



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

PETRÓLEOS MEXICANOS

HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

**“CONCORDANCIA DIAGNÓSTICA INTEROBSERVADOR DE LA
PRUEBA DE HER 2 EN EL CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE,
POR MEDIO DE EVALUACIÓN DE CONTROL DE CALIDAD DEL
PROCESO DE HERCEPTEST, EN EL HCSAE PEMEX EN UN
PERIODO DE 14MESES (NOV 2007-FEB 2009)”**

TESIS DE POSTGRADO

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO ESPECIALISTA
EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

PRESENTA:

DRA. MARÍA DE JESÚS VALDÉS GONZÁLEZ

TUTOR DE TESIS: DRA. MARÍA IRENE RIVERA SALGADO



MÉXICO, D.F.

JULIO, 2009



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. CARLOS FERNANDO DÍAZ ARANDA
DIRECTOR

DRA. JUDITH LÓPEZ ZEPEDA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. PEDRO MARIO PASQUEL GARCÍA VELARDE
PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

DRA. MARÍA IRENE RIVERA SALGADO
TUTOR DE TESIS
JEFA DEL SERVICIO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

DEDICATORIAS

A mi madre por su apoyo incondicional, con todo mi amor, respeto y agradecimiento.

A mi abuelita, por sus enseñanzas invaluable y su alegría de vivir.

A todos aquellos que han intervenido en mi formación académica, espiritual y personal.

Agradecimiento especial al Dr Andrés Lupian por su ayuda en la estadística de este estudio.

INDICE

I. Introducción.....	6
II. Planteamiento del problema.....	7
III. Marco teórico.....	8
1. Estructura anatómica y funcional de la glándula mamaria.....	8
2. Patología de la glándula mamaria.....	11
2.1 Etiopatología del cáncer de mama	
2.1.1 Niveles de estrógenos	
2.1.2 Edad de la menarquia	
2.1.3 Menopausia	
2.1.4 El peso	
2.1.5 Actividad física	
2.1.6 Lactancia	
2.1.7 Embarazo	
2.1.8 Terapias hormonales sustitutivas	
2.1.9 Uso de anticonceptivos orales	
2.1.10 Historia familiar y predisposición hereditaria	
2.1.11 Dieta	
2.1.12 Pesticidas xenobióticos	
3. Patología molecular del cáncer de mama	15
3.1 Cáncer de mama hereditario.....	15
3.1.1 BRCA1	
3.1.2 BRCA2	
3.1.3 p53	
3.1.4 ATM	
3.1.5 PTEN	
3.1.6 Polimorfismos génicos	
3.2 Cáncer de mama esporádico.....	17
3.3 Regulación del ciclo celular y cáncer de mama	
3.4 Factores de crecimiento y cáncer de mama.	
3.4.1 Receptores de membrana con actividad tirosina quinasa: la familia HER	
3.4.2 El papel de la familia HER en el desarrollo embrionario	
3.4.3 La activación de los receptores de la familia HER	
3.4.4 La unión del ligando a los receptores HER	
3.4.5 La señalización activada por HER-2	
3.4.6 La importancia de HER-2 en el tratamiento del cáncer por inmunoterapia	
3.4.7 La degradación de HER-2	
3.4.8 Implicaciones terapéuticas derivadas de la biología de HER-2 en cáncer de Mama	
3.4.9. Terapia dirigida: trastuzumab	
4. Evaluación y gradificación histológica en cáncer de mama mediante her2.....	25
4.1 Definición de Herceptest	
4.2 Principios de Procedimiento de Herceptest	
4.3 Recomendaciones de FDA y Herceptest	

4.4 Interpretación de la tinción	
4.5.Fallas en la interpretación:	
4.5.Fallas en la interpretación:	
4.7. CISH	
4.8. Reporte de CISH	
IV. Justificación.....	31
V. Hipótesis.....	31
VI. Objetivos.....	31
VII. Diseño Metodológico.....	32
1. Tipo de estudio	
2. Diseño	
2.1 Definición del universo	
2.1.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	
2.1.2 Método de selección de muestra	
2.1.3 Definición de variables	
2.1.4 Materiales y Métodos	
3. Procesamiento y Presentación de la Información	
4. Recursos humanos y materiales	
VIII. Resultados.....	38
IX. Discusión.....	52
X. Conclusiones.....	54
XI. Referencias.....	58
XII. Hoja de Trabajo	63
XIII. Cuadro de Actividades	64

INTRODUCCIÓN

El protooncogen Her2, conocido también como neu o ErbB2, pertenece a la familia de receptores celulares de membrana ErbB con actividad tirosinquinasa en su dominio intracitoplasmático. Codifica una glicoproteína de 185kDa, y se localiza en la región cromosómica 17q12-21. La amplificación del gen Her2 se ha encontrado en el 25-30% de los tumores de mama, y resulta en un aumento de expresión de la proteína. Slamon y colaboradores fueron los primeros en observar una relación significativa entre la amplificación del oncogén Her2 y el desarrollo de un mal pronóstico en las pacientes con cáncer de mama.

El epitelio ductal de la mama contiene 2 copias del gen Her2 cada uno localizado sobre una o dos copias del cromosoma 17. Durante ciertas fases del ciclo celular hay hasta 4 copias del gen Her2 y más de 2 copias del cromosoma 17 que pueden detectarse normalmente. Este gen es un protooncogen con potencial de transformarse en un oncogén secundario a mutaciones, y la amplificación de esta forma natural produce sobreexpresión. En estudios recientes se ha informado la coamplificación del Her2 y topoisomerasa II-alpha.

En cuanto al contexto morfológico la sobreexpresión y amplificación del Her2 neu, se ha observado asociado a enfermedad de alto grado (carcinoma in situ y carcinoma ductal infiltrante Grado Histológico II- III). También altamente positivo en subtipos histológicos agresivos del carcinoma invasor, como en la variante apócrina, micropapilar y lobulillar pleomórfico.

En recientes estudios se ha demostrado que la sobreexpresión de Her2 es un factor pronóstico adverso en pacientes con ganglios positivos o enfermedad metastásica. Ya que una mayor sobreexpresión del mismo se relaciona directamente con el aumento de mortalidad, sin el tratamiento específico.

Aunque la expresión de HER2 inicialmente se utilizó como marcador pronóstico, actualmente se usa para predecir la respuesta terapéutica; ya que la sobreexpresión del mismo predice la respuesta al Herceptin (Trastuzumab).

La aplicación terapéutica en fases iniciales y el hecho de que la respuesta depende de la alteración del gen, han convertido en esencial el estudio de HER2. Actualmente se considera obligado efectuarlo en todos los casos diagnosticados de carcinoma de mama invasor.

En el HCSAE PEMEX se realiza la determinación de Her2 desde el año 2003, requiriendo capacitación tanto de personal técnico como de médicos patólogos, en cuanto a estandarización de pruebas y para ello un buen control de calidad técnico. Para evaluar el control de calidad, se ha recurrido a dos controles externos (2 laboratorios nacionales), posteriormente se han realizado en junio de 2007 y mayo de 2008, la evaluación del control de calidad por medio de un control externo internacional (UK-NEQAS), recomendado por las normas de la ASCO/CAP 2007. En ambas evaluaciones se obtuvieron resultados buenos con algunas recomendaciones. Lo que determina la certificación a nivel internacional del laboratorio de Patología para la prueba de determinación de Her2.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) en su apartado de Recomendación para la Práctica Clínica, indica que el estatus de Her2 deber ser evaluado en cada carcinoma ductal infiltrante primario al tiempo de ser diagnosticado o en recurrencias. Un comité de la ASCO y Colegio de Patólogos de América (CAP) reviso los criterios que se usan para calificar el análisis inmunohistoquímico de Her2, ya que notaron que la mayoría de tumores que son positivos al oncogén, tienen un gran porcentaje de células positivas; por lo que se realizo la calificación de Her2, diviéndolos en 4 categorías posibles: 3+ o positivo inequívoco, 2+ positivo equivoco o indeterminado, 1+ y 0 como negativos inequívocos. Ya que a pesar de ser al inicio un indicador pronostico, recientemente se ha utilizado al Her2 como predictor de respuesta terapéutica al Trastuzumab, validado por numerosos estudios. La literatura de los últimos años se evidencio la ausencia de estandarización entre distintos ensayos, tanto en aspectos técnicos como de interpretación y confirmación de resultados. Esta variabilidad de resultados se atribuye a factores preanalíticos, como la fijación y el procesado tisular, analíticos, como los reactivos o los procedimientos del laboratorio, y pos analíticos, como los criterios de interpretación de resultados. Se menciona que existen discrepancias interobservador en la calificación del status del Her2, hasta de un 30%.

MARCO TEORICO

1. Estructura anatómica y funcional de la glándula mamaria

La glándula mamaria ocupa el tercio medio de cada hemipared anterior del tórax. La forma, dimensión y tamaño glandular varía enormemente en cada mujer, edad y raza.

Está constituida, fundamentalmente, por tejido conectivo-epitelial que se comporta esencialmente como un receptor hormonal. Así, es exquisitamente sensible a las variaciones de los niveles hormonales circulantes en el organismo femenino, no está solamente supeditada a los esteroides más importantes, fundamentalmente estrógenos y progesterona, sino que responde a muchas otras sustancias tales como factores locales de crecimiento y hormonas andrógenas.

Empleando animales de experimentación se ha demostrado que los estrógenos son responsables de la proliferación de los ductos lactíferos, con crecimiento de los túbulos y estimulación de los alvéolos. Sin embargo, a grandes dosis, esta hormona produce dilatación tubular, formación quística y marcada hiperplasia epitelial. La inyección de estrógenos aumenta la concentración de mucopolisacáridos ácidos en el tejido conectivo, particularmente de ácido hialurónico. Esta sustancia juega un importante papel en la constitución de las distrofias mamarias y, además, produce alteraciones de la permeabilidad capilar del tejido mamario.

Los elementos internos que constituyen la glándula mamaria son esencialmente tejido conectivo, aparentemente de soporte pero biológicamente activo, tejido glandular epitelial, la estructura más dinámica del órgano y tejido graso. El cuerpo glandular está rodeado por una cápsula de tejido conectivo, llamado ligamento suspensor de Cooper, que rodea la parte anterior. Este ligamento se sitúa entre la fascia superficial que separa la glándula mamaria del tejido subcutáneo y el tejido glandular. Dependencias fibrosas del mismo ligamento de Cooper se orientan de forma perpendicular a la piel formando las crestas mamarias de Duret.

El tejido adiposo es abundante y forma dos estratos. Una capa anterior, preglandular, interrumpida en la zona retroalveolar por el paso de los conductos y una capa de grasa posterior más fina.

La superficie posterior es plana, la anterior convexa-cónica e irregular donde emerge el pezón centralmente. Los ductos mamarios se ramifican hasta terminar en los acinos secretores. A cada conducto lactífero principal corresponde un lóbulo mamario que a su vez se subdivide en lobulillos. La estructura básica se compone de 15-25 lobulillos rodeados de tejido graso y conectivo. Por su parte posterior la glándula mamaria descansa sobre la fascia superficial. La bolsa retromamaria de Chassaignac, de tejido graso, es el estrato celular situado entre la fascia superficial y el pectoral mamario y serrato anterior.

La glándula mamaria propiamente dicha corresponde a la estructura de acinos y conductos, elementos secretores y excretores. La unidad histológica es el conducto galactóforo epitelial o el ducto terminal del lóbulo. Está formado por una capa epitelial simple cilíndrico-cúbica formada por las células ductales galactofóricas situadas en la luz interna y que descansan sobre una membrana basal. De su constitución también forma parte la capa externa de las células mioepiteliales.

Este sistema canicular está rodeado de tejido conectivo en el que puede diferenciarse el tejido intersticial y el tejido conjuntivo interlobulillar o específico que responde a los mensajes hormonales.

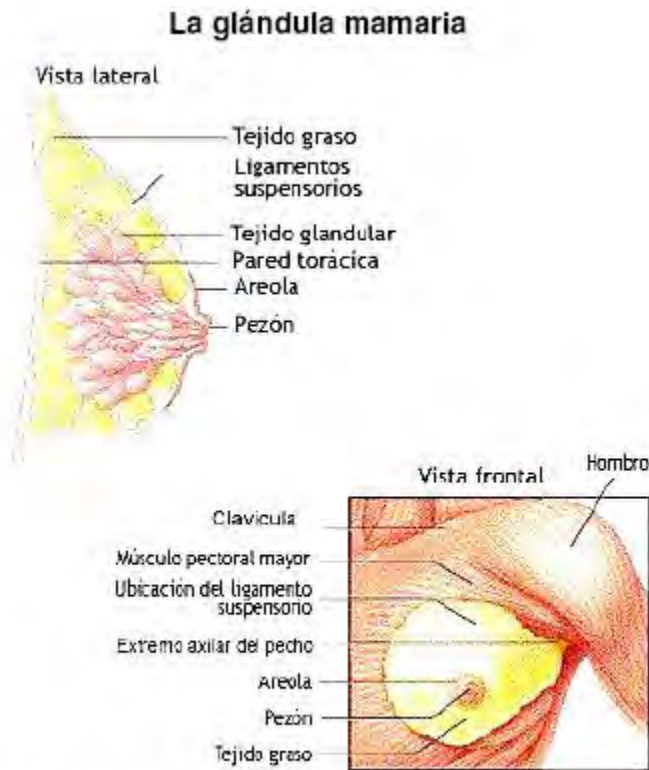


Figura 1: vista lateral y anterior de la mama.

Por otra parte, la irrigación arterial de la glándula es compleja y se distribuye de la siguiente forma:

- Arteria mamaria interna, es el aporte arterial más importante
- Arterias intercostales
- Arteria axilar

El drenaje venoso de la glándula es paralelo a la red arterial. Es importante conocer su distribución por ser la vía más frecuente de metástasis.

- I. Red subcutánea superficial.
- II. Red profunda:
 1. ramos venosos perforantes
 2. venas tributarias de la vena axilar
 3. venas intercostales

El drenaje linfático forma en este caso dos planos:

1. Plano profundo o plexo aponeurótico o linfáticos principales del parénquima mamario. Drena la zona lateral mamaria de los músculos pectorales y ganglio interpectoral de Rotter para dirigirse a continuación a la axila.

En la axila existen de 10 a 30 nódulos linfáticos distribuidos en 5 grupos:

- lateral o de la vena axilar

- pectoral o grupo lateral torácico
- subescapular
- central
- subclavicular o apical

Existe un drenaje inferior o submamario que llega a los ganglios infraclaviculares y linfáticos de la mama opuesta. Al confluir estos conductos linfáticos llegan a determinar un retículo periférico a los lobulillo de los que nacen troncos linfáticos que van a drenar los colectores principales de la glándula que son los siguientes:

1.1. Sistema axilar: es el principal colector linfático de la glándula. Los trayectos linfáticos, en forma de troncos, se dirigen a la axila recorriendo la mama en dirección a su prolongación axilar, allí rodean el pectoral mayor y desembocan en los grupos ganglionares de la axila.

1.2. Cadena mamaria interna: drena los cuadrantes internos de la glándula, pero no de manera exclusiva. Los troncos linfáticos penetran a través de la aponeurosis pectoral y músculo pectoral mayor y hacia la línea media hasta alcanzar los espacios intercostales y, posteriormente, los ganglios mamarios internos. Estos últimos ganglios se extienden desde el quinto espacio intercostal hasta la confluente yugulo-subclavio hacia arriba.

1.3. Vías accesorias:

- vía interpectoral
- drenaje contralateral: puede hacerse evidente en caso de neoplasias avanzadas
- drenaje supraclavicular directo
- drenaje linfático hacia los ganglios intercostales posteriores

2. Plexo areolar. Recoge el drenaje linfático procedente de la parte central de la glándula, piel, pezón y areola. Drena a los ganglios axilares inferiores, hacia fuera y a los nódulos paraesternales hacia dentro.

2. Patología de la glándula mamaria

Más del 95% de las neoplasias mamarias derivan de los componentes epiteliales de la mama. Se consideran carcinomas y se denominan, específicamente, adenocarcinomas.

Sin embargo, dentro de este término se engloban diversos tipos de lesiones que poseen diferentes aspectos microscópicos y comportamientos (Rosen et al., 1979).

