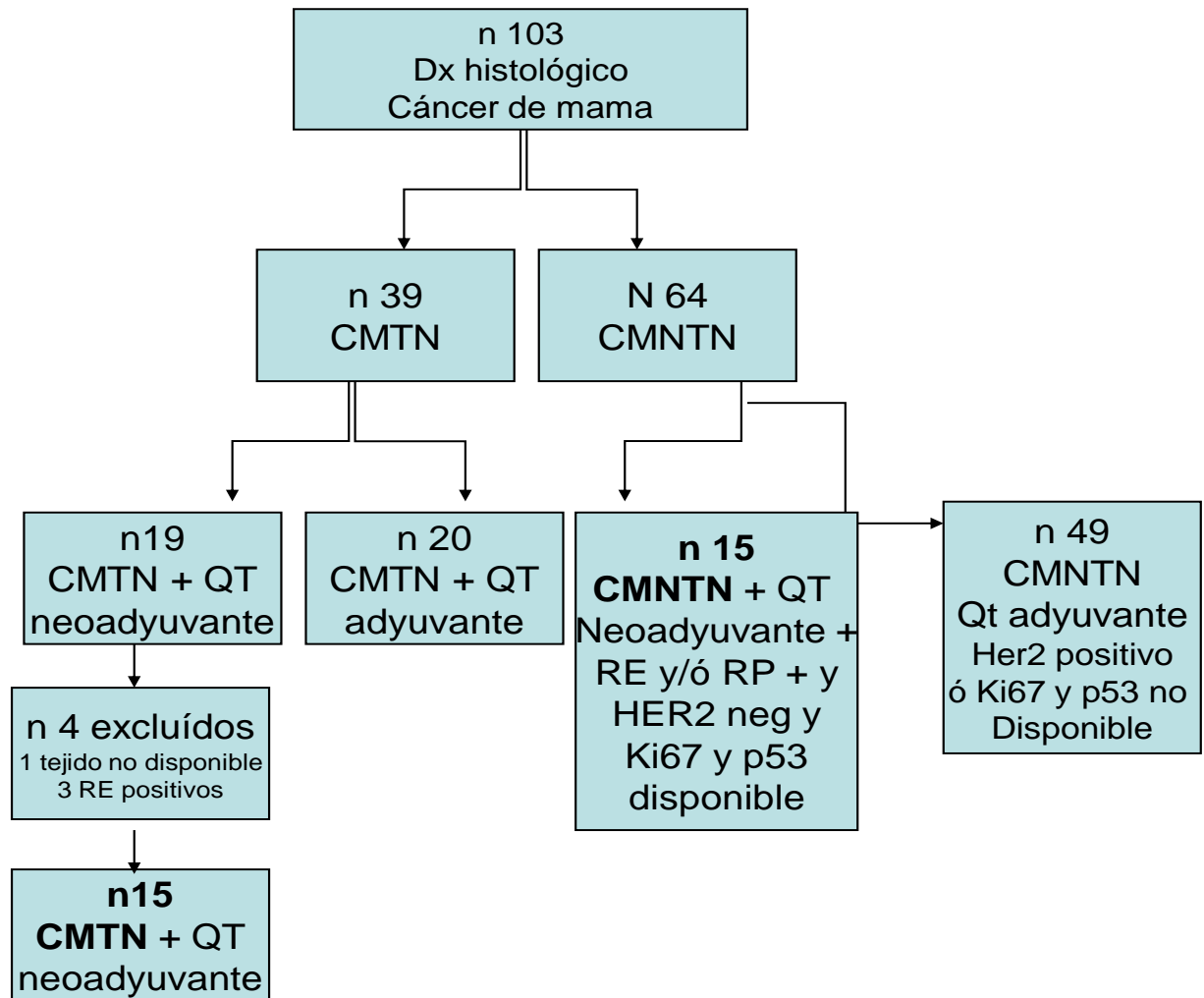
A pesar de ser un análisis retrospectivo este estudio demuestra que es posible utilizar la inmunohistoquímica(RE; RP; Her2,CK basales) para identificar los subtipos moleculares de cáncer de mama y así poder establecer el pronóstico y tratamiento sin necesidad de realizar microarreglos de DNA que son costosos y poco accesibles para los países del tercer mundo.

Nuestro estudio identifica como potenciales marcadores de respuesta patológica completa la expresión de Ki-67 y p53 en los carcinomas mamarios triple negativos de fenotipo basaloide.

En esta población se confirman las características clínicas y patológicas descritas en otras series de casos, con respecto a la mayor agresividad, diseminación a distancia, menor SLR, SG, y mayor respuesta clínica y patológica completa a quimioterapia neoadyuvante.

Es indispensable la realización de más estudios en población mexicana con mayor número de pacientes y diseños prospectivos, multi-institucionales que permitan aumentar el nivel de evidencia de este trabajo.

X Tablas y Figuras



Algoritmo 1. Se demuestra la distribución de los grupos estudiados. CMTN(Cáncer de mama triple negativo), CMNTN (Cáncer de mama no triple negativo), QT (Quimioterapia), RE (receptores de estrógenos), RP (receptores de progesterona)

Característica	CMNTN	CMTN	Cáncer de mama asociado BRCA1
Receptor estrógenos	Variable (33% neg)	Negativo	Negativo en 90.4%
Her2neu	15% positivo	Negativo	19% positivo
Mutación p53	~23% positiva	56% positiva	66% positiva
Grado histológico	variable	Alto	Alto
Patrón expresión genética	Basales 18.7%	Basales 56%	Basales 88%
Quimiosensibilidad	variable	Quimiosensible	Sensible a agentes dañen DNA
Pronóstico	variable	Pobre	Pobre
Anormalidades citogenéticas	Muy bajas	Relativamente altas	Relativamente altas

Tabla 1 Comparación entre cáncer de mama triple negativo (CMTN) versus cáncer de mama no triple negativo (CMNTN) y cáncer de mama asociado a BRCA1 Adaptada de la ref 41 Soonmo Meter Kang, Maritza Martel y Lyndsay N Harris. Triple negative breast cancer: current understanding of biology and treatments options. Curr Opin Gynecol.2008; 20: 40-46

Subtipo Cáncer de mama	No Respuesta	Respuesta patológica completa
Luminal A/B	28(93%)	2 (7%)
Normal	10 (100%)	0 (0%)
Erb2 +	11 (55%)	9(45%)
Basal	12(55%)	10(45%)

Tabla 2 Respuesta patológica a quimioterapia neoadyuvante según subtipo de cáncer de mama. Adaptada de la ref 34 Rouzier Roman, Perou Charles, Symmans Fraser. Breast Cancer Molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clin Onco Res. 2005; 11,16: 5678-5685

Característica	CMTN	CMNTN	p
Edad (mediana)	46	54	
<35 años	3 (20%)	0	0.065
>35 años	12 (80%)	15(100%)	
Premenopausia	9 (60%)	6 (40%)	0.46
Postmenopausia	6 (40%)	9 (60%)	
AHF Ca de mama 1era línea <50 años Positivos			
AHF Otro tipo cáncer Negativos	11(73.4%)	10(66.7%)	0.49
positivos	4 (26.6%)	5(33.3%)	
Tabaquismo positivo	5 (33.3%)	1(6.7%)	0.68
Obesidad IMC ≥ 30 No	9(60%)	7(46.7%)	0.29
Si	6(40%)	8(53.3%)	
Menarca <12	6 (40%)	4(26.7%)	0.43
≥12	9 (60%)	11(73.3%)	
Anticonceptivos hormonales sí	5(33%)	7 (46.7%)	0.45
Terapia reemplazo hormonal	1(6.7%)	2 (13.3%)	0.59
1 ó mas embarazos	13(87%)	12(80%)	0.62
Edad 1er embarazo <35 años	13 (86.7%)	10 (66.7%)	0.45
>35 años	2 (13.3%)	2 (12.7%)	

Tabla 3 Características clínicas de los grupos estudiados CMTN y CMNTN

Sitio de recaída	Numero (%)
Hueso e Hígado	2 (40%)
Pulmón	1 (20%)
Pulmón, pleura y cutánides	1 (20%)
Pulmón,médula espinal	1 (20%)

