



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO
HOSPITAL REGIONAL
“LIC. ADOLFO LOPEZ MATEOS”**

**Estudio inmunohistoquímico en carcinoma de mama de tipo basaloide como
grupo epidemiológico de mal pronóstico.**

**Estudio realizado en pacientes del hospital Regional Licenciado Adolfo López
Mateos**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

DRA. MERCEDES ANDREA DE LA CRUZ JASSO

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD:

ANATOMÍA PATOLÓGICA

ASESOR DE TESIS:

DR. FERNANDO E. DE LA TORRE RENDÓN

NO. DE REGISTRO

188.2012



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Dr. Félix Octavio Martínez Alcalá
Coordinador de Capacitación, Desarrollo e
Investigación

Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano
Jefe de Investigación

Dr. Guilebaldo Patiño Carranza
Jefe de Enseñanza

Dr. Luis Cisneros Sotelo
Jefe de Servicio de Anatomía Patológica

Dr. Fernando E. de la Torre Rendón
Jefe de Patología Quirúrgica
Asesor de tesis

Dra. Esperanza Tamariz Herrera
Jefa de Citopatología
Asesora de tesis

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo constante, comprensión y amor que me han dado a lo largo de mi vida.

A mis maestros de los que aprendí no solo aquello me serviría de base para el futuro, sino por enseñarme como trazar el camino de mi vida.

A mi tutor y asesora de tesis por apoyarme en este trabajo.

A todos mis maestros de la especialidad que tuvieron la paciencia y compromiso de formar un especialista más en esta interesante e importante rama de la medicina.

A los histotecnólogos y secretarias, ya que sin ellos la realización de este trabajo y el trabajo en general, no sería posible.

A mis compañeros de esta especialidad, quienes compartieron conmigo alegrías, tristezas, conocimientos pero sobre todo su valiosa amistad.

INDICE

Índice.....	5
Resumen.....	6
Abstrac.....	7
Antecedentes.....	8
Planteamiento del problema.....	13
Justificación.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
Material y métodos.....	17
Resultados.....	20
Discusión.....	24
Conclusiones.....	27
Referencias bibliográficas.....	28
Anexos.....	31

RESUMEN

El cáncer de mama es el más frecuente en la mujer a nivel mundial, aunque es más frecuente en los países desarrollados, las mayores tasas de crecimiento se observan en los países en desarrollo. En México para el año 2006 el cáncer de mama se había convertido en la segunda causa de muerte. El cáncer de mama triple negativo describe un grupo de tumores que carecen de expresión de ER, PR y Her2-neu.

El cáncer de mama tipo basaloide se caracteriza por la falta de expresión de ER,PR y Her2-neu y expresión de citoqueratinas basales (CK5/6 CK14,CK17, vim, p-cadherina, EGFR y un alto índice de proliferación) estos tumores representan 15 a 20% de todos los canceres de mama.

Los riesgos de muerte y recurrencia a distancia son mayores entre mujeres con cánceres de mama triple negativo que en el carcinoma de mama ductal, presentan recurrencia durante los tres primeros años y declinan rápidamente después, en cambio, los cánceres de mama no triple negativo tienen una tasa de recurrencia consistente durante todo el periodo de seguimiento. Además, los carcinomas basaloides tienen mayor incidencia de metástasis viscerales y tejidos blandos que óseas, alta tasa de metástasis a cerebro y a pulmón, alta tasa de recurrencia local y una edad menor. La correlación entre el tamaño del tumor y el número de ganglios positivos es menor comparado con los que no expresan CK5/6, lo que sugiere que los tumores basaloides pueden poseer un mecanismo diferente de diseminación metastásica.

El propósito de este estudio es investigar la frecuencia de carcinoma de mama basaloide, basado en la expresión de CK5/6 y EGFR. Se seleccionaron 61 casos, de los cuales se eliminaron 30 por no contarse con el material. De estos casos 20 fueron positivos para CK5/6, 1 positivo a EGFR y 1 caso positivo a ambos marcadores. Las edades oscilaban entre los 28 y los 81 años con edad promedio de 52.2 años.

En conclusión la citoqueratina CK5/6 resulta útil en la diferenciación del carcinoma de mama tipo basaloide, sin embargo el EGFR no representó lo expresado en la literatura; aunque no todos los triple negativo son basaloides ni todos los basaloides son triple negativo.

Este estudio deberá ampliarse utilizando más marcadores de inmunohistoquímica como CK14, CK7 o p53

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide mainly in developed countries, however the highest rates of growth are seen in developing countries. In Mexico breast cancer became the second leading cause of death for 2006. The triple-negative breast cancer describes a group of tumors that lack expression of ER, PR and Her2-neu. Breast cancer basaloid type is characterized by the lack of expression of ER, PR and Her2-neu and expression of basal cytokeratins (CK5 / 6 CK14, CK17), vimentin, e-cadherin and EGFR and a high proliferation index. In different series these tumors represent 15-20% of all breast carcinomas. The risk of distant recurrence and death are highest among women with triple-negative breast cancers, with recurrence during the first three years and then decline rapidly. However, no triple negative breast cancers have a recurrence rate consistent throughout the monitoring period. Furthermore, basaloid carcinomas have a higher incidence of visceral metastases and bone soft tissues, high rate of lung and brain metastases, high local recurrence rate and a lower age. The correlation between tumor size and number of positive nodes has been compared and is lower compared with those which not express CK5 / 6, suggesting that the basaloid tumor may possess a different mechanism of metastatic spread.

The purpose of this study is to investigate the frequency of breast basaloid carcinoma based on expression of CK5 / 6 and EGFR. From our archives 61 cases were selected, of which 30 were eliminated for several reasons. Of these 20 cases were positive for CK5 / 6, one was positive for EGFR and one case was positive for both markers. The ages ranged from 28 to 81 years with a mean age of 52.2 years.