Siguiendo estos criterios los carcinomas mamarios pueden subdividirse en dos grandes grupos:

El cáncer de mama no invasivo (*in situ*). Cuando las células tumorales permanecen confinadas en la estructura ductal, en el lóbulo o no presenta una imagen microscópica que induzca a pensar en una invasión del estroma. Este tipo de lesiones se subdividen, a su vez, en:

- carcinoma ductal *in situ* o carcinoma intraductal
- carcinoma lobular *in situ*

Ambos tipos de lesiones difieren en sus características clínicas, morfología y en su comportamiento biológico. Por ejemplo, mientras la apariencia microscópica del carcinoma lobular es estereotípica, el aspecto histológico de las lesiones de tipo ductal es muy heterogéneo. Esta heterogeneidad no se debe solamente a la morfología, sino también respecto a los marcadores biológicos presentes en los carcinomas ductales *in situ*.

El cáncer de mama invasivo, comprende un amplio número de lesiones muy heterogéneas entre las que cabe destacar, por ser la más frecuente, el carcinoma ductal infiltrante. Se trata, con frecuencia, de tumores sólidos, de color grisáceo, constituyendo masas areniscas que invaden el tejido circundante. Desde el punto de vista microscópico, y basándose en una serie de características morfo-citológicas, los carcinomas ductales infiltrantes se dividen en tres categorías:

- bien diferenciado o grado I
- moderadamente diferenciado o grado II
- poco diferenciado o grado III

El significado pronóstico de esta gradación está ampliamente documentado por diversos estudios clínicos. Aproximadamente un 20% de los carcinomas mamarios invasivos se consideran de características especiales.

Por otra parte, los carcinomas lobulares de tipo infiltrante son menos frecuentes que los de tipo ductal. Estos tumores se presentan con frecuencia de forma bilateral y son a menudo multicéntricos. Mientras algunos autores postulan que el pronóstico de ambos tipos de lesiones invasivas es similar, otros especulan que los casos de carcinoma lobular infiltrante poseen un pronóstico más favorable (Rosen et al., 1979).

Otras variantes de carcinoma de mama invasivo, entre las que se ubican el mucinoso (coloidal), el tubular y, por último, el papilar poseen mejor pronóstico que los carcinomas ductales infiltrantes. Los carcinomas medulares son pronósticamente más favorables que los carcinomas ductales infiltrantes con escasa diferenciación (grado III). Las variantes más inusuales de cáncer de mama invasivo son los carcinomas metaplásticos y los carcinomas quísticos adenoides.

Existen algunas características histológicas del cáncer de mama que han sido relacionadas con un peor pronóstico. Entre éstas destacan el grado histológico y la afectación ganglionar.

2.1. Etiopatología del cáncer de mama

El cáncer se caracteriza por el desarrollo de procesos tumorales malignos y se ha convertido en una de las causas más frecuentes de mortalidad. Posee una perspectiva global de curación del 50% que depende de múltiples factores. En la última década la incidencia del cáncer ha crecido hasta convertirse en la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades coronarias (Parkin et al., 1984).

El cáncer de mama es la segunda causa de enfermedad y muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, con más de 12 millones de nuevos casos reportados cada año en todo el mundo.

El cáncer de mama es el tumor maligno que más frecuente se presenta en la población femenina mexicana. Su incremento en las estadísticas es cada vez más parecido al de los países del primer mundo. De ellos el más frecuente es el carcinoma ductal de mama hasta un 65 %.

Tradicionalmente el desarrollo del cáncer se ha asociado a la exposición a agentes químicos o víricos. Sin embargo, también los factores de crecimiento o las hormonas, ya sean estas endógenas o exógenas, actúan promoviendo la división celular lo que incrementa la posibilidad de que aparezcan mutaciones debidas al azar. Este es el caso de algunos tipos de cáncer de mama, del cáncer de tiroides, ovario, próstata, endometrio, testículo y algún sarcoma óseo (Bitnner et al., 1947; Rosen et al., 1979)

En general, la aparición de un fenotipo maligno depende de una serie de mutaciones somáticas que tienen lugar durante la división celular. En el caso del cáncer de mama existen multitud de genes susceptibles de sufrir estas alteraciones. Entre éstos se identifican los genes que participan en la regulación endocrina, aquellos implicados en la reparación del DNA, genes supresores de tumores y, por último, los oncogenes.

Existen, además, factores de riesgo y, en contraposición, factores preventivos que deben ser tenidos en cuenta en la valoración del cáncer de mama (Spencer y Henderson, 2001)

2.1.1. Niveles de estrógenos

Son muchos los estudios llevados a cabo que han permitido correlacionar los elevados niveles de estrógenos en sangre con el desarrollo de cáncer de mama. Esta correlación se encuentra, además, asociada con la edad de manera que el riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa con la edad. A mayor edad el epitelio mamario ha estado expuesto durante más tiempo a las hormonas. Estos niveles hormonales caen radicalmente tras la menopausia pero, aún así, se ha comprobado que aquellas mujeres que padecen cáncer de mama después de la menopausia poseen unos niveles de estrógenos superiores a los de la media de su edad. (Henderson et al., 1982,1988; Key et al., 1988).

2.1.2. Edad de la menarquia

Los estudios llevados a cabo en adolescentes han demostrado que el riesgo de padecer cáncer de mama decrece en un 20% por cada uno de los años en que se retrasa la menarquia. Ésta es más tardía si se practica deporte y es más temprana en las sociedades occidentales que en las orientales (Ferguson et al., 1981; Frisch et al., 1981; Kaprio et al., 1995).

2.1.3. Menopausia

Una menarquia temprana asociada a una menopausia tardía incrementa el número de ciclos ovulatorios y por lo tanto el tiempo en el que la mujer está expuesta a elevados niveles de estrógenos. Siguiendo este criterio, las mujeres cuya menopausia tiene lugar a una edad inferior a 45 años poseen un 50% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas cuya menopausia tiene lugar después de los 55 años (Trichopoulos et al., 1972).

2.1.4. El peso

Este es un factor cuyo efecto varía en función del estado menopáusico de la mujer. En este sentido, en la mujer postmenopáusica un incremento de 10 kilos sobre su peso óptimo, calculado en función de su edad, estatura y constitución física, incrementa en un 80% el riesgo de padecer cáncer de mama. Se estima que ello se debe a las transformaciones químicas que sufren los lípidos endógenos, dando lugar a un aumento de los niveles de estrógenos circulantes. En cambio, en las mujeres premenopáusicas el efecto del sobrepeso es más contradictorio. En ocasiones se ha llegado a considerar este factor como beneficioso. Así, el sobrepeso se asocia con frecuencia a ciclos anaovulatorios, por lo que los niveles de estrógenos son menores a los correspondientes a su media de edad, con lo que se reduce la posibilidad de desarrollar cáncer de mama (Willett et al., 1985).

2.1.5. Actividad física

En general, los estudios realizados indican que el ejercicio físico reduce el riesgo de padecer cáncer de mama, sobre todo en adolescentes y en la mujer postmenopáusica.

Sin embargo, es este un factor difícil de tener en cuenta, ya que el tipo de actividad física y el grado de desarrollo de la misma son aspectos que alteran la respuesta. Por otra parte, en el grupo de edad intermedia no se ha podido encontrar ningún beneficio en el desarrollo de alguna actividad física con el fin de reducir el riesgo de padecer cáncer de mama (Bullen et al., 1985).

2.1.6. Lactancia

Una lactancia más duradera acarrea un menor riesgo de padecer cáncer de mama debido a que ésta es una etapa anaovulatoria en la que los niveles de estrógenos son reducidos y por lo tanto el desarrollo tumoral no está favorecido (Romieu et al., 1996).

2.1.7. Embarazo

También la edad del primer embarazo, así como el tiempo que transcurre entre embarazos altera la susceptibilidad de padecer cáncer de mama. En este sentido, se ha observado que las madres primerizas a una edad inferior a 20 años tienen la mitad de riesgo de padecer una patología mamaria que las primerizas a edades más tardías. El riesgo es aún mayor en las primíparas mayores de 30 años. Las probabilidades de padecer cáncer de mama se triplican en las mujeres cuyos embarazos son muy sucesivos, al igual que ocurre con las mujeres que sufren sucesivos abortos durante el primer trimestre de gestación, debido a las frecuentes oscilaciones hormonales (Wingo et al., 1997).

2.1.8. Terapias hormonales sustitutivas

Estos tratamientos, aplicados con el fin de reducir los efectos de la menopausia, han demostrado poseer efectos secundarios que incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama. Los tratamientos hormonales suministrados hasta ahora trataban de restablecer los niveles de estrógenos. Debido a ello, el riesgo de padecer cáncer de mama se incrementaba 2,5 veces por cada uno de los años en que se había seguido este tratamiento. En la actualidad se emplean

tratamientos hormonales combinados, de manera que se ha logrado disminuir el riesgo ocasionado por los estrógenos (Laya et al., 1996).

2.1.9. Uso de anticonceptivos orales

Los macroestudios llevados a cabo sobre este tipo de anticonceptivos no han demostrado que exista una correlación entre el desarrollo de una patología mamaria y la edad en la cual se inicia la toma de anticonceptivos. Tampoco existe relación con el tiempo durante el que se toman éstos (Feigelson et al., 1999).

2.1.10. Historia familiar y predisposición hereditaria

Una historia familiar en la que exista un caso de cáncer de mama incrementa el riesgo de padecer la enfermedad. Éste es aún mayor en el caso de que esta pariente sea de primer grado, haya sufrido la enfermedad muy joven, además de haberla padecido de forma bilateral (Feigelson et al., 1996).

En muy pocas ocasiones este tipo de cánceres hereditarios está ocasionado por una única mutación génica. Sin embargo, las mutaciones germinales de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, junto con las de *p53* y las del gen *ATM*, han demostrado ser frecuentes en este tipo de patología. El cáncer hereditario representa el 10% de los cánceres de mama y se ha especulado que es la combinación de factores genéticos y ambientales la que altera la penetrancia y expresión de este tipo de genes, que se estudian con más detalle con posterioridad (Easton et al., 1993).

2.1.11. Dieta

Los múltiples estudios llevados a cabo sobre este aspecto han demostrado la existencia de una relación entre la alimentación y el desarrollo del cáncer. En el caso del cáncer de mama se ha observado que existe una correlación positiva entre la ingesta de grasas y la predisposición a padecer la enfermedad. También se correlaciona con el consumo de alcohol, ya que éste incrementa los niveles plasmáticos de estrógenos. Por el contrario, el consumo de fibra resulta beneficioso al reducir la reabsorción de los estrógenos liberados por la vesícula biliar. En la actualidad, se están valorando los beneficios del consumo de soja, y más concretamente de los fitoestrógenos que contiene, se especula que actúan como antagonistas de los estrógenos endógenos (Armstrong et al., 1975; Heber et al., 1991).

2.1.12. Pesticidas xenobióticos

En contraposición a lo que ocurre con los fitoestrógenos, los xenobióticos, o estrógenos ambientales (pesticidas), se consideran agonistas de los estrógenos endógenos, por lo que incrementan el riesgo de padecer patologías mamarias (Ramamoorthy et al., 1997).

3. Patología molecular del cáncer de mama

Al estudiar la patología molecular del cáncer de mama hay que diferenciar claramente dos tipos de causas. Así, podemos distinguir entre el cáncer de mama en cuyo origen subyace una predisposición genética y aquellos que se desarrollan de forma esporádica (Hibshoosh y Lattes, 1997).

3.1. Cáncer de mama hereditario

El cáncer de mama hereditario representa aproximadamente un 10% del total de las patologías de mama. Éste engloba el síndrome de cáncer de mama y ovario, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Cowden y la ataxia telangiectasia (AT) (Dillon et al., 1998).

Los genes más comúnmente asociados a este tipo de síndromes son las alteraciones de *BRCA1* y *BRCA2*, las mutaciones germinales de *p53*, las del gen *ATM* y *PTEN* además de múltiples polimorfismos.

3.1.1. *BRCA1*

Se trata de un gen mapeado en el cromosoma 17 (17q21). Está compuesto por 24 exones que codifican para una proteína de 1863 aminoácidos. El hecho de que el dominio N-terminal de la proteína posea una estructura en dedos de zinc hace suponer que es un factor transcripcional. Por el contrario, el dominio C-terminal de la proteína contiene, por una parte, una región con carga negativa que participa en la regulación de la expresión génica y otra región de unión a Rad51, una proteína de reparación del DNA.

En estado nativo *BRCA1* es una proteína nuclear cuya expresión es frecuente en tejidos con respuesta hormonal como es el caso de ovario, timo, testículo y mama. La proteína *BRCA1* inhibe la progresión del ciclo celular inhibiendo la quinasa dependiente de ciclinas *p21^{waf1}* e interaccionando con *BRCA2*, *c-Myc*, γ -tubulina y la RNA helicasa A.

Se han descrito más de 500 mutaciones diferentes del gen *BRCA1* que en un 80% de los casos suponen la aparición de un codón de parada, lo que da lugar a una proteína de menor tamaño, no funcional (Claus et al., 1991).

3.1.2. *BRCA2*

Este gen está localizado en el cromosoma 13 (13q12-q13). Su secuencia fue conocida por completo en 1996 y se trata de un gen de 70kb, compuesto de 27 exones, que codifica una proteína de 3418 aminoácidos. Esta proteína nuclear se une a Rad51 junto con *BRCA1* y una acetiltransferasa de histonas, capaz de relajar la cromatina, facilitando la transcripción. De estas observaciones se deduce que ambos genes participan en fenómenos de reparación de los posibles errores presentes en el DNA de doble cadena. La expresión del gen *BRCA2* es muy elevada en la mama y el timo, siendo ésta menor en el ovario, pulmón y bazo.

En el caso de *BRCA2* también se han encontrado multitud de mutaciones y el 90% de éstas dan lugar a una proteína de menor peso molecular, al igual que ocurría con *BRCA1*. Las mutaciones de *BRCA2* se encuentran con frecuencia asociadas con mutaciones somáticas de *p53*, mientras que no suelen coexistir con la sobreexpresión de la proteína HER-2. Algunas mutaciones de estos genes se asocian a determinados grupos étnicos como es el caso de los judíos ashkenazi (Phillips et al., 1999).

3.1.3. *p53*

Aproximadamente el 50% de las mutaciones germinales de *p53* se asocian con el síndrome de Li-Fraumeni. Se trata de un extraño tipo de alteración de carácter autosómico dominante caracterizada por el desarrollo de multitud de masas tumorales a muy temprana edad. Éstas suelen ubicarse en hueso, mama y cerebro, además de dar lugar a leucemias y carcinomas adrenocorticales. Sin embargo, menos del 1% de los tumores de mama presentan mutaciones germinales de *p53* (Borresen et al., 1992).

3.1.4. *ATM*

En el gen *ATM*, localizado en 11q22-23, se han encontrado más de 300 mutaciones distribuidas a lo largo de sus 150 kb y 66 exones. Aproximadamente el 85% de éstas dan lugar a una proteína truncada y defectiva. La proteína ATM es un miembro de la familia de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K). Su función es detectar los daños existentes en el DNA y activar los mecanismos de control del ciclo celular (Gatti et al., 1999).

La ataxia telangiectasia es el clásico síndrome, hereditario, asociado a la mutación de *ATM*. Se trata de un síndrome de carácter autosómico recesivo en el que los heterocigotos para *ATM* manifiestan neurodegeneración, inmunodeficiencias, sensibilidad a la radiación ionizante, alteraciones de la regulación del ciclo celular y predisposición a determinados tipos de cáncer. Esta predisposición da lugar al desarrollo de linfomas primarios, leucemias y en menor medida a la aparición de tumores sólidos. En mama, las típicas alteraciones de *ATM* encontradas son mutaciones “missense” y aquellas que originan una proteína truncada.

3.1.5. *PTEN*

PTEN/MMMAC1/TEP1 es un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 10 (10q23.3). Este gen codifica para una proteína con actividad fosfatasa que actúa tanto sobre el propio fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) como sobre sus sustratos proteicos. Las mutaciones identificadas en este gen pueden ser homocigóticas o heterocigóticas, siendo éstas últimas frecuentes en pacientes con cáncer de mama bilateral.

Las alteraciones germinales del gen dan lugar al síndrome de Cowden, de carácter autosómico dominante, al que se asocian multitud de cánceres como los de mama, tiroides y cerebro, además de otras lesiones benignas. Este síndrome también lleva implícito una alteración del desarrollo denominado síndrome Bannayan-Zonana.

Entre un 30-50% de las mujeres que poseen la mutación en la línea germinal desarrollan cáncer de mama. Estas alteraciones no se correlacionan con el cáncer de mama esporádico ni tampoco se presentan en tumores de mama de tipo familiar generados por otras mutaciones germinales como son las de *BRCA1*, *BRCA2*, *p53* o *ATM* (Chen et al., 1998; Dunning et al., 1999).

