



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina
División de Estudios Superiores

HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"

SERVICIOS DE SALUD EN MICHOACAN

ESTUDIO CON INMUNOPEROXIDASA DE 78 PACIENTES CON CARCINOMA MAMARIO TRIPLE NEGATIVO (EVALUACION CLINICA Y MORFOLOGICA)

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN

ANATOMIA PATOLOGICA

P R E S E N T A

DRA. LINA URANIA HERNANDEZ ROMAN

ASESORES :

DRA. ROSA MARIA SILVA LOPEZ
DR. JESUS ANGEL VILLAGRAN URIBE



MORELIA, MICHOACAN. 2010.



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.

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a mis padres, Luisa Urania Román Marín y Juan Diego Hernández Hernández, quienes que con su ejemplo han inculcado en mi un espíritu de trabajo y pasión por el aprendizaje. Además agradezco su apoyo incondicional que hasta ahora me han brindado.

A mi esposo Francisco Javier Ayala Pantoja a mi hija Melissa Ayala Hernández y a nuestro próximo hijo, por su cariño, apoyo sin límites y que gracias a ellos cada día está lleno de alegría, ternura y amor.

De manera especial agradezco a mis suegros la Dra. Rosario Pantoja Sosa y el Dr. Javier Ayala Almeida por integrarme a su familia con cariño y por su apoyo que hasta ahora he recibido.

Con respeto, admiración y gratitud a mis maestros, Dr. Jesús Angel Villagrán Uribe, Dra. Rosa María Silva López y la Dra. Leilanie Arias González, por su enseñanza en lo profesional y personal, así como su apoyo en todo momento.

Agradezco también a todas aquellas personas que colaboraron en la elaboración de este trabajo. Al Dr. Jorge Cuitlahuac Barajas Echartea del Centro Estatal de Atención Oncológica a quien admiro y agradezco todas sus atenciones. A la Dra. María Sandra Huape Arreola del Departamento de Enseñanza e Investigación de este Hospital por su tiempo y asesoría en la estadística. A las Químico Farmacobiólogas Marisol Marmolejo Morales y Verónica Gómez Ruiz que laboran en nuestro departamento y quienes realizaron el aspecto técnico e inmunohistoquímico. Finalmente a mi mejor amiga y

diseñadora Elizabeth Sánchez Gómez por su apoyo en la elaboración de las fotos integradas en este trabajo.

Y no menos importante agradezco a mis compañeros y amigos de trabajo, en especial a Coty, Mayra y Sareni, por su amistad, ayuda, tolerancia y momentos tan agradables.

INDICE

1. INTRODUCCION

- 1.1 Epidemiología del cáncer de mama 1
- 1.2 Clasificación molecular del cáncer de mama 7

2. ANTECEDENTES

- 2.1 Consideraciones generales del cáncer de mama triple negativo y tipo basal 13
- 2.2 Definición del cáncer de mama de tipo basal 17
- 2.3 Factores de riesgo y características morfológicas del cáncer de mama tipo basal 19
- 2.4 Origen celular del cáncer de mama de tipo basal 22
- 2.5 Cáncer de mama de tipo basal y cáncer de mama relacionados con BRCA-1 23
- 2.6 Significado pronóstico del cáncer de mama tipo basal 26
- 2.7 Opciones de tratamiento del cáncer de mama de tipo basal 29

3. OBJETIVOS

- 3.1 Objetivo general 32
- 3.2 Objetivos específicos 32

4. JUSTIFICACION 33

5. MATERIAL Y METODOS

- 5.1 Criterios de inclusión 35
- 5.2 Criterios de eliminación 35
- 5.3 Recursos humanos 36
- 5.4 Recursos materiales 36
- 5.5 Revisión de casos 36
- 5.6 Técnica de tinción 37
- 5.7 Técnica de inmunoperoxidasa 38
- 5.8 Conteo de inmunopositividad 39
- 5.9 Análisis estadístico 40

6. RESULTADOS 41

7. DISCUSION 53

8. CONCLUSIONES 56

9. REFERENCIAS 58

1. INTRODUCCION

1.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la causa más común de cáncer en la mujer en los Estados Unidos y en los países ricos europeos. Históricamente, los países en vías de desarrollo reportaban porcentajes menores de cáncer de mama que los países desarrollados. Sin embargo desde hace 20 a 30 años ha aumentado la incidencia y mortalidad del cáncer de mama en países en vías de desarrollo, además de ser la principal causa de ausentismo laboral en estos países.¹ De los casi 1 millón de casos nuevos de cáncer de mama que fueron diagnosticados en el 2009 en el mundo, los países en vías de desarrollo contribuyen en un 45% de los casos y 55% de las muertes por cáncer de mama. El aumento en la incidencia y mortalidad en el cáncer de mama se atribuye a cambios en la prevalencia de factores de riesgo reproductivo, estilo de vida y diferencias biológicas entre grupos étnicos y raciales. Sin embargo, aún faltan datos que relacionen los factores etiológicos al incremento en el riesgo en países en desarrollo.² En México actualmente el cáncer de mama es causante de un mayor número de muertes, comparado con el cáncer cervicouterino, y afecta a mujeres adultas de todas las edades y de diferente nivel socioeconómico. Las tasas de mortalidad en nuestro país mostraron un aumento notorio en las últimas cinco décadas. Entre 1955 y 1960 la tasa era alrededor de 2 a 4 muertes

por 100 000 mujeres. Luego se elevó de manera sostenida en las mujeres adultas de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por 100 000 para la mitad de la década de 1990 y se ha mantenido más o menos estable desde entonces.¹ (Figura 1)

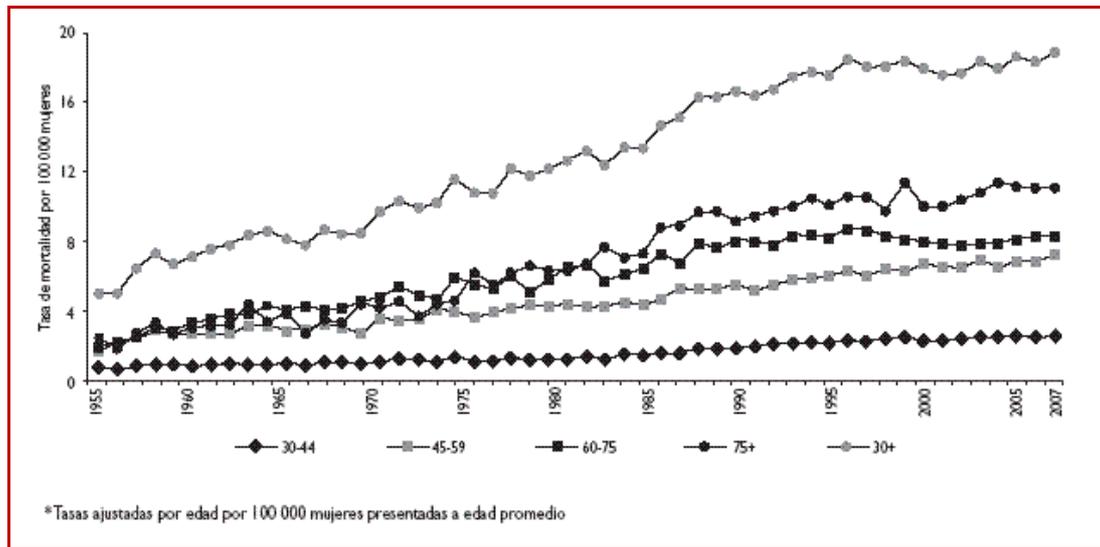


Figura 1. Mortalidad por tumores malignos de mama en México por grupo de edad. 1995-2007.¹

El cáncer de mama representa una pesada carga económica ya que produce muertes a edad temprana, donde 60% de las mujeres muere entre 30 a 59 años de edad. También existe cierta evidencia de que la edad promedio de inicio de la enfermedad es menor en los países en desarrollo que en los más desarrollados. Para el año 2006, el cáncer de mama se había convertido en la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad y la tercera más frecuente entre el grupo de 30 a 59 años (después de la diabetes y las cardiopatías) y se espera desde el punto de vista estadístico en los años venideros aumente de forma considerable. Si bien el cáncer de mama es todavía más común en los grupos de población de nivel socioeconómico más elevado, en la actualidad afecta a todos los grupos poblacionales. En cuanto a la detección temprana

de dicha enfermedad, los datos disponibles sugieren que sólo entre el 5 y 10% de los casos en México se detectan en fases iniciales en comparación con un 50% en Estados Unidos. Esta situación dificulta en buena medida el tratamiento y lo vuelve más costoso e incierto para las mujeres, sus familias y el sistema de salud.¹

La distribución de la mortalidad por estado también sugiere que el cáncer de mama ha crecido y afecta tanto a los estratos medios como a los pobres, aun cuando esta afección se concentra aún en las regiones más ricas del país.¹