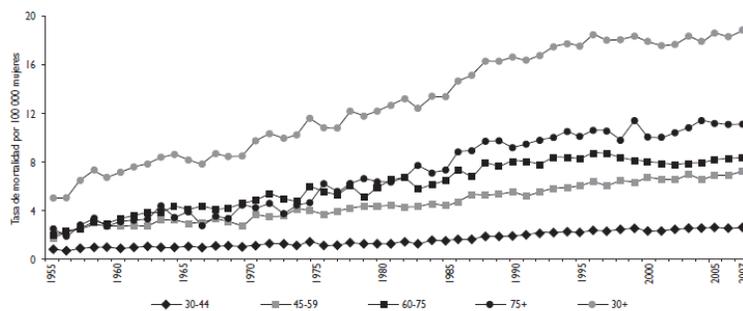
According to the literature and our findings cytokeratin CK5 / 6 is useful in the differentiation of a subgroup of triple negative breast carcinomas akin to basaloid type. In our material the EGFR expression was unusual and different from other reports. This study should be extended using other immunohistochemical markers like CK14, CK7 and p53

ANTECEDENTES

El cáncer es uno de los procesos más complejos de la naturaleza y resulta el más complicado en la esfera de la medicina por la amplia multicausalidad que incide en su origen, la complejidad de sus mecanismos patogénicos, biomoleculares y la variedad de formas y tipos que pueden originarse en los seres vivos.

El cáncer de mama es el más frecuente en la mujer a nivel mundial, su incidencia ha aumentado de 572 100 en 1980 a 1.38 millones de casos nuevos en 2008. Aunque es más frecuente en los países desarrollados, las mayores tasas de crecimiento se observan en los países en desarrollo. Igualmente es el cáncer que mayor número de muertes produce en el sexo femenino a nivel mundial: 268 000 muertes anuales. 12.7% de las muertes por cáncer en mujeres.

En México, para el año 2006, el cáncer de mama se había convertido en la segunda causa de muerte más común en México en las mujeres de 30 a 54 años y la tercera más frecuente en el grupo de 30 a 59 años.



* Tasas ajustadas por edad por 100 000 mujeres presentadas a edad promedio

FIGURA 2. MORTALIDAD POR TUMORES MALIGNOS DE MAMA EN MÉXICO POR GRUPO DE EDAD. 1995-2007^{*,2}

*

La mortalidad por cáncer cervicouterino en las mujeres mexicanas superó la mortalidad por cáncer de mama en el periodo 1955-2005. En 1980 el riesgo de morir por cáncer cervicouterino era dos veces mayor respecto del cáncer de mama en todos los grupos etarios. Para el año 2006, las tendencias se habían cruzado y por primera vez el cáncer de mama superó al cáncer cervicouterino¹.

El cáncer de mama triple negativo es un término usado para describir un grupo de tumores de mama biológicamente diverso que carece de expresión de receptores hormonales (ER, PR) y del oncogen c-erb2 (HER-2) y que tiende a tener un mal pronóstico.^{2,3}

Por medio de análisis de expresión genética se diferenció al cáncer de mama en subclases sólo con base en las diferencias observadas en el perfil genético y se demostró que la expresión de ER y HER-2 representa dos determinantes mayores de subgrupos moleculares del cáncer de mama.⁴

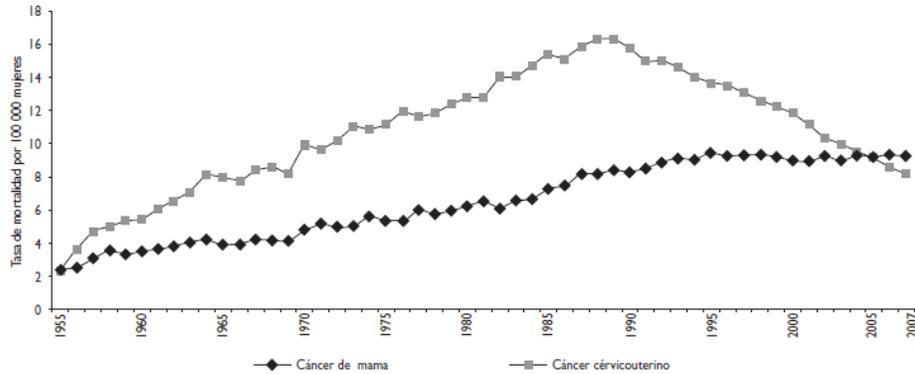


FIGURA 3. MORTALIDAD POR CÁNCER DE MAMA Y CÁNCER CÉRVICOUTERINO, TASA POR 100 000 MUJERES AJUSTADA POR EDAD. MÉXICO, 1955-2007²

*Gráficas de Salud Pública de México. 2009; 51 (S2)

Considerando que los acinos de la unidad conducto lobulillar terminal de la glándula mamaria normal están compuestos de por lo menos tres tipos de células epiteliales: las células luminales, las células basales /mioepiteliales y las células madre,⁵ se inició el establecimiento de un sistema de clasificación de cáncer de mama distinguiendo cinco subgrupos moleculares.² Dos subtipos que son ER positivos: luminal A y luminal B que expresan citoqueratinas (CKs) de bajo peso molecular incluyendo CK7, CK8, CK18, y CK19 e integrina alfa-6 MUC1, BCL2, ER, y moléculas de adhesión de células epiteliales,⁵ y que por tanto, podrían originarse de una célula precursora luminal más diferenciada. Y otros tres subtipos, caracterizados por tener una expresión baja de ER y que denominaron: a) cáncer de mama tipo basaloide caracterizado por la falta de expresión de ER, PR, HER-2⁶ y por la presencia de células mioepiteliales que expresan citoqueratinas basales como CK5/6, CK14, CK17, vimentina, p-caderina, caveolinas 1 y 2, EGFR, y un alto índice de proliferación,⁵ b) cáncer de mama “erbB2-like/HER-2-like” que muestra expresión aumentada de genes asociados con el erbB2 y c) cáncer de mama tipo normal porque comparte características del tejido mamario normal.

El término cáncer de mama basaloide radica en el parecido del patrón de expresión al observado entre las células normales basales/mioepiteliales de la mama por lo que se ha dicho que el cáncer de mama basaloide nace de dicha capa externa. O quizá se originen de células madre precursoras de células mioepiteliales basales.⁷ Esta clasificación es importante por caracteriza molecularmente, sino también porque los subtipos pueden pronosticar el comportamiento clínico de la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total.²

Los cánceres de mama basaloide representan 15 a 20% de todos los cánceres de mama.^{8,9} Se cree que los términos cáncer de mama basaloide y cáncer de mama triple negativo son sinónimos por las similitudes que guardan entre sí, pero no todos los cánceres de mama basaloide son triple negativo, ni tampoco, todos los triple negativo son del subtipo biológico basaloide.^{2,10,11,12,13}, se ha reportado en algunos estudios que 15 a 45% de los tumores de mama basaloide han expresado