Tabla 4 Frecuencia de sitios de recaída a distancia CMTN

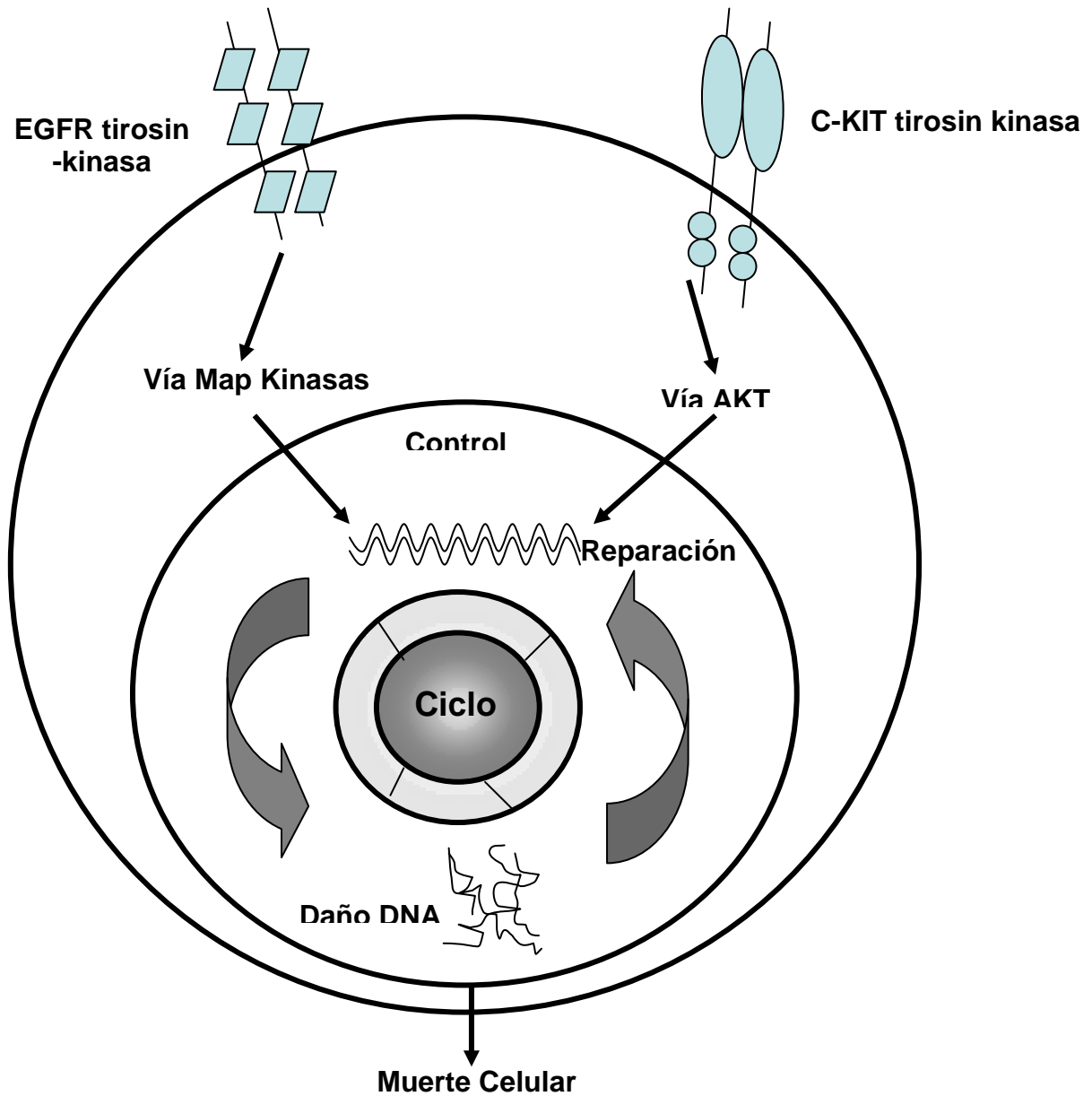


Fig 1. Vías de proliferación en cáncer de mama triple negativo. Adaptado de la Ref ¹ Cleator Susan, Wolfgang Heller, R Charles Coombes. Triple negative breast cancer: therapeutic options. Lancet Oncol. 2007; 8: 235 -44.

CMTN Y CMNTN ESTADIO CLINICO INICIAL

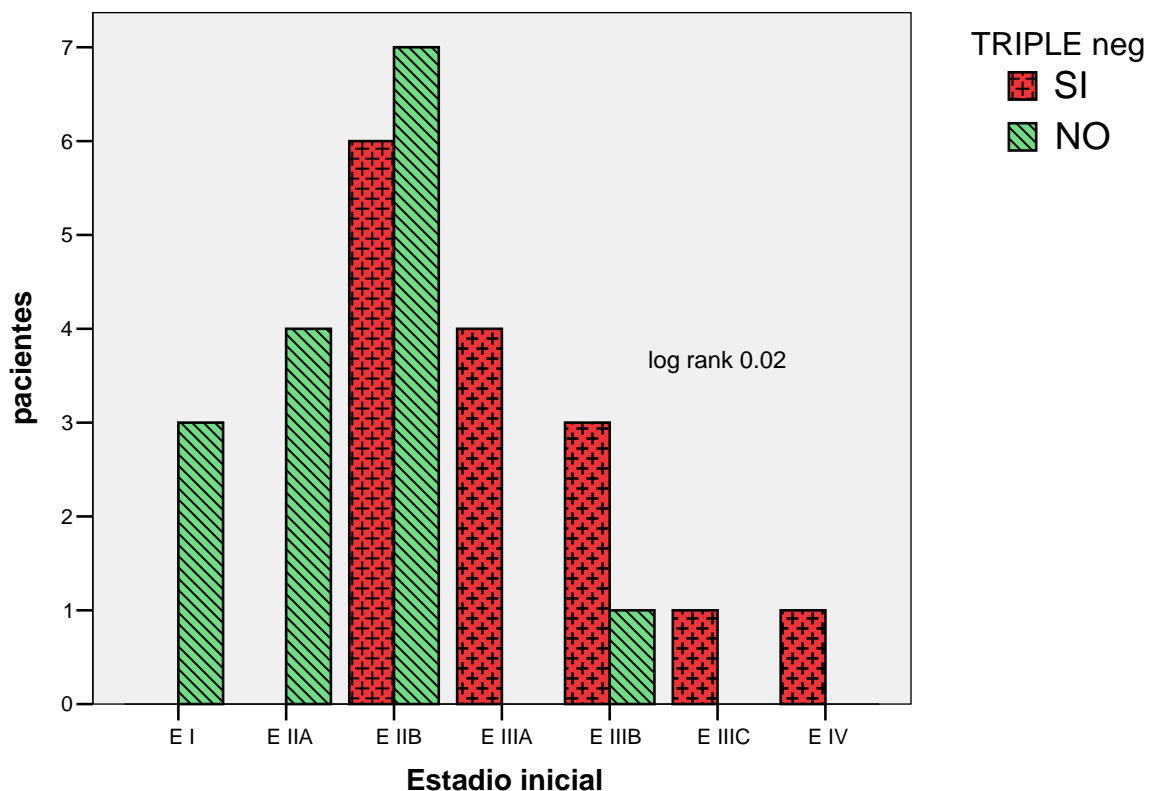


Fig 2 Estadio clínico inicial CMTN vs CMNTN En el grupo de CMTN se encontraron los siguientes estadios clínicos: Estadio IIB 6 (40%), Estadio IIIA 4 (26.7%), Estadio IIIB 3 (20%), Estadio IIIC 1 (6.7%) y Estadio IV 1 (6.7%), en el grupo de CMNTN Estadio I 3(20%), Estadio IIA 4 (26.7%), Estadio IIB 7 (46.7%) y Estadio IIIB 1 (6.7%). Las diferencias fueron estadísticamente significativas (p=0.02)

CMTN Y CMNTN SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECURRENCIA.

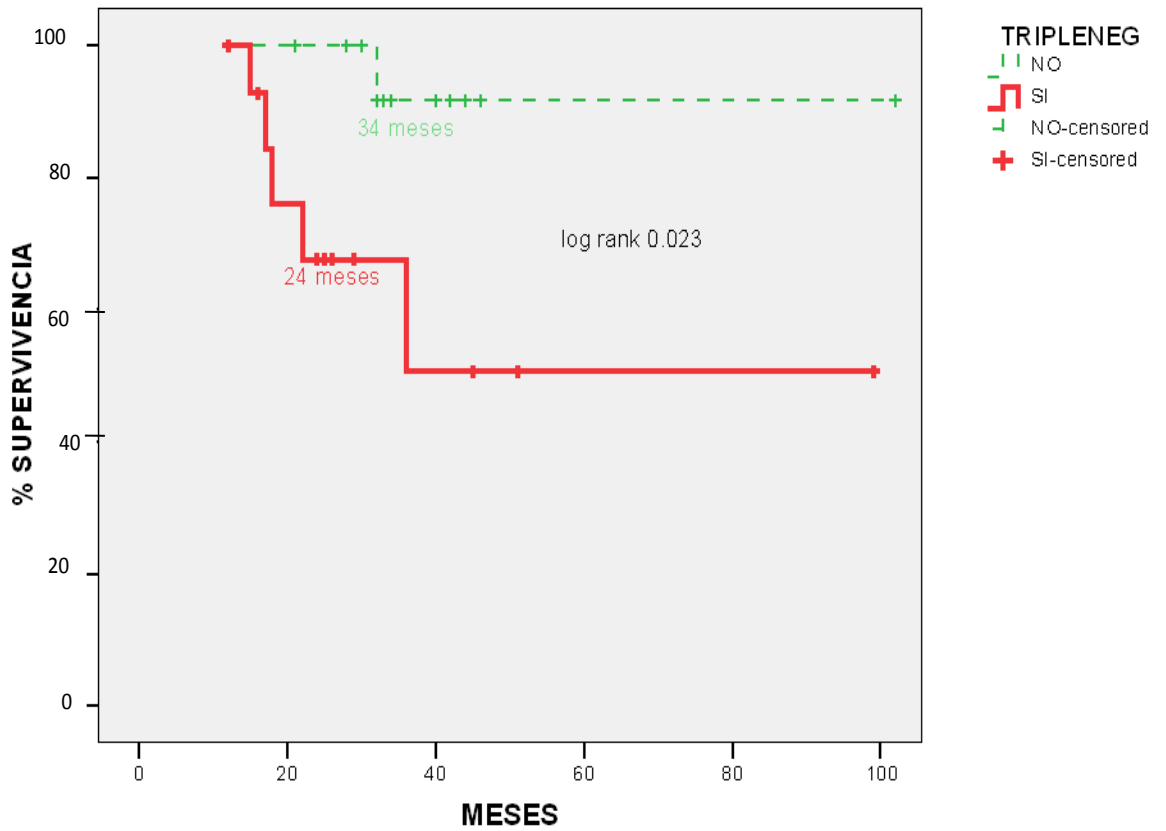


FIG 3. Supervivencia libre de recurrencia, se observa en el grupo CMTN una menor SLR con una mediana de 24 meses y en el grupo CMNTN una SLR con una mediana de 34 meses ($p=0.023$)