La mortalidad por cáncer cervicouterino en las mujeres mexicanas superó la mortalidad por cáncer de mama en el periodo 1955-2005. A partir de 2006, el riesgo de morir por cáncer de mama excede el riesgo de morir por cáncer cervicouterino (figura 2). Existe evidencia a nivel mundial que sustenta esta tendencia.³

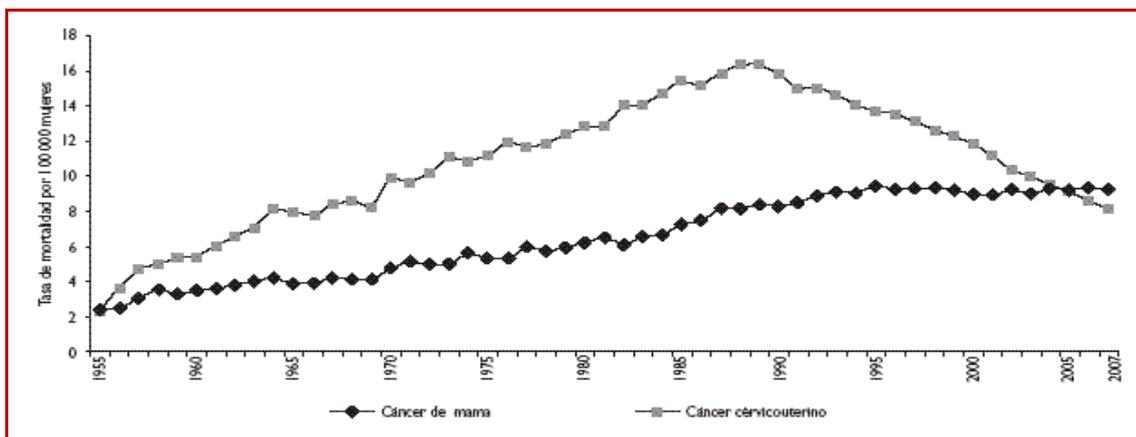


Figura 2. Mortalidad por cáncer de mama y cáncer cervicouterino, tasa por 100 000 mujeres ajustada por edad. México, 1955-2007.¹⁸

La edad al morir por cáncer de mama se ha mantenido estable, en tanto que la edad de muerte por cáncer cervicouterino se ha elevado en grado considerable. Antes

de 1985, la edad promedio al morir por cáncer cervicouterino se encontraba por debajo de la del cáncer de mama, mientras que en la actualidad la situación es contraria. La edad promedio de la mujer mexicana que moría por cáncer de mama en 2005 era casi dos años menor respecto de aquellas que morían por cáncer cervicouterino (figura 3).¹

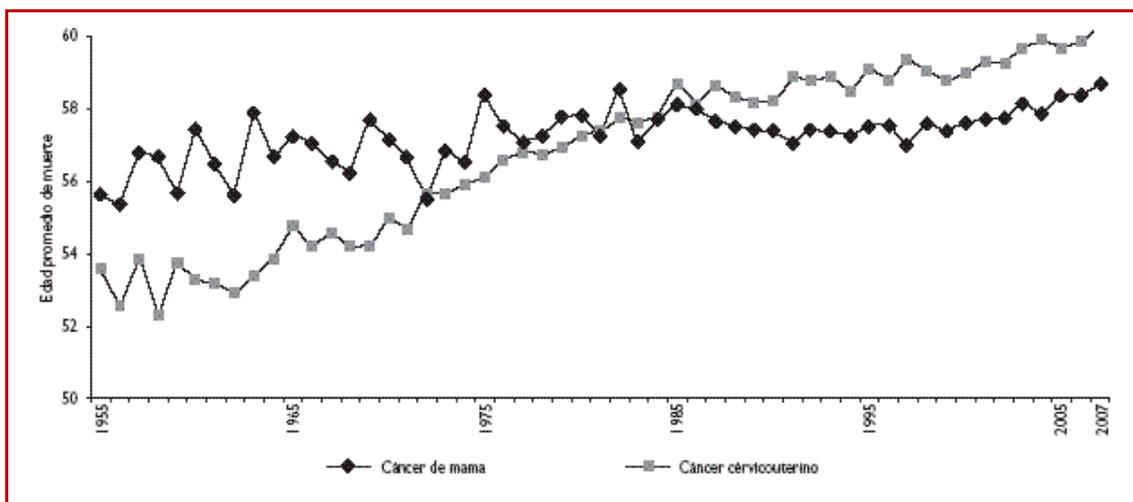


Figura 3. Edad promedio de mortalidad, cáncer de mama y cáncer cervicouterino.

En cuanto a la distribución geográfica por región de las tasas estandarizadas de mortalidad por cáncer mamario en México para el año 2006, se advierte que las tasas regionales más altas proceden del Distrito Federal y la región norte del país. Sin embargo, el Distrito Federal presenta una disminución de la tasa estandarizada de esta causa de muerte entre los años 2000 y 2006. En la región del centro, donde se localiza nuestro estado, tiene un promedio de 9.70 en 2006, pero es más heterogénea en el comportamiento de las cifras de las entidades federativas que lo componen; al respecto, Puebla posee la tasa más baja del centro (6.8) y Jalisco la más alta (14.6). En un estudio publicado en el 2009 por Palacio y cols.³ se señaló que al comparar el riesgo de fallecer por cáncer de mama

entre el año 2000 y 2006, el riesgo de fallecer por esta causa en el 2000 en el área urbana era 2.33 veces mayor respecto del área rural y éste ha disminuido a 1.9 veces para el año 2006, lo cual indica que mientras el riesgo de morir para mujeres en áreas urbanas disminuye, en mujeres en áreas rurales aumenta. Sólo 6 de las 32 entidades federativas mexicanas evidencian una disminución de las tasas estandarizadas de mortalidad por cáncer mamario entre los años 2000 y 2006, y son Nuevo León, Zacatecas, Yucatán y Aguascalientes. Por el contrario, en los demás estados, incluyendo nuestro estado de Michoacán, han aumentado las tasas de mortalidad por cáncer de mama, incluso en los estados más marginados.³

Al correlacionar las tasas de mortalidad por cáncer de mama con el grado de marginación de las entidades, se reconoció una leve correlación inversa, sobre todo en los grados extremos de marginación. Esto es, en los estados de marginación muy alta, como Oaxaca, Chiapas o Guerrero, se encuentran tasas de mortalidad por cáncer de mama bajas, pero en los estados con muy bajo grado de marginación, como Coahuila, Baja California, Nuevo León y el Distrito Federal, sobresalen tasas elevadas de mortalidad por esta causa. Por el contrario, en los estados con niveles medios (alto, medio y bajo grado) de marginación, dentro de los cuales se encuentra nuestro estado, la tasa de mortalidad fluctúa en grado considerable sin una tendencia lineal.³ (figura 4).

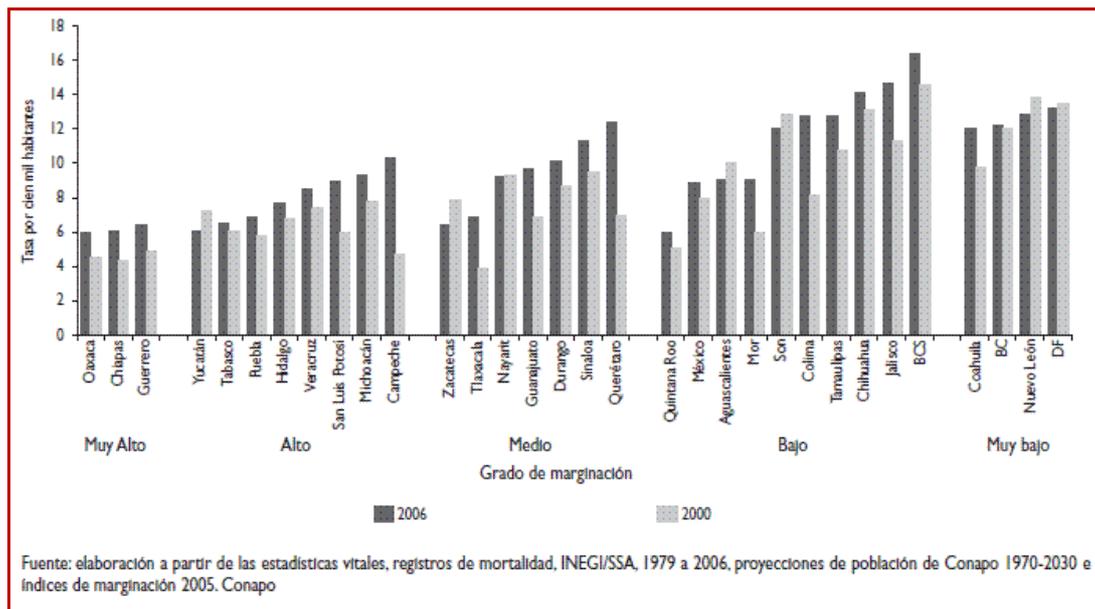


Figura 4. Tasas estandarizadas de mortalidad por cáncer de mama por entidad federativa, según grado de marginación, México 2000 y 2006.³