ER^{2,14} y 14% expresan HER-2,¹⁵ de 16 a 44% de los cánceres de mama triple negativo son negativos para todos los marcadores basales,^{15,16} así mismo 7.3% de los cánceres de mama triple negativo expresan marcadores basaloide,¹⁷ y 71% de los cánceres de mama triple negativo son positivos para al menos un marcador basal,¹⁸ y la expresión de EGFR puede encontrarse en 57% de los cánceres de mama basaloide pero solo en 8% de los cánceres de mama no basaloide.¹⁹ Si bien se pueden identificar usando la expresión del perfil genético por análisis de datos de microarreglos tisulares y categorizarlos por inmunohistoquímica, no hay un método clínico validado para detectarlo. Lo ideal sería, sin embargo, que se hiciera por microarreglos tisulares un perfil genético, pero es una tecnología no disponible de manera rutinaria, y la definición de los grupos varía de acuerdo con los genes escogidos para definir estos tumores, por lo que se sigue buscando una definición más precisa del cáncer de mama basaloide que sea accesible a la práctica clínica diaria por métodos de inmunohistoquímica de rutina. En un estudio realizado por Nielsen et al.,²¹ en el cual se estudiaron 21 casos de tumores basaloide determinados por su perfil de expresión genética, los describieron como tumores ER y HER-2 negativos, pero positivos para citoqueratinas basales (CK5/6), HER-1 o c-KIT o incluso las tres. El panel de estos tres anticuerpos podrían identificar a los cánceres de mama basaloide con 76% de sensibilidad y 100% de especificidad, en cambio, si sólo se usaba CK5/6 se hubiera perdido la mitad de los tumores basales. En otro estudio realizado en 2009¹⁸, se usaron inmunomarcadores basales. (CK5/6, CK17, CK14 o EGFR) a los cánceres de mama basaloide utilizando microarreglos; se encontró que el 71% de los triple negativo expresó uno o más de los marcadores basales definiéndolos como cánceres de mama basaloide contra el 29% de los casos triple negativo sin marcadores basaloide. Las pacientes con cánceres de mama basaloide desarrollaron más metástasis (37%) que los restantes (26%), con predilección de metástasis a cerebro y a pulmón y menos ganglios afectados.

Los cánceres de mama basaloide tiene características clínicas específicas, tales como, mujeres jóvenes (menores de 40 años), menarquia a menor edad, con más paridad, menor edad de embarazo a término, que amamantaron a menos hijos y por menos tiempo, y con mayor índice de masa corporal y relación cintura-cadera, especialmente entre las pacientes premenopáusicas, comparados con los luminal A.³⁰

Se ha propuesto que mujeres jóvenes con cáncer de mama triple negativo sean consideradas para pruebas genéticas aun en ausencia de antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario ya que tanto las portadoras y no portadoras de mutaciones de BRCA1 son más jóvenes que las diagnosticadas con mutaciones de BRCA2³⁹ Hay mayor incidencia de cáncer de mama triple negativo en mujeres afroamericanas con predominio de premenopáusicas⁹ y entre premenopáusicas de descendencia afroamericana.^{38,40} Lo que no se sabe es si está relacionada con factores genéticos de la línea germinal, con factores ambientales, o con la combinación de ambos.

Además, quienes usan métodos para suprimir la lactancia tienen mayor riesgo de un cáncer de mama basaloide que uno luminal A.⁸

Independientemente de cómo se defina a los cánceres de mama basaloide, la descripción morfológica de este subtipo de cáncer es consistentemente de alto grado, tipo ductal, puede ser metaplásico o medular^{22,23,24,25}, tiene una cuenta mitótica alta, escaso contenido estromal, muestran necrosis central, un borde de invasión agresivo, células apoptóticas y respuesta estromal linfocítica^{22,23,26,27,28,29}

Los cánceres de mama triple negativo se caracterizan por una historia clínica agresiva en diferentes estudios^{21,22,30}, se reportan datos de mal pronóstico clínico, con baja supervivencia, menor a cinco años (77% comparados con 93% de otros tipos de cáncer).³⁰

En los carcinomas que se detectan en etapas avanzadas (estadios III-IV) las posibilidades de que se trate de un triple negativo son 16 veces más en comparación con aquellos detectados en estadios tempranos

Esta variedad de tumores mamarios, se ha caracterizado por anomalías en las copias de genes, lo cual se ha demostrado usando hibridación genómica comparativa, sugiriendo un mayor grado de inestabilidad genética^{9,19}. así mismo presentan un mayor número de polimorfismos en un solo nucleótido que otros subtipos (la expresión de diferentes nucleótidos entre los tejidos normales y tumorales se consideran una pérdida de heterocigocidad, una alta frecuencia de heterocigocidad indica daño e inestabilidad del DNA) se ha mostrado que las tasas más altas de pérdida de heterocigocidad está en los cánceres de mama basaloide

Los cánceres relacionados con mutación del BRCA 1 y los triple negativos comparten algunas características, tales como mal pronóstico independientemente del estado ganglionar, grado nuclear alto, negatividad a ER, alto índice de proliferación nuclear (Ki67) y expresión de CK5/6 y EGFR^{24,30}, por lo que se ha sugerido que tengan vías carcinogénicas o causas similares estos dos subtipos.

El mal pronóstico asociado con el cáncer de mama triple negativo se reconoció uniformemente examinando el resultado por los subtipos intrínsecos, particularmente comparándolos con las clases de buen pronóstico como los luminal A.^{2,20}

Los riesgos de muerte y recurrencia a distancia son mayores entre mujeres con cánceres de mama triple negativo y la forma de desarrollar la recurrencia es diferente.

Los cánceres de mama triple negativo presentan recurrencia durante los tres primeros años y declinan rápidamente después, en cambio, los cánceres de mama no triple negativo tienen una tasa de recurrencia consistente durante todo el periodo de seguimiento. Además, los carcinomas basaloideos tienen mayor incidencia de metástasis viscerales y tejidos blandos que óseas, alta tasa de metástasis a cerebro²⁸ y a pulmón, alta tasa de recurrencia local y una edad menor. La correlación entre el tamaño del tumor y el número de ganglios positivos es menor comparado con los que no expresan CK5/6, lo que sugiere que los tumores basaloideos pueden poseer un mecanismo diferente de diseminación metastásica.