CMTN Y CMNTN SUPERVIVENCIA GLOBAL

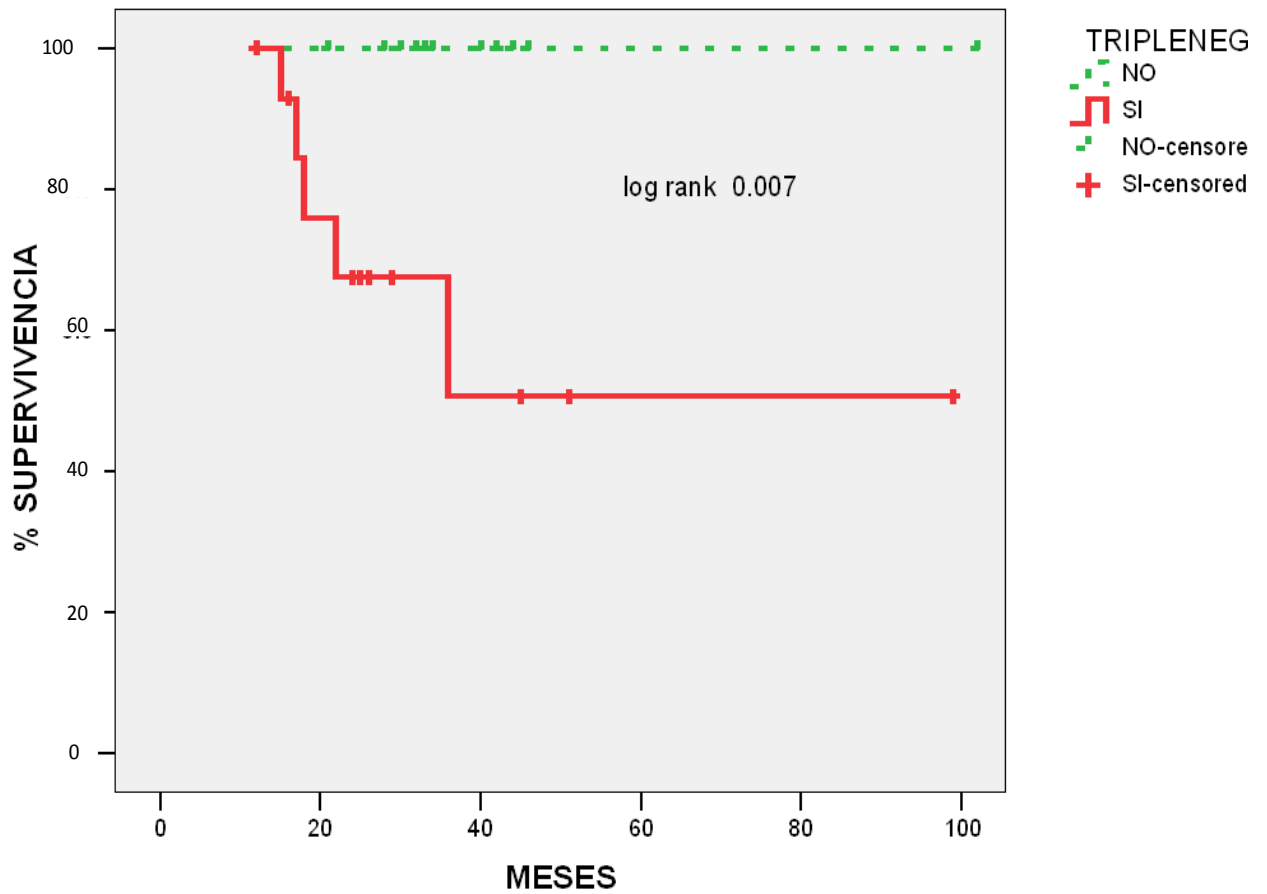


FIG 4. Supervivencia global. Se observa en el grupo de CMTN una menor supervivencia global con una mediana de 25 meses y en el grupo de CMNTN un SG con una mediana de 39 meses ($p=0.007$).

CMTN CK5 Y CK6 Y RESPUESTA PATOLÓGICA COMPLETA

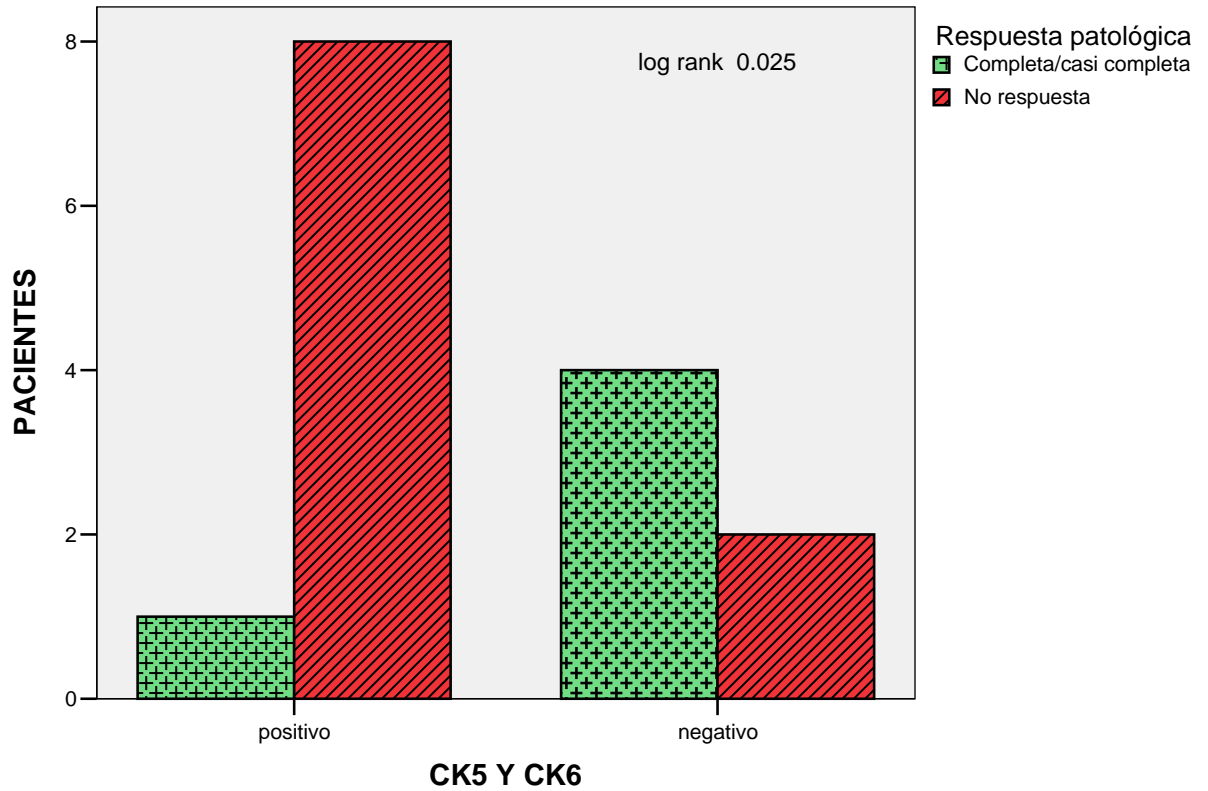


Fig 5 CMTN Negatividad de CK y respuesta patológica. Se observa en el grupo de CMTN que la ausencia de CK5 y 6 predice respuesta patológica completa (p 0.025)