Michoacán ocupa el décimo lugar a nivel nacional en cuanto a incidencia del cáncer de mama. De acuerdo con cifras del 2007, se encuentra en el lugar 22 en cuanto a tasa de mortalidad por esta causa, con 11.97 defunciones por 100 mil mujeres mayores de 25 años para el año 2006. Anualmente se registran en el estado más de 200 casos.³

No se dispone de datos confiables a nivel nacional sobre la prevalencia e incidencia de la enfermedad debido a la ausencia de un registro de cáncer, sin embargo las estimaciones publicadas sugieren que en 1990 se presentaron alrededor de 6000 nuevos casos de cáncer de mama en México y se prevé una elevación de más de 16 500 por año para el 2020. La falta de acceso a los servicios de salud y a la detección temprana también sugiere que existe un gran acumulo de casos no detectados.¹

El reto es mejorar los sistemas de información y la infraestructura diagnóstica para la detección oportuna y el tratamiento adecuado con la finalidad de detener la

tendencia ascendente de la mortalidad prematura que ocurre principalmente en países en vías de desarrollo como el nuestro.

1.2 Clasificación molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama comprende un grupo muy diverso de enfermedades desde el punto de vista racial⁴, clínico, morfológico, inmunohistoquímico y biológico. Incluso tumores morfológicamente similares varían en su respuesta terapéutica y comportamiento clínico, lo que refleja la gran variación del cáncer de mama en sus características biológicas y perfiles genéticos. Esta heterogenicidad combinada con el gran avance en la detección y tratamiento del cáncer mamario, convierte en un reto el diagnóstico y el tratamiento actual de las pacientes. Por ello, es necesario identificar clases de tumores con diferente comportamiento biológico y respuesta a terapias específicas. La clasificación molecular permite una clasificación funcional del cáncer mamario, por lo que la investigación de ciertos biomarcadores y fenotipos genéticos podrían revelar posibles blancos terapéuticos e indicadores pronósticos.⁵

Actualmente en el informe histopatológico del carcinoma mamario es necesario consignar los factores de importancia pronóstica como el tamaño tumoral, el tipo y grado histológico y la presencia o no de metástasis a ganglios linfáticos axilares.⁶ Los marcadores moleculares específicos incluidos en la actualidad en el estudio del cáncer de mama son los receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y el HER-2/neu, ambos con valor predictivo y pronóstico.

Es importante señalar que además de los factores ya señalados, se han estudiado y probado en estudios clínicos algunos otros factores que aun no se encuentran bien sustentados y son la proteína p53, invasión a los vasos linfáticos y el índice de proliferación por Ki-67. Existe otro grupo más de factores que no han sido bien estudiados como son la ploidia, catepsina-D y marcadores de angiogénesis.⁶

Los receptores estrogénicos fueron identificados en los años 60's y en poco tiempo se conoció que la evidencia de estos receptores puede ayudar en la identificación de aquellos cáncer de mama que responden mejor al tratamiento endócrino (por ejemplo tamoxifeno e inhibidores de aromatasa). La presencia de progesterona, que se encuentra inducida por los estrógenos, también ha probado ser predictor de respuesta al tratamiento endócrino. Estudios previos han demostrado que los cánceres de mama positivos para receptores hormonales y aquellos negativos para los mismos, son dos entidades diferentes, con distinta morfología, genética y comportamiento biológico. Generalmente los tumores negativos para receptores hormonales, que constituyen un 20-40% de los casos de cáncer de mama, tienden a tener un alto grado histológico, mayor frecuencia de mutaciones en BRCA1 y TP53, peor pronóstico y carecen de respuesta a tratamiento hormonal. La importancia clínica de la amplificación de HER2 en el cáncer de mama fue reconocida en el año 1987. Se encuentra amplificado en aproximadamente 18-20% de los casos de cáncer de mama, y es más frecuente en tumores negativos para receptores hormonales. La amplificación del HER2 se asocia a peor pronóstico (mayor recurrencia y mortalidad) en pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama sin recibir alguna terapia adyuvante sistémica. HER2 es también

un factor predictivo para varias terapias sistémicas, particularmente para agentes con blanco HER2. El desarrollo de un anticuerpo monoclonal humano contra HER2 (trastuzumab) ha resultado en la reducción del riesgo de recurrencia y mortalidad en pacientes con amplificación del HER2.⁵

Hace tiempo se suponía que las pacientes con negatividad para receptores hormonales y HER2 tendrían mayor sobrevida por la ausencia de la amplificación del HER2, ahora estas pacientes no tienen el beneficio de alguna terapia blanco de rutina disponible. En los últimos años, los tumores triple negativos (TN), caracterizados por la falta de expresión de receptores hormonales y Her2-neu, han llamado la atención de oncólogos y patólogos como un grupo pronóstico fácilmente reconocible con un comportamiento agresivo que carece actualmente de beneficio terapéutico sistémico disponible, por lo que podría ser candidato a terapia sistémica blanco específica. Los tumores TN constituyen de un 12-24% de los cánceres de mama y son actualmente fáciles de identificar, pues en la práctica de la patología de rutina ya se incluye en el reporte la inmunohistoquímica para receptores de estrógeno, progesterona y HER2. Sin embargo, con la introducción reciente del término cáncer de mama "basal-like", semejante a células basales, tipo basal o basaloide, como una clase molecular diferente, se presenta una sobreposición de ambas entidades, lo que ha resultado en una gran confusión de la definición, características y comportamiento de este tipo de tumores.⁵

Existe una falsa concepción en los artículos acerca del descubrimiento del cáncer tipo basal (TB), puesto que la mayoría señalan fueron descubiertos por medio de los

microarreglos. Sin embargo, ya desde 1960 algunos artículos de Wellings y Roberts, Sarkar y Kallenbach y Mural y Scarpelli, demostraron que una proporción de cáncer de mama tienen fenotipo mioepitelial a nivel ultraestructural. Pero fue hasta principios de los años 80's que los experimentos de Moll et al. investigaron los perfiles específicos con citoqueratina en tejido mamario normal, benigno y maligno, que demostraron que del 2-18% de todos los cánceres de mama y más del 25% de los tumores grado III expresaron citoqueratinas de alto peso molecular y de ahí su fenotipo basal/mioepitelial. Posteriormente se reconoció que estos tumores son negativos para receptores hormonales y HER2. Por tanto, desde antes del desarrollo de los microarreglos, el cáncer de mama con fenotipo basal fue reconocido, aunque no dentro del sistema de clasificación del cáncer mamario.⁷

En el año 2000, Perou et al.⁸, demostraron que el cáncer de mama puede ser clasificado en distintos grupos moleculares basados en perfiles de expresión de genes (GEP) y sus similitudes con sus contrapartes celulares normales. La mayor diferencia entre los GEP se observó entre los tumores de resultados positivos para receptores hormonales y aquellos negativos para los mismos. Los tumores positivos para receptores hormonales se agruparon en la clase luminal (que incluyen el tipo luminal A, B y C descritos por Sorlie et al. en el año 2001), mientras que los negativos se catalogaron en 3 subgrupos moleculares distintos: 1) tumores con amplificación del HER2 (clase HER2 positiva), 2) tumores con expresión genética similar a las células basales/mioepiteliales normales de la mama (TB), y 3) tumores que carecen de amplificación de receptores hormonales, HER2 y perfil de expresión TB, los cuales tienen similitud molecular con las células estromales

mamarias normales (clase semejante a mama normal)⁸ (figura 5). La caracterización inmunohistoquímica de los cánceres TB identificados por GEP ha demostrado que la mayoría de estos tumores son triple negativos y expresan otros marcadores de células basales/mioepiteliales tales como citoqueratinas basales (CK 5/6, CK14 y CK17), vimentina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR ó HER1), además de tener un índice de proliferación elevado. La característica que llamó la atención de esta clase de tumor fue su peor pronóstico, incluso mayor que los cáncer HER2 positivos, que fue descrito por primera vez en el estudio de Sorlie et al. en el año 2001.^{7,9}

