

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

**COMPARACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LA  
INMUNOHISTOQUÍMICA DE p53 EN TEJIDO TOTAL Y EN  
MICROARREGLOS EN CARCINOMA DUCTAL DE MAMA**

TESIS DE POSGRADO  
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:  
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA  
PRESENTA:

**DR. IVAN JACINTO CORTÉS**

TUTORES DE TESIS: DRA. MARIA VIRGILIA SOTO ABRAHAM



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.

---

**Dra. Patricia Alonso de Ruiz**

Jefa del Servicio de Patología del Hospital General de México, Departamento de Patología UNAM.

---

**Dra. María Virgilia Soto Abraham**

## ÍNDICE

	PAG
i. Abreviaturas	1
ii. Índice de tablas	2
iii. Índice de figuras	3
iv. Resumen	4
1. Antecedentes	5
2. Justificación	12
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo General	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. Material y métodos	15
5.1 Diseño del estudio	15
5.2 Selección de la muestra	15
5.3 Procedimientos	15
5.4 Evaluación de la Inmunohistoquímica	20
5.5 Método estadístico	20
5.6 Consideraciones éticas	21
6. Resultados	22
7. Discusión y conclusión	30
8. Bibliografía	32

## ABREVIATURAS

BRCA 1: Gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 17 relacionado con el carcinoma de mama hereditario con patrón autosómico dominante denominado “Breast cáncer 1”

BRCA 2: Gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 13 relacionado con el carcinoma de mama hereditario con patrón autosómico dominante denominado “Brest cáncer 2”

PTEN: Tumor neuroectodérmico primitivo periférico.

STK11: Gen localizado en el cromosoma 19 relacionado con el síndrome de Peutz-Jeghers llamado “serina-treonina quinasa.

CDH1: Gen encargado de la síntesis de E-caderina relacionado con el carcinoma gástrico hereditario con patrón autosómico dominante llamado “Carcinoma difuse hereditary”.

BAAD: Biopsia por aspiración con aguja delgada.

RMN: Resonancia magnetica nuclear.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

TNM: Sistema creado por el comité conjunto Estadounidense sobre el cáncer para determinar es estadio del al enfermedad en el paciente. Las descripciones de las letras son: T tamaño del tumor y si ha invadido el tejido cercano; N describe cualquier ganglio linfático afectado; M describe metástasis.

MRM: Mastectomía radical modificada.

Her-2: Proteína tipo receptor tirosin-cinasa que participa en el crecimiento normal de las células también llamado factor 2 de crecimiento epidérmico humano.

ARN: Acido ribonucleico.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

## ÍNDICE DE TABLAS

	PAG
Tabla No. 1: Resultado de la inmunohistoquímica en todo el tejido	23
Tabla No. 2: Resultado de la inmunohistoquímica en los microarreglos	25
Tabla No. 3: Comparación entre las dos técnicas de inmunohistoquímica en los 23 tejidos	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1: Clasificación TNM para cáncer de mama.	8
Figura 2: Constructor de microarreglos de tejido 1802.	18
Figura 3: Construcción del Bloque Receptor.	18
Figura 4: Selección de áreas de interés en bloque donador.	19
Figura 5: Inserción de los cilindros del bloque donador al bloque receptor y su homogenización.	19
Figura 6: Tabla de orientación de los casos para construcción de microarreglo.	26
Figura 7: Bloque construido	26
Figura 8: Microarreglos terminados	27
Figura 9: Resultado de la Inmunohistoquímica en un caso con intensidad fuerte en todo el tejido y en el microarreglo del mismo.	27
Figura 10: Comparación entre las dos técnicas (todo el tejido en azul y microarreglos en rosa) para cada uno de los 23 casos.	29

## **RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN:** El cáncer de mama es la principal enfermedad maligna no cutánea, teniendo en primer lugar el carcinoma tipo ductal. Aproximadamente un tercio de los cánceres de mama presentan mutaciones del gen supresor tumoral p53, lo cual se asocia a una mayor agresividad tumoral y mayor grado histológico. Los estudios de microarreglos en p53 en cáncer de mama la relacionan con la sobrevida y es junto con otras proteínas y factores pronósticos, sin embargo no hay algún estudio que evalúe la concordancia de la expresión de dicha proteína expresada en todo el tejido neoplásico con microarreglos.

**OBJETIVO:** Analizar la expresión inmunohistoquímica de p53 en todo el tejido neoplásico de mujeres con carcinoma ductal infiltrante y en microarreglos de tejido.

**RESULTADOS:** Se evaluaron los 23 casos se evaluaron con inmunohistoquímica para p53 en todo corte de tejido y en microarreglos. En intensidad en todo el tejido, dos casos la intensidad fue leve, 10 con moderada, fuerte 6 y negativo en 5; 12 tuvieron menos de 1/3 de las células neoplásicas teñidas, 9 con intensidad moderada, 2 con leve y 1 con fuerte; en puntuación 3 casos el score fue de cuatro cruces y correspondieron a intensidad fuerte y >2/3 de células teñidas. En microarreglos 3 casos con intensidad fuerte, 4 con moderada, 1 con leve, y 15 negativos; 4 casos con >2/3, tres con intensidad fuerte y uno con moderada y 15 casos no positivos con intensidad negativa; en puntaje 2 casos con score de cuatro cruces, intensidad fuerte y >2/3 de células teñidas

**CONCLUSIONES:** La expresión de p53 a través de la inmunohistoquímica en todo el tejido obtenido de biopsias de carcinoma ductal infiltrante es con más frecuencia positiva en comparación con la expresada en microarreglos de tejido.

## 1. ANTECEDENTES

El cáncer de mama es una enfermedad maligna en donde la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células pertenecientes a distintos tejidos de la glándula mamaria forman un tumor que invade los tejidos vecinos y metastatiza en órganos distantes del cuerpo. Específicamente el carcinoma ductal, es la neoplasia maligna más común de la mama. El cáncer de mama es la neoplasia maligna no cutánea más común en mujeres<sup>1</sup>.