3.1.6. Polimorfismos génicos

Se define polimorfismo como la presencia de múltiples alelos de un gen en una población. Así, existen lo que se denominan marcadores polimórficos que se transmiten a la siguiente generación y que se utilizan para caracterizar el riesgo que posee un individuo de sufrir una enfermedad. En el caso del cáncer de mama se ha encontrado una correlación positiva entre el desarrollo del mismo y ciertos polimorfismos como pueden ser los del gen *CYP19*(TTA)_n, los del gen *GSTP1* Ile105Val y los de *p53* Arg72Pro. Los polimorfismos de *GSTM1* se correlacionan con el cáncer de mama postmenopáusico (Dunning et al., 1999).

3.2. Cáncer de mama esporádico

Se han identificado multitud de loci potencialmente implicados en el cáncer de mama esporádico de los que, en muchas ocasiones, no se conoce con exactitud la función del gen en el que se encuentran estas mutaciones.

Se incluyen entre éstos la delección de 3p (*FHIT*, 34-45% de los casos), delecciones de 10q (*PTEN*), delecciones de 13q (*BRCA2* y *Rb*, 35-75% de los casos), amplificaciones de 8q (*c-myc*, 15%), amplificaciones de 11q (*CCND1*, 15-20%), delecciones 16q (*CDHI*, 57-85%); delecciones de 17p (*p53*, 41-73%), y la delección de 17q (*BRCA1*) y sus amplificaciones (*HER-2/neu*, 30-70%) (Ingvarsson et al., 1999).

También se ha establecido una correlación entre la presencia de determinadas alteraciones génicas y el grado histológico del cáncer. Siguiendo este criterio podemos encontrar lesiones no neoplásicas y que, sin embargo, tienen pérdida de heterocigosidad (LOH) en algunos loci (3p22, 11p15, 17p13). En las hiperplasias epiteliales nos encontramos con pérdidas de heterocigosidad (LOH de 16q, 17p y 17q) que también se encuentran en el caso de las hiperplasias atípicas (AH) (LOH de 11q13, 16q, 17p, y 17q).

Por otra parte, los carcinomas *in situ* se asocian con alteraciones de *p53*, del gen *Rb* y *HER-2/neu*, y pérdidas de heterocigosidad (LOH en 11q13 y en 16q). El desarrollo del carcinoma invasivo se asocia con múltiples alteraciones, tales como las del gen *cmyc*, las ciclinas D1 y E, la de p27, además de la alteración de la actividad telomerasa.

Por último, se ha demostrado que los carcinomas metastásicos se encuentran asociados con alteraciones de *nm23*, el gen *maspín*, a las de la E-caderina y de *MMp/TIMPs* (Dillon et al., 1998).

3.3. Regulación del ciclo celular y cáncer de mama

La progresión normal del ciclo celular se encuentra altamente regulada por multitud de elementos coordinados entre sí. Por ejemplo, el balance entre los niveles de ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (cdks) y quinasas activadoras de cdk, se encuentra estrechamente regulado. Lo mismo ocurre con los procesos que, a su vez, regulan su activación, por fosforilación, así como su inhibición, mediada por INK4 (p15, p16, p18, y p19) y por las proteínas KIP/CIP (p21, p27, y p57). Por último, el control transcripcional ejercido por pRb, p53 y otras proteínas asegura que la progresión del ciclo celular transcurra sin errores y que tenga lugar únicamente en presencia de los estímulos fisiológicos necesarios.

En presencia de algún estímulo que promueva el crecimiento, la ciclina D1 forma un complejo con las quinasas dependientes de ciclinas, cdk4 ó cdk6. Una vez formado, este complejo es capaz de fosforilar la proteína del retinoblastoma (pRB). Este proceso libera el factor transcripcional E2F que permanecía inactivo unido a pRB. E2F promueve la transcripción de la ciclina E, lo que se traduce en la progresión del ciclo celular de la fase G₁ a la fase S.

Sin embargo, se han descrito un gran número de alteraciones que desestabilizan esta estricta regulación y que acaban dando lugar al desarrollo de neoplasias. Así, se han identificado amplificaciones del gen regulador de la ciclina D1, *CCND1*, en aproximadamente el 15-20% de los casos de cáncer de mama. También se ha observado sobreexpresión de la ciclina D1 en el

40% de los casos de cáncer de mama (hasta en un 70% en los carcinomas ductales no invasivos) que coincide, con frecuencia, con la sobreexpresión de la proteína HER-2 (Wang et al., 1994).

La sobreexpresión de la ciclina D1 se correlaciona con la presencia de receptores de estrógenos (RE), lo que se asocia a buen pronóstico y óptima respuesta a tratamientos con tamoxifeno. Por el contrario, la sobreexpresión de la ciclina E es una alteración poco frecuente y los tumores que la expresan carecen de expresión de receptores de estrógenos y no responden a quimioterapia.

En cuanto a la expresión de la proteína p27, ésta es regulada negativamente en presencia de estímulos mitógenos. La proteína p27 es miembro de la familia cip/kip, inhibidores de cdk. Sus niveles permanecen elevados en células que no se dividen y su sobreexpresión se traduce en la parada del ciclo celular en la fase G1. Sin embargo, en el 56% de los casos de cáncer de mama su expresión está disminuida, por lo que el normal funcionamiento del ciclo celular está alterado (Catzavelos et al., 1997).

Otra proteína, imprescindible en la normal regulación del ciclo celular, es la fosfoproteína de 53 kDa p53. Ésta se expresa y activa en respuesta a daños en el DNA, mecanismo que pretende prevenir la acumulación de células con daños en su material genético. Se ha demostrado que p53 media en la respuesta de las células cancerígenas a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia. En células de cáncer de mama las mutaciones del gen que codifica para p53 ocurren con frecuencia (30-40%) (Falette et al., 1998).

En general, se trata de mutaciones que dan lugar a una proteína defectiva que se acumula en las células. El 80% de estas mutaciones tienen lugar entre los exones 5 y 8, con mayor frecuencia en los codones 175, 248, y 273.

Las mutaciones de p53 se asocian con tumores de alto grado, más concretamente con carcinomas *in situ*, que ofrecen resistencia a quimioterapia y radioterapia, dan lugar a recaídas tempranas y al desarrollo de metástasis ganglionares. Se estima así que, en pacientes en los que no existe afectación ganglionar, la supervivencia esperada es de un 56% en ausencia de mutación de p53, mientras que ésta se reduce a un 28% si existe mutación. Cuando existe afectación ganglionar la supervivencia se estima en un 33% con la mutación de p53 y de 71% en su ausencia (Blaszyk et al., 2000).

3.4. Factores de crecimiento y cáncer de mama

Tanto el desarrollo normal de la mama como el crecimiento de las células cancerosas mamarias recibe una clara influencia hormonal. Distintos estudios han demostrado que este tipo de tejido posee una serie de moléculas de membrana, comúnmente denominadas receptores de membrana, que se caracterizan por ser los sitios de unión de distintos factores de crecimiento. Este es el caso de la familia de receptores HER (Yarden, Y., 2001).

3.4.1. Receptores de membrana con actividad tirosina quinasa: la familia HER

La evolución de la vía de señalización mediada por los miembros de la familia HER se ha producido en paralelo a la evolución de las formas de vida compleja. Se han localizado, así, receptores de semejantes características a HER en formas de vida sencilla. Se han encontrado, además, formas ancestrales de la molécula con actividad tirosina quinasa en invertebrados. Este es el caso del gusano *Caenorhabditis elegans*, que posee un único receptor, semejante a HER, capaz de unir un único tipo de ligando (Aroian et al., 1999).

Un caso más evolucionado es el de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, cuyo organismo posee receptores con estructura semejante a HER y en este caso capaces de unir hasta 4 ligandos distintos (Wasserman et al., 1997).

En cambio, los mamíferos se caracterizan por poseer una familia de receptores formada por cuatro miembros, HER-1 (EGFR), HER-2, HER-3, HER-4, todos ellos estrechamente relacionados entre sí, capaces de unir una amplia variedad de ligandos (Stein et al., 2000). Estos cuatro miembros son codificados por cuatro genes homólogos.

Estos receptores de membrana se han localizado en multitud de tejidos e interaccionan con ligandos que actúan como factores de crecimiento.

Todos los receptores de la familia HER se ubican en la membrana y comparten una estructura semejante. Poseen un dominio extracelular de unión a ligando rico en cisteínas, una fracción transmembrana de carácter lipofílico y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. A diferencia de los restantes componentes de la familia HER, HER-3 carece de algunos residuos pertenecientes al dominio catalítico, habitualmente invariables en las proteínas con actividad quinasa. Este hecho nos indica que este miembro de la familia posee una débil actividad quinasa.

3.4.2. El papel de la familia HER en el desarrollo

Esta familia de receptores de factores de crecimiento desempeña un importante papel en el desarrollo humano. En el feto humano HER-2, uno de los miembros de dicha familia, se ha detectado en el sistema nervioso, en los huesos en desarrollo, en piel, músculo, corazón, pulmón y epitelio intestinal (Morris et al., 1999). La secreción, por parte del endocardio, de factores de crecimiento activa el receptor HER-4 que, junto a HER-2, participa en el desarrollo del ventrículo (Meyer et al., 1995). La ausencia de HER-2 en los embriones de ratón en desarrollo supone la muerte de los animales en el útero materno.

Después del nacimiento, HER-2 está implicado en el crecimiento y desarrollo normal de la mama. Se ha comprobado que los ligandos del tipo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y neuregulinas, que se unen a los receptores de esta familia, estimulan el desarrollo de la ración lóbulo-alveolar de la glándula mamaria del ratón (Henninghausen et al., 1998).

El gen de rata *neu* se aisló de un neuroblastoma de rata, mientras que su homólogo normal se aisló de una librería de cDNA de rata y humano. La variabilidad de nombres que le han signado son el producto del descubrimiento de genes homólogos, implicados en la patogenicidad del eritroblastoma de pollo (*erbB*) y de los genes codificantes para receptores de factores de crecimiento en el hombre (HER).

La denominación más común es la de HER. *HER-2* es un proto-oncogén ubicado en el cromosoma 17q21. Este gen codifica para una glicoproteína transmembrana de 1255 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 185 kDa denominada p185^{HER-2} que, en muchas ocasiones, se denomina simplemente HER-2.

3.4.3. La activación de los receptores de la familia HER

Los receptores proteicos de la familia HER se encuentran en forma de monómeros en la membrana plasmática. La activación de estos receptores requiere normalmente de la presencia

de pequeñas moléculas, denominadas ligandos, y de otros receptores pertenecientes a la misma familia.

Tras la unión del ligando a su respectivo receptor se produce la dimerización de los receptores. Los cuatro miembros de la familia pueden asociarse entre sí para formar hasta diez diferentes dímeros, ya sean homodímeros o heterodímeros. La estructura formada por el dímero unido a su ligando es mucho más estable que la forma monomérica. Todos los ligandos de esta familia poseen un dominio de 50 a 55 aminoácidos cuya estructura es semejante a la del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y en la que existen seis residuos de cisteína altamente conservados entre las distintas isoformas (Alroy y Yarden, 1997).

HER-1 es capaz de unir varios ligandos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$), la anfiregulina (AR), el factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), la betacelulina (β -cel) y la epiregulina. Tanto HER-3 como HER-4 se unen a multitud de neuregulinas, también denominadas factores de diferenciación de *neu* (NDFs), todos ellos péptidos de diferente estructura. HER-2, en cambio, es conocido como el receptor huérfano por carecer de ligando conocido.

3.4.4. La unión del ligando a los receptores HER

Como hemos señalado anteriormente, en la actualidad no se conoce el ligando de HER-2. Sin embargo, se ha observado que HER-2 es capaz de unir ligando, de forma indirecta, al interactuar formando heterodímeros con los restantes miembros de la familia HER. Así, actuaría como co-receptor favoreciendo la formación de los heterodímeros y participando en la transducción de señal.

Estudios llevados a cabo recientemente han demostrado que los ligandos de la familia HER son en realidad moléculas bivalentes, es decir, poseen dos lugares de unión para los receptores HER. Así, la neuregulina-1 posee un sitio de unión de alta afinidad, próximo al extremo N-terminal y otro de baja afinidad, próximo, en este caso, al extremo C-terminal.

Estos estudios sugieren que se produciría unión de HER-1, HER-3, o HER-4 al lugar de elevada afinidad del ligando, y otra unión de baja afinidad al otro componente del homo- o heterodímero, que con frecuencia es HER-2. En efecto, la interacción entre los miembros de la familia HER no ocurre al azar sino que existe una clara jerarquía que hace que HER-2 sea el co-receptor de elección para la formación de estos dímeros (Tzahar et al., 1996; Olayioye et al., 1999).

De esta manera HER-2 actúa como co-receptor y participa en la transducción de señal, pese a ser un receptor carente de ligando específico. Por este motivo, en las líneas celulares de cáncer que sobreexpresan HER-2 se fomenta la formación de los heterodímeros de los restantes miembros de la familia HER con HER-2, dando como resultado la transducción de señal al núcleo y que en último lugar conduce a la activación de genes nucleares y a la división celular (Beerli et al., 1995; Graus-Porta et al., 1995).

La transfección de los distintos miembros de la familia HER en líneas celulares que no expresan ninguno de estos receptores permitió elucidar cual era el papel fisiológico de cada uno de éstos. En presencia de EGF o TGF las células transfectadas con HER-1 crecían normalmente. Sin embargo, las células transfectadas con HER-2 no sobrevivían en presencia de

estos ligandos, hecho que confirma que no existe una interacción directa entre HER-2 y el ligando.

3.4.5. La señalización activada por HER-2

Considerando el gran número de interacciones que existen entre los diferentes miembros de la familia HER, es imposible pensar que las vías de señalización iniciadas por los mismos sean de tipo lineal. Por el contrario, se trata de un sistema de señalización muy interactivo en el que los ligandos pueden dar lugar a la formación de diferentes homodímeros y heterodímeros que interaccionan estimulando varias vías de señalización.

Realmente el patrón de transducción de señal se puede subdividir en varios pasos. Una primera etapa en la que se produce la llegada de la señal iniciadora, el factor de crecimiento. Una segunda etapa en donde se produce el procesamiento de la información, en la que intervienen los receptores, proteínas con grupos SH2 y factores transcripcionales. Por último, surge el resultado, es decir, la división, diferenciación o migración celular.

La dimerización de los receptores de la familia HER permite la difusión de diferentes tipos de mensajes a la célula (Olayioye et al., 1999). Para que esto ocurra debe existir un estricto mecanismo de coordinación y se ha especulado que HER-2 desempeña este papel y la ausencia de ligando conocido para HER-2 ha reforzado esta hipótesis.

3.4.6. La importancia de HER-2 en el tratamiento del cáncer por inmunoterapia

Como señalamos con anterioridad, la combinación de los distintos miembros de la familia HER origina hasta diez posibles homo- y heterodímeros en la membrana celular. La participación de HER-2 en los heterodímeros permite una unión más estable con el ligando, motivo por el que ésta combinación posee una mayor potencia biológica. Los otros dímeros HER envían las señales necesarias para el crecimiento celular y no participan en el desarrollo tumoral. A raíz de estos datos, en los últimos tiempos se están desarrollando anticuerpos específicos para HER-2 destinados a inhibir el crecimiento tumoral promovido por este receptor. Éstos han demostrado tener una efectividad variable, ya que mientras algunos consiguen una inhibición casi completa del crecimiento tumoral, otros solamente son antagonistas parciales e, incluso, algunos promueven este crecimiento. Al parecer, éstos últimos no serían procesados por las células tumorales (Klapper et al., 2000).

Por el contrario, los anticuerpos que más efectividad han demostrado son aquellos rápidamente internalizados y metabolizados por las células cancerígenas que sobreexpresan HER-2, interacción que da lugar a una endocitosis del receptor. Una vez internalizado el receptor ya no puede interaccionar con los restantes miembros de la familia HER. De esta manera, HER-2 no puede formar heterodímero y su potencial señalizador y, consecuentemente, el crecimiento tumoral, se ven mermados (Kasprzyk et al., 1992).

3.4.7. La degradación de HER-2

En general, el mecanismo habitual de degradación del receptor unido a su ligando implica la endocitosis del complejo, de manera que la vesícula formada constituye el endosoma temprano. En este endosoma el ligando puede separarse del receptor para que éste último sea reciclado a la membrana celular, o bien acabar en el lisosoma para ser degradado.