CMTN SLE Y RESPUESTA PATOLÓGICA

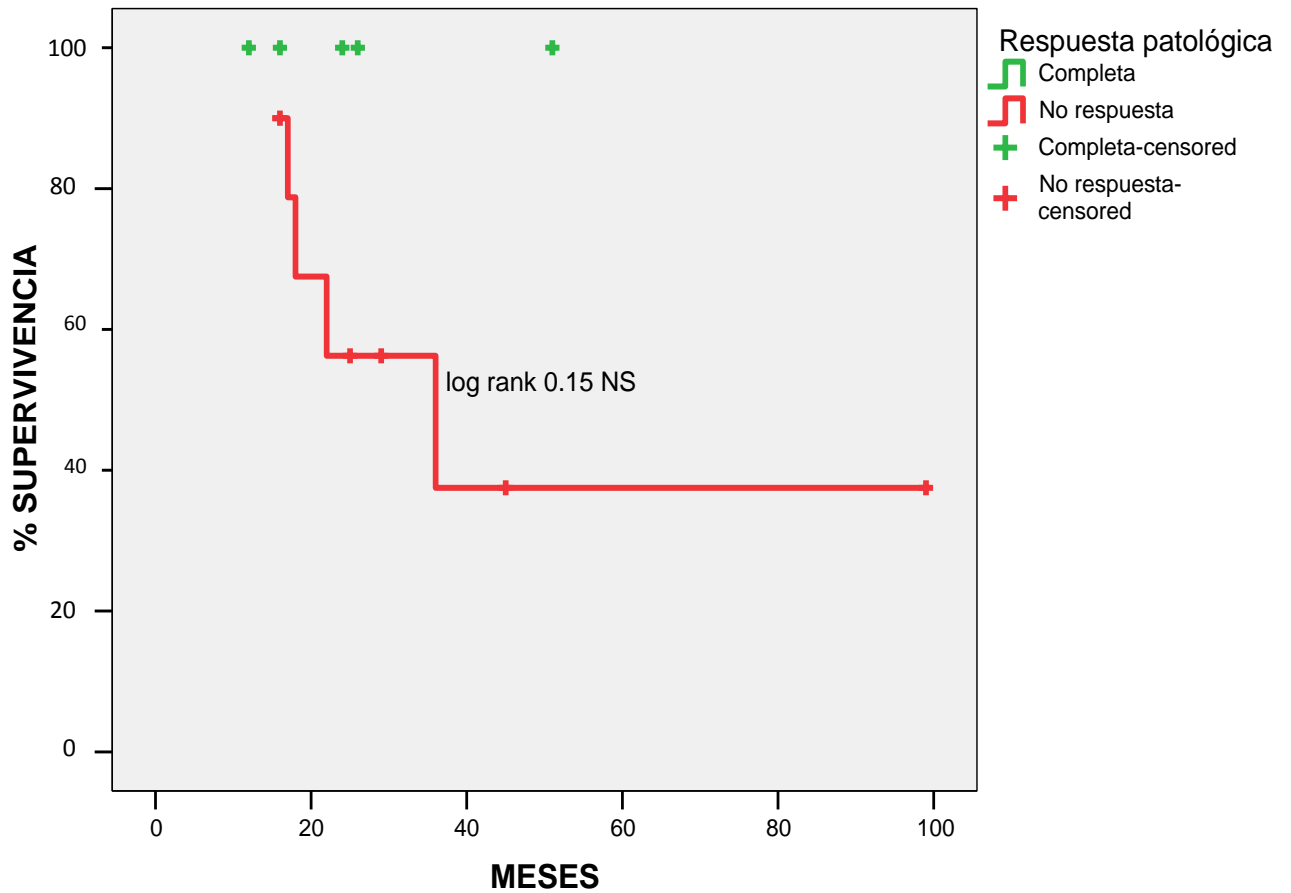


FIG 6 CMTN SLE Y respuesta patológica. Se observa en el grupo de CMTN que todas las pacientes que desarrollaron RPC no presentan recaída de la enfermedad. El número de pacientes no fue suficiente para demostrar diferencias estadísticamente significativas. ($p=0.15$)

CMTN SUPERVIVENCIA GLOBAL Y RESPUESTA PATOLÓGICA

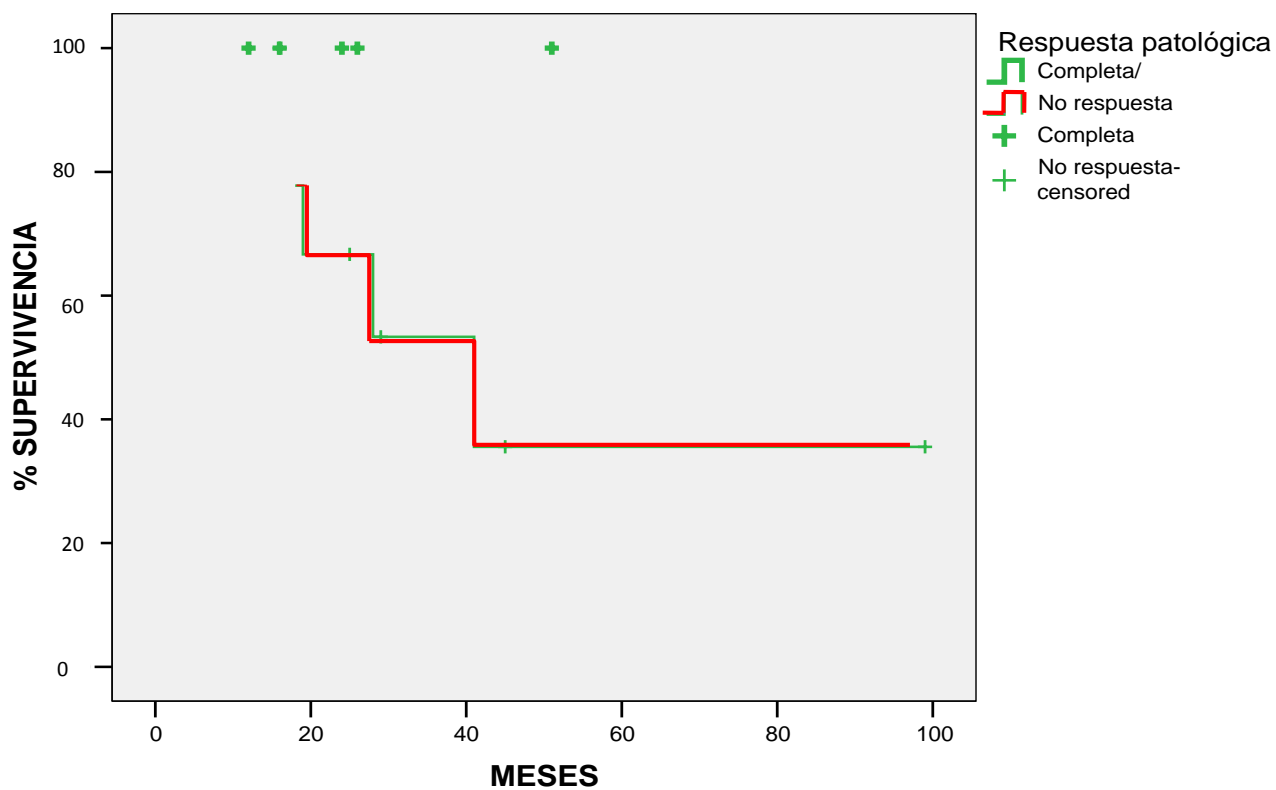


FIG 7 CMTN SG y respuesta patológica. Se observa en el grupo de CMTN que todas las pacientes que desarrollaron RPC continúan vivas . El número de pacientes no fue suficiente para demostrar diferencias estadísticamente significativas. ($p=0.15$)

CMTN Y CMNTN HISTOLOGÍA

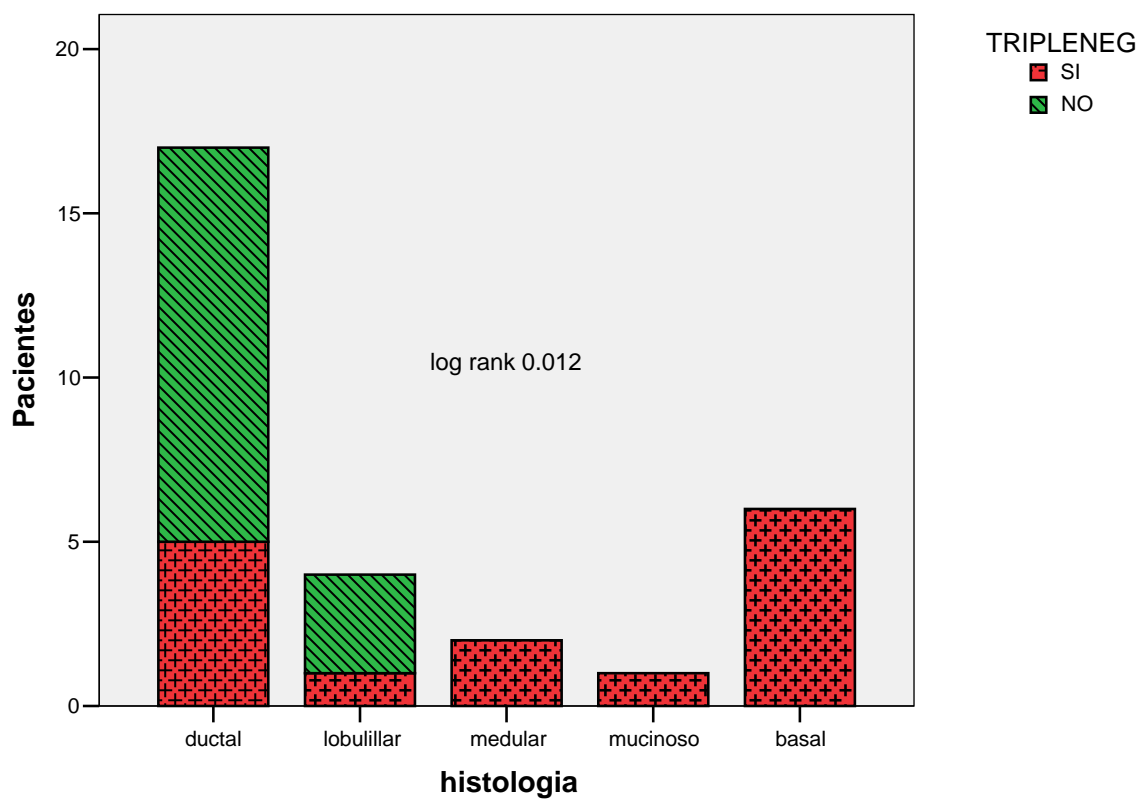


Fig 8 CMTN y CMNTN Histología. Se observa que la variante histológica más frecuente fue la basaloide en el grupo de CMTN y la ductal en el grupo de CMNTN ($p=0.012$)