Con respecto al tratamiento, se han investigado aquellos que van dirigidos como el inhibidor del receptor de cinasa; ya que el cáncer de mama triple negativo está fuertemente asociado con la sobreexpresión de EGFR y, aunque el mayor beneficio de altas dosis de quimioterapia se demostró entre ellos, no se vió en un pequeño subgrupo de tumores EGFR positivos, que requieren terapias blanco adicionales. La señalización de EGFR se ha inhibido en otros tipos de cánceres con éxito clínico, igual usando anticuerpos contra EGFR como el cetuximab⁷⁰ o los inhibidores de la fosforilación del receptor, gefitinib y erlotinib. Además, parece que la inhibición de EGFR con quimioterapia tiene una mayor eficacia comparada con quimioterapia o terapia blanco solas, y que hay una radiosensibilidad mejorada con el uso de cetuximab en cáncer de mama basaloide/triple negativo. El receptor de factor de crecimiento c-KIT se expresa en cerca de 30% de los cánceres de mama basaloide.²⁴ El imatinib inhibe c-KIT y tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Los agentes antiangiogénicos proveen un mecanismo apto para mejorar la eficacia en el tratamiento de pacientes con cáncer triple negativo. Se ha encontrado que concentraciones elevadas de factor de crecimiento endotelial vascular en pacientes con cáncer de mama triple negativo con una sobre vida libre de enfermedad más corta en comparación con los que no son triple negativo.²⁹

Por las características clínicas de mal pronóstico de este tumor, es importante clasificarlo con ayuda de la inmunohistoquímica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Identificar el perfil inmunohistoquímico basaloide de los carcinomas de mama Triple Negativo (sin positividad a marcadores hormonales de estrógeno/progesterona y Her-2), como guía a la terapia blanco ya que son frecuentes en mujeres jóvenes y con elevado potencial metastásico.

JUSTIFICACION

Actualmente el cáncer más común en las mujeres es el cáncer de mama y se ha convertido en la primera causa de muerte en México.

Se trata de una enfermedad heterogénea con subgrupos moleculares y genéticos. La inmunohistoquímica ha identificado carcinomas triple negativos, por su falta de expresión de receptores de estrógeno, receptores de progesterona y Her-2/neu; clínicamente son más agresivos y tienen mal pronóstico, también se ha identificado un subgrupo de tipo basaloide (CK5/6) con mutación de EGFR, que puede ser guía para manejo quimioterapéutico blanco.

Cabe destacar que es necesario continuar las investigaciones en este subtipo tumoral para encontrar nuevos marcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos de terapia blanco

HIPOTESIS

Los carcinomas de mama triple negativos (RE/RP/Her-2) son de alto riesgo y mal pronóstico, no son candidatos a terapia blanco anti Her-2 (Traztusumab) ni inhibidores de receptores estrogénicos (Tamoxifen), por lo que la aplicación de reacciones de inmunohistoquímica para citoqueratinas de alto peso (CK5/6) y sobreexpresión de EGFR (receptor a factor de crecimiento epitelial-1), pueden ser útiles para identificar neoplasias de tipo basaloide, así como identificar positividad a EGFR, con posibilidad de terapia blanco, que puede coadyuvar como guía en el manejo de las pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Definir la frecuencia de la expresión de las citoqueratinas de alto peso molecular (CK5/6) y el EGFR para identificar los carcinomas de mama de tipo basaloide en los casos de carcinoma de mama triple negativo

Objetivos específicos:

- 1.- Identificar un perfil inmunohistoquímico basaloide en carcinomas utilizando citoqueratinas de alto peso molecular (CK5/6) así como la sobreexpresión de EGFR en carcinomas triple negativo.
- 2.- Conocer la frecuencia global de carcinoma mamario de tipo basaloide en nuestra población
- 3.- Conocer los grupos etarios de riesgo en la población de mujeres derechohabientes del hospital regional Licenciado Adolfo López Mateos
- 4.- Identificar carcinomas basaloides como guía en el manejo de las mujeres triple negativo.

MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio descriptivo, prospectivo y retrospectivo, en el cual se seleccionaron 61 casos diagnosticados como carcinoma mamario infiltrante, independientemente del grado histológico de Nottingham, pero con ausencia de expresión de receptores de estrógenos, progesterona y Her2/neu, procedentes del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Regional Adolfo López Mateos diagnosticados en el periodo de enero de 2009 a diciembre del 2011. Fueron localizados en la base de datos de estudios de inmunohistoquímica de la Sección de Patología Quirúrgica e Inmunohistoquímica en este período.

Los criterios de inclusión fueron casos diagnosticados como carcinoma de mama infiltrante que tuvieron estudio de inmunohistoquímica negativo para receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y Her2-neu, se consideró criterio de exclusión cuando el tumor tenía positivo los tres marcadores (receptores de estrógenos, progesterona y Her2/neu).

Se utilizó una cédula de recolección de datos en la que se incluyó el número quirúrgico del caso, la edad de la paciente, el grado nuclear de Black Fisher y grado histológico de Scarff-Bloom-Richardson.

La segunda cedula de recolección incluye únicamente los casos que se estudiaron con nuevas reacciones de inmunohistoquímica, el grado nuclear, grado histológico y el resultado de inmunohistoquímica para CK5/6 y EGFR

En este período (enero de 2009 a diciembre de 2011) se identificaron un total de casos de carcinoma mamario estudiados con marcadores de inmunohistoquímica, de éstos 61 casos fueron seleccionados como triple negativo. Se incluyeron aquellos que cumplían los criterios de inclusión y que se contaba con los bloques de parafina; finalmente se realizó el estudio en 31 casos porque se contaba con el material para el estudio.

De los bloques seleccionados se realizaron cortes de 4 µm y se colocaron de 2 a 3 casos por laminilla; se usaron laminillas recubiertas con poli L-lisina para asegurar la óptima adhesión del tejido a la laminilla.

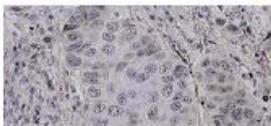
Para la inmunomarcación de las citoqueratinas CK5/6, se utilizó anticuerpos de la clona D5/16B4 marca DAKO con dilución de 1:100 y para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) la clona 3C6 prediluido marca VENTANA; se colocaron las laminillas para su proceso automatizado en el equipo Benchmark Classic de Ventana, ROCHE.