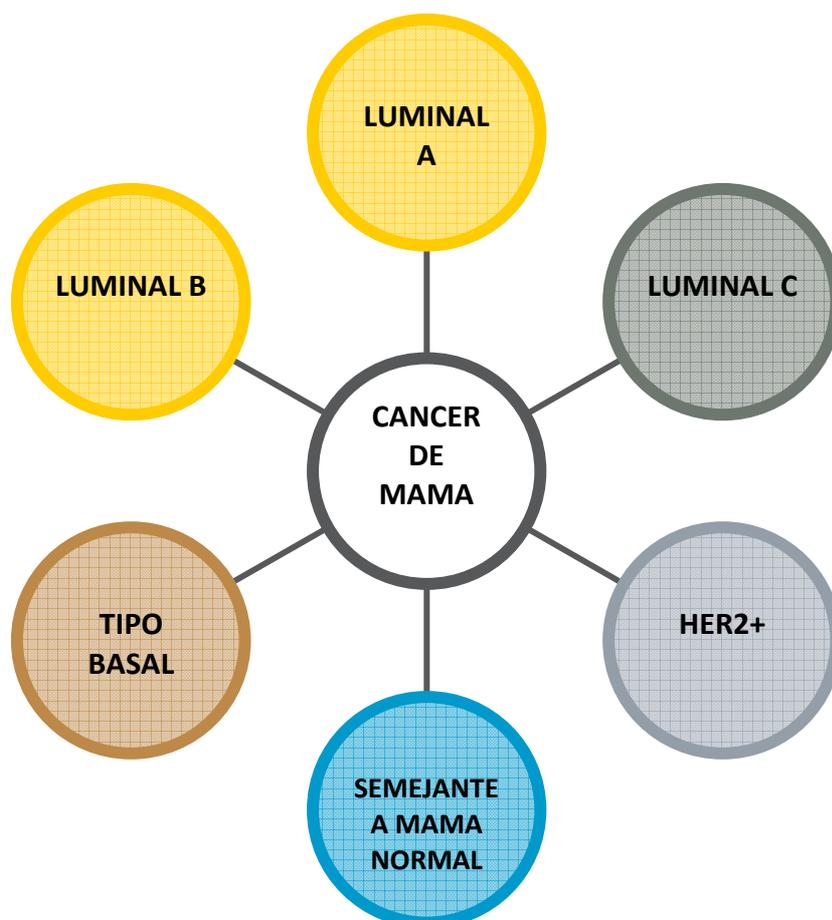


Figura 5. Tipos moleculares del cáncer de mama basados en perfiles de expresión de genes (GEP).

Aunque se ha confirmado la diversidad molecular del cáncer de mama, existe algún grado de homogeneidad entre las diferentes clases moleculares, al menos a nivel de ARNm, y pueden implicar una patogénesis en común y justificar una estrategia terapéutica enfocada. Es por eso que el cáncer de mama clase TB es una entidad que se le ha prestado mucha atención para entender su retrato molecular, biológico, clínico e identificar nuevas terapias blanco.

2. ANTECEDENTES

2.1 Consideraciones generales del cáncer de mama triple negativo y tipo basal

El cáncer de mama semejante a las células basales tiene características muy particulares que incluyen el fenotipo triple negativo. Algunos autores han afirmado que los cánceres semejante a la célula basal están compuestos casi exclusivamente por tumores triple negativos, y por tanto, el fenotipo triple negativo puede indicar de que se trata de un cáncer mamario tipo basal. Desde el punto de vista de los oncólogos, los tumores triple negativos son innegablemente uno de los subgrupos más relevantes del cáncer de mama, dado que no existen terapias blanco efectivas por ahora para este grupo y su comportamiento clínico es agresivo. Debido a que los tumores triple negativos se pueden identificar fácilmente en la práctica de rutina, a la ausencia de un consenso acerca de la definición de los tumores TB y la falta de entendimiento de los mecanismos oncogénicos y por ello blancos terapéuticos en estos tumores, algunas autoridades usan los términos TN y TB alternativamente para definir el mismo tipo de tumor. Sin embargo, existen autores que señalan que el fenotipo triple negativo no es ideal para identificar los tumores TB, ya que son entidades no sinónimas. Hay quienes incluso señalan que sí son sinónimos mediante un estudio de perfil de expresión genética con la consigna que los tumores tipo

basal son un grupo heterogéneo de tumores mediante estudio genético.¹⁰

La expresión de marcadores basales se encuentra asociada a características específicas morfológicas e inmunohistoquímicas (por ejemplo p53), mutaciones BRCA1 y mal pronóstico, comparando los tumores TN no tipo basal con los cánceres de mama TB.^{11,12} En algunos estudios GEP se demostró que los cánceres de mama TB expresan receptores de estrógenos en un 5-45% y HER2 en un 14%. Incluso Jumppanen et al.¹³ encontraron en un estudio GEP más de 1700 genes diferentes expresados entre tumores positivos para CK5/14 y negativos para receptores de estrógenos. En otro estudio de Tan et al.¹⁴ encontraron que 6 de 31 (19%) de tumores TN fueron negativos para EGFR y citoqueratinas basales, mientras que 15 de 207 (7.3%) de los tumores no triple negativos fueron positivos para marcadores basales; además 4 tumores clasificados como TB según el criterio de Nielsen, expresaron receptores de progesterona, por lo que deben ser clasificados dentro del grupo luminal. En un estudio reciente, Bertucci et al.¹⁵ reportaron que 37 (23%) tumores definidos como TB según GEP, mostraron un fenotipo no triple negativo, mientras 49 (29%) de los tumores con un fenotipo triple negativo fueron definidos como no basales por medio de GEP. Por tanto, si se define a los tumores TB mediante expresión inmunohistoquímica para marcadores basales específicos, 65-90% de los tumores triple negativos y 10-30% de los tumores positivos a receptores hormonales pueden ser clasificados como TB.⁵

De hecho, el cáncer de mama TN es una enfermedad heterogénea a nivel clínico y molecular que comprende más de una entidad. En estudios GEP, además de la clase TB, el grupo TN también incluye cáncer semejante a mama normal

(más del 10% de todos los cánceres de mama). Aunque aun poco caracterizado, se ha reportado que tiene mejor pronóstico que el TB, no responde a quimioterapia neoadyuvante y se encuentra mayormente asociado con el uso de terapia de reemplazo hormonal que otras clases moleculares. Estudios previos de inmunohistoquímica han demostrado que una proporción de tumores TN no muestra positividad con algún marcador basal específico y por tanto no puede ser clasificado como TB. A éstos se les ha denominado no clasificados, indeterminados, negativos a marcadores múltiples o subtipo nulo.⁵ En un estudio reciente de 713 tumores negativos para receptores hormonales, Liu et al.¹⁶ demostraron que 316 casos (58%) no mostraron positividad a algún marcador basal (CK5/6, CK14 y/o EGFR). Encontraron que este subtipo nulo es biológicamente y clínicamente diferente de los tumores TB.

Clínicamente, no todos los carcinomas de mama TN tienen similares características morfológicas ni comportamiento agresivo. Estudios previos han demostrado que entre el 50-80% de los tumores triple negativos expresan marcadores basales ^{12,14,15}, lo que identifica a un subgrupo tumoral que se encuentra asociado a mal pronóstico.^{11,12,17} En un estudio reciente, se mostró que la relación entre el número de ganglios positivos y tamaño tumoral no es la misma entre tumores TB y TN no tipo basal; existió una correlación positiva en los tumores TN no basales, no así en los tumores triple negativos TB donde la correlación no fue significativa.¹⁸ Con respecto a la relación entre el tamaño tumoral, estado ganglionar y la sobrevida, los cánceres TN que no expresan marcadores basales son más similares a los cánceres de mama no triple negativos que los tumores TB.¹⁸ Algunos autores señalan que la negatividad para receptores hormonales y HER2 por sí

solas para identificar el cáncer TB implica el riesgo de clasificar mal a dichas lesiones apoyado en errores técnicos y falsos negativos.¹⁹

Así, estudios de correlación que usen el fenotipo TN para identificar tumores TB estarán compuestos de una mezcla de tumores TB y no tipo basal con histología y comportamiento variables.⁵ Incluso Moinfar F. en su artículo de revisión señala que el cáncer de mama de tipo basal no representa un grupo biológico uniforme de cáncer de mama pues tiene gran variación fenotípica, de graduación y comportamiento clínico, por lo que se requiere de estudios mejor diseñados que comprueben que este subtipo representa en verdad una entidad clínico-patológica distinta.²⁰