De acuerdo con las estimaciones del año 2002 se presentaron 1,151,298 casos nuevos de cáncer de mama y 410,712 defunciones y más de 4.4 millones de mujeres viven con este tipo cáncer de mama alrededor del mundo<sup>2-3</sup>. En México se diagnosticaron 11,656 casos y se presentaron 3,919 muertes en el año 2002 y actualmente constituye la primera causa de diagnóstico de carcinoma invasor en la mujer seguido por el cáncer cervicouterino<sup>4</sup>. En Estados Unidos y otros países desarrollados la incidencia de cáncer de mama ha disminuido, esto ha sido atribuido a:

- a) A los programas de detección oportuna (mastografía).
- b) Disminución en la prescripción de la terapia de reemplazo hormonal<sup>5</sup>.

Como ocurre en otros tipos de cáncer, en el de mama existen factores que pueden estar solos o en conjunto y favorecer el desarrollo de esta neoplasia<sup>6-7</sup>. Pueden estar presentes durante periodos largos; algunos de estos factores tienen riesgos relativos menores. La presencia de dos o más incrementan la posibilidad de desarrollar esta enfermedad. Los más importantes son<sup>8</sup>:

- Edad avanzada.

- Menstruación a temprana edad (antes de los 12 años).
- Edad avanzada al momento del primer parto (34 años) o nuliparidad.
- Antecedentes personales de cáncer de mama o de enfermedad benigna (no cancerosa) de mama (hiperplasia ductal atípica).
- Madre o hermana(s) con cáncer de mama.
- Tratamiento con radioterapia dirigida a la mama/pecho 10 a 15 años previos al diagnóstico de cáncer de mama.
- Densidad mamaria aumentada en una mastografía.
- Terapia de reemplazo hormonal<sup>9</sup>.
- Consumir bebidas alcohólicas.
- Ser de raza blanca.
- Alteraciones genéticas (BRCA 1 y BRCA 2 en cáncer hereditario de mama/ovario, PTEN en el síndrome de Cowden, p53 en el síndrome de Li-Fraumeni, STK11 en el síndrome de Peutz-Jeghers, CDH1 en el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario)<sup>10</sup>.

El riesgo de desarrollar un cáncer de mama a 5 años puede ser tan bajo como de 0.4% en una mujer de 40 años sin factores de riesgo, o tan alto como de 6% en mujeres de 49 años con varios factores de riesgo. Mujeres entre 40 y 49 años de edad que presenten cualquiera de los siguientes factores tienen un riesgo mayor de padecer esta enfermedad que aquellas mujeres mayores de 50 años que no los presenten:

- Dos biopsias previas de la mama no concluyentes.
- Un familiar de primer grado con cáncer y una biopsia previa.

- Diagnóstico previo de cáncer de mama.
- Carcinoma ductal *in situ* o hiperplasia atípica.
- Historia de radioterapia a la pared torácica.

El diagnóstico se hace por medio de la exploración física, la mastografía, el ultrasonido y la biopsia con aguja de corte (Trucut). En presencia de adenopatías sospechosas, también se solicitará la biopsia con aspiración con aguja delgada (BAAD), algunas pacientes también requerirán de la resonancia magnética nuclear (RMN) y la tomografía por emisión de positrones (PET)<sup>7</sup>.

El diagnóstico anatomopatológico es de gran importancia para determinar el tipo histológico de la lesión. La clasificación histológica actual de los carcinomas de mama por la organización mundial de la salud (OMS) presenta una extensa lista de la cual los tipos más frecuentes son el carcinoma ductal invasor (50 a 70%) y el carcinoma lobulillar invasor (5-15%). Los restantes considerados tipos especiales, son menos frecuentes e incluyen el carcinoma tubular, mucinoso, medular, metaplásico entre otros<sup>1</sup>.

Después de tener el diagnóstico histopatológico de cáncer se realizan estudios de laboratorio y gabinete, encaminados a determinar la extensión de la enfermedad. El pronóstico y tratamiento son individualizados y dependerán de la etapa clínica; ésta última se determina dependiendo del tamaño tumoral, la presencia o ausencia de metástasis ganglionares y/o a distancia (sistema de clasificación TNM)<sup>11</sup>. (Figura 1).

ESTADIO	TAMAÑO DEL TUMOR	GANGLIO LINFÁTICO	METÁSTASIS
0	Tis	N0	Mo
I	T1*	N0	Mo
IIA	T0	N1	Mo
	T1*	N1	Mo
	T2	N0	Mo
IIB	T2	N1	Mo
	T3	N0	Mo
IIIA	T0	N2	Mo
	T1*	N2	Mo
	T2	N2	Mo
	T3	N1	Mo
	T3	N2	Mo
IIB	T4	N0	Mo
	T4	N1	Mo
	T4	N2	Mo
IIIC	cualquier T	N3	M0
IV	cualquier T	cualquier N	M1

\* T1 incluye T1 mic [microinvasión (0.1 cm)]

**Figura 1: Clasificación TNM para cáncer de mama**

El tratamiento es variado e incluye cirugía, quimioterapia, hormonoterapia, terapia biológica y radioterapia. El uso de cada una de estas terapéuticas depende de la etapa clínica en la que se encuentre la paciente. La cirugía es la principal modalidad de tratamiento local del cáncer mamario, existen diversos procedimientos quirúrgicos, considerándose la mastectomía radical modificada (MRM) el tratamiento estándar. Sin embargo si el cáncer de mama se detecta en una etapa clínica temprana, se puede ofrecer un tratamiento conservador (Tumorectomía), en el que la paciente puede incluso conservar la mama sin comprometer el tratamiento oncológico radical. Dependiendo del tamaño tumoral, el número de ganglios linfáticos con metástasis y de otros factores clínicos y patológicos se ofrecerá tratamiento con radioterapia, hormonoterapia y/o quimioterapia adyuvante. Estos tratamientos prolongan la sobrevida, el período libre de enfermedad y

disminuyen el riesgo de recurrencia local-regional y a distancia<sup>11</sup>. Sin embargo no son suficientes para predecir el comportamiento biológico del carcinoma por lo que se busca una nueva clasificación que refleje adecuadamente un pronóstico para una mejor posibilidad terapéutica<sup>12</sup>. Recientemente la terapia biológica ha demostrado efectos benéficos en el tratamiento de cáncer de mama, específicamente el trastuzumab que incrementa la supervivencia cuando se administra como tratamiento adyuvante a mujeres cuyos tumores expresan la oncoproteína Her-2 y asociados a quimioterapia en el cáncer de mama metastásico<sup>13, 14, 15</sup>.