Todas las laminillas se evaluaron mediante observación en el microscopio de luz en base a lo siguiente:

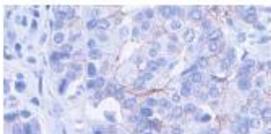
Valoración de la expresión de EGFR

La expresión del EGFR1 a nivel tisular se evaluó similar al HER2, según la intensidad del marcaje y su continuidad en la membrana celular. Se describieron como: 0 la ausencia de marcaje, 1+ coloración débil y discontinua de la membrana, 2+ moderada y 3+ intensa ambos con una

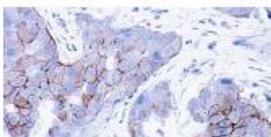
definición completa de la membrana celular. A diferencia del anti-HER2, se consideran positivos todos los niveles de expresión desde 1+ hasta 3+



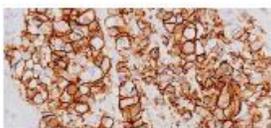
0 No se observa marcaje en la membrana citoplasmática de las células tumorales.



1+ Se observa marcaje débil e interrumpido de la membrana citoplasmática celular, en más del 10% de las células tumorales.



2+ Se observa marcaje débil a moderado y continuo de la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.



3+ Marcaje intenso y continuo de la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.

VALORACION DE LA CITOQUERATINA CK5/6

Se valoró la marcación en el citoplasma de la célula neoplásica y se consideró como positivo cuando por lo menos el 1% de las células tumorales expresaron el anticuerpo.

Una vez recabados los datos de la muestra y con los resultados de inmunohistoquímica de los casos estudiados, se analizaron los siguientes puntos:

Edad de presentación, número de casos, expresión de los marcadores para células basales en células malignas, grado histológico y grado nuclear. Se realizaron gráficas que representan los hallazgos

VALORACION DEL GRADO HISTOLOGICO

Grado histológico para el carcinoma de mama invasivo	
Clasificación de Scarff Bloom Richardson	
Característica	Puntuación
Formación de túbulos	
Mayoría del tumor (>75%)	1
Grado moderado (10-75%)	2
Poco o nada (<10%)	3
<i>Debe estar presente luz clara para puntuación adecuada</i>	
Pleomorfismo nuclear	

Células uniformes, regulares, pequeñas <i>Tamaño normal de células, cromatina uniforme</i>	1	
Incremento moderado en tamaño y variabilidad	2	
Núcleo vesicular abierto con nucléolo visible Variación marcada, especialmente núcleos grandes y bizarros <i>Vesiculosos con nucleólos múltiples o prominentes</i>	3	
Cuenta mitótica con objetivo 40x		
Diámetro del campo 0.44 (área 0.152mm ²)	Diámetro del campo 0.59 (área 0.24mm ²)	Puntuación
0-5 mitosis por 10 CAP	<10 mitosis por 10 CAP	1
6-10 mitosis por 10 CAP	10-20 mitosis por 10 CAP	2
>10 mitosis por 10 CAP	>20 mitosis por 10 CAP	3

VALORACION DEL GRADO NUCLEAR

Criterios citológicos para el Grado nuclear de Black Fisher			
Característica	1 (bien)	2 (moderado)	3 (pobre)
Tamaño nuclear en relación al conducto normal	Similar, agrandamiento mínimo	Dos veces de variación; uniformidad es la regla con variación leve	Tres veces de variación en el diámetro nuclear
Membrana nuclear		Redonda, lisa	Irregular
Cromatina		Uniforme, fina	Hipercromática, gruesa
Nucleólo		Macro ±	Macro ±
Mitosis		Moderadas	Frecuentes

RESULTADOS

De los 61 casos seleccionados, se eliminaron 30 casos por no disponerse de bloques de parafina en el archivo de Patología ya que las pacientes fueron transferidas a otra unidad.

El análisis se realizó en 31 casos de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama infiltrante triple negativo (ER, PR, Her2/neu), esto representó el 50.81% del total de casos seleccionados; las edades oscilan de los 28 a los 81 años con edad promedio de 52.2 años; se dividieron en 3 grupos etarios: a) menores de 40 años, b) de 41 a 60 años y c) mayores de 61 años; el primer grupo de edad estuvo constituido por un total de 5 casos que corresponde al 6.1% del total de los casos de estudio, el segundo grupo fue representado por 15 casos, corresponde al 48.3% y el tercer grupo 11 casos, representó el 35.4%. de un caso se desconoce la edad, ya que no se refirió.

Fueron positivos para cualquiera de los dos marcadores 21 casos que representaron el 67.7% del total; en 10 casos no hubo marcaje para ninguno de los dos anticuerpos (CK5/6 y EGFR), lo que representó un 32.2% del total de casos.

De los 21 casos (67.7%) detectados como probables carcinoma mamario basaloide, la citoqueratina 5/6 resultó positiva en 20 casos (64.51%) mientras que el EGFR solo resultó positivo en 1 caso (3.22%) y solo un caso expreso los dos marcadores (3.22%)

El grado nuclear fue grado 3 en 22 casos (70.96%) y grado 2, 9 casos (29.03%); expresaron CK5/6 positiva 14 casos (45.16%) de los de grado nuclear 3 y de grado 2 solo 6 casos (19.35%) la expresaron.

No se pudo evaluar el grado histológico en todos los casos, porque algunos casos se trataban de biopsias tomadas con aguja de corte, por lo que únicamente se pudo valorar el grado nuclear.

De los que se tiene el grado histológico, 10 casos son grado 3, es decir poco diferenciados y 3 son grado 2, moderadamente diferenciado y el resto de los casos se desconoce.

El caso que resulto positivo para ambos marcadores, tiene un grado nuclear 2 y no se pudo evaluar el grado histológico por lo ya comentado previamente.

El caso positivo para EGFR presento un grado nuclear 3 y citoqueratinas negativas, el grado histológico 3 y el caso positivo para citoqueratinas CK5/6 y EGFR tiene un grado nuclear 3, sin embargo el grado histológico se desconoce por tratarse de una biopsia tomada con aguja de corte.