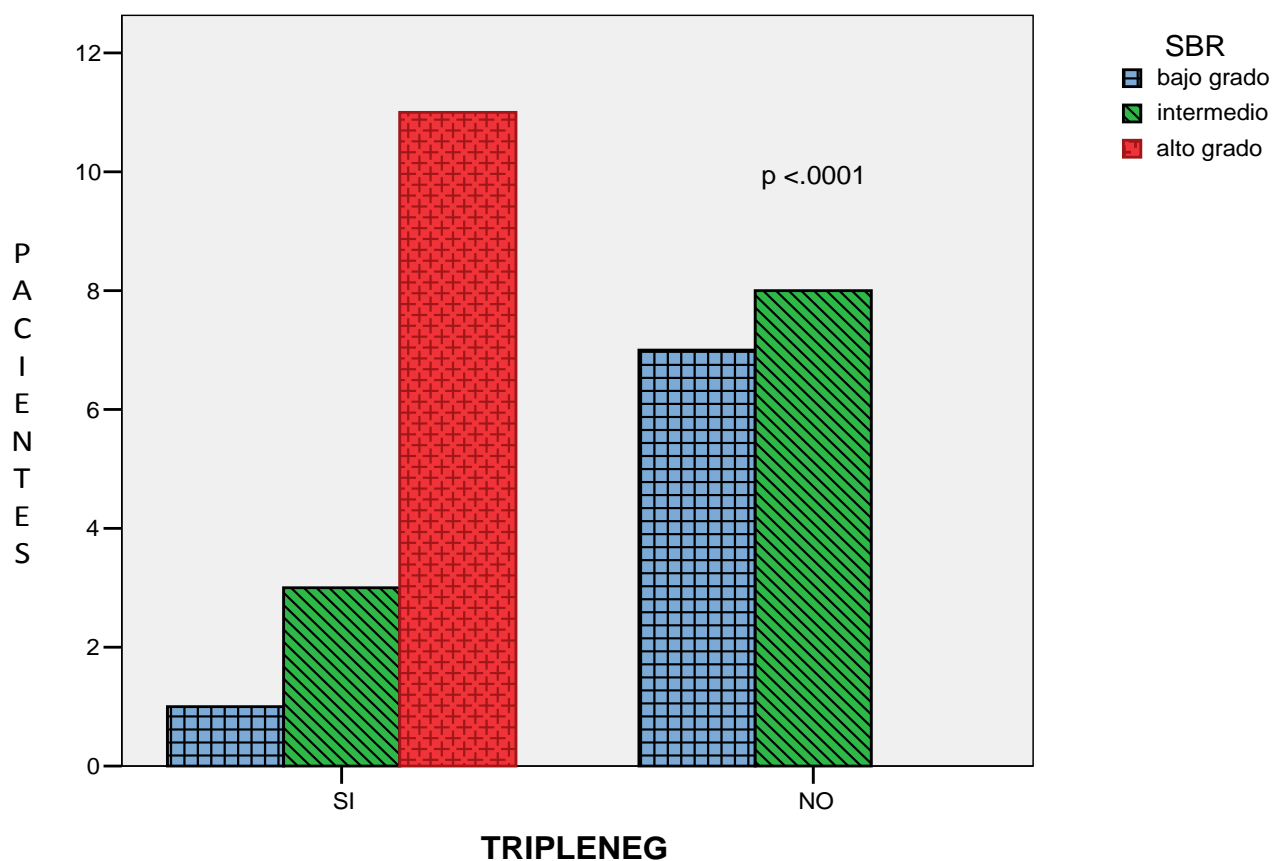


Fig 9 CMTN y CMNTN Scarff-Bloom Richardson. Se observa que en el grupo de CMTN que la gran mayoría presentan SBR grado alto y en el grupo de CMNTN no presentan SBR de grado alto ($p < .0001$)

CMTN Y CMNT PORCENTAJE POSITIVIDAD KI 67

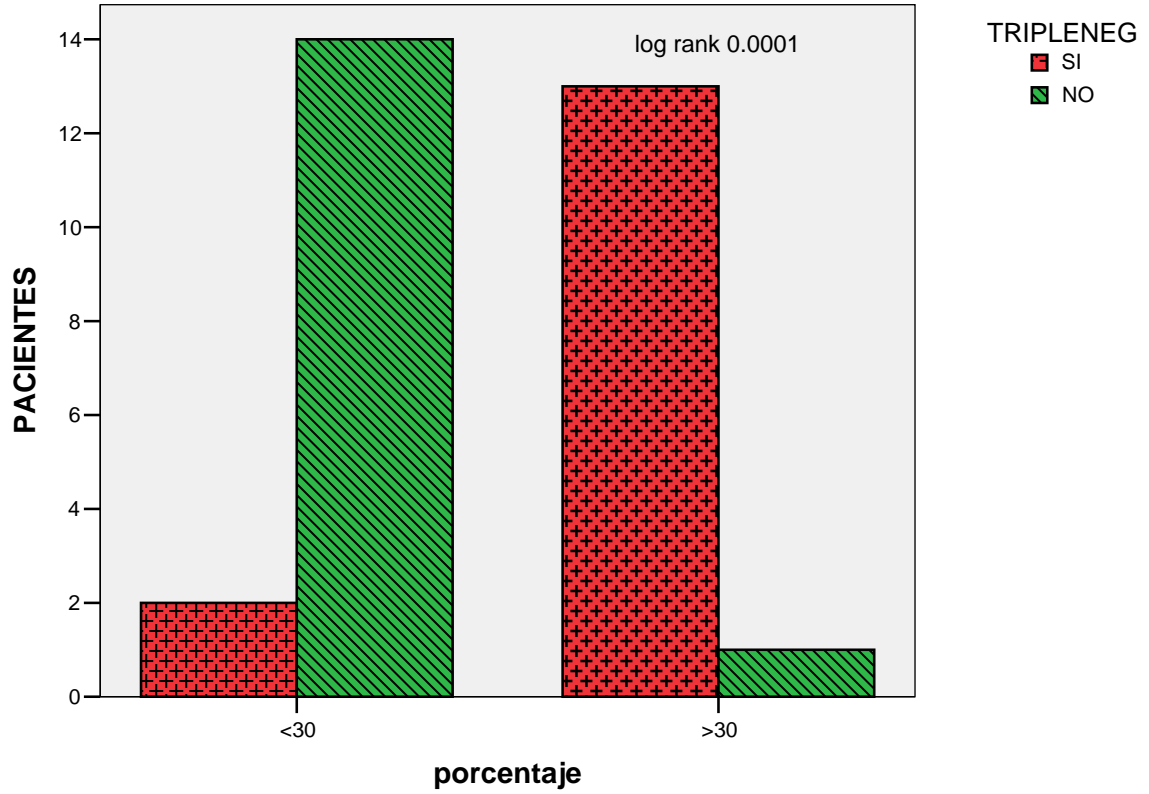


FIG 10 CMTN Y CMNTN % POSITIVIDAD KI 67 PRE NEOADYUVANCIA. Se observa que en el grupo de CMTN el ag de proliferación Ki-67 es más positivo y en mayor porcentaje (>30%) que en el grupo de CMNTN ($p < 0.0001$)

CMTN KI67 POSTQT NEOADYUVANTE Y RESPUESTA PATOLOGICA

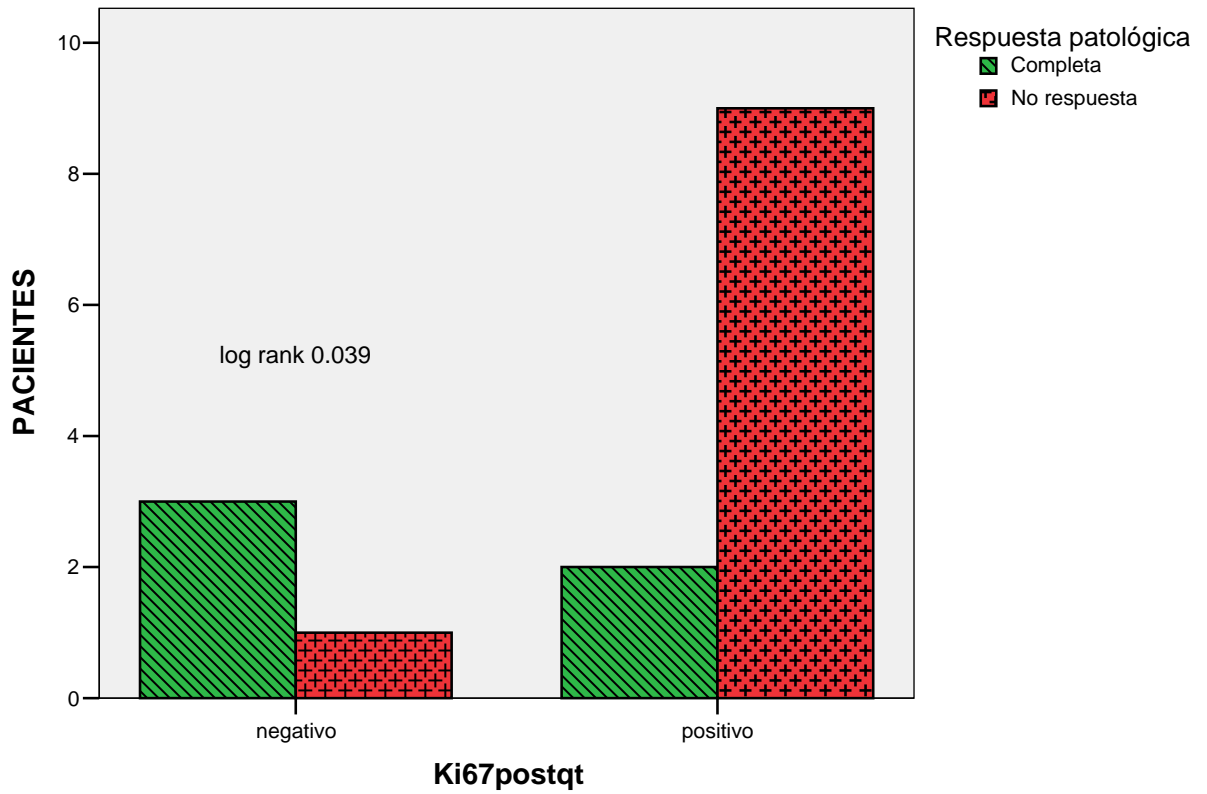


Fig 11. CMTN KIP67 POSTQT NEOADYUVANTE Y RESPUESTA PATOLÓGICA. Se observa que en el grupo de CMTN el ki-67 negativo posterior a la quimioterapia neoadyuvante se relaciona con RPC p (0.039)