El gen p53 está localizado en el cromosoma 17p13.1, y es blanco habitual de la alteración genética de los tumores humanos<sup>16</sup>. La proteína supresora de tumores p53 es el mayor mecanismo anticancer y está demostrado que su alteración genética es la más frecuente asociada con carcinoma. Aproximadamente un tercio de los cánceres de mama presentan mutaciones del gen supresor tumoral p53, lo cual se asocia a una mayor agresividad tumoral y mayor grado histológico<sup>17-18</sup>. Los datos que disponemos de estudios realizados sobre mutaciones en p53 están generalmente basados en la secuencia de exones desde el 5 al 9 debido a que es la zona donde por el momento se ha conseguido localizar estas mutaciones. Los estudios basados en la secuencia genética de estas mutaciones están limitados debido a su complejidad molecular de este gen, aunque se están consiguiendo grandes avances debido al desarrollo de técnicas de alta resolución para el estudio genético<sup>19</sup>.

Las técnicas de inmunohistoquímica generalmente detectan la sobreexpresión de este gen, cuya consecuencia resulta generalmente en la prolongación de la vida media de la proteína codificada.

Mientras la mayoría de las mutaciones del p53 ocurren de forma espontánea sobre células somáticas, cuando esta mutación se asocia a alteraciones sobre células germinales (como en el síndrome de Li-Fraumeni), existe además una mayor incidencia de cáncer de mama<sup>20</sup>. Además se ha demostrado una relación entre BRCA1 y p53 en cáncer de mama hereditario, de tal manera que la mutación en p53 funciona como un cofactor en estos pacientes<sup>21</sup>.

El p53 es considerado en forma habitual como uno de los marcadores en el cáncer de mama, particularmente en la enfermedad sin afección linfática, aportando además ayuda para identificar pacientes que van a responder mejor a la quimioterapia y radioterapia<sup>22</sup>. Se ha identificado y relacionado por diferentes metodologías con carcinoma de mama en porcentajes variables de pacientes pero con resultados mixtos en términos de correlación clínica y seguimiento con respuesta a tratamiento<sup>23</sup>.

En 1998 Kononen y colaboradores publicaron la técnica de microarreglos de tejido en donde describen detalladamente la técnica en donde seleccionan una muestra representativa del tumor del tejido fijado en etanol frío e incluido en parafina para preservación del ARN y ADN, tomando la muestra de tejido en forma de cilindro con una aguja del bloque de parafina llamado “bloque donador” y depositada en el “bloque receptor”. Este procedimiento tiene como gran ventaja ahorro de tiempo y costo de técnicas de inmunohistoquímica y estudios de ADN y ARN en comparación con el corte completo de la lesión<sup>24 25</sup>.

Los microarreglos de tejido han sido evaluados en cuanto a su correlación en la expresión de marcadores de cáncer de mama como estrógenos, progesterona, HER2 5, p53,  $\beta$  catenina. Estos estudios han sido con cohortes pequeñas y se cree que puede variar si el bloque donador tiene poco material o el tumor es heterogéneo <sup>26</sup>.

La concordancia es variable dependiendo del marcador estudiado y también comparado ya sea con todo el corte de la lesión o con estudio bioquímico o genético. Los estudios de microarreglos en p53 en cáncer de mama la relacionan con la sobrevida y es junto con otras proteínas y factores pronósticos <sup>26</sup>, sin embargo no hay algún estudio que evalúe la concordancia de la expresión de dicha proteína expresada en todo el tejido neoplásico con microarreglos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El carcinoma ductal, es la neoplasia maligna más común de la mama. En nuestro país se diagnosticaron en el año 2002 11,656 nuevos casos y 3,919 mujeres murieron por esta causa. Por lo anterior, es considerada la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en México, superando incluso al carcinoma cervicouterino<sup>4</sup>.

El diagnóstico de carcinoma de mama requiere de de la exploración física, mastografía, ultrasonido, BAAD, biopsia con aguja de corte (Trucut). Para la estadificación es necesario RMN y PET. En el tratamiento la terapia biológica ha demostrado efectos benéficos<sup>13, 14, 15</sup>. La proteína supresora de tumores p53 es el mayor mecanismo anticancer y está demostrado que su alteración genética es la más frecuente asociada con carcinoma. Aproximadamente un tercio de los cánceres de mama presentan mutaciones del gen supresor tumoral p53, lo cual se asocia a una mayor agresividad tumoral y mayor grado histológico<sup>17-19</sup>. Las técnicas de inmunohistoquímica detectan la sobreexpresión de este gen. La técnica de microarreglos de tejido ha sido evaluada en cuanto a su correlación en la expresión de marcadores de cáncer de mama como estrógenos, progesterona, HER2 5, p53,  $\beta$  catenina. Sin embargo, estos estudios han sido con cohortes pequeñas y se cree que puede variar si el bloque donador tiene poco material o el tumor es heterogéneo<sup>26</sup>. En México y no hay algún estudio que evalúe la concordancia de la expresión de dicha proteína expresada en todo el tejido neoplásico con microarreglos.

Por otra parte, en el Hospital General de México, la clínica de cáncer de mama del servicio de Oncología cuenta con un gran número de pacientes con diferentes neoplasias de mama, de las cuales contamos con el bloque de parafina óptimo para esta comparación entre la expresión de p53 con inmunohistoquímica en todo el tejido contra microarreglos.