Tabla 1. Distribución por edades

Grupo de edad	Número
Menores de 40 años	5 (16.1%)
De 41 a 60 años	13(41.9%)
Mayores de 61 años	12(38.7%)
No referido	1 (3.2%)

Grafico 1. Distribución por edades

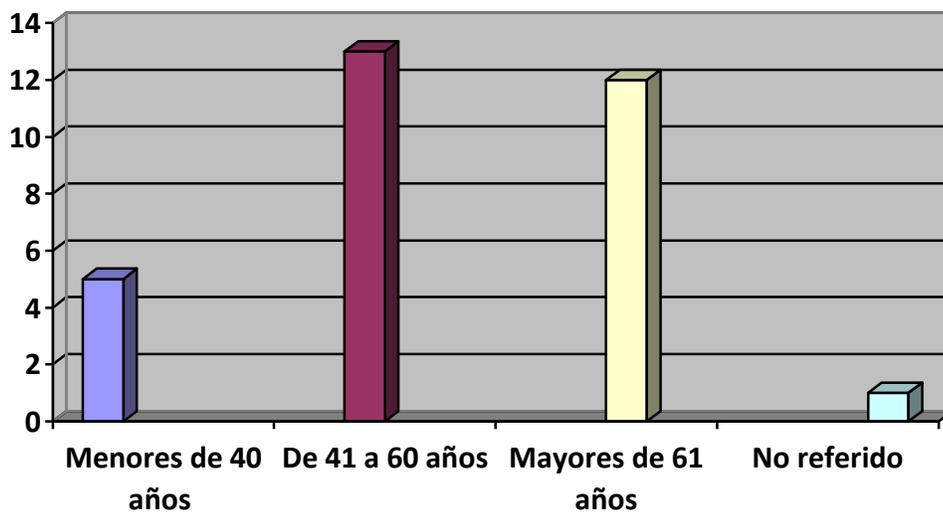


Tabla 2. Edad promedio y media

Número de pacientes	Edad (promedio/media) años
31	52.2/56.6 años

Tabla 3. Casos positivos

Anticuerpo	Número de casos	Porcentaje
CK5/6	20/31	64.5%
EGFR	2/31	6.4%

Tabla 4. Casos positivos por edad.

Rango de edad	CK5/6 (%)	EGFR (%)
Menores de 40 años	3 (9.6%)	0 (0%)
De 41 a 60 años	8 (25.8%)	0 (0%)
Mayores de 61 años	9 (29.0%)	2 (6.4%)

Grafico 2. Casos positivos por edad

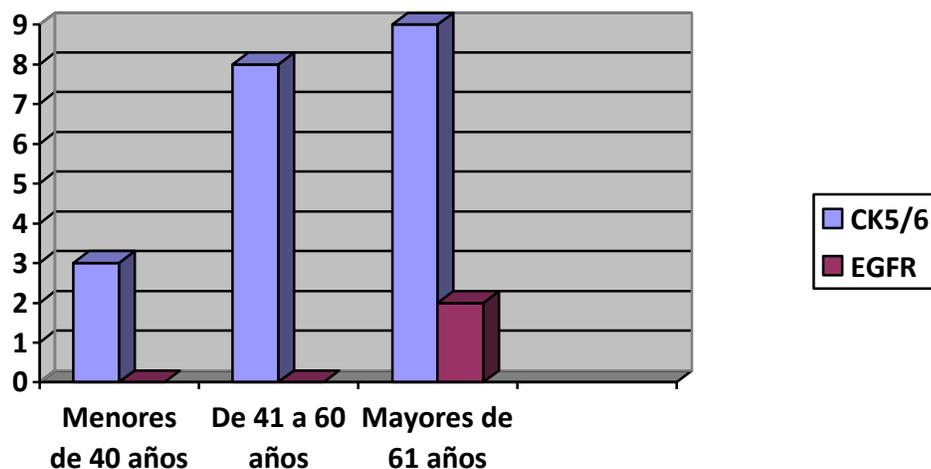


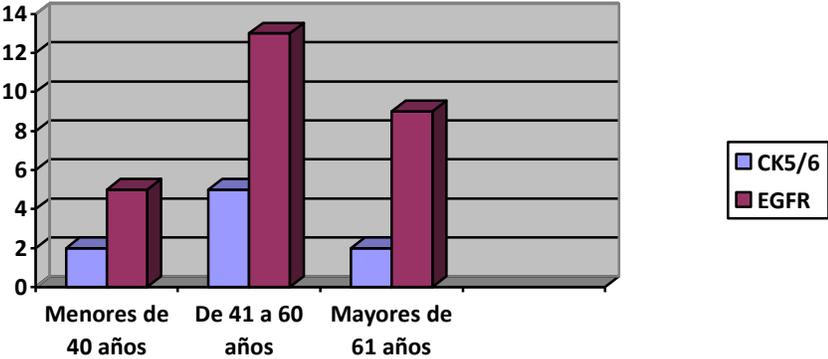
Tabla 5. Grado nuclear de Black-Fisher (BF) y grado histológico Scarff-Bloom-Richardson (SBR) de los casos triple negativo

Rango de edad	Grado nuclear (BF)			Grado histológico(SBR)			
	1	2	3	1	2	3	Desconocido
Menores de 40 años	0	2(40%)	3 (60%)	0	1(20%)	2(40%)	2(40%)
De 41 a 60 años	0	3(23.07%)	10(76.9%)	0	0	7(53.8%)	6(46.1%)
Mayores de 61 años	0	4(33.3%)	7(58.3%)	0	2(16.6%)	5(41.6%)	2(16.6%)

Tabla 6. Casos negativos por edad

Rango de edad	CK5/6 (%)	EGFR (%)
Menores de 40 años	2 (6.4%)	5 (16.1%)
De 41 a 60 años	5 (16.1%)	13 (41.9%)
Mayores de 61 años	3 (9.6%)	10 (32.2%)
Edad no referida	1 (3.2%)	1 (3.2%)

Grafico 3. Casos negativos por edad



DISCUSION

En este estudio se analizaron 31 casos diagnosticados como carcinoma de mama infiltrante y que resultaron negativos a los receptores hormonales y al Her2-neu, por lo que se les da el nombre de triple negativo.

Desde el punto de vista clínico-patológico, el carcinoma mamario con inmunofenotipo semejante al de la célula basal se manifiesta a una edad menor que otros carcinomas de alto grado, como lo demuestra el estudio realizado por Fulford y col²² que indicó una edad promedio de presentación de 49.9 años en comparación con el promedio de 53.9 años del carcinoma ductal grado 3. Esto difiere con lo presentado en nuestro estudio, ya que la edad promedio de este fue de 50.9 años, que son 10 años de diferencia entre lo referido en la literatura y lo encontrado por nosotros.

En este estudio pudimos observar que la CK5/6 se expresó en el 64.51% de los casos, siendo el inmunomarcador que más se expresó en nuestros triple negativos y que es el que más se recomienda en la literatura como marcador de células basales.