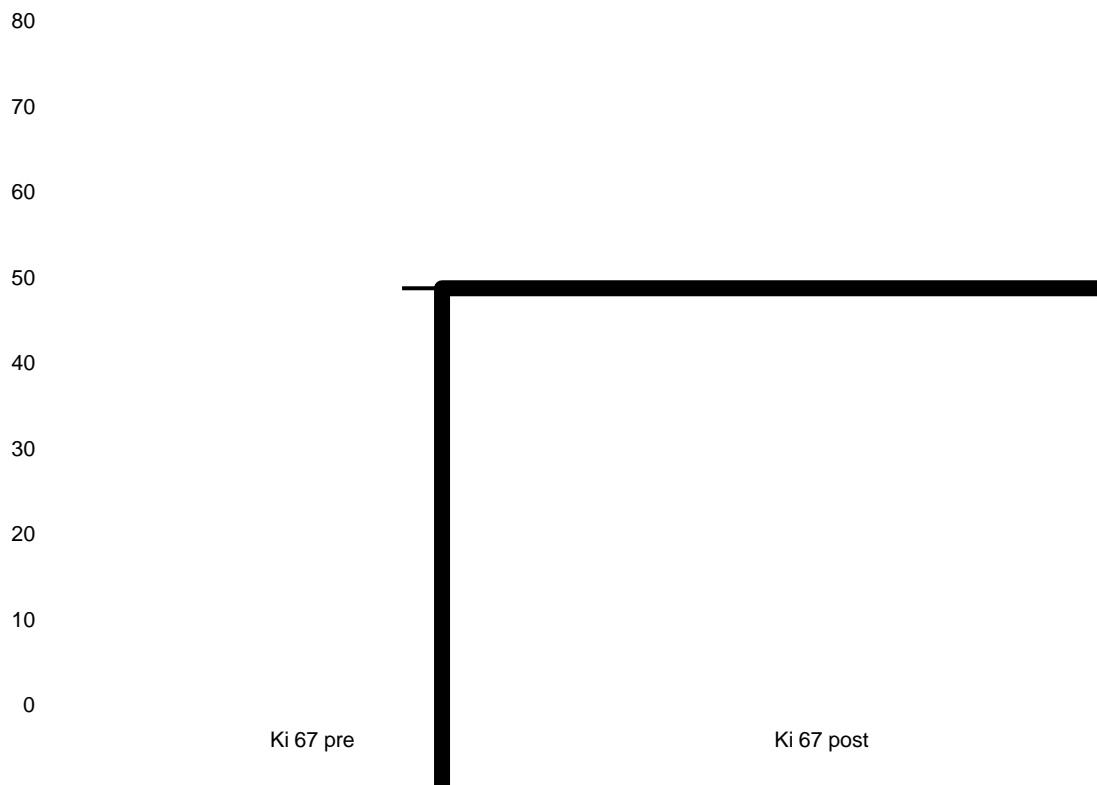


FIG 12. CMTN COMPORTAMIENTO Ki-67 PRE Y POST QT NEOADYUVANTE. Se observa que en el grupo de CMTN la mayor parte de los pacientes presentan negativización y/o descenso en el porcentaje del antígeno de proliferación de Ki-67.

CMTN Y CMNTN POSITIVIDAD PARA P53

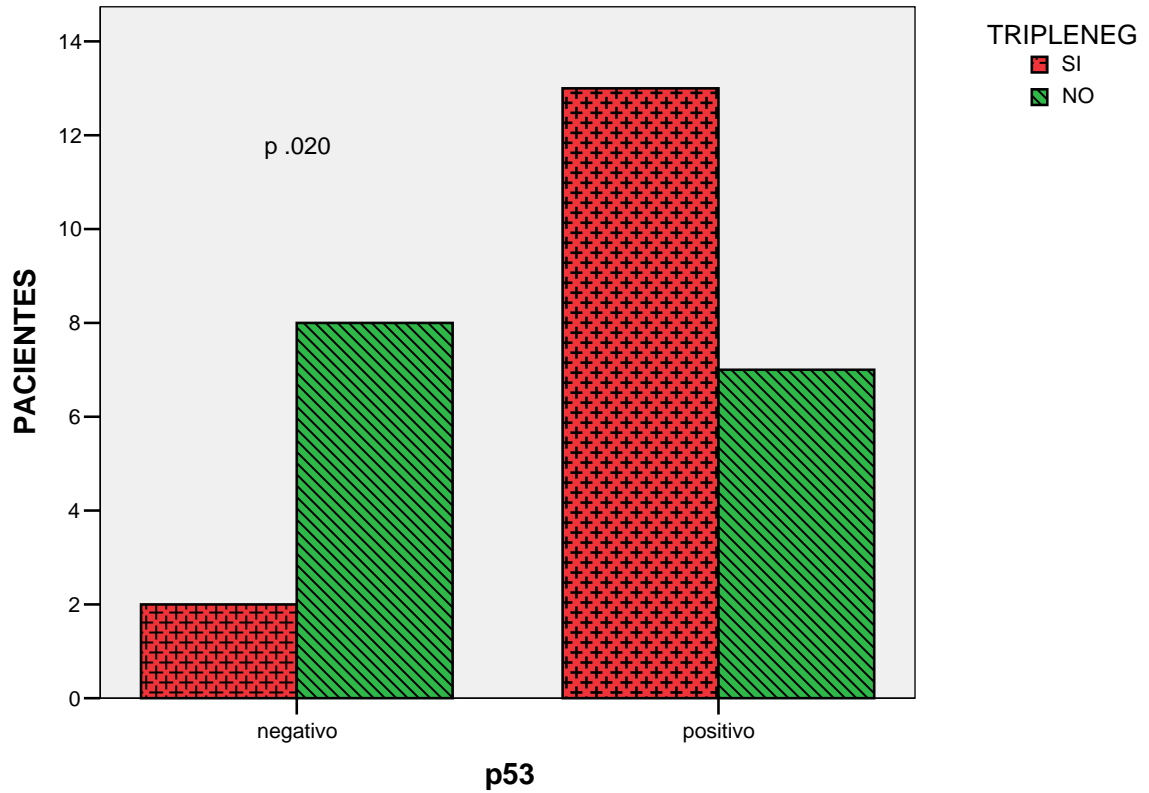


FIG 13 CMTN Y CMNTN POSITIVIDAD P53. Se observa que en el grupo de CMTN se la proteína p53 se encuentra más positiva que en el grupo de CMNTN (P=.020)

CMTN % P53 pre neoadyuvancia y respuesta patológica

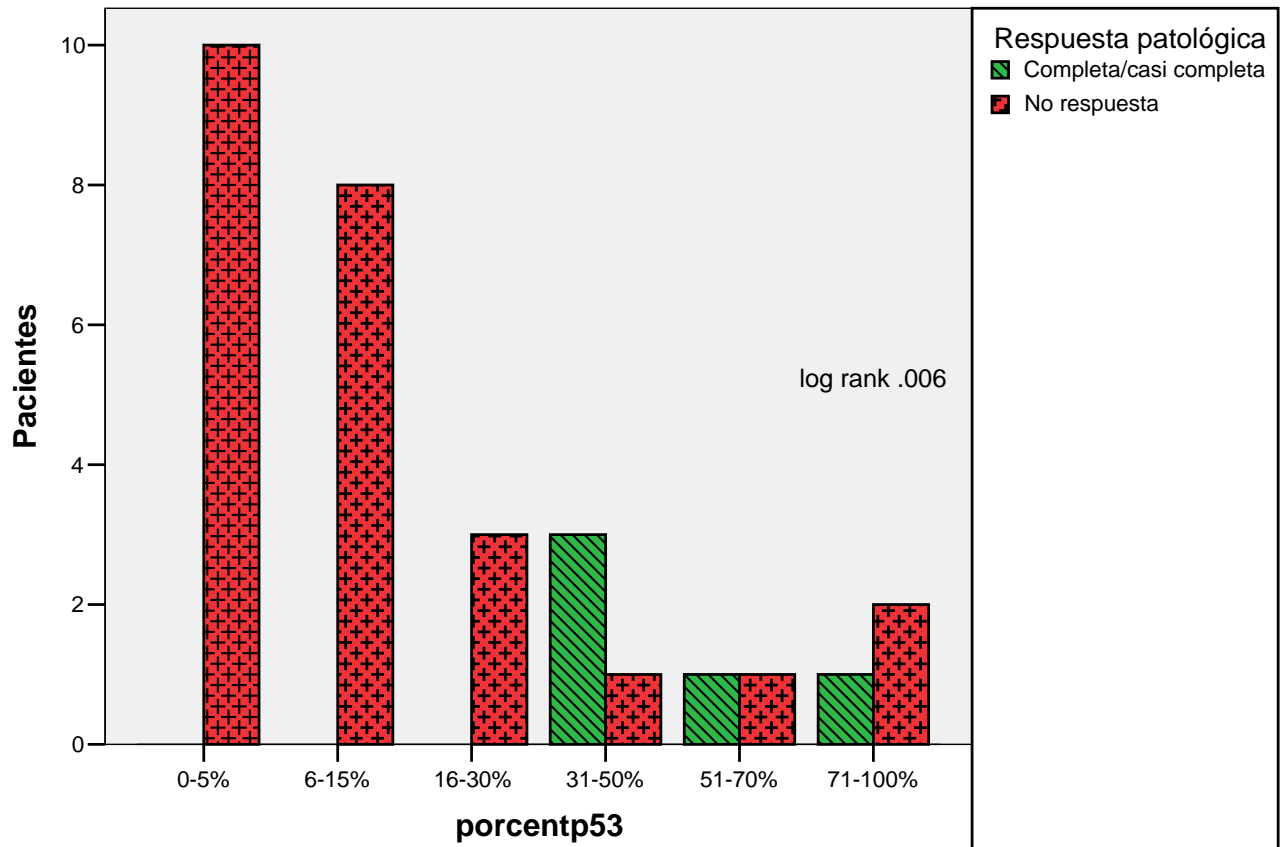


Fig 14 CMTN % P53 pre neoadyuvancia y respuesta patológica. El porcentaje de p53 es mayor en el grupo de CMTN comparado con el grupo de CMNTN ($p=.006$).