Esto es lo que ocurre, por ejemplo, con el homodímero formado por HER-1 que es degradado por vía lisosomal (Levkowitz et al., 1999). Sin embargo, cuando se forman heterodímeros constituidos por HER-1 y HER-2, HER-1 no es degradado sino que es reciclado a la membrana celular. Esto permite que también la transducción de señal mediada por HER-1 se prolongue desempeñando, sin duda, un papel en la oncogénesis.

El proceso de selección de los endosomas tempranos es crítico puesto que permite que determinados receptores sean degradados, mientras que otros sean devueltos a la membrana celular en donde continúan su función de señalización. En este sentido, las investigaciones llevadas a cabo han permitido identificar una proteína adaptadora, denominada c-Cbl, que se encarga del control del proceso de reciclaje o degradación.

La unión de esta proteína adaptadora, junto con la del ligando, conduce al receptor a su degradación por la vía lisosomal. La interacción que se produce entre HER-1 y c-Cbl es fuerte, en cambio, la unión de la proteína adaptadora con HER-2 es muy laxa, mientras que no interacciona con HER-3.

Como su nombre indica, se trata de una proteína que sirve de adaptador entre los receptores y un enzima con actividad ubiquitinadora denominada E2. Esta enzima se une a un dominio específico de c-Cbl, defectivo en formas potencialmente oncogénicas de la proteína adaptadora. La proteína c-Cbl se une, a su vez, al receptor HER en residuos de tirosina fosforilados, lo que favorece su ubiquitinación y permite que éste sea degradado bien por la vía proteasoma o bien por la vía lisosomal (Waterman et al., 2000).

HER-3, que no posee un dominio de unión para c-Cbl, es reciclado continuamente a la membrana celular. Se ha especulado que los anticuerpos dirigidos contra HER-2 refuerzan la unión, normalmente laxa, existente entre el receptor y c-Cbl, promoviendo su degradación.

El componente epitelial del tumor responde a un gran número de factores procedentes del estroma. Cuando existe una sobreexpresión de HER-2 la transducción de señal tiene lugar principalmente por los heterodímeros formados con este miembro de la familia HER. Estos heterodímeros se unen fuertemente al ligando, emitiendo señales de proliferación al núcleo y poseen una elevada tasa de reciclaje a la membrana después de sufrir endocitosis. Este eficiente poder de señalización promueve la división celular y da lugar a la aparición de malignidad (Levkowitz et al., 1999).

Los anticuerpos dirigidos contra HER-2 promueven la destrucción del receptor en el lisosoma, con lo que se reduce la concentración de este tipo de receptor en la membrana celular. Esto obliga a los restantes miembros de la familia HER a formar homodímeros y/o heterodímeros entre ellos, sin la participación de HER-2.

3.4.8. Implicaciones terapéuticas derivadas de la biología de HER2

Los niveles de proteína HER-2 pueden ser hasta cien veces mayores en una célula cancerígena si la comparamos con una célula normal. Este fenómeno se debe, con frecuencia, a amplificaciones del gen codificante para la proteína HER-2 pero, en ocasiones, se debe a alteraciones del normal proceso de transcripción. Las amplificaciones del gen conducen a una mayor transcripción de RNA mensajero y síntesis de proteína HER-2.

En cáncer de mama, el 92% de los casos de sobreexpresión de la proteína son debidos a la presencia de amplificación del gen. La sobreexpresión de HER-2 se ha identificado en todos los

estadios de evolución de la enfermedad aunque no se ha encontrado en lesiones benignas de la mama, lo que sugiere que *HER-2/neu* no está amplificado hasta la aparición de una forma maligna de la enfermedad. La sobreexpresión de HER-2 se mantiene en la etapa de metástasis, lo que indicaría un funcionamiento permanente (Salomon et al., 1989).

Los heterodímeros HER-2/HER-3 confieren una mayor actividad transformante, predisponiendo al desarrollo de neoplasias, por lo que la detección de ambos receptores podría tener una mayor significación clínica y pronóstica que la de cualquiera de ellos de forma aislada.

Debido a su, en ocasiones, elevada expresión, su localización celular que le hace fácilmente accesible y su ya confirmado papel en la aparición de carcinogénesis, HER-2 se ha convertido en una de las principales dianas terapéuticas en cáncer de mama. A todo ello se suma el hecho de que la expresión de HER-2 en las células normales es baja, con lo que se esperan pocos efectos secundarios en estas últimas como consecuencia de los tratamientos aplicados (Zheng et al., 2000).

La proteína HER-2 interacciona, a su vez, de forma directa o indirecta, con un gran número de proteínas celulares que pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo del cáncer. Por este motivo, muchas de estas proteínas pueden convertirse en futuras dianas terapéuticas, con el fin de bloquear la transducción de señal mitógena.

Sin embargo, este bloqueo podría no ser suficiente para inhibir la capacidad oncogénica de HER-2 en su totalidad, ya que la señal podría discurrir a través de una vía alternativa.

Por tanto, y con el fin de lograr un bloqueo completo la estrategia más efectiva es la de reprimir la expresión de HER-2 o bien inhibir la acción de aquellas moléculas situadas en los inicios de la cascada de señalización.

En este sentido, se han producido diversos avances terapéuticos. Por una parte, han surgido los métodos destinados a inhibir la expresión o la función de la proteína. Para ello se han desarrollado elementos que inhiben la expresión del gen, otros que alteran el promotor del gen y, por último, se ha intentado bloquear la actividad tirosina quinasa del receptor.

Otra área terapéutica pretende desestabilizar la proteína de la membrana celular favoreciendo su degradación. Pero, sin duda, son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de HER-2 los que más eficacia han demostrado, en el caso de tumores que sobreexpresan este receptor. Este es el caso del trastuzumab, comercialmente denominado Herceptin, que ha resultado muy efectivo en el tratamiento de estos tumores, sobre todo en combinación con quimioterapia convencional (Baselga y Mendelson, 1994)

3.4.9. Terapia dirigida: trastuzumab.

A finales de los años 90 se demostró que anticuerpos monoclonales dirigidos frente a HER2 eran capaces de ejercer un efecto antitumoral. Uno de estos anticuerpos, el anticuerpo murino 4D5, era particularmente activo en líneas celulares o tumores con sobreexpresión de HER2. La humanización de 4D5 resultó en el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab (Herceptin, Roche, Basel) (Ross JS 1998).

En análisis retrospectivos, se sugirió que sólo las pacientes con tumores con sobreexpresión 3+ y/o amplificación del gen por FISH (Fluorescent in situ hybridization) se beneficiaron de trastuzumab (Cobleigh MA.1999)

De manera muy remarcable, el uso de Trastuzumab adyuvante (post-operatorio) en pacientes con cáncer de mama precoz HER2 positivo reduce a la mitad el riesgo de recaídas y reduce en un tercio el riesgo de mortalidad. Estos resultados están avalados por cinco estudios fase III multicéntricos con un reclutamiento de más de 13.000 mujeres (Rommond y Untch 2005-2008).

Todos los ensayos de trastuzumab adyuvante incluyeron pacientes con cáncer de mama invasivo, HER2 positivo por inmunohistoquímica (IHQ) (3+), o por FISH. En uno de los ensayos la detección se hizo por CISH (Chromogenic in situ hybridization). Colectivamente, hubo diferencias metodológicas en la determinación del estado de HER2 entre los cinco estudios, lo que subraya de nuevo la necesidad de avanzar hacia una estandarización de la técnica y de su interpretación. Además de su eficacia en cáncer de mama metastático y en terapia adyuvante, la adición de trastuzumab a la quimioterapia llega a triplicar la tasa de remisiones completas patológicas cuando se administra de manera neoadyuvante (preoperatoria) en tumores HER2 positivos (Dawood S. 2007).

Además de trastuzumab, recientemente se ha reportado que un inhibidor dual de la actividad tirosina cinasa HER1/HER2, llamado lapatinib (Tykerb, GSK), mejora la evolución clínica de pacientes con cáncer de mama avanzado HER2 positivo cuando se combina con capecitabina, cuando la enfermedad progresa tras el tratamiento con quimioterapia o incluso con trastuzumab (Geyer, 2006).

Se ha reportado también recientemente que el uso de Trastuzumab más capecitabina es también más eficaz que capecitabina sola tras progresión a quimioterapia y al propio trastuzumab (Von Minckwitz G, 2008).

La terapia anti-HER2 comporta también diversos efectos secundarios adversos. Aunque la tolerancia es en general buena, hay riesgos clínicamente relevantes de toxicidad cardíaca. En estudios de tratamiento adyuvante con trastuzumab, entre un 5% y un 15% de pacientes desarrollan disfunción cardíaca tras un seguimiento mediano de tres años o menos, y en un 1% a 4% desarrollan clínica cardíaca significativa (Tan-Chiu E y Pérez EA, 2005-2008). Además, el tratamiento es generalmente de varios meses, y en el caso de la terapia adyuvante la duración recomendada es de 12 meses.

4. Evaluación y gradificación histológica en cáncer de mama, mediante her 2

4.1. Definición de Herceptest

El Herceptest es un ensayo inmunohistoquímico semicuantitativo y es el método usado con más frecuencia aplicado para medir la sobreexpresión de la proteína Her2, ya que mide indirectamente la amplificación y está basada en la habilidad del anticuerpo a identificar la proteína Her2, expresadas en células fijadas de tejido procesado en parafina o congelado.

4.2. Principios de Procedimiento de Herceptest

HercepTest™ contiene los reactivos necesarios para completar un procedimiento de tinción inmunohistoquímica en dos pasos con especímenes procesados de forma rutinaria e incluidos en parafina. Después de la incubación con el anticuerpo primario de conejo de la proteína HER2 humana, este kit utiliza un reactivo de visualización listo para su uso basado en tecnología de dextrano. Este reactivo consiste tanto de moléculas secundarias de inmunoglobulina de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo como de moléculas de peroxidasa de rábano rusticano ligadas a un esqueleto de polímero de dextrano común, lo que elimina la necesidad de una aplicación secuencial de anticuerpos de enlace y anticuerpos conjugados de peroxidasa. La conversión enzimática del cromógeno añadido posteriormente provoca la formación de un producto de reacción visible en el lugar del antígeno. Entonces, el espécimen puede someterse a contratinción y se puede colocar el cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico. Los portaobjetos de control que contienen tres líneas celulares humanas con cáncer de mama incluidas en parafina y fijadas en formol con puntuaciones de intensidad de tinción de 0, 1+ y 3+ se suministran para validar las secuencias de tinción. La intensidad de tinción de estas líneas celulares se ha relacionado con el número de receptores por célula. HercepTest™, número de catálogo K 5204, se puede aplicar tanto en tinción manual como automática, utilizando el Autostainer.

HercepTest™ se interpreta como negativo para la sobreexpresión de la proteína HER2 (con intensidad de tinción 0 y 1+), débilmente positivo (con intensidad de tinción 2+) y altamente positivo (con intensidad de tinción 3+). HercepTest™ no está pensado para ofrecer información de pronóstico a los pacientes y médicos y no se ha validado a este efecto. Para cada secuencia de tinción, deben examinarse los portaobjetos del modo presentado en la tabla anterior para determinar la validez de la secuencia de tinción y permitir una evaluación semicuantitativa de la intensidad de tinción del tejido muestra.

Para cada secuencia de tinción, deben examinarse los portaobjetos para determinar la validez de la secuencia de tinción y permitir una evaluación semicuantitativa de la intensidad de tinción del tejido muestra.

4.3. Recomendaciones de FDA y Herceptest

La fijación del tejido debe realizarse en formol buffereado al 10%, por lo menos 6 hrs en caso de tratarse de biopsias y 24 hrs en caso de tratarse de tumorectomías, cuadractecomías o mastectomías, para evitar la pérdida de ácidos nucleicos y epitopes.

La selección del tejido debe de incluir áreas con componente invasor predominante, evitando áreas de carcinoma in situ.

Descartar áreas de fibrosis, inflamación, con artificios y áreas mal fijadas.

La sobreexpresión del Her 2 neu solo será evaluada en la membrana citoplásmica,

El uso de controles apropiados es importante (el control 3+ solo NO es suficiente; se debe utilizar un control extra ya sea mama normal que no expresa Her2 y/o control negativo 0)

Se debe poner atención al patrón de tinción, ya sea homogéneo vs heterogéneo,

No se debe valorar la tinción citoplásmica.

La contratinción no debe ser fuerte.

Reconocer artefactos de tinción.

La tinción del epitelio normal de la mama es rara.

Los cortes deben ser de 5 micras, no mayor a 6 semanas de almacenamiento para preservar antigenicidad.

Dentro del estudio inmunohistoquímico para Her 2 neu, existen dos clonas recomendadas por la FDA que son el Herceptest del fabricante DAKO y CB11 del fabricante Ventana. Cada uno presenta un inserto, que son los pasos de protocolo del procedimiento de cada ensayo inmunohistoquímico.

Verificar resultados usando un segundo método de hibridación in situ FISH o CISH que puede discriminar entre polisomía y amplificación. Figura 3

La concordancia entre IHQ e Hibridación in situ debe ser mayor del 95%.

4.4. Interpretación de la tinción.

Basado en la guía de recomendaciones de la ASCO&CAP 2007 para evaluación de Her2 en carcinoma de mama. Figura 4

En la determinación de la sobreexpresión de la proteína HER2, sólo deben evaluarse la intensidad y el patrón de tinción de la *membrana citoplásmica*, utilizando la escala presentada en la tabla siguiente (Tabla 1 y Figura 2).

La evaluación de la laminilla debe realizarla un patólogo con la ayuda de un microscopio óptico. Para la evaluación de la tinción y la puntuación inmunohistoquímica, resulta apropiado un objetivo de aumento 10x. La utilización de un objetivo de aumento 20-40x puede resultar de utilidad para confirmar la puntuación. La tinción citoplasmática debe considerarse como tinción no específica y no se incluirá en la evaluación de la intensidad de tinción de la membrana.

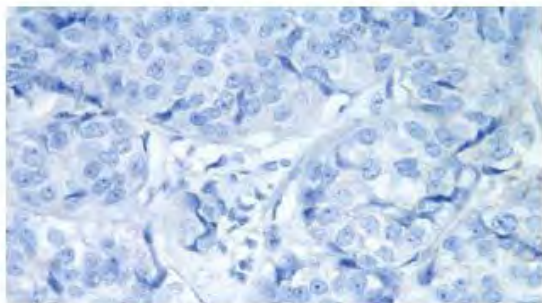
La validación de la prueba de Herceptest se lleva a cabo mediante:

- La verificación de la tinción adecuada de los controles de las líneas celulares. La tinción inadecuada de las tres líneas celulares invalida la prueba.

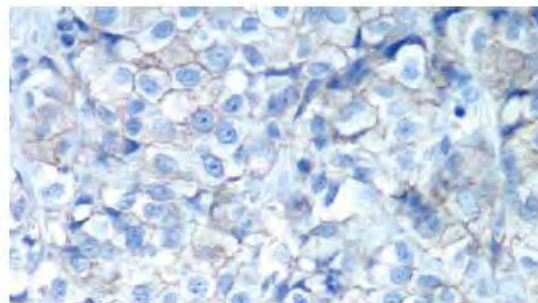
- Verificación el caso de control positivo y el caso de control negativo del propio laboratorio

Patrón de tinción	Puntuación	Evaluación de la sobreexpresión de la proteína HER2
No se observa tinción o la tinción de la membrana se observa en menos de un 10% de las células tumorales	0	Negativa
Se detecta una tinción de la membrana débil o prácticamente imperceptible en más de un 10% de las células tumorales Las células sólo presentan tinción en parte de su membrana	1+	Negativa
Se observa una tinción de membrana completa entre débil y moderada en más de un 10% de las células tumorales	2+	Indeterminado
Se observa una tinción de membrana completa fuerte en más de un 30% de las células tumorales	3+	Positivo inequívoco

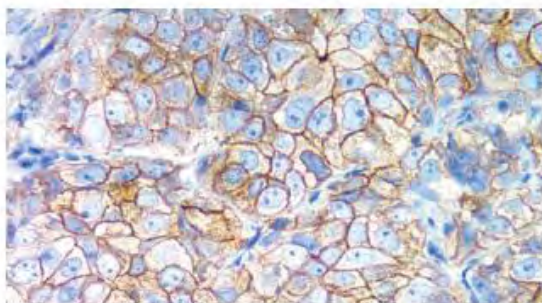
Tabla 1: Evaluación de Her 2, de acuerdo a patrón de tinción e interpretación.