Sin embargo con respecto al EGFR solo dos casos lo expresaron, que representa el 7.4% lo cual no va acorde con lo expresado en la literatura, que refieren hasta un 57% de casos expresando este marcador de inmunohistoquímica.

La mayor parte de los carcinomas mamarios con inmunofenotipo semejante al de la célula basal corresponden morfológicamente a carcinomas ductales de alto grado, y muchos de ellos comparten algunas características como: patrón sólido de crecimiento, necrosis extensa de aspecto geográfico, margen de crecimiento expansivo ("pushing") del tumor, intenso pleomorfismo nuclear, elevada proliferación celular (promedio de 45 mitosis en 10 campos de gran aumento)
3,4,22,23

En este estudio, el alto grado nuclear fue una constante que pudo valorarse en todos los casos, (66.6% para un grado 3 y 33.3% para un grado 2) que es lo que se menciona en los estudios como una de las características de estas neoplasias en lo que a su morfología se refiere.

Por lo tanto el carcinoma mamario con inmunofenotipo semejante al de la célula basal consiste de un grupo de carcinomas mamarios que comparten un perfil de expresión génica e inmunohistoquímica y algunas características morfológicas

Si comparamos este estudio con otros, podemos ver que difieren con el nuestro, ya que varios autores recomiendan realizar más de 3 inmunomarcadores de tipo basal para poder dar el diagnóstico de carcinoma de células basales, nuestro estudio se realizó únicamente con dos inmunomarcadores (CK5/6 y EGFR)

Tabla comparativa.

Autor	Año del estudio	Número de casos	CK 5/6 (%)	EFGR (%)	CD117 (%)
Kreike ³²	2007	97	76	27	38
Vicent-Salomon ³³	2007	26	54	38	46
Buys ³⁴	2008	54	90	73.3	45.6
Barroso (20 de noviembre ISSSTE) ³⁵	2008	40	80	17.5	57.5
Hernández (Hospital general Dr. Silva. Michoacán) ³⁶	2010	78	76	-	-
Nuestro estudio	2012	31	64.5	6.44	-

En esta tabla se encuentran algunos trabajos previos los que se ha estudiado el cáncer de mama de tipo basaloide, y lo usaremos para compararlo con nuestro trabajo, podemos ver que el número de casos totales estudiados es semejante al nuestro; únicamente el estudio de Bas Kreike se dispara con un total de 97 casos,

En lo que se refiere a los inmunomarcadores, podemos ver que las citoqueratinas de alto peso molecular el porcentaje de casos positivos es semejante a nuestro estudio, dándole mayor valor a este inmunomarcador en comparación con el resto de los inmunomarcadores. En estudios realizados en nuestro país, donde se valoraron semejantes inmunomarcadores, la positividad a las citoqueratinas (CK5/6) tiene porcentajes similares, existe bastante coincidencia entre el estudio de Buys³⁴ y Barroso³⁵ en comparación con nuestros estudios hay un 25.5% y 15.5% de diferencia respectivamente, sin embargo en un estudio realizado en el 2010 en un hospital de Michoacán (SSA) la diferencia que existe entre ese estudio y el nuestro es del 11%, sin embargo el número de casos de sus estudio es de 78 a diferencia del nuestro que consta solo de 31 casos; sin embargo no se realizó ningún otro marcador para tipificar este tipo de tumores; cabe señalar que

en ese mismo estudio nos mencionan el grado histológico (SBR) el cual correspondió a un 36% en el grado II y 34.6% en el grado III, a diferencia de nuestro estudio, nosotros contamos con pocos datos para obtener esos valores debido al tipo de biopsia tomada, sin embargo de los datos obtenidos 10% de los casos son grado 2 y 45% de los casos son grado 3; el resto de los casos desafortunadamente se desconoce.

El EGFR varía mucho en comparación con el resto de los estudios, ya que en nuestro caso únicamente representa el 6.4% del total de nuestra muestra y en otros estudios como el de Vincent-Solomon³², representa hasta el 73% de positividad en sus casos.

Estos autores realizaron dentro de su panel de inmunomarcación el anticuerpo CD117, que resulto con cifras bastante altas, de hasta un 60%, por lo que para ellos fue un marcador útil, según lo demostrado por estos autores, en nuestro caso desconocemos el porcentaje de positividad porque no fue aplicado regularmente en el estudio.

CONCLUSIONES

El carcinoma mamario basaloide es una entidad diferente dentro de los carcinomas mamarios, la importancia radica en que se trata de una patología altamente agresiva con mal pronóstico.

El objetivo de nuestro estudio era identificar los carcinomas mamarios de tipo basaloide, usamos citoqueratina (CK5/6) que se expresó en el 67.7% de los casos, por lo tanto consideramos que la CK5/6 es un marcador útil para clasificar el carcinoma mamario como esta variante, sin embargo hasta un 25% de los casos es triple negativo y no expresó estas citoqueratinas semejante a lo, que se refiere en la literatura. Presumiblemente son triples negativos no basaloide o basaloide sin expresión de uno de los marcadores.

El uso de más de 2 marcadores de tipo basaloide permitiría una mejor clasificación a los carcinomas mamarios triples negativos. Falta definir el significado terapéutico y pronóstico del uso de marcadores múltiples.

REFERENCIAS

1. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola H, Langer A, Frenk J. Cáncer de mama en México: Una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*. 2009; 51 (S2): S335-344
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-10874.
3. Seal MD, Chia SK. What is the difference between triple negative and basal breast cancers? *Cancer J* 2010;16:12-16.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747.
5. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 2009;41:40-47.
6. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160-1167.
7. Gluzi O, Gottschalk N, Pusztai L, Harbeck N. Triple-negative breast cancer-current status and future directions. Review. *Ann Oncol* 2009;20:1913-1927.
8. Millikan RC, Newman B, Tse C-K, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:123-139.
9. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* 2006;295:2492-2502.
10. Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:560-569.
11. 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.
12. Moll R, Franke WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation* 1983; 23: 256-69
13. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:5678-5685.
14. Calza S, Hall P, Auer G, et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res* 2006;8:R34.
15. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that over expresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
16. Rakha E, El-Sayed M, Green A, et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007;109:25-32.