Este estudio fue posible con el apoyo para la realización de las dos técnicas del Instituto de Patología e Inmunología Molecular de la Universidad de Oporto (IPATIMUP) en Oporto, Portugal.

### **3. HIPOTESIS**

La expresión de p53 a través de inmunohistoquímica en todo el tejido neoplásico de las biopsias de mujeres con carcinoma ductal infiltrante es diferente a la expresión en microarreglos de tejido.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 GENERAL**

Analizar la expresión inmunohistoquímica de p53 en todo el tejido neoplásico de mujeres con carcinoma ductal infiltrante y en microarreglos de tejido.

#### **4.2 ESPECÍFICOS**

Analizar la expresión inmunohistoquímica de p53 en todo el tejido neoplásico de mujeres con carcinoma ductal infiltrante.

Analizar la expresión inmunohistoquímica de p53 en microarreglos de tejido neoplásico de mujeres con carcinoma ductal infiltrante.

Correlacionar la expresión inmunohistoquímica de p53 en todo el tejido neoplásico de mujeres con carcinoma ductal infiltrante con su mismo caso en microarreglos de tejido.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

### **5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Es un estudio descriptivo.

### **5.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

Se seleccionaron de la clínica de mama de la unidad de Oncología Ginecológica del Hospital General de México por muestreo no probabilístico consecutivo, 23 casos de mujeres con una edad de 35 y 69, con diagnóstico carcinoma ductal infiltrante de mama que contaran con expediente clínico completo y tratadas con mastectomía radical modificada. Los especímenes fueron obtenidos por mastectomía fueron fijados en formaldehído al 10% e incluidos en parafina. El diagnóstico fue hecho por microscopía de luz con cortes teñidos por hematoxilina y eosina de acuerdo a los criterios de Bloom y Richardson<sup>27</sup>. Fueron seleccionados los casos con el corte y bloque de tejido en parafina con la mayor cantidad células neoplásicas.

### **5.3 PROCEDIMIENTOS**

#### **5.3.1 INMUNOHISTOQUÍMICA**

Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón (DO-7; Dako, Carpintería, EE.UU; dilución 1:75) para la detección inmunohistoquímica de la proteína p53 en los casos seleccionados. Para tal efecto, cortes histológicos de 4 mm de espesor representativos de cada tumor fueron montados en láminas silanizadas, desparafinados en xilol y rehidratados con pasos sucesivos de alcoholes de grado decreciente hasta agua desionizada. La actividad de peroxidasa endógena y las uniones electrostáticas inespecíficas fueron bloqueadas

respectivamente con solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol y un agente bloqueante de proteínas (Immunon Shandon, Pittsburg, EE.UU). La recuperación antigénica se efectuó por calor con una vaporera de marca comercial durante 30 minutos, para lo cual se dejaron las láminas inmersas en solución recuperadora blanco de Dako de pH 6.1. Posterior al lavado con solución de tris buffer salino con tween 20 (TBST), las láminas fueron colocadas en contenedores adecuados y los siguientes pasos realizados en el aparato automático Dako AutoStainer. El anticuerpo primario fue incubado sobre las secciones histológicas a temperatura ambiente durante una hora, seguido de lavado con TBST. Utilizando el sistema de detección y amplificación EnVision (Dako, Carpintería, EE.UU), se aplicó un anticuerpo secundario anti-Ig G de ratón unido a un polímero de dextrano marcado con peroxidasa de rábano blanco, con tiempo de incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavado de las láminas histológicas con TBST. Posteriormente, se aplicó una mezcla conteniendo peróxido de hidrógeno como sustrato y el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (sistema DynaChrome; ThermoShandon, Pittsburg, EE.UU) durante 10 minutos, seguido de lavado con agua corriente. Finalmente, los preparados histológicos fueron contrastados con hematoxilina de Mayer, deshidratados y cubiertos. Se utilizó como control positivo del método inmunohistoquímico un carcinoma epidermoide de esófago colon con reactividad conocida para la proteína p53, y como control negativo tejido mamario normal.

### **5.3.2 CONSTRUCCIÓN DE MICROARREGLOS DE TEJIDO.**

La construcción de nuestros microarreglos se realizó según la técnica ya descrita por Rim y colaboradores<sup>28</sup>. Las áreas representativas de carcinoma de mama fueron seleccionadas en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina y marcados en su correspondiente bloque de

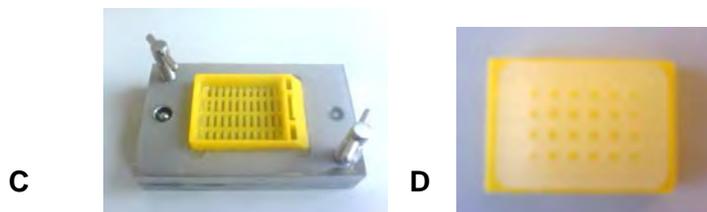
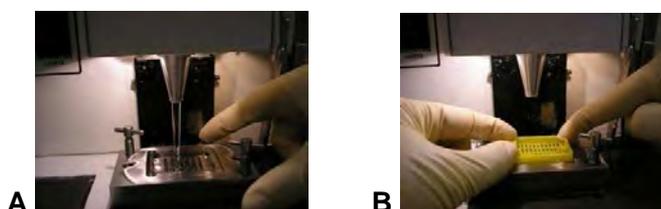
parafina. Dos cilindros de tejido fueron obtenidos del área seleccionada del bloque donador y depositadas dentro del bloque receptor usando el equipo especial para técnica de construcción de microarreglos (TMA builder ab1802, Abcam, Cambridge, UK) con control de hígado para orientación de los casos y de tejido mamario normal como control. Se hicieron dos cortes con hematoxilina y eosina de los microarreglos para identificar que fueran las áreas seleccionadas. Se realizaron cortes en laminillas cargadas eléctricamente para inmunohistoquímica ( Superfrost Plus ).