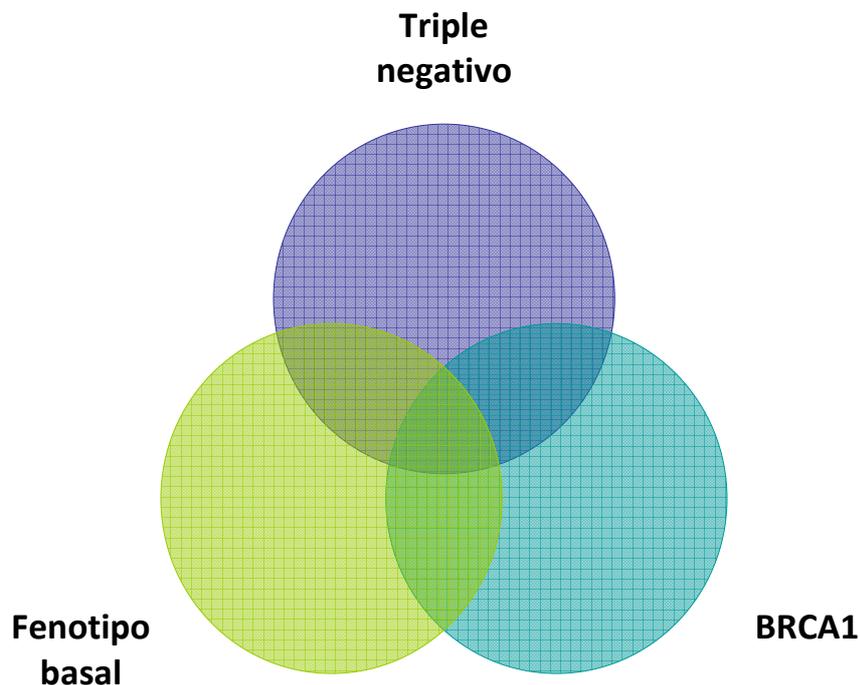


Figura 6. Los tumores triple negativos, los de fenotipo basal y los relacionados con mutaciones del BRCA1 son entidades que se superponen entre sí.

2.2 Definición de cáncer de mama tipo basal

Está reconocido actualmente que el análisis de los perfiles de expresión génica (GEP) es el estándar de oro para la identificación de los tumores TB como una entidad molecular diferente del cáncer de mama. Sin embargo es una técnica costosa y no se encuentra disponible para aplicaciones clínicas a gran escala o estudios retrospectivos con material fijado en formalina y embebido en parafina. Por tanto, la tinción con inmunohistoquímica es una técnica útil en estos casos. Teóricamente, esta técnica puede colaborar a investigaciones estandarizadas, identificar un subgrupo uniforme de tumores que tienen un programa transcripcional TB, proveer un valor pronóstico y aumentar la probabilidad que cualquier característica pronóstica/predictiva pueda ser aplicable de manera uniforme a la mayoría o todos los tumores molecularmente definidos como TB. Se han propuesto varias combinaciones inmunohistoquímicas, sin embargo, el perfil inmunohistoquímico óptimo del cáncer basal aún permanece en investigación y no existe actualmente un consenso internacional sobre el complemento preciso de marcadores que defina al cáncer TB.⁵ Nielsen et al.²¹ propusieron que la combinación de cuatro anticuerpos (RE, HER1, HER2 y CK 5/6) puede identificar con precisión los tumores TB, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 76%.¹² Rakha et al.²² afirmó que la expresión de solamente una citoqueratina basal puede definir los tumores TB, y que los marcadores adicionales sugeridos por otros investigadores no mejoraría el reconocimiento de estos casos y sí reduciría considerablemente la proporción de casos pertenecientes a este grupo de mal pronóstico. Otros estudios requieren además la ausencia de reactividad para receptores hormonales y HER2, lo que conlleva mayor

especificidad pero una sensibilidad baja para la detección de estos tumores.^{21,23} Se ha reportado que algunos marcadores que pueden servir en algún grado en la definición de los tumores TB incluyen receptores tirosin cinasas (EGFR, expresado en un 50-70% de los casos; MET), proteínas estructurales (vimentina), moléculas relacionadas con la motilidad y adhesión celular (p-cadherina, integrinas), proteínas relacionadas con células madre (nestina y p63), supresores tumorales (p53, NGFR), inhibidores de la apoptosis ($\alpha\beta$ cristallina), mediadores de angiogénesis (VEFG), osteonectina, moléculas endócrinas (GABA π), proteínas estromales asociadas a tumor (laminina, CD10), c-kit (CD117)²⁴ y otras metaloproteinasas de la matriz.^{25, 26} En un estudio reciente, Tang et al.²⁷ compararon diferentes definiciones inmunohistoquímicas de los tumores TB en 195 casos y mostró que las tasas de los tumores definidos como TB variaron de 14 a 40%; 19 a 76% para los tumores de alto grado y de 1-7% para los carcinomas de no alto grado. En todas las clasificaciones, los tumores TB se encontraron fuertemente relacionados con los tumores de alto grado. Concluyeron que esas clasificaciones se encontraban relacionadas pero que no eran intercambiables entre sí.

En consecuencia, esta variabilidad en la definición inmunohistoquímica ha creado cierto grado de discordancia y resultados contradictorios entre los diferentes estudios que consideran el tipo de clase a la que pertenecer los tumores, su significado pronóstico y su comportamiento. A este respecto, el cáncer de mama TB no es el único, puesto que otras variables pronóstica y diagnósticas bien establecidas sufren de falta de un acuerdo por consenso. Por ejemplo, no existe un consenso para la positividad del receptor estrogénico, está por cambiar según la evidencia

actual, el criterio de positividad para HER2, no hay un acuerdo universal que considere el valor de evaluar el receptor de progesterona en el cáncer de mama y no hay un criterio acordado para definir el carcinoma semejante al medular. Por tanto, es importante señalar que la clase TB ha llamado la atención desde hace varios años y la investigación está tratando de definir el mejor criterio que puede ser utilizado para identificar este tipo de tumores, y cual puede proveer el mayor significado biológico y clínico en términos de pronóstico, predicción del comportamiento y respuesta a terapia específica.⁵

A pesar de las diferentes definiciones del cáncer TB, estos tumores tienen en común ciertas características, que aunque no específicas, ayudan a identificarlas en la práctica de rutina. Estas características pueden ser usadas en conjunto para identificar este tipo de tumores con cierto grado de confianza hasta que se encuentren disponibles terapias blanco que hayan sido aprobadas. Aunque los beneficios de identificar este tipo de tumores en la práctica de rutina aún es de valor limitado, le indican al clínico que este tumor puede tener peor pronóstico, puede responder a un tipo específico de quimioterapia y finalmente, otras opciones pueden ser consideradas cuando exista suficiente evidencia, tal como terapias blanco contra nuevos marcadores tales como EGFR, c-kit, $\alpha\beta$ -crystallina o deficiencia del BRCA1.^{5,19}

2.3 Factores de riesgo y características morfológicas del cáncer de mama tipo basal

El cáncer TB representa del 8-37% de todos los casos de cáncer de mama,^{8,9,28-30} dependiendo del criterio de definición y de la proporción de los casos grado III

incluidos en la población (promedio 16.7%) estudiada. El promedio de edad de las pacientes de cáncer de mama TB oscila entre 47 a 55 años, y suelen ser pacientes más jóvenes y premenopáusicas en comparación de los tumores no basales.^{5,28,31} En E.U. son más comunes entre mujeres Afro-Americanas e Hispanas.³² Incluso se ha postulado que el cáncer de mama en pacientes Afro-americanas es biológicamente diferente a los otros tipos⁴. Los factores de riesgo epidemiológicos para el cáncer de mama TN son diferentes para aquellos no TN³³ (tabla 1).

Alta paridad, edad temprana del primer embarazo, ausencia de lactancia, uso de anticonceptivos orales (mujeres <40 años)
Edad temprana al diagnóstico (< 50 años)
Etnia Afro-Americana
Etnia Hispana
Estado socioeconómico bajo
Alto índice de masa corporal
Síndrome metabólico

Tabla 1. Factores de riesgo para cáncer de mama triple negativo.

Algunos autores han reportado que los tumores TB se encuentran mayormente asociados con historia familiar que otros tipos moleculares,³⁴ representan una mayoría de los casos del llamado cáncer de mama de intervalo (es decir, cánceres que se originan y diagnostican entre mamografías anuales), tienen características mastográficas específicas³⁵ y suelen tener un crecimiento rápido. Dentro de las características mastográficas estos tumores suelen ser unifocales, de límites más o menos bien definidos, con baja incidencia de tener microcalcificaciones y carcinoma ductal in situ peritumoral.³³ La mayoría de los tumores TB

son ductales de tipo no específico (68-86%)^{13,28} pero ocasionalmente son tubulares mixtos.²⁸ Además, la gran mayoría de los carcinomas metaplásicos y del cáncer semejante al medular, también llamados carcinomas de mama invasores con características medulares, muestran un fenotipo basal, lo cual se encuentra poco en otros tipos especiales de cáncer mama.²³ Los carcinomas de mama TB y TN son frecuentemente de alto grado histológico y de un 75-100% son grado 3.^{28,37} Otras características histológicas importantes incluyen bordes de infiltración empujantes no infiltrativos, grandes zonas de necrosis geográfica o necrosis tipo comedo, arquitectura que semeja cintas, esclerosis central que semeja cambios necrobióticos o degenerativos, áreas acelulares centrales, infiltrado linfocítico estromal, contenido estromal escaso, ausencia de formación de túbulos, marcado pleomorfismo celular, alta relación núcleo-citoplasma, cromatina vesicular, nucléolo prominente, índice mitótico elevado y frecuentes células apoptósicas.^{5,36} Se caracterizan además por la presencia de elementos metaplásicos, que incluye metaplasia escamosa y células ahusadas, y proliferación microvascular glomeruloide.³⁷ Kreike sugirió que el desarrollo de metástasis a distancia en los tumores TB se encuentran asociados con la presencia de fibrosis central y escasa cantidad de infiltrado linfocítico.¹⁰ Todas estas características que se han observado en diferentes estudios sugieren pueden ser útiles en la práctica diaria para la identificación de este tipo de tumores tan importantes y con ello considerar estudios adicionales inmunohistoquímicos con citoqueratinas basales. Incluso puede ser de ayuda en la identificación de portadores de la mutación del gen BRCA1.^{29,31}