17. Tischkowitz M, Brunet J-S, Begin L, et al. Use of immunohistochemical markers can define prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:134.
18. Tan D, Marchio' C, Jones R, et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:27-44.
19. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, et al. Triple negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 2009;15:2302.
20. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 2002;82:1525.
21. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27:1160-1167.
22. 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.
23. Fulford L, Easton D, Reis-Filho J, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006;49:22-34.
24. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:5175-5180.
25. Reis-Filho J, Milanezi F, Steele D, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 2006;49:10-21.
26. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol* 2005;207:260-268.
27. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2005;19:264.
28. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa T, et al. Myoepithelial differentiation in high grade invasive ductal carcinomas with large central acellular zones. *Hum Pathol* 1999;30:1134-1139.
29. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, et al. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am J Surg Pathol* 2000;24:197-202.
30. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathological features and sites of recurrence according to breast cancer subtype in the National Comprehensive Cancer Network (NCCN). *J Clin Oncol* 2009;27: Abstr 543).
31. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterized series identifies biologically

- distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer* 2005;116:340-50
32. Kreike B, Kouwenhove M, Hurlings H et al. Gene expression profiling and histopathological of triple negative/ basal like breast carcinomas. *Breast cancer research* 2007; 9: R65
 33. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic subgroup of basal like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Research*; 2007; 9:R24
 34. Jorge Buys DL, Zárate Osorno A. Carcinoma mamario con inmunofenotipo similar al de las células basales. Estudio morfológico y perfil de expresión inmunohistoquímico en 54 casos *triple negativo*. *Patología Rev Latinoam* 2008;46(4):303-8
 35. Barroso E.M. Identificación del carcinoma de tipo basal utilizando marcadores de inmunohistoquímica para células basales en neoplasias de mama infiltrante triple negativo en el Centro Médico Nacional "20 de noviembre, ISSSTE". Tesis recepcional UNAM, 2008
 36. Hernández RL. Estudio con inmunoperoxidasa de 78 pacientes con carcinoma mamario triple negativo (evaluación clínica y morfológica). Tesis recepcional UNAM, 2010

ANEXOS

Hoja de recolección de datos.

No.	Caso	Edad	RE (%)	RP (%)	Her2-neu	Grado nuclear	Grado histológico
1	10268-08	78	0%	0%	1+	3	3
2	6627-08	49	0%	0%	1+	3	3
3	1035-09	29	0%	0%	0	3	3
4	1154-09	59	0	0	1+	3	-
5	1161-09	NR	0	0	1+	3	-
6	1780-09	47	0	0	0	3	-
7	1975-09	40	0	0	1+	3	-
8	3176-09	52	0	0	0	3	-
9	3621-09	43	0	0	1+	3	-
10	2701-09	78	0	0	1+	3	-
11	3109-09	58	0	0	0	2	-
12	4353-09	53	0	0	0	3	-
13	4599-09	80	0	0	0	3	3
14	5167-09	47	0	0	0	-	3
15	5476-09	73	0	0	0	2	3
16	5475-09	42	0	0	0	2	3
17	5234-09	58	0	0	1+	2	2
18	5048-09	80	0	0	0	3	3
19	6233-09	43	0	0	0	3	3
20	6169-09	38	0	0	0	3	3
21	6309-09	62	0	0	1+	2	2
22	7541-09	67	0	0	0	3	3
23	8493-09	30	0	0	1+	-	-
24	8347-09	74	0	0	1+	-	-
25	894-10	55	0	0	1+	3	3
26	1634-10	86	0	0	0	-	-
27	2233-10	50	0	0	1+	3	3

28	1953-10	41	0	0	1+	3	3
29	2435-10	74	0	0	0	3	3
30	2811-10	49	0	0	0	3	3
31	3396-10	67	0	0	0	-	-
32	3800-10	49	0	0	1+	2	2
33	4076-10	54	0	0	0	3	3
34	4933-10	NR	0	0	0	3	3
35	4856-10	49	0	0	0	3	3
36	7541-09	68	0	0	0	3	3
37	5633-10	62	0	0	1+	3	3
38	6846-10	37	0	0	0	3	3
39	7085-10	66	0	0	0	2	2
40	7262-10	54	0	0	0	3	3
41	7304-10	47	0	0	0	3	3
42	7341-10	47	0	0	1+	-	3
43	8383-10	45	0	0	0	2	3
44	8582-10	61	0	0	0	3	3
45	2169-11	44	0	0	1+	-	-
46	2860-11	36	0	0	0	3	3
47	3194-11	49	0	0	0	-	-
48	3513-11	63	0	0	1+	-	-
49	4034-11	63	0	0	1+	-	-
50	7304-10	47	0	0	0	-	3
51	5718-11	40	0	0	0	-	-
52	6317-11	46	0	0	0	3	3
53	6532-11	60	0	0	0	3	3
54	6751-1	56	0	0	0	-	3
55	6983-11	54	0	0	0	2	3
56	7217-11	62	0	0	0	-	-
57	7521-11	52	0	0	0	3	3
58	7731-11	40	0	0	0	3	3
59	8152-11	36	0	0	0	2	2
60	8358-11	81	0	0	0	-	-
61	8548-11	28	0	0	0	-	3

Hoja de resultados de casos estudiados

No	Caso	Edad	CK5/6	EGFR	Grado nuclear	Grado histológico
1	1154-09	59	-	-	3	-
2	1161-09	NR	-	-	3	-
3	3621-09	43	-	-	3	-
4	2701-09	78	-	-	3	-
5	4353-09	53	+	-	3	-
6	5476-09	73	+	-	2	-
7	5475-09	42	-	-	2	3
8	5048-09	80	-	+	3	3
9	6309-09	62	+	-	2	2
10	7541-09	67	+	-	3	3
11	8493-09	30	+	-	3	-
12	8347-09	74	+	-	3	-
13	3176-09	52	+	-	3	-
14	3109-09	58	-	-	3	3
15	4599-09	80	+	-	3	3
16	894-10	55	+	-	3	3
17	7085-10	66	+	-	2	2
18	7304-10	47	+	-	3	3
19	2860-11	36	+	-	3	3
20	3194-11	49	+	-	2	-
21	3513-11	63	+	-	3	-
22	4034-11	45	+	-	3	-
23	5718-11	40	-	-	2	-
24	6317-11	46	+	-	3	3
25	6532-11	60	+	-	3	3
26	6983-11	54	-	-	2	3
27	7217-11	62	+	+	2	-
28	7521-11	62	+	-	3	3
29	8152-11	36	+	-	2	2
30	8358-11	81	-	-	3	-
31	8548-11	28	-	-	3	3

Azul: Menores de 40
 Verde: 41 a 60
 Rosa: Mayores de 61