### 5.3.2.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS MICROARREGLOS DE TEJIDO



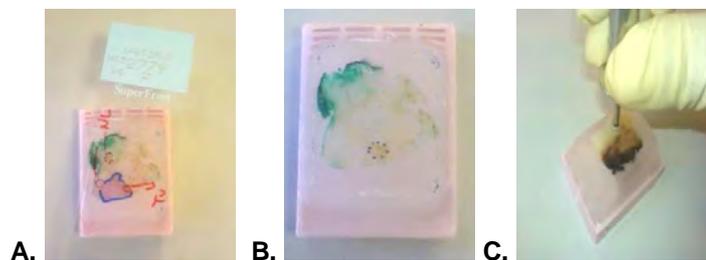
**Figura 2. Constructor de microarreglos de tejido (Numero de serie ab1802). Instrumento constituido por un molde de bloque receptor (A) y la “jeringa extractora” (B).**

### 5.3.2.2. CONSTRUCCIÓN DEL BLOQUE RECEPTOR



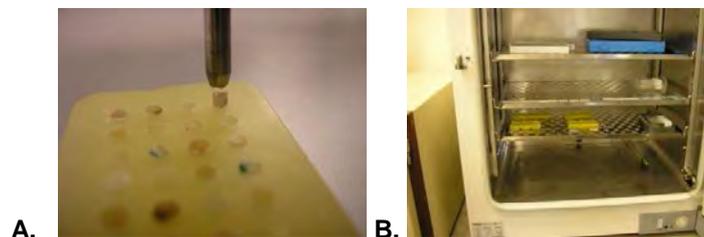
**Figura 3: Construcción del Bloque Receptor. (A)- Colocación de parafina vertida sobre un molde. (B)- Colocación del cassette en la tapa del molde. (C)- Reforzamiento del molde en una placa fría. (D)- Bloque receptor final de microarreglo de tejido.**

### 5.3.2.3. SELECCIÓN DE ÁREAS EN BLOQUES DONADORES



**Figura 4: Selección de áreas de interés en bloque donador. (A)- Comparación del corte histológico con el tejido del bloque. (B)- Bloque donador con zona de interés marcada. (C)- Extracción del cilindro a través de la “jeringa extractora”.**

### 5.3.2.4. CONSTRUCCIÓN DEL BLOQUE RECEPTOR



**Figura 5: Inserción de los cilindros del bloque donador al bloque receptor y su homogenización. (A)- Colocación de los cilindros en el bloque receptor. (B)- Homogenización de las parafinas en la estufa a 37°C.**

#### **5.4 EVALUACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUIMICA**

La inmunoreacción nuclear fue considerada positiva por la presencia de la tinción nuclear negra. La puntuación fue hecha por examen de todo el tejido neoplásico con el objetivo de bajo poder (objetivo 10X) usando el método semicuantitativo de cinco grados para receptores de estrógenos<sup>29,30</sup>. Este sistema es basado en la intensidad y por porcentaje de las células teñidas. La intensidad de la tinción fue dividida en negativa, leve, moderado y fuerte. El porcentaje de células teñidas ocasionales <1/3, en grupos aislados 1/3- 2/3, casi todas >2/3. La positividad de la reacción fue calificada en negativa (-) cuando no fue vista en células neoplásicas. Positivo + indicaba la presencia ocasional de una célula positiva; positivo ++ indicaba arriba de un tercio de células neoplásicas positivas con intensidad moderada; positivo +++ indicaba intensidad fuerte y más de dos tercios de células neoplásicas teñidas o moderada en casi todas; positivo ++++ intensidad fuerte en casi todas las células neoplásicas<sup>31</sup>. Los cortes fueron evaluados por dos patólogos de forma independiente.

#### **5.5 MÉTODO ESTADÍSTICO.**

Se expresaron las variables cualitativas en número de cruces +/++++. Se utilizó tanto el programa de Excel para el análisis estadístico, SPPSS versión 10 para Windows y el programa GraphPad Prism 3.02, para la realización de figuras. Para el análisis entre las dos técnicas se utilizó una prueba no paramétrica bivariada con método de Pearson.

## **5.6. CONSIDERACIONES ETICAS**

La realización del estudio no significó algún riesgo para el paciente, ya que no se efectuaron procedimientos adicionales o diferentes a los recomendados para pacientes en de la Oncología Ginecológica del Hospital General de México. Se tomaron en cuenta los lineamientos para las investigaciones biomédicas vigentes en México, publicadas por la Secretaría de Salud a través del Diario Oficial de la Federación.

Además se tomaron en cuenta los artículos para el manejo, procesamiento y eliminación de tejidos y residuos biológicos, vigente, en la Ley General de Salud.

## **6. RESULTADOS**

Se evaluaron los 23 casos se evaluaron con inmunohistoquímica para p53 en todo corte de tejido y en TMA.

### **6.1 INMUNIOHISTOQUIMICA DE TODO EL TEJIDO**

#### **6.1.1 INTENSIDAD.**

En dos casos la intensidad fue leve, 10 con moderada, fuerte 6 y negativo en 5.

#### **6.1.2 CÉLULAS NEOPLÁSICAS TEÑIDAS.**

12 tuvieron menos de 1/3 de las células neoplásicas teñidas, 9 con intensidad moderada, 2 con leve y 1 con fuerte. Cinco con tinción  $>2/3$  de células neoplásicas teñidas y todas correspondieron a una intensidad fuerte. Un caso fue considerado entre 1/3 a 2/3 y correspondió a intensidad moderada. Cinco casos negativos correspondieron a intensidad negativa.

#### **6.1.3. PUNTUACIÓN**

En 3 casos el score fue de cuatro cruces y correspondieron a intensidad fuerte y  $>2/3$  de células teñidas. Dos casos con score de tres cruces correspondieron a intensidad fuerte y  $>2/3$  de células teñidas. En el puntaje de dos cruces solo se encontró un 1 que correspondió a intensidad moderada y 1/3 – 2/3 en total de células teñidas. Con un puntaje de una cruz fueron 12 casos. 1 correspondió a intensidad fuerte y 1/3 de células teñidas. 9 fueron con intensidad moderada y  $<1/3$  de células teñidas. 2 con intensidad leve y  $<1/3$  de células teñidas. Cinco casos con puntaje negativo y también en intensidad y en cantidad de células teñidas. Los resultados antes mencionados se expresan en la Tabla 1.