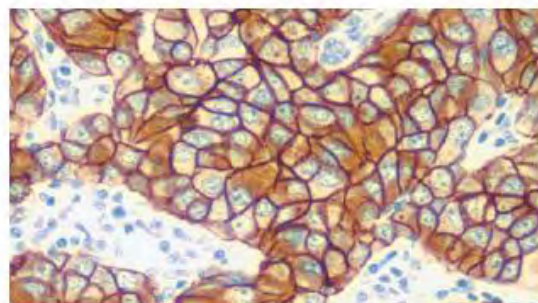
Score: **0** (40x)



Score: **1+** (40x)



Score: **2+** (40x)



Score: **3+** (40x)

Figura 2: Patrones de expresión de Her2

4.5. Fallas en la interpretación:

- Tinción de fondo: es rara pero puede ser causada por: el uso de fijadores no validados, por secado de las preparaciones. El tipo de tinción puede ser difuso en ciertas áreas del tejido. Se debe examinar la preparación de control negativo.
- Tinción citoplásmica: la tinción puede ser difusa y homogénea específicamente confinada al citoplasma. Si no hay tinción de membrana, no se evalúa. Puede ocurrir hasta un 3-5% del total de los casos. Se asocia a tumores con diferenciación neuroendocrina.
- Daño morfológico del tejido:
 - Artificio en el borde: puede estar dado por alteraciones en la fijación o secado del tejido antes de la misma, se observa un aumento en la tinción en el borde, por tanto no se debe evaluar si solo hay positividad en esa área.
 - El artificio de retracción puede verse como pequeños espacios en los que el anticuerpo y el cromógeno pueden precipitar. Suele haber un depósito circular de tinción marrón.
 - El artificio por calor es causado por alteración en el tejido la excisión quirúrgica por electrocoagulación que lesiona la preservación del tejido. Se observa en el borde del mismo y se aprecia menos en el centro. Por tanto el área mejor conservada es el centro del mismo.
 - El artificio por aplastamiento es por compresión del tejido, ocurre durante el proceso de corte y se distorsiona la morfología celular del tejido. Se observa tinción intensa y se observan núcleos condensados.
 - El daño por descalcificador, es intenso por tanto no se deben evaluar tejidos descalcificados.

4.6. Hibridación in situ

La hibridación in situ es la hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de RN con secuencias complementarias (sondas) a ADN/ARN celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables. En general, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (filtros de nylon o nitrocelulosa), en solución (in vitro) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (in situ). Se pueden utilizar sondas marcadas con elementos radioactivos, pero como se necesita protección y manipulación especiales, no son de elección para su uso rutinario. Las técnicas no-isotópicas o colorimétricas son más rápidas y permiten una localización más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables y más baratas. La sensibilidad es igual o levemente inferior a la de los métodos isotópicos. Se han utilizado sondas marcadas con biotina y digoxigenina.

La sensibilidad de la técnica depende de:

- 1) efecto de la preparación del tejido sobre la retención y accesibilidad de ADN celular blanco o ARN
- 2) tipos de sondas, eficiencia de la marcación de la sonda y sensibilidad del método utilizado para la detección de la señal y

3) efecto de las condiciones de hibridación in situ sobre la eficiencia de la hibridación.

4.7. CISH

La técnica de CISH (hibridización in situ cromogenica) permite la detección de la amplificación de genes, del número de cromosomas y de las traslocaciones, usando reacciones peroxidasas tradicionales que pueden aplicarse en tejidos fijados en parafina y se visualizan en el microscopio de luz convencional. Utiliza sondas de ácido nucleico capaces de unirse (hibridar) in situ a secciones complementarias de ácido nucleico presentes en la muestra

4.8. Reporte de CISH

Amplificación: alta (> 10 puntos o grumos por núcleo en > 50% de CT)

baja (5 - 10 puntos o pequeños por núcleo en > 50% de CT)

Sin amplificación: Polisomía (3 - 5 puntos por núcleo en > 50% de CT)

diploide (1 - 2 puntos por núcleo en > 50% de CT)

**American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists
Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor
Receptor 2 Testing in Breast Cancer.
*J Clin Oncol 25:1. 2007***

- **Test positivo:**

IH: Tinción completa de membrana, intensa y uniforme de > 30% de las células en el componente infiltrante (3+)

FISH: >6 copias núcleo (sin sonda centromérica)
Her2/CEP 17 > 2'2

- **Test negativo:**

IH: 0/1+ Ausencia de tinción o tinción débil de membrana incompleta

FISH: <4 copias núcleo (sin sonda centromérica)
Her2/CEP 17 <1'8

- **Test equívoco:**

IH: 2+. Tinción completa de membrana, débil o no uniforme en al menos 10% de las células

FISH: 4-6 copias núcleo (sin sonda centromérica)
Her2/CEP 17= 1'8-2'2

Tabla 2: Correlación Her 2 y FISH

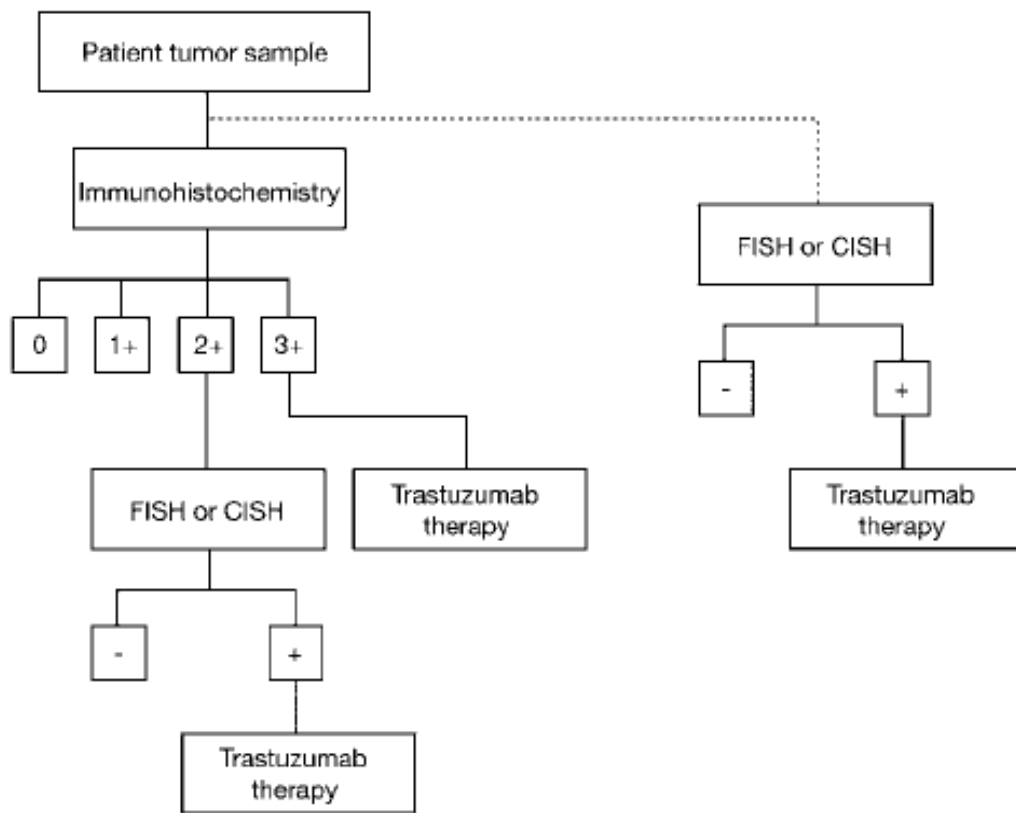


Figura 3: Algoritmo de Interpretación de Her 2

JUSTIFICACIÓN

A nivel institucional (HCSAE PEMEX) el carcinoma mamario es la neoplasia más frecuente en las mujeres adultas teniendo 1513 casos en 10 años(1999-2009), y solo 130 casos de carcinoma cervicouterino en el mismo periodo, teniendo una relación inversa a los datos epidemiológicos nacionales, donde el carcinoma cervicouterino sigue siendo un problema de salud pública.

El carcinoma ductal de mama es la neoplasia más frecuente ya que se presenta hasta en un 65 % del total de los cánceres de mama, y de estos entre el 20 y el 30% presentan sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER-2/neu*.

La determinación por inmunohistoquímica de Her2 neu y receptores hormonales, es fundamental para el tratamiento de cáncer de mama. En el mundo se ha reconocido la necesidad de estandarizar la técnica de realización e interpretación de dichos marcadores, sin embargo en México no existe acuerdo al respecto, para calificar el status del oncogén Her 2 en base a criterios recomendados por la ASCO /CAP 2007

Al obtener un status de Her2 con positividad de membrana 3+ y 2+ con FISH amplificado, el beneficio de tratamiento específico inequívoco para la paciente a través del Herceptin, se verá reflejado en un aumento de sobrevida y alto porcentaje de respuesta al tratamiento; por tanto una mejor calidad de vida.

En cuanto al costo beneficio del estudio, resulta en un costo nulo ya que la inmunotinción con marcadores se hace de rutina en todos los carcinomas ductales infiltrantes de la mama. Así como un beneficio en reducción de costo a nivel institucional, al solo tratarse a las pacientes específicas con Herceptin.

HIPOTESIS

“Si el proceso de tejidos en los cortes de parafina con carcinoma ductal infiltrante tiene un buen control de calidad, y si la inmurreacción del anticuerpo Her2, se realiza bajo lineamientos estandarizados, entonces el tejido no perderá antigenicidad por tanto la evaluación del score de Her2 tendrá una elevada correlación interobservador.”

OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar prospectivamente en un lapso de 14 meses, todos los casos de carcinoma ductal infiltrante con Her 2 neu, cualitativa y cuantitativamente
- Evaluar el control de calidad técnico del proceso de Herceptest, mediante 3 testigos.
- Evaluar del proceso de fijación y de contratinción del tejido problema.
- Confirmación de los casos Her2 (2+) mediante FISH o CISH

Objetivo particular

- La concordancia interobservador entre 3 evaluadores será igual o mayor al 95%, de la inmunorreacción de Her2.

DISEÑO METODOLOGICO

1. Tipo de estudio

Estudio prospectivo, observacional, comparativo, transversal

2. Diseño

2.1 Definición del universo

El conjunto de muestras empleadas en nuestro estudio procedió de la resección quirúrgica de tumores de mama que incluye muestras tumorales que se realizaran entre noviembre de 2007 y febrero de 2009. Dichas muestras fueron obtenidas siguiendo los procedimientos institucionales de este hospital, ya sean biopsias, marcajes, tumorectomías, cuadrantectomías y mastectomías.

También se incluyeron muestras enviadas en bloques de parafina de consultorios de consulta externa de ginecología u oncología o de consultorios periféricos de 16 estados, pertenecientes a esta institución.

2.1.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

- **Inclusión:** todos los casos con carcinoma ductal infiltrante que tengan bloque de parafina representativo del tumor.
- **Exclusión:** todos los casos de carcinoma ductal infiltrante que no tengan bloque de parafina o que el carcinoma infiltrante ya no esté representado en el tejido que se estudia,
- **Eliminación:** todas aquellas muestras que presenten daños por autólisis, o mala técnica de fijación, o artificios, así como material insuficiente. En el caso de que presenten menos de dos controles o testigos necesarios para valoración de Her2.

2.1.2 Método de selección de muestra

Bloque de parafina representativo de carcinoma ductal infiltrante ya sean biopsias, excisionales, insicionales, (trucut o biopsia abierta) tumorectomías, marcajes con arpón, lumpectomías mastectomías y bloques de parafina representativos del tumor enviadas por los servicios de Oncología, Ginecología u otras unidades de adscripción.

2.1.3 Definición de variables

- **Independiente:** Carcinoma Ductal Infiltrante
- **Dependiente:** Resultados de Her2-neu: Negativo 0, Negativo 1+, Positivo 2++, Positivo 3+++ . Resultados de FISH: amplificado o no amplificado.

2.1.4 Materiales y Métodos

Asimismo, y para preservar la integridad de los tumores y la correcta conservación del material biológico, el procedimiento seguido fue el que se describe a continuación:

En primer lugar y tras recibir la pieza de tejido completa, a hacer secciones del mismo con el fin de localizar y aislar los nódulos sospechosos. Una vez aislados, éstos fueron fijados por inmersión en un baño de formol tamponado al 4%. La fijación consigue interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, lo que pretende conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo.

A continuación, las muestras se sometieron a sucesivos tratamientos necesarios para su inclusión en parafina y posterior procesamiento. En primer lugar, las muestras fueron sometidas a un progresivo proceso de deshidratación que permitió eliminar el agua existente en el espécimen. Esta operación se llevo a cabo empleando baños sucesivos, de 2 ó 3 horas de duración cada uno, en alcoholes de graduación creciente 50%, 70%, 80%, 95% y, por último, alcohol absoluto.

Tras la deshidratación las muestras se sometieron a un “aclarado”, proceso en el que se sustituye el agente deshidratante por una sustancia miscible en el medio de inclusión, en este caso se utilizó xilol. Se procedió a sumergir las muestras tisulares en baños sucesivos, 3 de 30 minutos cada uno, en distintos recipientes con xilol. Una vez completado este proceso, se procedió a la infiltración o impregnación de la muestra, que consiste en rellenar o infiltrar completamente la muestra histopatológica con el medio que se va a utilizar para la inclusión en el bloque final.

En el estudio de la histopatología de la mama la sustancia de infiltración empleada es la parafina líquida a una temperatura de 58° a 65° C, dependiendo del punto de fusión de la misma. En este punto, las muestras se pasaron directamente desde el último baño de xilol a un recipiente con parafina líquida. Para facilitar la completa impregnación y eliminar totalmente los restos de xilol se realizaron dos baños sucesivos en diferentes recipientes con parafina líquida de 2 horas de duración cada uno de ellos y un último baño de 4 horas de duración que permite que la impregnación sea perfecta.

Protocolo manual de tinción de Hematoxilina y Eosina

Una vez completada la infiltración de la muestra, ésta fue encastrada en un molde plástico para la confección del bloque característico. Los tejidos infiltrados fueron orientados de forma adecuada, en función de la superficie de interés, en el molde plástico y se recubrieron con la misma parafina líquida con la que habían sido infiltrados. El material plástico del molde junto con un enfriamiento lento a 10°- 15° C confirieron una dureza homogénea al bloque. Este mismo proceso se lleva a cabo con los bloques de parafina para su Reinclusión..

En este punto la muestra en el bloque de parafina se sometió al corte con microtomo. Los cortes, de 5 µm de grosor, se realizaron sobre un recipiente con agua caliente (40-50° C) en donde quedaron flotando, para recogerse posteriormente introduciendo un portaobjetos de forma vertical en el agua de manera que el corte quedó depositado sobre dicho portaobjetos

En primer lugar se eliminó la parafina del corte siguiendo un proceso de desparafinización. Para ello, los cortes histológicos se dejaron en estufa a 60° C durante 14 horas, de manera que la parafina volvió de nuevo a un estado líquido.

Posteriormente, las muestras se hidrataron de forma progresiva para lo que se realizó una primera incubación en xilol durante 20 minutos, seguido de 5 lavados sucesivos de 2 minutos de duración cada uno de ellos en distintos envases que contenían xilol. A continuación, se realizaron lavados sucesivos de los cortes con alcoholes de concentración decreciente, cuya proporción va disminuyendo desde el alcohol absoluto hasta el 70% etanol, seguido de sucesivos lavados que se efectuaron empleando agua bidestilada. De esta manera, la muestra va adquiriendo el nivel de hidratación óptimo para la tinción, ya que los colorantes son miscibles en agua.

La primera tinción a los cortes de tejido fue con Henatoxilina de Harris: 0.5% Hematoxilina, 5% alcohol absoluto, 10% alúmina potásica, 0.25% óxido de mercurio.

Este colorante tiñe específicamente los núcleos celulares. Los cortes se lavaron tres veces sucesivas con agua destilada durante 2 minutos. A continuación se tiñeron durante 3 ó 4 minutos con una solución de 0.5% eosina, que marca el componente citoplásmico, y posteriormente las preparaciones se lavaron tres veces sucesivas con agua destilada durante 2 minutos.

En este punto y antes de proceder a su montaje y posterior observación, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación. Con este fin, los cortes se pasaron por gradientes crecientes de etanol. El primer baño, de 2 minutos, se realizó con 70% etanol para posteriormente pasarlos a un recipiente que contenía 80% etanol, en donde permanecieron 2 minutos más. En este momento las preparaciones se pasaron a un baño de 95% etanol, donde se incubaron 2 minutos antes de ser transferidas a un recipiente con xilol, en donde permanecieron durante un período de 10 minutos.