La mayoría de los estudios han reportado una asociación entre el cáncer TB con un mayor tamaño del tumor primario y negatividad de ganglios linfáticos.^{11,18} Sin embargo otros estudios no demuestran dicha asociación.¹³ Los tumores tipo basal se pueden asociar con carcinomas ductales in situ, que por lo general son de tipo sólido, plano o micropapilar, y muestran el mismo inmunoperfil del componente invasor, lo que sugiere podrían tratarse de lesiones precursoras para dicho tipo de tumores.²⁵ Las características inmunohistoquímicas de los tumores TB incluyen la expresión positiva para citoqueratinas basales, EGFR, p53, p-cadherina, caveolinas 1 y 2, ciclina E, ki-67, c-kit, fascina, Sox2, moesina, vimentina, nestina y laminina.³⁷ Son predominantemente negativos para receptores de estrógenos, progesterona y HER2 (triple negativos), BRCA1, proteína FHIT, ciclina D1, p27 y MUC1.^{5,19,21,28} Comparado con los grupos luminales y HER2, los tumores TB demuestran expresión disminuida, pero aún frecuente, de citoqueratinas luminales y aumento en la positividad de marcadores específicos mioepiteliales como p63, SMA y CD10.^{28,38} Aunque en general estas características no son específicas y hallazgos individuales pueden encontrarse en otros tumores de alto grado considerando su perfil molecular, la presencia de todas estas características juntas con ausencia de receptores hormonales y HER2, nos debe hacer sospechar de que se trata de un cáncer TB y requiera de tinción para marcadores específicos basales.

2.4 Origen celular del cáncer de mama tipo basal

Existe una considerable cantidad de información que sustenta morfológicamente y molecularmente que las vías del desarrollo del cáncer de mama de alto y bajo grado son diferentes desde un inicio. En otras palabras, es raro que

exista una desdiferenciación de un carcinoma de bajo grado a uno de alto grado. La información hasta ahora publicada parece indicar que los tumores TB obedecen a este principio, perteneciendo a los de alto grado y que pueden ser identificados desde su estadio in situ. Se ha postulado que los tumores TB se originan probablemente de las células basales/mioepiteliales debido a su similitud inmunohistoquímica, sin embargo se debe considerar que existe una pequeña proporción celular luminal que expresan dichos marcadores basales. Otros han sugerido que la habilidad de los cánceres basales para mostrar fenotipos mixtos luminales/basales, implica su origen de una célula madre. Incluso existe la hipótesis que un tipo de BRCA1 puede funcionar como un regulador de célula madre. Sin embargo, algunos autores comentan que se trata de una teoría muy simplificada, puesto que aun se conoce poco acerca de la plasticidad de las diferentes poblaciones celulares. También se ha propuesto que la célula luminal al sufrir mutaciones adquiridas durante su evolución a célula neoplásica maligna, adquiere la capacidad de expresar una gran variedad de moléculas, dando lugar a una diferenciación divergente como ocurre en los carcinomas metaplásicos.^{7,25,39}

En conclusión, aun es incierto el origen celular de estos tumores, pero se espera que en un futuro cercano esto pueda ser dilucidado.⁷

2.5 Cáncer de mama tipo basal y cáncer de mama relacionados con BRCA-1

Las mutaciones de BRCA1 y BRCA2 constituyen alrededor del 8% de todos los casos de cáncer de mama y hasta un 40% de los casos de cáncer de mama familiar con mutaciones del

BRCA1. Los tumores triple negativos y los TB semejan en varias características clínicas, patológicas y moleculares a los tumores de mama hereditarios en mujeres con mutaciones germinales en el gen BRCA1, el cual se encarga de regular diversas funciones celulares que incluyen el control de la activación del ciclo celular y la reparación del ADN. Al igual que los tumores TB y TN esporádicos, los cánceres de mama familiares portadores de BRCA1 son tumores de alto grado que ocurren en pacientes jóvenes y se asocian a mal pronóstico, debido en parte a la predilección por presentar metástasis viscerales. En la siguiente figura se ilustra la propuesta de la vía mediada por BRCA1 que conlleva al desarrollo de los tumores triple negativos y TB.²⁵

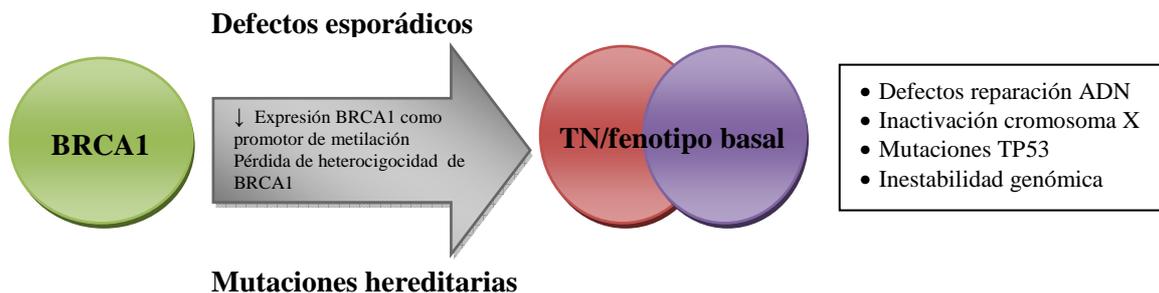


Figura 7. Vía propuesta mediada por BRCA1 que conlleva al desarrollo de los tumores triple negativos y tipo basal.

Otras vías para la formación de este tipo de tumores, no relacionadas con el BRCA1, están aún por definirse.²⁵

A nivel molecular, la mayoría de los tumores de mama asociados a BRCA-1 tienen un perfil de expresión génica TB, son triple negativos y comparten otras características moleculares de los tumores TN esporádicos, que incluye la expresión de citoqueratinas basales, EGFR, ciclina E y mutaciones del TP53. Además, la inactivación del cromosoma

X y la expresión inactiva específica de transcripción (XIST), los cuales requieren de una proteína BRCA1 funcional, son defectuosos en el cáncer mama tanto triple negativo esporádico como con el asociado a BRCA-1. En conjunto, estos hallazgos implican un mal funcionamiento en el BRCA1 en la etiología de los tumores triple negativos esporádicos. Sin embargo, a diferencia de los tumores relacionados con mutaciones del BRCA-1 hereditario, los tumores triple negativos no suelen presentar mutación a ese nivel, más bien existe una disminución del ARNm del BRCA1 y de la expresión de la proteína, como resultado de la promoción de metilación y/o sobreexpresión de ID4, un inhibidor de la expresión de BRCA1 que se expresa en los tumores TN. Por tanto, el hecho de que algunos tumores triple negativos tengan una expresión normal y localización nuclear, sugieren que el desajuste de otros componentes en el complejo de reparación del ADN del BRCA1, tal como el complejo anemia de Fanconi, puede jugar un papel etiológico en este clase de tumores.²⁵

Los tumores de mama BRCA1 hereditarios son frecuentemente triple negativos y muestran expresión para citoqueratinas basales y EGFR. Por lo que la combinación de estas características, con la morfología tumoral y la expresión de p53 y ki-67, puede ser una herramienta predictora útil para pacientes con mutaciones germinales del BRCA1, y de esta manera seleccionar de una manera más precisa a las pacientes candidatas a una prueba genética.⁴⁰ Algunas mujeres que tienen mutaciones en el gen BRCA1 no tienen historia familiar de cáncer de mama y/o ovario. De allí que al encontrar una paciente joven con cáncer, con características morfológicas e inmunohistoquímicas que indiquen se trata de un carcinoma semejante al medular o TB, se pueda alertar a los clínicos la posibilidad de una

predisposición familiar. Genetistas clínicos han estado trabajando en el desarrollo de algoritmos para ayudar a identificar mujeres que se puedan beneficiar de la prueba genética, donde además se ha demostrado que la información patológica puede ser benéfica.^{7,25}

2.6 Significado pronóstico del cáncer de mama tipo basal

El cáncer TB se encuentra asociado con el desarrollo de metástasis a distancia, sobrevida corta y tasa de mortalidad relativamente alta. En los cánceres de mama invasores pequeños detectados mediante mastografía de escrutinio, el fenotipo basal se demostró ser un poderoso factor pronóstico independiente. Además, tiene un patrón característico de metástasis a distancia. Tienen una proporción aumentada de metástasis visceral a encéfalo y pulmones, sitios que se conoce se asocian a peor pronóstico, y con menor probabilidad de metástasis en hueso, hígado y ganglios linfáticos.⁴¹ Estos datos sugieren que el cáncer TB puede tener un mecanismo distinto de diseminación metastásica probablemente por vía hematógena.