<b>Tabla 1. Inmunohistoquímica en todo el tejido</b>		
Intensidad	Células teñidas	Puntaje
Leve	<1/3	+
Moderado	<1/3	+
Fuerte	>2/3	++++
Fuerte	>2/3	+++
Moderado	<1/3	+
Moderado	<1/3	+
Leve	<1/3	+
Negativo	0	-
Negativo	0	-
Negativo	0	-
Moderado	<1/3	+
Moderado	1/3 - 2/3	++
Moderado	<1/3	+
Moderado	<1/3	+
Moderado	<1/3	+
Negativo	0	-
Negativo	0	-
Moderado	<1/3	+
Fuerte	>2/3	++++
Moderado	<1/3	+
Fuerte	>2/3	+++
Fuerte	<1/3	+
Fuerte	>2/3	++++

## **6.2 INMUNOHISTOQUIMICA EN LOS MICROARREGLOS**

### **6.2.1 INTENSIDAD**

3 casos con intensidad fuerte, 4 con moderada, 1 con leve, y 15 negativos.

### **6.2.2 CANTIDAD DE CÉLULAS TEÑIDAS.**

4 casos con  $>2/3$ , tres con intensidad fuerte y uno con moderada.

3 casos con células positivas de  $1/3 - 2/3$  con intensidad moderada.

1 caso con  $<1/3$  de células positivas con intensidad leve.

15 casos no positivos con intensidad negativa.

### **6.2.3 PUNTAJE**

2 casos con score de cuatro cruces, intensidad fuerte y  $>2/3$  de células teñidas.

3 casos con tres cruces de score, uno con intensidad moderada y  $1/3 - 2/3$  de células teñidas, los dos restantes con  $>2/3$  de células teñidas e intensidad moderada y fuerte.

Lo anterior se expresa concentrado en la Tabla 2.

<b>Tabla 2: Inmunohistoquímica en microarreglos</b>			
<b>No</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Células teñidas</b>	<b>Puntaje</b>
<b>1</b>	Negativo	0	-
<b>2</b>	Negativo	0	-
<b>3</b>	Moderado	>2/3	+++
<b>4</b>	Fuerte	>2/3	+++
<b>5</b>	Negativo	0	-
<b>6</b>	Negativo	0	-
<b>7</b>	Negativo	0	-
<b>8</b>	Negativo	0	-
<b>9</b>	Negativo	0	-
<b>10</b>	Negativo	0	-
<b>11</b>	Negativo	0	-
<b>12</b>	Moderado	1/3 - 2/3	++
<b>13</b>	Leve	<1/3	+
<b>14</b>	Negativo	0	-
<b>15</b>	Negativo	0	-
<b>16</b>	Negativo	0	-
<b>17</b>	Negativo	0	-
<b>18</b>	Negativo	0	-
<b>19</b>	Fuerte	>2/3	++++
<b>20</b>	Moderado	1/3 - 2/3	++
<b>21</b>	Fuerte	>2/3	++++
<b>22</b>	Negativo	0	-
<b>23</b>	Moderado	1/3 - 2/3	+++