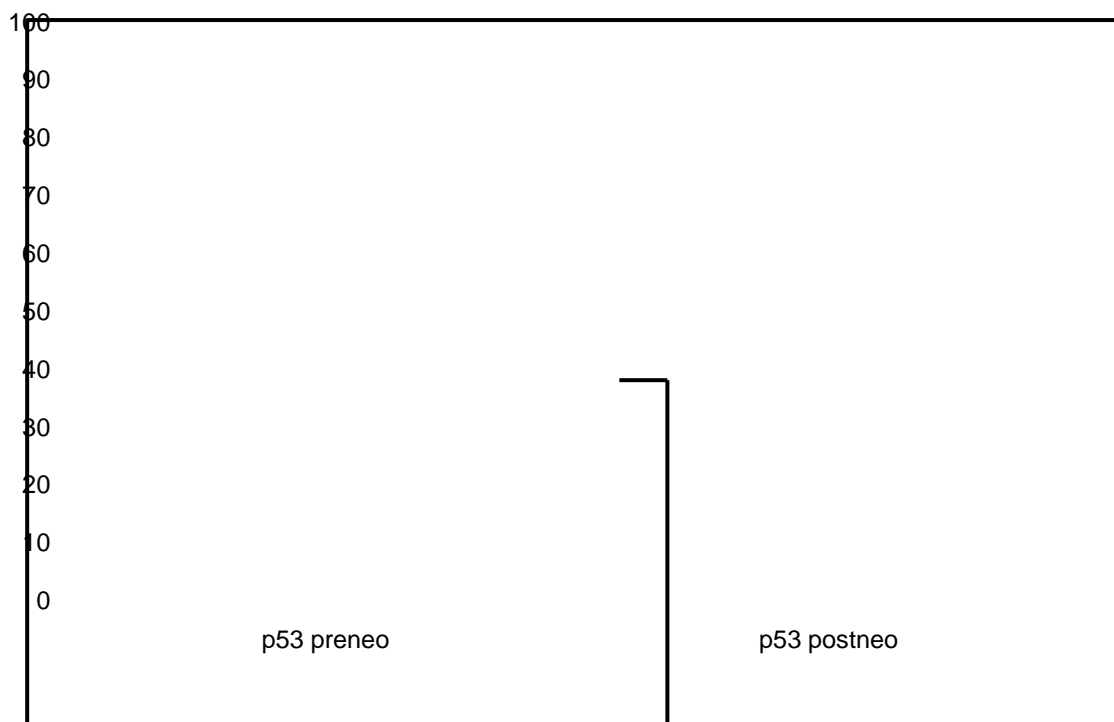


Fig 15 CMTN Comportamiento p53 pre y post qt neoadyuvante. Se observa el comportamiento de p53 en el grupo de CMTN, no se observa un patrón específico de comportamiento.

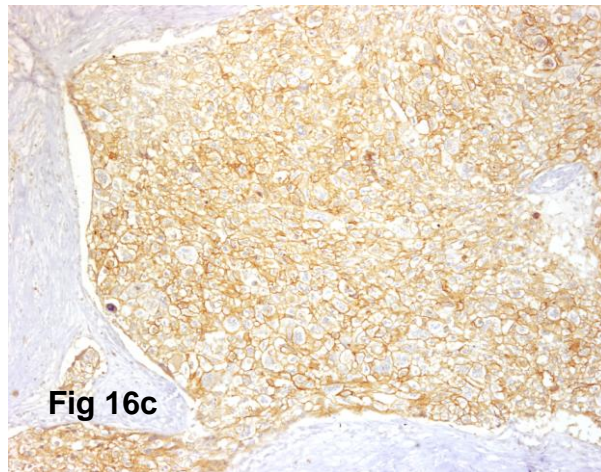
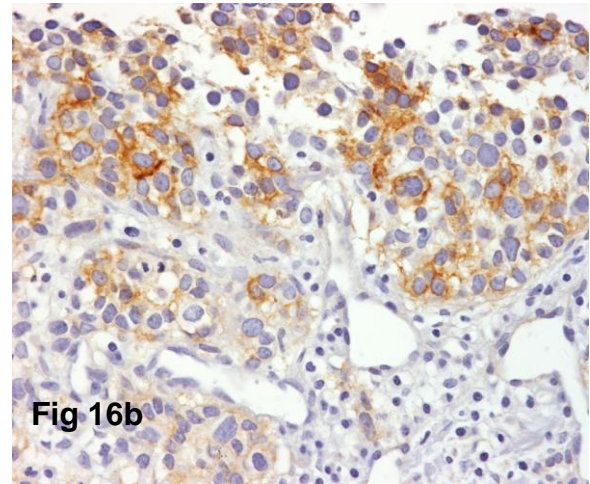
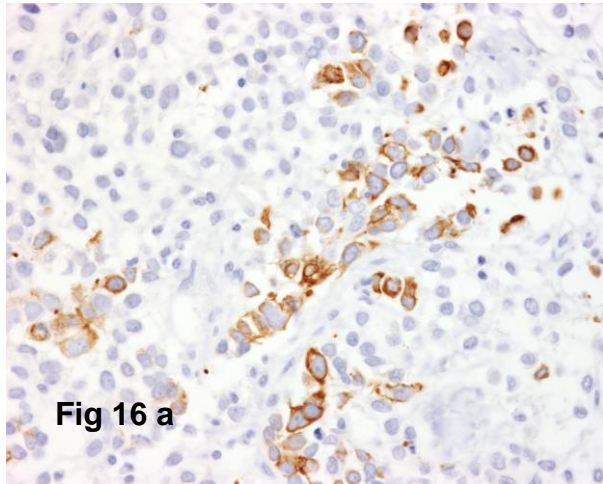


Figura 16. Inmunofenotipo de tres casos diferentes con reactividad citoplasmática para citoqueratina 5/6 que se observa de color café ocre (a). La reactividad para EGF-R muestra reforzamiento en las membranas citoplasmáticas (b). La tinción para c-kit demostró extensa marca citoplasmáticas con reforzamiento en membrana celulares (c).

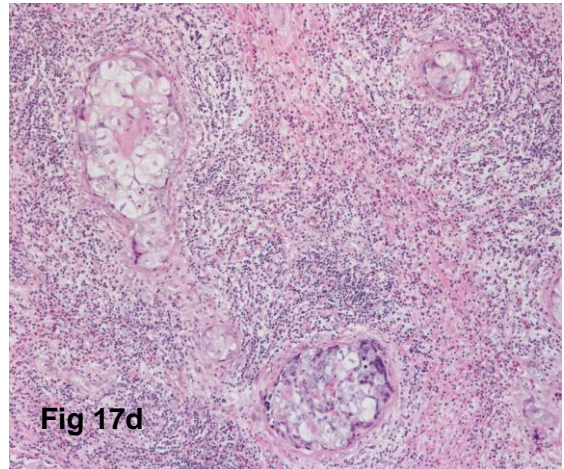
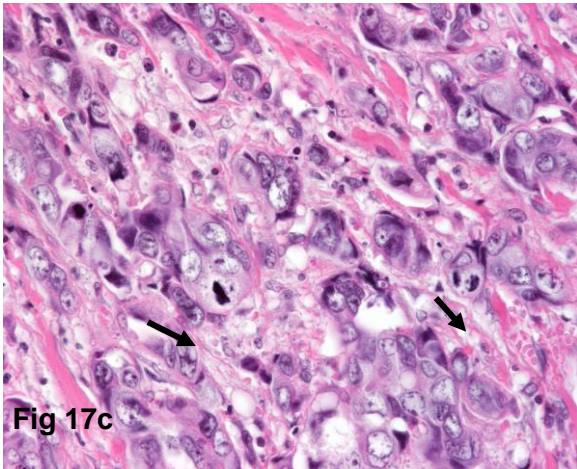
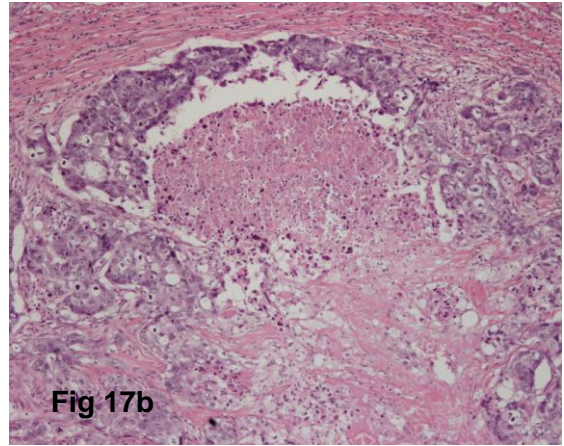
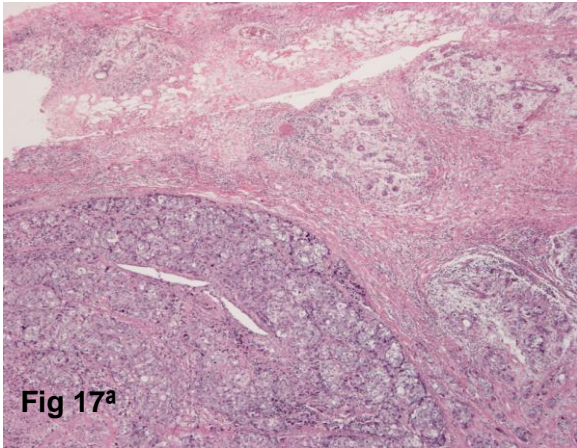