La mayoría de estudios indican un impacto negativo en el pronóstico de las pacientes tanto con tumores TN como con aquellos TB. Sin embargo existen otros autores como Cheang et al.¹² quienes señalan existe una disminución significativa en la sobrevida de los tumores TB si se compara con aquellos TN. Es importante recalcar que el efecto pronóstico adverso es independiente del alto grado tumoral, estado ganglionar, tamaño tumoral y tratamiento.^{32,33}

Aunque la gran mayoría de estudios previos han descrito que el cáncer TB tiene un comportamiento agresivo

y mal pronóstico, es importante recordar que esta clase de tumor es un grupo heterogéneo con diferentes resultados clínicos.^{19,30} Por ejemplo, los tumores semejantes al medular,⁴² el semejante a glándula salival de bajo grado y los mioepiteliales, así como el carcinoma de células ahusadas de bajo grado²⁵, tienen un fenotipo TB/TN y todos ellos muestran un pronóstico favorable. Fulford LG et al.⁴³ estudiaron la expresión de CK14 como único marcador para definir los tumores TB en 443 carcinomas invasores grado III y sugirieron que existen dos subgrupos de carcinomas basales, uno que presenta una recaída temprana y curso clínico agresivo y otro grupo que a pesar de su tradicional pobre pronóstico, no tiende a recaer, y que ambos subtipos no pueden ser identificados por las características morfológicas "típicas" de los tumores con fenotipo basal, sólo mediante la expresión de CK14, esto es, si la tinción es difusa (>90%) los tumores tienen un mejor pronóstico. Se ha descrito otra subclasificación adicional de los tumores basales de acuerdo con la expresión de citoqueratinas basales en subtipos basales y basoluminales, lo que sugiere que existen tumores con un fenotipo basal puro que tienen mejor pronóstico.⁴⁴

Estudios acerca de la respuesta de los cánceres TB a la quimioterapia neoadyuvante han demostrado que el cáncer TB tiene una mayor prevalencia de respuesta patológica completa después de haber recibido dicho tratamiento, al igual que los tumores erB2+, sin embargo, como grupo, aún tiene un mal pronóstico.^{45,46} Análisis de subgrupo mostraron que los pacientes que evolucionaron a respuesta patológica completa tienen una respuesta clínica excelente, mientras que el resto de las pacientes tienen el peor pronóstico de todos los grupos. Se ha reportado que el cáncer TB no se asocia con un aumento de riesgo de recaída locorregional

después de terapia conservadora, por lo que la cirugía conservadora se puede ofrecer a estas pacientes.^{47,48} El peor pronóstico de las pacientes con tumor TB ocurre usualmente dentro de los primeros años (es decir de 3-5 años) después del tratamiento y después no existe diferencia de resultado clínico entre tumores TB y no basales.^{11,49} Después del diagnóstico de enfermedad metastásica se ha observado una sobrevida significativamente corta en pacientes tanto con tumores TN como en aquellos TB.³³ Algunos autores como Jumppanen et al.¹³ señalan que aunque la expresión de citoqueratinas basales predice recaída temprana entre diversos tipos de tumores, la respuesta clínica de los tumores basales es similar a los tumores no basales negativos a receptores de estrógenos.

Collett et al.⁵⁰ evaluaron casos de cáncer de intervalo diagnosticados en un programa de tamizaje entre 1996 y 2001; encontraron que los cánceres triple negativo se presentaron más frecuentemente que otros tipos de cáncer. Esto puede estar relacionado a las diferencias de densidades de tejido mamario en las mujeres con cáncer de mama TN, lo que le confiere mayor dificultad su identificación mediante mastografía convencional. Otra explicación sugerida es que los tumores triple negativos pueden crecer rápidamente en relación al intervalo de tamizaje mastográfico.

Liu et al.¹⁶ comentaron en uno de sus trabajos, que existe un pequeño porcentaje de tumores negativos para receptores hormonales que expresan HER2 y marcadores basales simultáneamente, y que tienen una sobrevida global a 5 años significativamente menor que otros tumores tipo basal, por lo que sugiere se debe prestar mayor atención a

este tipo de tumores que podrían requerir de estrategias terapéuticas diferentes. Así pues se requieren más estudios para descifrar el significado clínico de los diferentes subgrupos del cáncer TB y triple negativos.

Respecto a los marcadores pronósticos de los cánceres triple negativo, Rakha EA et al.¹⁷ señaló que la evaluación del receptor de andrógenos, además de las variables patológicas ya establecidas de tamaño tumoral y estado ganglionar, es un marcador pronóstico útil, sin embargo en aquellas pacientes con ganglios linfáticos negativos, el único factor pronóstico útil es la determinación de que se trata de fenotipo basal (CK5/6 y/o CK14).

2.7 Opciones de tratamiento del cáncer de mama de tipo basal

Estudios previos han demostrado que el pronóstico del cáncer TB es tan malo como el cáncer de mama HER2 positivo/receptores hormonales negativos y las opciones estándar de tratamiento están limitadas a opciones con quimioterapia adyuvante genérica, que aun no han sido estandarizadas para estos subtipos de cáncer.¹⁴ Existen varias características inherentes a los cánceres TB que le confieren respuesta clínica y patológica a la quimioterapia neoadyuvante, tal como la negatividad a receptores de estrógenos y su alto índice de proliferación. Se ha reportado que los tumores TB definidos por GEP tienen mejor respuesta a quimioterapia neoadyuvante que aquellos que no expresan perfil TB, ya sea con adriamicina y ciclofosfamida, a paclitaxel, doxorubicina, 5-fluoracilo y ciclofosfamida, o a altas dosis de quimioterapia comparado con quimioterapia a dosis densas.⁵ Nueva información al respecto ha sugerido que existe una asociación entre la respuesta a la quimioterapia y la extensión en la respuesta

inmune local en los tumores TN, donde los marcadores predictivos de respuesta a quimioterapia neoadyuvante son el infiltrado inflamatorio por linfocitos y el nivel de células tumorales con apoptosis.³³

Se ha identificado en los tumores TB la expresión de diversos blancos terapéuticos potenciales como: receptores de superficie tal como EGFR, HER3 y HER4 y c-kit, componentes tirosin cinasas de la vía cinasa proteína activada mitógena (MAP), componentes de tirosin cinasa de la vía de proteína cinasa B (akt), y la cinasa de señalización de daño de ADN ATM. Por ejemplo, la señalización de EGFR ha sido inhibida en otro tipo de cánceres con algún éxito clínico, mediante el uso de anticuerpos directos contra EGFR o con inhibidores de la fosforilación del receptor. Estudios clínicos aun están investigando la eficacia de anti-EGFR (cetuximab con y sin quimioterapia) en el cáncer TB. El c-kit, que se encuentra expresado en una alta proporción del cáncer TB, ha sido un blanco exitoso en otro tipo de tumores con mesilato imatinib u otro tipo de inhibidores del receptor tirosin cinasa III. Dasatinib, un inhibidor src, ha demostrado efectividad en tumores triple negativos en modelos preclínicos. Los tumores TB han mostrado ser celulares y asociados con neovascularización. Bevacizumab interviene en la vía de angiogénesis del factor de crecimiento endotelial vascular, por lo que podría ser una terapia efectiva en tumores triple negativos. La similitud biológica entre los tumores asociados a BRCA1 y tumores TB ha sugerido que las estrategias que actúan contra la vía disfuncional de BRCA1 de los tumores TB podría ser efectiva. Existe evidencia de que los defectos de reparación del ADN característicos de los cánceres relacionados a BRCA1, especialmente defectos en la recombinación análoga, le confieren sensibilidad a

ciertos agentes sistémicos tales como quimioterapia basada en sales de platinum e inhibidores de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Se ha reportado también que un subtipo de tumores triple negativos, aquellos con características mesenquimales, pueden beneficiarse con el uso de inhibidores del TRAIL (factor de necrosis tumoral relacionado con ligando inductor de apoptosis).^{5,33}

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Analizar la expresión por inmunohistoquímica de CK 5/6 en los carcinomas mamarios triple negativos, sus características morfológicas y pronóstico.