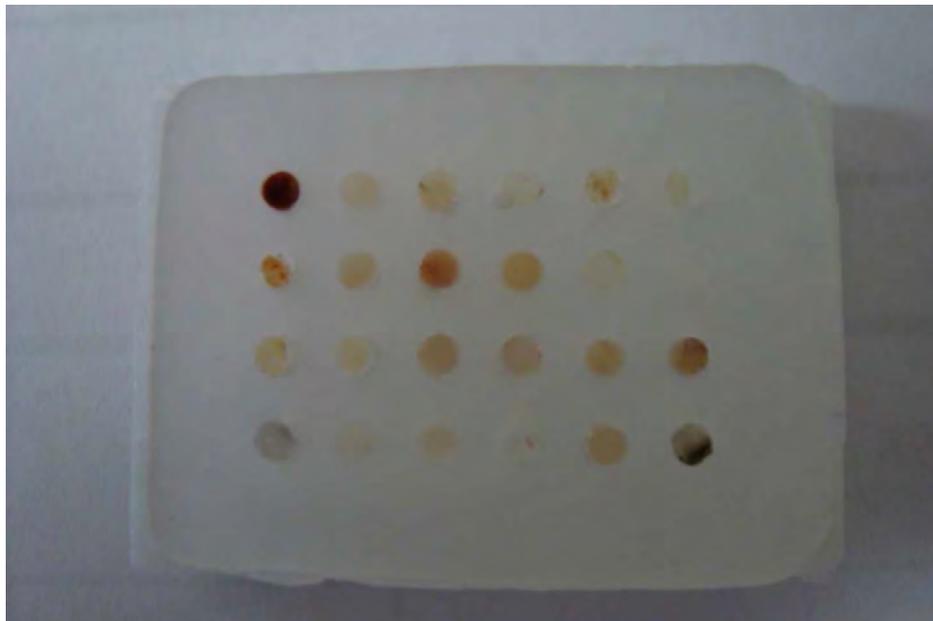
TMAs Dr. Ivan

TMA MX1

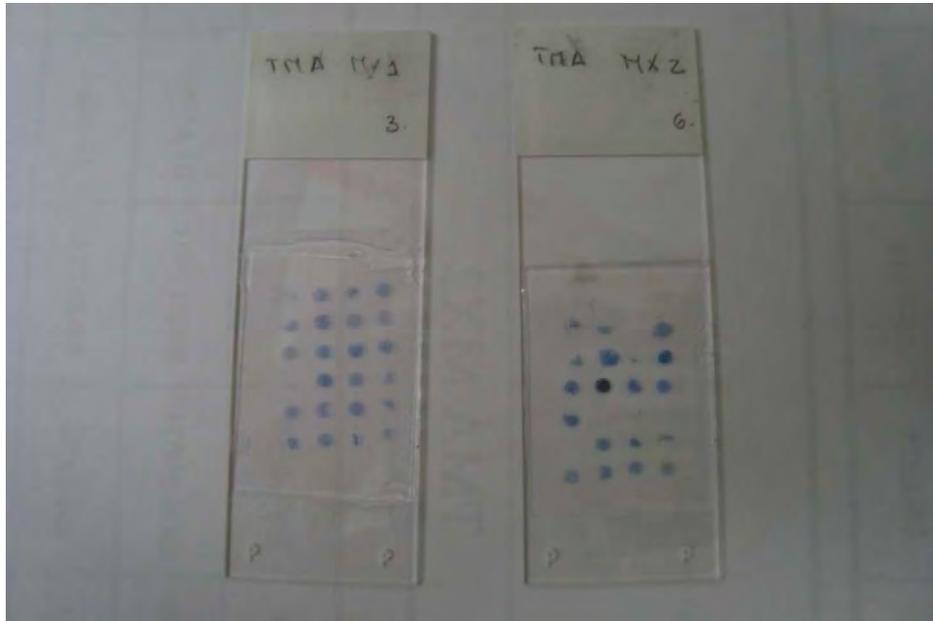
Fígado	08-8925	06-757 D	B07-1293313	04-1432	B07-1293313
06-1474	83-14256	08-50334	06-11599	B07-1293313	B08-12974
07-15933	07-3044	B07-5729A	B08-8117	B07-21127	06-757 D
B08-8117	04-1432	08-8925	06-1474	07-15933	B07-5729A

Ponto de orientação do bloco

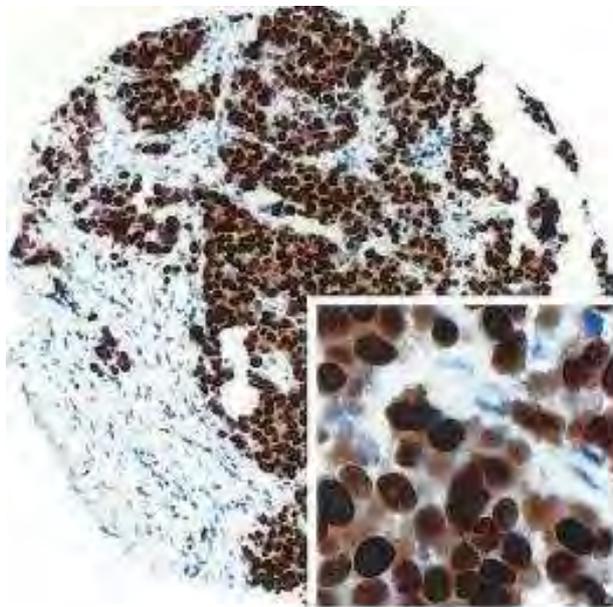
**Figura 6: Tabla de orientación de los casos para construcción de microarreglo.**



**Figura 7: Bloque construido**



**Figura 8: Microarreglos terminados**

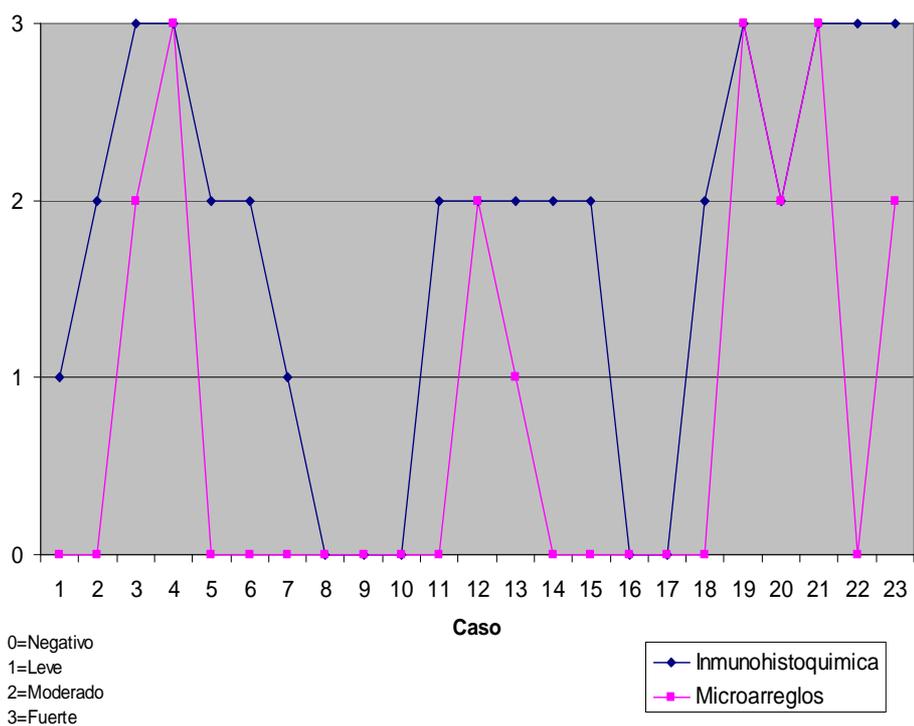


**Figura 9: Resultado de la Inmunohistoquímica en un caso con intensidad fuerte en todo el tejido y en el microarreglo del mismo.**

En la Tabla 3 se puede observar las diferencias entre el número de casos positivos (en diferentes grados) y negativos entre la inmunohistoquímica realizada en todo el tejido y en los microarreglos. Resulta muy notorio como los casos negativos son significativamente mas en los microarreglos (15/23; 65.21%) que en todo el tejido (5/23; 21.73%). Es decir, la inmunohistoquímica para p53 realizada en todo el tejido, detecta con más facilidad células positivas.

En la Figura 10 se observa la diferencia entre ambos métodos para cada uno de los 23 casos.