A continuación, se llevaron a cabo varias inmersiones de un minuto de duración de las preparaciones en diferentes recipientes con xilol con el fin de lograr la perfecta deshidratación de los cortes. Por último, las preparaciones fueron recubiertas con un cubreobjetos impregnado en medio de montaje para histología para asegurar su correcta conservación. Mediante este tipo de tinción se identificaron los nódulos tumorales que fueron posteriormente utilizados.

Protocolo manual de tinción de Herceptest

1) Recuperación antigénica: Colocar en un vaso de Coplin la solución de recuperación antigénica en el baño, y se mantiene la temperatura hasta que la solución desenmascaradora alcanza 95-99°C. Posteriormente se sumergen las preparaciones en el vaso de Coplin y se incuban por 40 min. Se sacan del baño y se deja enfriar 20 min a temperatura ambiente. Se decanta la solución de desenmascaramiento y se lava con Buffer de lavado.

2) Bloqueo de peroxidasa endógena: Para eliminar el exceso de Buffer, y se seca cuidadosamente alrededor de la preparación. Se añade el reactivo bloqueante de peroxidasa y se deja incubar por 5 minutos..

3) Anticuerpo primario o reactivo control negativo: Elimina el exceso de buffer mientras se escurre. Se cubren las muestras con 100ul de anticuerpo primario o control negativo. Se incuban durante 30 minutos.

- 4) Reactivo de visualización: deja escurrir las preparaciones y se añade 100 ul de reactivo de visualización. Se incuba durante 30 min. Se lava suavemente Buffer de lavado, por ultimo se colocan las preparaciones en solución fresca de buffer.
- 5) Solución substrato-cromogeno DAB: se prepara la solución de sustrato cromógeno (1ml substrato: 1 gota de cromógeno), se escurren las preparaciones, y se añade 100 ul de substrato cromógeno DAB, y se deja incubar por 10 minutos. Se lava suavemente Buffer de lavado, por ultimo se colocan las preparaciones en solución fresca de buffer.
- 6) Contratación(hematoxilina): Se añade hematoxilina

Las muestras fueron entonces contrastadas durante algunos segundos con hematoxilina de Harris: 0.5% Hematoxilina, 5% alcohol absoluto, 10% alúmina potásica, 0.25% óxido de mercurio. Antes de ser aplicada a la muestra, la solución se suplementó con 0.8% ácido acético y fue filtrada.

Con el fin de observar las preparaciones, proceso que requiere de un óptimo montaje y facilitar su conservación, éstas fueron progresivamente deshidratadas. Con este fin, y después de eliminar el exceso de colorante de contraste lavando en sucesivas ocasiones las preparaciones con agua destilada, los cortes se pasaron por gradientes crecientes de etanol.

El primer baño, de 2 minutos, se realizó con 70% etanol para posteriormente pasarlos a un recipiente que contenía 80% etanol, en donde permanecieron 2 minutos más. En este momento las preparaciones se pasaron a un baño de 95% etanol, donde se incubaron 2 minutos antes de ser transferidas a un recipiente con xilol, en donde permanecieron durante un período de 10 minutos.

A continuación, se llevaron a cabo varias inmersiones de un minuto de duración de las preparaciones en diferentes recipientes con xilol, con el fin de lograr la perfecta deshidratación de los cortes. Por último, las preparaciones fueron recubiertas con un cubreobjetos impregnado en medio de montaje para histología.

Resumen de Metodología:

- **Paso 1:** El residente de patología, realiza la recolección de tejidos como biopsias, tumorectomías, mastectomías, laminillas (muestras locales) y bloques de revisión (muestras foráneas), enviados por los servicios de Cirugía, Ginecología u Oncología.
- **Paso 2:** Fijación de piezas o biopsias (muestras locales) en formol amortiguado al 10%.
- **Paso 3:** Registro de las mismas en libreta de quirúrgicos.
- **Paso 4:** Descripción de tejidos e inclusión en casetes de cortes representativos
- **Paso 5:** Proceso de tejidos por histotecnólogo:
 - **Muestras locales:** Por medio de deshidratación en Histoquinet (12-24 hrs) Inclusión en parafina, cortes de 5 micras del tejido, desparafinación, tinción con H E, montaje e identificación de laminillas (8 hrs).

- **Muestras foráneas:** Reinclusión en parafina de tejidos procesados en otras unidades de adscripción, corte, tinción y montaje.
- **Paso 6:** revisión e interpretación de laminillas teñidas con Hematoxilina y eosina, para evaluación y gradificación de carcinoma ductal, por patólogo residente y adscrito. (3-4 hrs)
- **Paso 7:** Selección de corte de carcinoma que será marcado con inmunohistoquímica que se registra en libreta correspondiente.
- **Paso 8:** El histotecnólogo se encarga de la realización de técnica de inmunohistoquímica de receptores tumorales: receptores de estrógenos, receptores de progesterona, p53 , Her2-neu, (24-72 hrs) de acuerdo al protocolo de procedimientos de cada Anticuerpo: En caso del Her 2 por medio de los siguientes pasos: Recuperación antigénica, Bloqueo de peroxidasa Endógena, Anticuerpo, Primario o Reactivo control negativo, Reactivo de visualización, Solución sustrato- cromógeno, Contratinción (hematoxilina) Montaje
- **Paso 9:** revisión de laminillas de inmunohistoquímica, Her 2-neu con receptores por residente de patología y patólogo adscrito, quienes evaluarán de la positividad de cada uno de los marcadores,
- **Paso 10:** A las laminillas marcadas con Her2 –neu se les otorgará la calificación de : negativo 0, Negativo 1+, positivo 2++, positivo 3+++ . (3-4 hrs)
- **Paso 11:** En caso de Her2-neu positivo 2++ se envía a CISH en laboratorio externo (15 días).
- **Paso 12:** Evaluación por 3 patólogos adscritos todos los casos acumulados durante 14 meses, de carcinoma ductal infiltrante e inmurreacción de Her2 neu, que incluyen las variables descritas; tomando en cuenta la calidad del tejido, calidad de la reacción y score de la tinción.
- **Paso 13:** Recopilación de información y análisis estadístico
- **Paso 14:** Discusión y Conclusiones.

3. Procesamiento y Presentación de la Información

Los datos clínico-patológicos de interés, se recogieron en una base de datos inicialmente en Excel, para su posterior transferencia al programa “SPSS” para análisis estadísticos. En esta base de datos, (*véase hoja de recolección de datos*) se hace constar: el numero consecutivo del caso, numero de quirúrgico, edad de la paciente, la unidad de adscripción de servicio medico, el tipo de material utilizado para realización el método de inmunohistoquímica (Herceptest) ya sea bloque de parafina foráneo o de tejido procesado en este laboratorio, casos con CISH como método de confirmatorio de sobreexpresión de Her2, score original de Her2. Posteriormente las variables evaluadas por 3 interobservadores, que son divididas en tres partes, cada uno evalúa la calidad del tejido problema por medio de tres variables que son contratinción, tinción citoplásmica, y daño morfológico, por medio de 2 valores de valido o no valido (1 y 2), la evaluación del score de Her2 por medio de 4 valores establecidos del 0-3, y finalmente evaluación de tres testigos (tejido positivo 3+, negativo 1+ y mama normal), por medio del procedimiento Herceptest de Dako.

Todos los estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos, se evaluaron por 3 interobservadores designados como A, B y C , a ciegas con relación a la información clínica. Las variables numéricas se resumirán con media y desviación estándar.

Los datos se analizaron mediante técnicas estadísticas simples, que se basaron en técnicas no paramétricas. Éstas incluyeron comparaciones cuantitativas como son las tablas de contingencia, se hicieron correlaciones simples (Spearman) entre los distintos parámetros analizados que permiten medir cómo se relacionan las variables. así como un análisis estadístico a través de Kappa, evaluando la concordancia observada, la concordancia específica, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo

4. Recursos humanos y materiales

Recursos Humanos:

- Médico Residente
- Anatómicos patólogos
- Histotecnólogos
- Auxiliar de Laboratorio
-

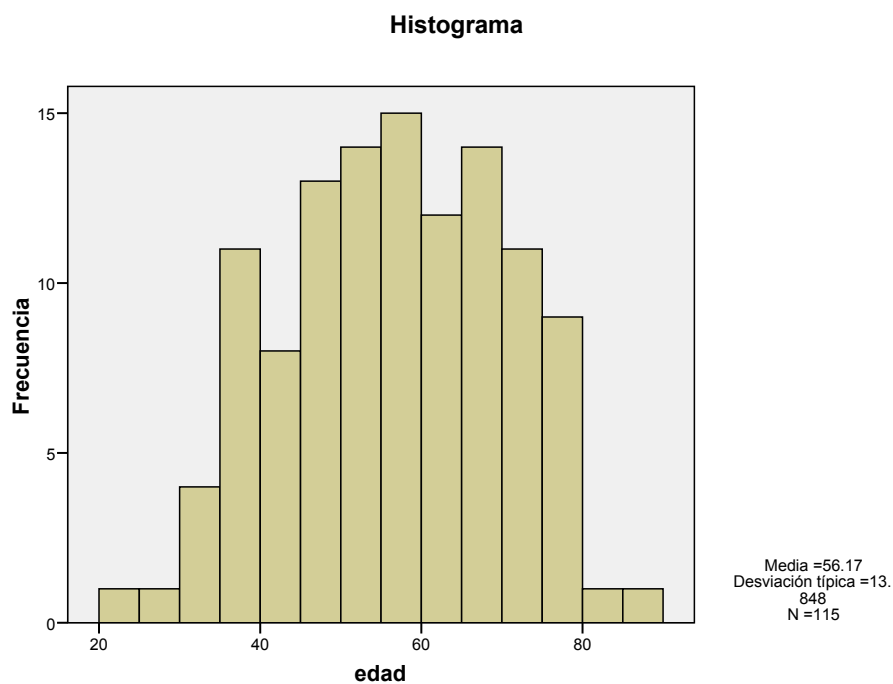
Recursos Materiales:

- Microscopio óptico
- Histoquinet
- Incluidor de parafina
- Microtomo
- Capsulas de Inclusión
- Formol buffereado al 10%
- Tren de tinción: Hematoxilina de Harris y Eosina
- Kit Herceptest Dako
- Olla de recuperación antigénica
- Incubadora de tejidos
- Autostainer Dako
- Soluciones Buffer y Citratos
- Hematoxilina
- Libretas de registro de quirúrgicos e inmunohistoquímica
- Hoja de recolección de Datos

RESULTADOS

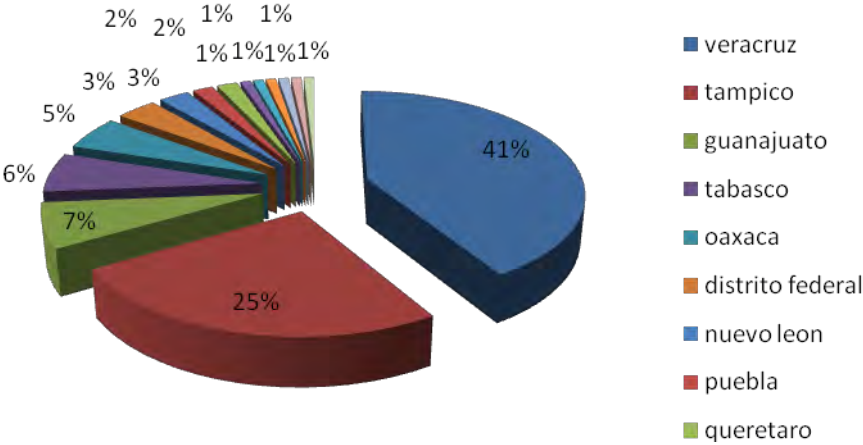
Para este estudio se incluyeron 115 pacientes femeninas todas ellas con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante. El rango de edad osciló entre los 22 años y 87 años, con una media de 56 años.

EDAD	Estadístico	Error típ.
Media	56.17	1.291
Intervalo de confianza para la media al 95%		
Límite inferior	53.61	
Límite superior	58.72	
Media recortada al 5%	56.33	
Mediana	57.00	
Varianza	191.771	
Desv. típ.	13.848	
Mínimo	22	
Máximo	87	
Rango	65	
Amplitud intercuartil	21	
Asimetría	-.133	.226
Curtosis	-.664	.447



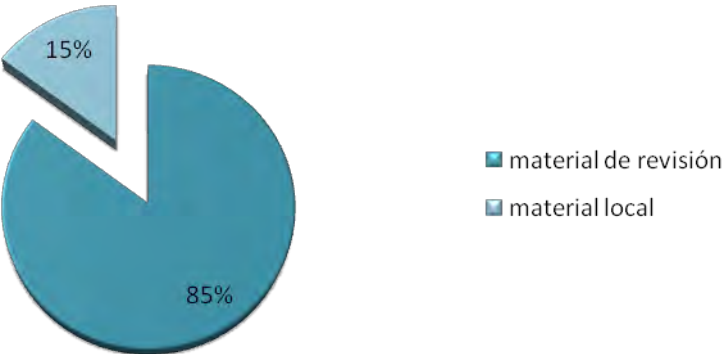
Los 115 casos estudiados provenían de 16 estados del país, de los cuales el 41% correspondió al estado de Veracruz, el 25% correspondió al estado de Tamaulipas, indicando que dos terceras partes del estudio se concentro en solo dos estados.

Estados con prevalencia alta de CDI



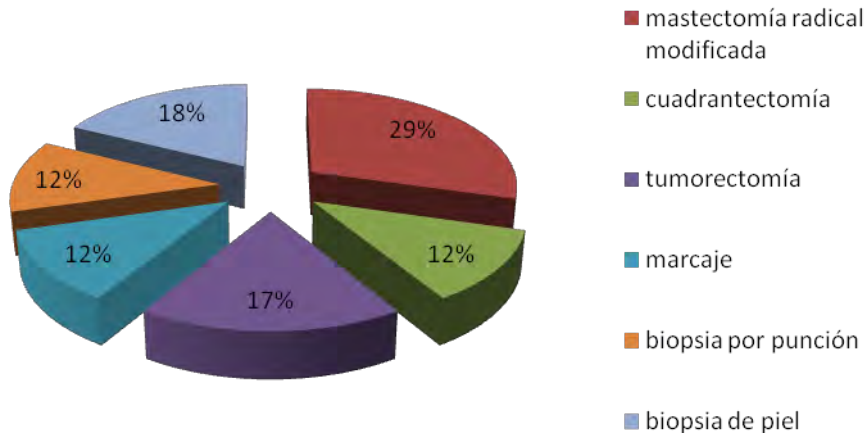
Del todo el material revisado se observo que el 85% era material de revisión (bloques de parafina). Solo el 15% de el material revisado correspondía a tejido obtenido por algún tipo de procedimiento en este hospital HSCAE PEMEX (mastectomías, cuadractomías, marcajes, biopsias, etc).

Numero de casos



El material procedente de esta institución, mas frecuente son piezas quirúrgicas: mastectomías y tumorectomías con un 29 y 17% del total del material local.

Material local



Tres interobservadores realizaron evaluaciones visuales de los 115 casos, al evaluar la calidad del tejido mamario en laminilla teñida con hematoxilina y eosina, representativo del diagnostico de carcinoma ductal infiltrante.

Evaluación cuantitativa de la inmunorreacción de Her2 con el kit de Herceptest

Distribución por edad:

edad			
score her 2 original	Mean	N	Std. Deviation
0	57.83	90	13.223
1	51.86	7	12.429
2	50.75	8	14.849
3	48.50	10	17.090
Total	56.17	115	13.848

El score de Her2 que mas se repite es el de Negativo 0 en, y con una media de edad de 57 años, En frecuencia le sigue el score Positivo 3, con una media de edad de 48 años. Le sigue el score de Her2, Indeterminado o 2++, con una mediana de edad de 50.7 años, El score menos frecuente es el Negativo 1 con mediana de edad de 51 años.