Figura 17. Carcinoma infiltrante con fenotipo basal. La imagen panorámica muestra bordes desplazantes de la neoplasia sobre el tejido mamario residual **Fig a.**, zonas de necrosis tumoral central eosinófila **Fig b.**, con mitosis frecuentes y anormales **Fig c.** En la periferia de la neoplasia, se identifica infiltrado inflamatorio crónico de densidad variable **Fig d.**

XI BIBLIOGRAFIA

- ¹ Cleator Susan, Wolfgang Heller, R Charles Coombes. Triple negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 235 -44.
- ² American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2008. www.cancer.org
- ³ Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752
- ⁴ J S Reis Filho y A N J Tutt. Triple negative tumours: a critical reviews. *Histopatology* 2008; 52, 108-118
- ⁵ Sorlie T, Tibshirani R, Parker J. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 8418-8423
- ⁶ Van de Rijn M et al *Am J Pathol.* Expresión of citokeratins 17 a 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. 2002; 161: 1991-1996
- ⁷ Abd EI-Rehim DM et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses *Int J Cancer.* 2005; 116: 340-350
- ⁸ Pinilla SM, Honrado E, Hrdisson D et al. Caveolin-1 expression is associated with basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer . *Breast Cancer Res Treat* 2006 99; 85-90
- ⁹ Moyano JV, Evans JR, Che F et al. Alpha B-crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *J Clin Invest.* 2006; 116:261-270
- ¹⁰ Kreike Bas, Marieke Van Kouwenhove, Horling Hugo. Gene expression profiling and histopathological charactrization of triple negative-basal like breat carcinomas. *Breast Cancer Research.* 2007; 9, 5: 1-14
- ¹¹ Bidard FC, Conforti R, Boulet T et al. Does triple negative phenotype accurately identify basal-like tumor ? An immunohistochemical analysis based on 143 "triple negative" breast cancer. *Ann Oncol.* 2007; 18:1285-1286
- ¹² Troxel D. Diagnostic errors in surgical pathology uncovered by review of malpractice claims: Part III. Breast biopsies. *Int J Surg Pathology*, 2000;8, 335-337
- ¹³ Mitsunori Sasa, Yoshimi Bando, Msalo Takahasi et al. Screening for basal marker expresión is necessary for decision of therapeutic strategy for triple negative breast cancer. *Journal of Surgical Oncology.* 2008; 97: 30-34

-
- ¹⁴ Bergamaschi A, Kim YH, Wang P. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 1033-1040
- ¹⁵ Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006; 49: 22-34
- ¹⁶ Foulkes WD, Bruner JS, Stefansson IM et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high, p27 low, p53 +, glomeruloid-microvascular proliferation +) phenotype of BRCA 1-related breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64:830-835
- ¹⁷ Kennedy RD, Quinn JE, Mullan PB et al. The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1659-1668,
- ¹⁸ Turner NC, Reis Filho JS. Basal like breast cancer and the BRCA 1 phenotype. *Oncogene.* 2006; 25:5846-5853
- ¹⁹ Kilburn L S. Triple Negative Breast Cancer: a New Area for Phase III Breast Cancer Clinical Trials. *Clinical Oncology.* 2008; 20: 35-39
- ²⁰ Dent R, Trudeau M, Pitchard KI. Triple Negative breast cancer clinical features and patterns of recurrence. *Clin Canc Res* 2007; 13: 4429-4434
- ²¹ Haffty BG, Yang Q, Reis M et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006 ; 24: 5652-5657
- ²² Rakha EA, El Sabed ME, Green AR. Prognostic markers in triple negative breast cancer. *Cancer* 2007: 109: 25-32
- ²³ Tischlowitz M, Brunet JS , Begin LR et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7: 134
- ²⁴ Fulford LG, Reis-Filho, Ken Ryder et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival *Clin Cancer Res* 2007;9: R4
- ²⁵ Hicks DG, Short Sarah , Prescott Nichole et al. Breast Cancers With Brain Metastases are More Likely to be Estrogen Receptor Negative, Express the Basal Cytokeratin CK5/6, and Overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1097-1104
- ²⁶ Torsten O Nielsen, Forrest D Hsu, Jensen Kristin et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal like subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 2004; 10:5367-5374

-
- ²⁷ Bauer Katrina, Brown Monica, Cress Rosemary. Descriptive Análisis of Estrogen Receptor negative, Progesterone receptor 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, 9: 1721-1728
- ²⁸ Carey Lisa, Perou Charles, Chad A Livasy et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2007; 295,21: 2492-2502.
- ²⁹ Gerson Raquel, Alban Fernando, Villalobos Alberto et al. Recurrencia y supervivencia en cáncer mamario temprano con inmunofenotipo triple negativo. *Gac Méd Méx*. 2008; 144: 27-34
- ³⁰ Zepeda Ernesto, Robles Carlos. Clasificación molecular del cancer de mama por inmunohistoquímica en mujeres mexicanas, nuevos subtipos con relevancia clínica. Tesis de Postgrado UNAM, México 2006
- ³¹ Banerjee S, Reis Filho JS, Ashley S et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. 2006; 59: 729-735
- ³² Eralp Y, Derin L, Ozluk Yet al. MAPK overexpression is associated with anthracycline resistance and increased risk for recurrence in patients with triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*. 2007
- ³³ Tan David, Marchio Catherina , Jones Robin L et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2007
- ³⁴ Rouzier Roman, Perou Charles, Symmans Fraser. Breast Cancer Molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cnver Res*. 2005; 11,16: 5678-5685
- ³⁵ Carey Lisa, Dess Claire, Sawyer Lynda et al. The triple negative paradox : Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 (8) : 2329-2334
- ³⁶ Torrisi Rosalba, Balduzzi Alessandra, Ghisini Rafaella et al. Tailored preoperative treatment of locally advanced triple negative (hormone receptor negative and her2neu negative) breast cancer with epirubicin, cisplatin, and infusional fluoracil followed by weekly paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007
- ³⁷ Bhumsuk Keam, Seocl-Ah Im, Hee Jun Kim et al. Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007; 7, 203-214

-
- ³⁸ Rodenhuis S, Bontenbal M, van Hoesel et al. Efficacy of high dose alkylating chemotherapy in Her2/neu breast cancer. *Ann Oncol* 2006;17: 588-596
- ³⁹ Nitz UA, Gluz O, Herr A et al. Retrospective analysis of WSG AMO1 tandem high dose chemotherapy trial in high risk primary breast cancer: A hypothesis generating study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2006; 24:665 (Abstr)
- ⁴⁰ Liedtke Cornelia, Chafika Mazouni, Hess Kenneth et al. Response to neoadjuvant therapy and long term survival in patients with triple negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26, 8: 1-9
- ⁴¹ Soonmo Meter Kang, Maritza Martel y Lyndsay N Harris. Triple negative breast cancer: current undetanding of biology and treatments options. *Curr Opin Gynecol*.2008; 20: 40-46
- ⁴² Veronesse SM, Gambacorta M, Gottardi O et al. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer*. 1993; 71:3926-3931
- ⁴³ Bottini A, Berruti A, Bersiga A et al. Relationship between tumor shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1106-1112
- ⁴⁴ Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7212-7220.
- ⁴⁵ Dowsset M, Smith IE, Ebbs SR et al. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 1024s-1030s.
- ⁴⁶ Burcombe Rusell, Wilson George, Dowsett Mitch. Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Research* 2006;8(3)
- ⁴⁷ E de Azambuja, F Cardoso, G de Castro et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British Journal of Cancer* 2007,96: 1504-1513
- ⁴⁸ Vousden KH, Lu X,et al Live o death: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594-604
- ⁴⁹ Sorlie T, Perou CM, Tibshinari R et al. Gene expresión patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 10869-10874
- ⁵⁰ Bidard FC, Matthieu MC, Mollet P et al. P53 status and efficacy of primary anthracyclines- alkylating agent based regimen according to breast cancer molecular classes. *Annals of Oncology* 2008; 10: 1093

⁵¹ Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res. 2004; 10:5367-5374

⁵² Siziopikou KP, Ariga R, Prousaloglou et al. The challenging estrogen receptor negative, progesterone receptor negative, her2 negative patient: a promising candidate for epidermal growth factor receptor targeted therapy. Br J Cancer. 2006;12:360-2