Tabla 3: Comparación entre las dos técnicas de inmunohistoquímica en los 23 tejidos				
Técnica	Negativos		Positivos	
		Leve	Moderado	Fuerte
Inmunohq	5	2	10	6
Microarreglos	15	1	4	3



**Figura 10: Comparación entre las dos técnicas (todo el tejido en azul y microarreglos en rosa) para cada uno de los 23 casos.**

## 7. DISCUSIÓN

Desde la publicación de la técnica por Kononen y colaboradores en 1998 se sabe que los microarreglos de tejido que sirven para seleccionar una muestra representativa del tejido neoplásico estudiado, tiene como gran ventaja ahorro de tiempo y costo de técnicas de inmunohistoquímica y estudios de ADN y ARN en comparación con el corte completo de la lesión <sup>24 25</sup>.

Los microarreglos de tejido han sido evaluados en cuanto a su correlación en la expresión de marcadores de cáncer de mama como estrógenos, progesterona, HER2, p53 y  $\beta$  catenina. Estos estudios han sido con cohortes pequeñas y se cree que puede variar si el bloque donador tiene poco material o el tumor es heterogéneo <sup>26</sup>.

La concordancia entre la expresión del tejido completo y el marcado en microarreglos es variable dependiendo del marcador estudiado. Los estudios de microarreglos en p53 en cáncer de mama lo relacionan con la sobrevida y es junto con otras proteínas y factores pronósticos <sup>26</sup>, sin embargo no hay algún estudio que evalúe la concordancia de la expresión de dicha proteína expresada en todo el tejido neoplásico con microarreglos.

En nuestros resultados obtuvimos más positividad (18 de 23 casos) (78.26%) cuando la inmunohistoquímica se evaluó en todo el tejido que cuando se hizo lo mismo en los microarreglos (8/23 casos) (34.78%). La explicación posible es que al seleccionar solo una parte representativa del tejido, a pesar de que se ahorra tiempo y recursos, la zona seleccionada puede no ser la más viable para inmunohistoquímica o donde haya mayor cantidad de células neoplásicas que expresen p53.

## **8. CONCLUSIÓN**

La expresión de p53 a través de la inmunohistoquímica en todo el tejido obtenido de biopsias de carcinoma ductal infiltrante es con más frecuencia positiva en comparación con la expresada en microarreglos de tejido.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Robbins, Cotran R: The female breast, Pathologic basis of disease, 7 edition, Elsevier Saunders, Philadelphia 2005; pp1129-51.
2. Ferlay J, Bray F, Pisan P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Globocan 2002. IARC Cancer Base No 5 version 2.0 IARC Press: Lyon, 2004.
3. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann of Oncol 2005; 16: 481-88.
4. Secretaria de salud, compendio de cáncer. Registro histopatológico de neoplasias malignas, 2002.
5. Ravdin PM, Cronin KA, Howlander N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer et al. The Decrease of Breast cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med 2007; 356(16):1670-74.
6. Chen WY and Golditz GA. Risk factors and hormone receptors status: epidemiology, risk prediction models and treatment implications for breast cancer. Nat Clin Pract Oncol 2007; 4(7):415-23.
7. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch, Orecchia R, Viale G. Breast Cancer. Lancet 2005, 365:1727-41.
8. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/patient>
9. Risks and Benefits of estrogen plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. Principal results from the Women's Health initiative Randomized controlled Trial. JAMA 2002; 288: 321-333.

10. Cheng D, Yoon S, Lauwers G, Patel D. Case 22-2007: A women with family history of gastric and breast cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 281-91.
11. Cancer: Principles and practice of oncology. De Vita VT, Jr Helfman S, Rosemberg S. 2004 7<sup>th</sup> edition.
12. Fátima Silva et al, Carcinoma da mama tipo basal, *Acta Med Port.* 2008; 21(4):373-378
13. Romond EH, Perez EA, Bryant j, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy in HER2 positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-1684.
14. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones b, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (16):1659-1672.
15. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without for Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(8):809-820.
16. Liu MC, Gelmann EP: P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 29:246, 2002.
17. Thor Ad, Moore DM, Edgerton SM. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1992,84:845-855.
18. Tsuda H, Hirohashi S. association among p53 gene mutation, nuclear accumulation of the p53 protein and aggressive phenotypes in breast cancer. *Int J Cancer* 1994;57:498-503.

19. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: and important new indicator of prognosis. *Hum Pathol.* 1993;24:469-476.
20. Malkin D, Li FP, Strong LC. Germiline p53 mutations in a familial syndrome of Breast Cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 1990;20:1234-1238.
21. Sobol H. BRCA1-p53 relationship in hereditary breast cancer. *Int J Oncol.* 1997;10:349-353.
22. Bergh, Norberg T. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med.* 1995;1:1029-1034.
23. Chung GG, Zerkowski MP, Ocal IT, Dolled-Filhart M, Kang JY, Psyrrri A, Camp RL, Rimm DL. Beta-Catenin and p53 analyses of a breast carcinoma tissue microarray. *Cancer.* 2004 May 15;100(10):2084-92.
24. Kyndi M, Sørensen FB, Knudsen H, Overgaard M, Nielsen HM, Andersen J, Overgaard J. Tissue microarrays compared with whole sections and biochemical analyses. A subgroup analysis of DBCG 82 b&c. *Acta Oncol.* 2008;47(4):591-9
25. Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol.* 2003 Jan;16(1):79-84
26. Warnberg F, Armini MR: Quality aspect of the tissue microarray technique in a population based cohort whit ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopath.* 2008 Dec;53(6):642-9

27. Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grading in breast cancer: Experience from a large study with long term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410
28. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J.* 2001;7:24 –31.
29. Sannino P, Shousha S (1994) Demonstration of estrogen receptors in paraffin wax sections in breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. *J Clin Pathol* 47: 90-92
30. Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I (1995) Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diagn Cytopathol* 13: 347-351.
31. Schmitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. *Pathol Res Pract.* 1998;194(12):815-9.