*Para realizar la estadística de concordancia interobservador, se descartaron los casos no validos por medio de la valoración de testigos o controles internos de cada caso. Se tomo como caso valido todo aquel que tuviera al menos dos controles adecuados, (positivo 3+++, negativo 0 y mama normal)

Tabla de contingencia Interobservador A y B

score1 * score2 Crosstabulation Count						
		score2				Total
		.00	1.00	2.00	3.00	
score1	.00	68	1	0	0	69
	1.00	3	4	0	0	7
	2.00	0	0	4	0	4
	3.00	0	0	0	9	9
Total		71	5	4	9	89

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score1 * score2	89	76.7%	27	23.3%	116	100.0%

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.976	.013	42.250	.000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.906	.049	19.957	.000(c)
Measure of Agreement	Kappa	.877	.060	12.041	.000
N of Valid Cases		89			

**Tabla de contingencia
Interobservador A y C**

score1 * score3 Crosstabulation Count						
		score3				Total
		.00	1.00	2.00	3.00	
		score1	.00	69	0	
1.00	3		4	0	0	7
2.00	0		0	4	0	4
3.00	0		0	0	9	9
Total		72	4	4	9	89

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score1 * score3	89	76.7%	27	23.3%	116	100.0%

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.983	.010	49.573	.000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.931	.039	23.817	.000(c)
Measure of Agreement	Kappa	.906	.053	12.446	.000
N of Valid Cases		89			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

□□□

**Tabla de contingencia
Interobservador B y C**

score2 * score3 Crosstabulation Count						
		score3				Total
		.00	1.00	2.00	3.00	
		score2	.00	68	3	
1.00	4		1	0	0	5
2.00	0		0	4	0	4
3.00	0		0	0	9	9
Total		72	4	4	9	89

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score2 * score3	89	76.7%	27	23.3%	116	100.0%

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.958	.018	31.313	.000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.821	.073	13.432	.000(c)
Measure of Agreement	Kappa	.769	.083	10.369	.000
N of Valid Cases		89			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

La concordancia interobservador mas alta corresponde a la correlacion entre el interobservador A y C) y la menor entre los interobservadores B y C).

Correlacion evaluación de Her2 original con calificación de Her2 de cada interobservador A , B y C

Tabla de frecuencias Interobservador A y B)

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score her 2 original * score de her 2	115	99.1%	1	.9%	116	100.0%

score her 2 original * score de her 2 Crosstabulation Count						
		score de her 2				Total
		0	1	2	3	
score her 2 original	0	88	2	0	0	90
	1	2	5	0	0	7
	2	0	0	5	3	8
	3	0	0	1	9	10
Total		90	7	6	12	115

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.964	.013	38.546	.000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.926	.037	26.113	.000(c)
Measure of Agreement	Kappa	.813	.060	12.874	.000
N of Valid Cases		115			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

**Tabla de frecuencias
Interobservador B y C)**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score her 2 original * score de her 2	115	99.1%	1	.9%	116	100.0%

score her 2 original * score de her 2 Crosstabulation Count						
		score de her 2				Total
		0	1	2	3	
score her 2 original	0	87	3	0	0	90
	1	5	2	0	0	7
	2	0	0	5	3	8
	3	0	0	1	9	10
Total		92	5	6	12	115

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.945	.017	30.830	.000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.851	.055	17.243	.000(c)
Measure of Agreement	Kappa	.709	.073	11.169	.000
N of Valid Cases		115			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

**Tabla de frecuencias
Interobservador Ay C**

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score her 2 original * score de her 2	115	99.1%	1	.9%	116	100.0%

score her 2 original * score de her 2 Crosstabulation Count						
	score de her 2					Total
		0	1	2	3	
score her 2 original	0	90	0	0	0	90
	1	3	4	0	0	7
	2	0	0	5	3	8
	3	0	0	1	9	10
Total		93	4	6	12	115

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.968	.011	41.299	.000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.944	.030	30.475	.000(c)
Measure of Agreement	Kappa	.827	.058	13.005	.000
N of Valid Cases		115			
a Not assuming the null hypothesis.					
b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.					
c Based on normal approximation.					

Igualmente que en la observacion previa, existe una concordancia interobservador mayor entre los interobservadores Ay C), la menor concondancia existe entre los interobservadores B y C). Sin embargo se mantiene la concordancia buena interopbservador.

Evaluación preanalítica

Se evaluó la calidad del tejido problema por medio de la siguiente tabla:

No. De caso	Valoración cualitativa de tejido problema			
	contra tinción	tinción citoplásmica excesiva	daño morfológico	Suma total de variables
	Buena (1) o mala (2)	Presente (1)/ausente(2)	Con daño(1)/sin daño(2)	

Correlación entre suma total de variables

Tabla de contingencia Interobservadores A y B)

score total (ideal 3) * score Crosstabulation Count				
	score		Total	
	3	4		
score total (ideal 3)	3	82	12	94
	4	13	6	19
	5	1	1	2
Total	96	19		115

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score total (ideal 3) * score	115	99.1%	1	.9%	116	100.0%

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.223	.113	2.430	.017(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.217	.111	2.366	.020(c)
Measure of Agreement	Kappa	.(d)			
N of Valid Cases		115			

**Tabla de contingencia
Interobservadores A y C**

score total (ideal 3) * score Crosstabulation Count					
	score				Total
	3	4	5		
	score total (ideal 3)	3	4	5	
	3	59	27	8	94
	4	4	12	3	19
	5	0	0	2	2
Total		63	39	13	115

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score total (ideal 3) * score	115	99.1%	1	.9%	116	100.0%

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.373	.093	4.272	.000(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.350	.086	3.978	.000(c)
Measure of Agreement	Kappa	.261	.072	3.964	.000
N of Valid Cases		115			

**Tabla de contingencia
Interobservador B y C**

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
score * score	115	99.1%	1	.9%	116	100.0%

score * score Crosstabulation Count					
	score				Total
	3	4	5		
	score	3	4	5	
	3	56	33	7	96
	4	7	6	6	19
Total		63	39	13	115

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.248	.106	2.715	.008(c)
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.217	.101	2.360	.020(c)
Measure of Agreement	Kappa	.(d)			

□

La concordancia interobservador entre los 3 interobservadores es baja, lo que denota mala preservación de los tejidos.

Tabla de frecuencia

contratincion

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	buena	109	94.0	94.8	94.8
	mala	6	5.2	5.2	100.0
	Total	115	99.1	100.0	
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

contratincion A

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	buena	115	99.1	100.0	100.0
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

contratincion B

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	buena	106	91.4	92.2	92.2
	mala	9	7.8	7.8	100.0
	Total	115	99.1	100.0	
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

Gráfico de barras

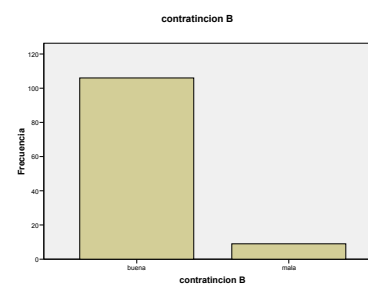
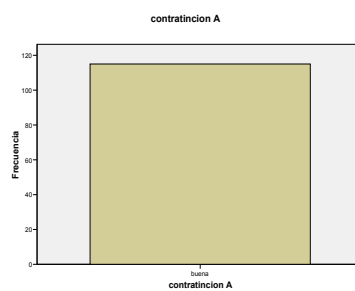
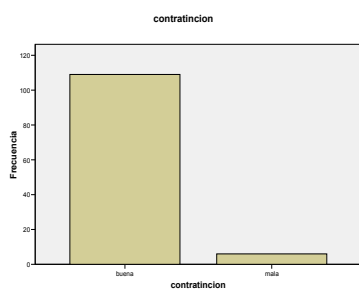


Tabla de frecuencia

tincion citoplasmatica

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	presente	115	99.1	100.0	100.0
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

tincion citoplasmatica A

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	presente	99	85.3	86.1	86.1
	ausente	16	13.8	13.9	100.0
	Total	115	99.1	100.0	
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

tincion citoplasmatica B

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	presente	99	85.3	86.1	86.1
	ausente	16	13.8	13.9	100.0
	Total	115	99.1	100.0	
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

Gráfico de barras

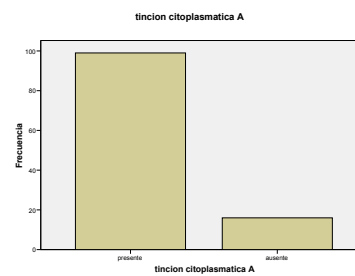
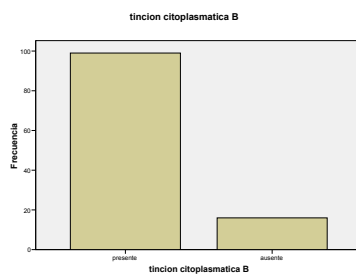
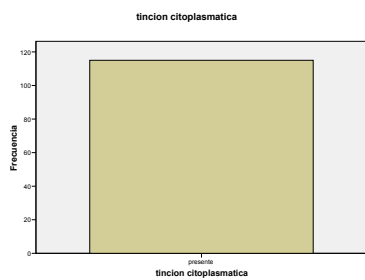


Tabla de frecuencia

daño morfologico

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	con	98	84.5	85.2	85.2
	sin	17	14.7	14.8	100.0
	Total	115	99.1	100.0	
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

daño morfologico A

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	con	112	96.6	97.4	97.4
	sin	3	2.6	2.6	100.0
	Total	115	99.1	100.0	
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

daño morfologico B

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	con	75	64.7	65.2	65.2
	sin	40	34.5	34.8	100.0
	Total	115	99.1	100.0	
Perdidos	Sistema	1	.9		
Total		116	100.0		

DISCUSION

Desde hace varios años, la determinación de HER2 en cáncer de mama invasivo se considera rutinaria pero, en cambio, el mejor método para determinar el estado de HER2 y los algoritmos diagnósticos son objeto de controversia. Esto resulta llamativo dado que la determinación de HER2 influye en la toma de decisiones clínicas a nivel pronóstico y a nivel de predicción de respuesta. A nivel pronóstico, el estado de HER2, junto con otros factores, puede afectar a la decisión de administrar, o no, terapia adyuvante en mujeres con cáncer de mama operable. Además, la información sobre el estado de HER2 es crucial para decidir el uso de terapia anti-HER2.

La evaluación se efectuó sobre una preparación problema que contenía varias secciones de tejido con distintos niveles de amplificación de HER2. Los tejidos habían estado fijados durante 24 h. en formol al 10% tamponado a pH 7,0 e incluidos posteriormente en parafina. Los criterios de evaluación en fueron constantes.

Los criterios de evaluación fueron los mismos:

Los resultados óptimos se asignaron a aquellos casos en que todas las muestras del estudio presentaban unos resultados correctos y sin artefactos en el tejido, lo que permitía una interpretación adecuada.

Los resultados aceptables eran aquellos que permitían la interpretación pero que en algunas secciones la intensidad se hallaba disminuida o aumentada, lo que en ciertos casos podrían llevar a una interpretación deficiente.

Los casos con resultados inadecuados eran aquellos en que globalmente los resultados obtenidos eran incorrectos, por negatividad de la expresión en los casos 3+ y 2+, posiblemente por causa de una recuperación antigénica insuficiente o por una técnica poco sensible, o por una marcada sobreexpresión de los casos negativos (0 y 1+), asociados frecuentemente a expresión intensa y extensa de los ductos normales y en ocasiones a tinción inespecífica de las células del estroma, lo que conducía a interpretaciones incorrectas, por tanto fueron invalidados

Landis y Koch propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa:

kappa	grado de acuerdo
< 0	sin acuerdo
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Bajo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bueno
0,8 - 1	muy bueno

Evaluación de prueba de Her2

Posterior a la eliminación de casos no validos, se obtienen resultados favorables en cuanto la determinación de la inmunorreacción del Her2, obteniendo concordancias interobservador de .906, de .877 y de 0.769 que determina concordancias interobservador por medio de kappa entre buenas y muy buenas, ligeramente por debajo de lo esperado en los objetivos descritos.

Evaluación de la correlación IHQ y CISH

Se realizaron 40 pruebas de CISH para valorar la correlación de la prueba inmunohistoquímica y la hibridación in situ, obteniendo resultados favorables, ya se estudiaron 38 casos evaluados inicialmente como negativos 0 y un caso evaluado como positivo 3+, la correlación fue exacta ya que solo hubo amplificación de señal en este último caso. Existe un caso que equivale al 0.25 del total, que resulto discordante, fue inicialmente valorado como Negativo 0 y en la prueba confirmatoria de CISH, se encontró amplificado el gen; sin embargo no se encontró entre los casos eliminados o no validados, por falta de controles.

Evaluación del control de calidad del proceso del tejido

Por medio de estudio, se constata que las tasas de concordancia están en la evaluación de control de calidad del procesamiento están alejadas de lo que es deseable (acuerdo kappa insignificante o bajo), ya sea en muestras locales o foraneas. Por lo tanto, hay que buscar nuevas estrategias para que la determinación de HER2 en nuestra institución, que sea lo más equitativa posible, es decir, evitar la heterogeneidad en la calidad de las determinaciones existente. En segundo lugar, es necesario poner en contexto las guías internacionales y nuevos modelos de evaluación de HER2

Los casos estudiados muestran una importante discordancia entre los resultados obtenidos en la sección de evaluación de calidad de la muestra especialmente en los casos con material foráneo, donde el acuerdo interobservador es casi nulo.

Esto se debe a diferentes causas como la falta de normalización de procedimientos y técnicas, la variabilidad en la interpretación de las preparaciones, y muy especialmente, a la calidad no óptima del tejido debido a que las condiciones de fijación, procesamiento y conservación no han sido las idóneas.

En este estudio pudimos encontrar fuentes de variabilidad que se pueden dividir en tres partes: preanalíticas, analíticas y postanalíticas

Preanalítica:	Analítica	Postanalítica
Tiempo hasta la fijación Método de procesamiento de tejido Tiempo de fijación Tipo de Fijación Método de tinción	Variaciones en el kit Calibración del equipo Procedimiento de laboratorio estandarizado Entrenamiento y competencia del personal de laboratorio Tipo de recuperación antigénica Reactivos del test Controles Automatización	Criterios de interpretación Uso de análisis de imagen Tipo de informe Procedimientos de garantía de calidad Laboratorios Tests Patólogos

CONCLUSIONES

La detección de pacientes con carcinoma mamario y sobreexpresión de la proteína HER2 es crítica para que obtengan el beneficio de terapia dirigida.

La detección de la sobre-expresión de HER2, constituye una prueba de selección para tratamiento con Herceptin, un anticuerpo monoclonal desarrollado para eliminar de forma selectiva las células tumorales que presenten sobre-expresión de HER2 en su superficie.

El estatus del Her2 es independiente de la histología de carcinoma mamario.

El grado de sobreexpresión correlaciona con la probabilidad de respuesta terapéutica.

La evaluación precisa y reproducible del estatus de HER 2 se hace indispensable debido a los efectos potenciales y al alto costo de la terapia.

Los estudios de IHQ han sido de elección para la rutina diaria, pero los de hibridación in situ, se han recomendado para casos dudosos o cuando la calidad o peculiaridades de la muestra han impedido su correcta valoración o en todo caso como método confirmatorio.

La hibridación in situ también se recomienda en casos en los que el tejido se halla en mal estado y no sea posible la determinación de HER2 por IHQ, entonces debe usarse como método inicial de sobreexpresión de HER2. Figura 5. Algoritmo propuesto para determinación de HER2.

La determinación de HER2 presenta notables dificultades de reproducibilidad.

La variabilidad interobservador apreciada se debe tanto a causas técnicas y de procesamiento como de interpretación, especialmente en calidad de la muestra y en valoración de testigos de inmunorreacción de HER2.

Por estos motivos, patólogos expertos en la determinación de HER2 de los grandes centros de referencia, así como oncólogos médicos con una contrastada actividad en cáncer de mama, deben reunirse para consensuar las recomendaciones nacionales de determinación de HER2, las cuales no solo deben estar basadas en la experiencia de los participantes en el consenso, sino también en la experiencia internacional publicada en recientes guías de distintos países, tales como Estados Unidos Reino Unido y Canadá

El resultado debe ser una guía que sirva de base a patólogos y clínicos de nuestro país para la práctica diaria.

A continuación se mencionan los puntos clave sugeridos para realizar una guía o norma oficial de determinación de Her2 neu.

1. Determinación de HER2 en cáncer de mama

Indicación

- A todo paciente diagnosticado de cáncer de mama (infiltrante y/o metastático) antes de iniciar el tratamiento.

Tipo de muestra

- Biopsias o pieza quirúrgicas procedente del tumor primario.
- En caso de recidiva o metástasis, se recomienda la determinación sobre muestras de la recidiva o metástasis si éstas han sido extirpadas o biopsiadas.
- En muestras subóptimas (defectos de fijación, artefactos de retracción, aplastamiento, cauterización, etc.) se recomienda el uso de técnicas de hibridación in situ.

2. Condiciones de fijación y procesamiento para la determinación de HER2 en cáncer de mama

- La fijación se realizará lo antes posible, en formol neutro tamponado al 10%, y siempre en la primera hora tras la obtención de la muestra.
- No se utilizarán fijadores basados en alcohol o que contengan mercurio (Bouin.).
- El tiempo óptimo de fijación es de entre 24 y 48 horas.
- Las muestras de piezas fijadas menos de 24 o más 48 horas pueden dar falsos negativos.
- Las muestras pequeñas (biopsias) deben fijarse al menos 6 horas.
- Las muestras pequeñas fijadas menos de 6 horas no deben utilizarse.
- No se utilizarán secciones almacenadas por más de 6 semanas para estudios de inmunohistoquímica ni por más de seis meses para hibridación in situ.
- Si las técnicas se van a demorar más de dos semanas tras efectuarse las secciones, se recomienda que dichas secciones sean almacenadas previamente parafinadas.
- Se recomienda el uso de técnicas de hibridación in situ en muestras subóptimas.

3. Causas de rechazo de la determinación de HER2 en cáncer de mama

- Cuando no se alcancen los requerimientos de calidad de la muestra (prefijación, fijación, inclusión, corte...) recomendados.
- Resultados insatisfactorios en los controles.
- Ausencia de componente infiltrante en la sección.
- Presencia exclusivamente de un carcinoma infiltrante tan pequeño que sería difícilmente evaluable con el microscopio de luz.
- Tinción intensa y extensa de membrana en ductos o acinos normales (la tinción débil y focal no excluye ni hace modificarla valoración)

4. Interpretación de la determinación inmunohistoquímica de HER2

Se evaluará exclusivamente en el componente infiltrante y la tinción de membrana.

Interpretación:

- *Negativo (0)*: ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células.
- *Negativo (1+)*: tinción de membrana débil e incompleta en más del 10% de las células.
- *Borderline (2+)**: tinción completa de membrana, débil o moderada, en más del 10% las células o tinción completa e intensa en 10-30% de las células.
- *Positivo (3+)*: tinción de membrana completa e intensa en más del 30% de las células.

5. Datos requeridos en el informe de la determinación de HER2 mediante inmunohistoquímica

- Identificación del paciente.
- Identificación del médico solicitante.
- Fecha de la petición y determinación.
- Identificación de la muestra (caso y número de bloque).
- Tipo de muestra y procedencia anatómica.
- Tipo de fijador (obligatorio), tiempo hasta la fijación (recomendable) y tiempo de fijación (recomendable).
- Anticuerpo y método utilizado (clon, proveedor, especificar si está aprobado por FDA u otra agencia reguladora).
- Método de evaluación (semicuantitativo, análisis de imagen).
- Idoneidad de la muestra (adecuada/inadecuada para diagnóstico).
- Interpretación de los resultados:
 - *Positivo (3+)*
 - *Borderline (2+)*
 - *Negativo (0/1+)*
 - *No interpretable*

Otro punto importante es el adecuado control de calidad a nivel institucional y control de calidad por un mecanismo externo para determinar la correcta realización de los procedimientos y protocolos:

Control de calidad interno

La adecuada determinación de HER2 requiere seguir estrictas normas de calidad en los laboratorios. El control de calidad interno debe incluir aspectos tales como la estandarización de los procedimientos (incluyendo el procesamiento de los tejidos y el procedimiento específico de determinación de HER2). Para ello, se recomienda tener documentada la estructura, organización y funcionamiento del laboratorio, así como todos los procedimientos en forma de protocolos normalizados de trabajo.

Control de calidad externo

Todos los laboratorios que tengan los procesos para detección de sobreexpresión de la proteína HER2 y valoración de la amplificación de dicho gen, participen en programas de garantía de calidad externos, para control de las fases previa al procesamiento y de procesamiento técnico, dada la importancia de las mismas ya que condiciona la valoración de los resultados y por tanto el tratamiento que se puede ofrecer a las pacientes.

En todas las publicaciones de consenso sobre la determinación de HER2 se hace notoria la necesidad y en algunos casos la obligación (UK y Canadá) de participar en programas externos de garantía de calidad para mantener la acreditación de los laboratorios para realizar dichas técnicas. Desde esta guía de consenso se aconseja la participación en programas de garantía de calidad con una periodicidad bianual y considerar como, resultados satisfactorios de buen funcionamiento de la técnica cuando el 90% de los resultados sean óptimos.

Los programas de garantía de calidad internacionales más conocidos son el UK NEQAS y NordiQC.

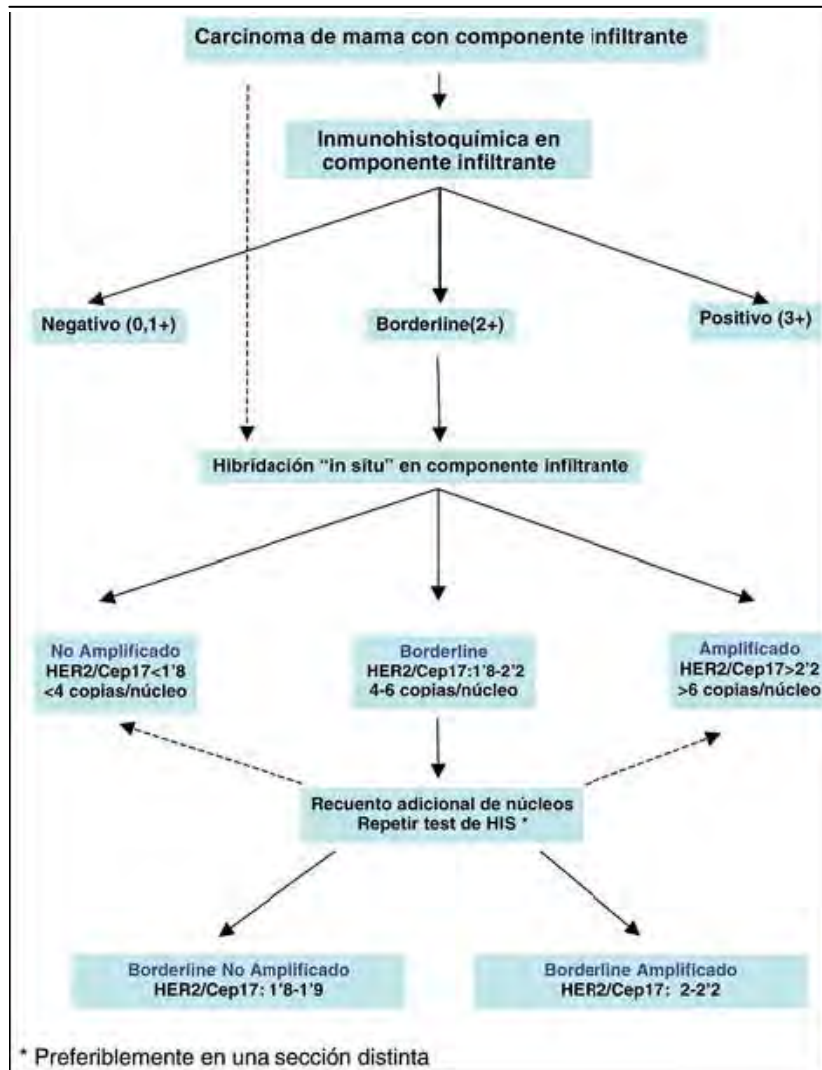


Figura 4: Algoritmo propuesto para la determinación de Her2.

BIBLIOGRAFÍA

- Adeyinka, A., Mertens, F., Bondeson, L., Garne, J.P., Borg, A., Baldetorp, B., Pandis, N. Cytogenetic heterogeneity and clonal evolution in synchronous bilateral breast carcinomas and their lymph node metastases from a male patient without any detectable BRCA2 germline mutation. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **118**: 42-47, 2000.
- Agrup, M., Stal, O., Olsen, K., Wingren, S. C-erbB-2 overexpression and survival in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **63**: 23-29, 2000.
- Aguilar, Z., Akita, R.W., Finn, R.S., Ramos, B.L., Pegram, M.D., Kabbinavar, F.F., Pietras, R.J., Pisacane, P., Sliwkowski, M.X., Slamon, D.J. Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene*, **18**: 6050-6062, 1999.
- Aigner, A., Juhl, H., Malerczyk, C., Tkybusch, A., Benz, C.C., Czubayko, F. Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene*, **20**:2101-2111, 2001.
- Allred, D.C., Clark, G.M., Tandon, A.K., Molina, R., Tormey, D.C., Osborne, C.K., Gilchrist, K.W., Mansour, E.G., Abeloff, M., Eudey, L., McGuire, W.L. HER-2/neu in breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of *in situ* carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **10**: 1049-1056, 1992.
- Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol.*, **11**:155-168, 1998.
- Bacus, S.S., Gudkov, A.V., Zelnick, C.R., Chin, D., Stern, R., Stancovski, I., Peles, E., Badoual C, Maruani A, Ghorra C, Et al. Pathological prognostic factors of invasive breast carcinoma in ultrasound guided large core biopsies- correlation with subsequent surgical escisions. *Breast*, **14**:22-7; 2005
- Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*; **14**: 737-44. 1996
- Beckmann, M.W., Niederacher, D., Massenkeil, G., Tutschek, B., Beckmann, A., Schenko, G., Schnurch, H.G., Bender, H.G. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantage of prediction in recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology*, **53**: 441-447, 1996.
- Ben-Levy, R., Paterson, H.F., Marshall, C.J., Yarden, Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J.*, **13**: 3302-3311, 1994.

- Bittner, J.J. Relation of nursing to the extra-chromosomal theory of breast cancer in mice. *Am. J. Cancer*, **35**: 90-97, 1947.
- Blaszyk, H., Hartmann, A., Cunningham, J.M., Schaid, D., Wold, L.E., Kovach, J.S., Sommer, S.S. A prospective trial of midwest breast cancer patients: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int. J. Cancer*. **89**: 32-38, 2000.
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*; **17**: 2639-48, 1999.
- Dawood S, Gonzalez-Angulo AM, Peintinger F, Broglio K, Symmans WF, Kau SW, Islam R, Hortobagyi GN, Buzdar AU. Efficacy and safety of neoadjuvant trastuzumab combined with paclitaxel and epirubicin: a retrospective review of the M. D. Anderson experience. *Cancer*; **110**: 1195-200, 2007.
- Depowski, P.L., Brien, T.P., Sheehan, C.E., Stylos, S., Johnson, R.L., Ross, J.S. Prognostic significance of p34cdc2 cyclin-dependent kinase and MIB1 overexpression, and HER-2/*neu* gene amplification detected by fluorescence *in situ* hybridization in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, **112**: 459-469, 1999.
- DiGiovanna, M.P., Carter, D., Flynn, S.D., Stern, D.F. Functional assay for HER-2/*neu* demonstrates active signalling in a minority of HER-2/*neu*-overexpressing invasive human breast tumours. *Br. J. Cancer*, **74**: 802-806, 1996.
- Esteva, F.J., Hortobagyi, G.N., Sahin, A.A., Smith, T.L., Chin, D.M., Liang, S.Y., Pusztai, L., Buzdar, A.U., Bacus, S.S. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol. Onco Res.*, **7**: 171-177, 2001.
- Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., Thor, A.D., Allred, D.C., Clark, G.M., Ruby, S.G., O'Malley, F., Simpson, J.F., Connolly, J.L., Hayes, D.F., Edge, S.B., Lichter, A. Schnitt, S.J. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **124**: 966-978, 2000.
- Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*; **355**: 2733-43, 2006.
- Hermanto, U., Zong, C.S., Wang, L.H. ErbB2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth. *Oncogene*, **20**: 7551-7562, 2001.
- Jeffrey S. Ross, et. al., Standardizing Slide-Based Assays in Breast Cancer: Hormone Receptors, HER2, and Sentinel Lymph Nodes, *Clin Cancer Res*; **13** : 2831-2835, 2007.

- Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkio S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jaaskelainen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*; **354**: 809-20, 2006.
- Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, et al. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, **120**:86-92; 2003.
- Gown AM. Current issues in ER and Her2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol*, **21**:S8-S15;2008
- Klapper, L.N., Waterman, H., Sela, M., Yarden, Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.*, **60**: 3384-3398;2000.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast Cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matters*, **16**:113-23;2008.
- Mitch Dowsett, et. al., Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study, *Modern Pathology* **20**: 584–591, 2007.
- Nieto, Y., Cagnoni, P.J., Nawaz, S., Shpall, E.J., Yerushalmi, R., Cook, B., Russell, P., McDermit, J., Murphy, J., Bearman, S.I., Jones, R.B. Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose. *J. Clin. Oncol.*, **18**: 2070-2080, 2000.
- Patrick L. Fitzgibbons, MD, et. al., Interlaboratory Comparison of Immunohistochemical Testing for HER2, *Arch Pathol Lab Med*, **130**: 1440-1445. 2006.
- Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Sledge GW, Kaufman PA, Hudis CA, Martino S, Gralow JR, Dakhil SR, Ingle JN, Winer EP, Gelmon KA, Gersh BJ, Jaffe AS, Rodeheffer RJ. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *J Clin Oncol*; **26**: 1231-8, 2008.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Gnant M, Ward C, Strahle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **353**: 1659-72, 2005.
- Rabiya S. Tuma, Inconsistency of HER2 Test Raises Questions, *JNCI*, **99**:1064-1065, 2007.

- Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, et al: Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* **94**:855–857, 2002.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*; **353**: 1673-84, 2005.
- Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and target for Therapy. *Oncologist*; **3**: 237-52,1998.
-
- Salomon, D.S., Kidwell, W.R., Kim, N., Ciardiello, F., Bates, S.E., Valverius, E., Lippman, M.E., Dickson, R.B., Stampfer, M. Modulation by estrogen and growth factors of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Recent Results Cancer Res.*, **113**: 57-69, 1989.
- Simon, R., Nocito, A., Hubsher, T., Bucher, C., Torhorst, J., Scharml, P., Bubendorf, Mihatsch, M.M., Moch, H., Wilber, K., Schotzau, A., Kononen, J., Sauter, G. Patterns of HER-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **93**: 1141-1146, 2001.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*, **235**: 177–182, 1987.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**: 707-712, 1989.
- Soonmyung Paik, MD, et. al., *HER2* Status and Benefit from Adjuvant Trastuzumab in Breast Cancer, *N Engl J Med*; **358** : 1409-1411, 2008.
- Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, Geyer CE, Jr., Ewer M, Keefe D, Shannon RP, Swain SM, Brown A, Fehrenbacher L, Vogel VG, Seay TE, Rastogi P, Mamounas EP, Wolmark N, Bryant J. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumabas adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol*; **23**: 7811-9, 2005.
- Untch M, Gelber RD, Jackisch C, Procter M, Baselga J, Bell R, Cameron D, Bari M, Smith I, Leyland-Jones B, de Aza mbuja E, Wermuth P, Khasanov R, Feng-Yi F, Constantin C, Mayordomo JI, Su CH, Yu SY, Lluch A, Senkus- Konefka E, Price C, Haslbauer F, Suarez Sahui T, Srimuninnimit V, Colleoni M, Coates AS, Piccart-Gebhart MJ, Goldhirsch A. Estimating the magnitude of Trastuzumab effects within patient subgroups in the HERA trial. *Ann Oncol*; **19**: 1090-6. 2008

- Venkateswarlu, S., Dawson, D.M., St Clair, P., Gupta, A., Willson, J.K., Brattain, M.G. Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, **21**: 78-86, 2002.
- Von Minckwitz G, Zielinski C, Maarteense E, al e. Capecitabine vs. capecitabine + trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing during trastuzumab treatment: The TBP phase III study (GBG 26/BIG 3-05). *J Clin Oncol*; **26**: 26 (May 20 suppl; abstr 1025), 2008.
- Wolff AC, Hammond EH, Schwartz et. al., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer, *J Clin Oncol* **25** 1: 118-145;2007.

CUADRO DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	MESES								
	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Mayo	Jun	Jul	Ago
Recolección de datos en hoja de trabajo y recolección de laminillas	X								
Revisión de casos y selección de bloque de parafina representativo		X							
Recortes de los bloques seleccionados			X						
Revisión de casos				X					
Revisión de casos					X				
Procesamiento de datos Análisis de resultados						X			
Análisis estadístico							X		
Análisis estadístico Informe final								X	
Conclusión y fin del trabajo								X	