3.2. Objetivos específicos

- A. Clasificar los casos de carcinoma mamario según la clasificación inmunohistoquímica TN y conocer la prevalencia de casos triple negativos y no triple negativos en nuestro medio.
- B. Analizar la expresión por inmunohistoquímica de CK 5/6 de los carcinomas mamarios triple negativos.
- C. Evaluar las características morfológicas de los carcinomas triple negativos y tipo basal y determinar si existen diferencias significativas entre ambos grupos.
- D. Comparar la sobrevida global de las pacientes con carcinoma triple negativo con aquellas con carcinoma tipo basal.

4. JUSTIFICACION

El carcinoma mamario es un grupo heterogéneo y complejo de entidades biológicas con características patológicas y comportamiento específico. Para determinar el tratamiento y predecir el pronóstico del carcinoma mamario se necesita saber el tipo, tamaño y grado tumoral, los márgenes quirúrgicos y el estado de los ganglios linfáticos, así como la expresión de los estrógenos, progesterona y HER2/neu. Gracias al estudio de perfil genético, se han clasificado los carcinomas mamarios infiltrantes en diferentes tipos, los cuales tienen implicaciones clínicas, terapéuticas y biológicas diferentes. El estándar de oro para clasificarlos es el estudio genético, sin embargo la técnica es costosa y no se encuentra disponible para aplicaciones clínicas a gran escala o estudios retrospectivos con material fijado en formalina y embebido en parafina. Por tanto, la tinción con inmunohistoquímica es una técnica útil en estos casos. Existe un grupo de tumores que en los últimos años han llamado la atención de oncólogos y patólogos por ser un grupo pronóstico desfavorable, que ocurre frecuentemente en mujeres premenopáusicas, y que es fácilmente reconocible por medio de inmunohistoquímica. Se trata de los tumores triple negativos, es decir, negativos a receptores de estrógenos, progesterona y HER2, que se ha observado tienen en su mayoría un comportamiento agresivo a corto plazo y que carece actualmente de beneficio terapéutico sistémico disponible, por lo que podría ser candidato a terapia sistémica blanco

específica en un futuro. La mayoría de estos tumores tienen fenotipo basal, el cual se ha sugerido es un factor pronóstico más confiable incluso a largo plazo, además que podría tener implicaciones terapéuticas blanco. Consideremos que puede ser identificado en la práctica de rutina mediante el estudio morfológico y mediante inmunohistoquímica, lo que sería utilidad como factor pronóstico y probablemente predictivo en nuestras pacientes.

5. MATERIAL Y METODOS

Se trató de un estudio observacional, retrospectivo y transversal.

Se realizó una revisión de todos los casos de carcinoma mamario enviados para estudio de inmunohistoquímica en el lapso de los últimos 6 años, lo cual abarca del periodo del 01 de Enero del 2004 al 31 de Diciembre del 2009.

5.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron todos los casos de carcinoma de mama triple negativo dentro del periodo de tiempo de 1 de Enero del 2004 al 31 de Diciembre del 2009 del departamento de Anatomía Patológica del Hospital General "Dr. Miguel Silva".

5.2 Criterios de eliminación

Se excluyeron para fines de análisis estadístico los casos que no contaron con bloque de parafina ni laminillas teñidas con hematoxilina-eosina para el estudio morfológico y aquellos que no contaban con expediente clínico.

5.3 Recursos humanos

Se contó con la participación de dos Anatomopatólogos adscritos del departamento de Anatomía Patológica, un Cirujano Oncólogo del Centro Estatal de Atención Oncológica, una Dra. del Departamento de Investigación del Hospital General "Dr. Miguel Silva", dos Químicas Farmacobiólogas del mismo hospital y un residente de Anatomía Patológica encargado del proyecto.

5.4 Recursos materiales

Archivo clínico
Archivo de patología
Laminillas y bloques de parafina
Procesador de tejidos
Batería de tinciones
Laminillas y cubreobjetos
Microscopio de luz
Anticuerpo de Citoqueratina 5/6
Computadora
Expedientes clínicos

5.5 Revisión de Casos

La revisión de todos los casos de carcinoma mamario enviados para estudio de inmunohistoquímica se obtuvo del registro de estudios de inmunohistoquímica del departamento de Anatomía Patológica de nuestro Hospital. Posteriormente se seleccionaron los casos triple negativo. Se consultaron los expedientes clínicos de cada una de las pacientes donde se recabó información referente a edad, estadio clínico, tiempo de seguimiento (en meses), sobrevida global (en

meses), periodo libre de recaída (en meses), periodo libre de recaída local (en meses), sitio de metástasis, tratamiento recibido, tamaño tumoral, número de ganglios linfáticos axilares con metástasis, así como el diagnóstico histopatológico. Posteriormente se revisaron nuevamente las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina y las teñidas bajo técnica de inmunoperoxidasa de los casos triple negativos, donde se valoró el tipo histológico, el grado histológico según la escala de Bloom-Richardson (túbulos, grado nuclear, mitosis), necrosis, infiltrado linfoplasmacítico, márgenes tumorales, patrón sólido, permeación linfovascular y otras características especiales según el caso. Se seleccionaron los bloques de parafina más apropiados para la determinación de la expresión de CK 5/6 mediante estudio de inmunohistoquímica y posteriormente fueron interpretados por la Patóloga adscrita y la residente a cargo del proyecto.

5.6 Técnica de tinción

Se utilizó la técnica de tinción con hematoxilina y eosina procedimiento de Mayer, el cual requirió de tejido mamario previamente fijado en formol al 10% y embebido en parafina, después de haber realizado cortes de 4 micrómetros, se colocó sobre una laminilla portaobjetos y se aplicaron los siguientes pasos:

1. Desparafinización con xilol e hidratación con alcohol, agua.
2. Tinción en la solución de hematoxilina de Harris por 5 minutos.
3. Lavar en agua durante 15 minutos.
4. Colocar en agua destilada.

5. Colocar en alcohol 80° ácido al 1% durante 1 minuto.
6. Colocar en agua amoniacal al 1% 1 minuto.
7. Contrateñir con solución de eosina durante 2 minutos.
8. Lavar en agua 2 minutos.
9. Deshidratar con alcohol 95%, alcohol absoluto, xilol por 2 minutos cada uno.
10. Montar con resina.

Como resultado de esta tinción el núcleo se tiñe de azul y el citoplasma de rosa.

5.7 Técnica de inmunohistoquímica

Se trata de una técnica que mediante el uso de anticuerpos específicos identifica antígenos específicos, es una prueba extraordinariamente sensible para detectar cantidades muy pequeñas (nanogramos) o moléculas individuales de una sustancia.

Las tinciones de inmunohistoquímica se realizaron sobre cortes de tejido previamente embebido en parafina de 3 a 4 micras de espesor con el anticuerpo monoclonal CK 5/6 (Cell Marque) dilución 1:20, después de un pretratamiento con buffer y recuperación de antígeno. Se utilizó el método de detección de inmunoperoxidasa de avidina-estreptavidina que se detalla a continuación.

Numero	Paso	Veces	Minutos	Reactivo-solución
1	Desparafinizar	2	3	Xilol
2	Deshidratar	2	3	Alcohol 100%
3	Deshidratar		3	Alcohol 95%
4	Rehidratar	2	5	TBT o agua
5	Recuperación Ag	1	15	Declere o trilogy
6	Reposo	1	20	Declere o trilogy
7	Lavado	1	5	TBT
8	Bloqueo peroxidasa endógena	1	5	H2O2 3%
9	Lavado	1	5	TBT
10	Anticuerpo primario	1	30	Anticuerpo (diluido)
11	Lavado	1	5	TBT
12	Ac. Secundario	1	30	LINK=Biotilado de unión
13	Lavado	1	5	TBT
14	Terciario	1	30	HRP= estreptavidina peroxidasa
15	Lavado	1	5	TBT
16	Cromógeno	1	10	1 gota DAB
17	Lavado	1	5	TBT
18	Contratinción	1		Hematoxilina
19	Montaje	1		Acuoso o permanente

Tabla 2. Técnica de inmunoperoxidasa de avidina-estreptavidina.

TBT= TRIS-HCL 50nM, pH 7.4-7.6, Tween 20 0.1%.

5.8 Conteo de inmunopositividad

El conteo de la positividad para CK 5/6 se realizo en un microscopio de luz de cinco cabezas a seco débil y fuerte. En cada caso los campos fueron simultáneamente analizados por el médico patólogo Rosa María Silva López y por mi como residente a cargo del proyecto. La

inmunoreactividad citoplasmática fue considerada como positiva sin importar su intensidad y con un punto de corte de 10% o más de las células neoplásicas del componente infiltrante.

5.9 Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva mediante medidas de tendencia central, medidas de dispersión y gráficas. Se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney donde la p se consideró estadísticamente significativa si es menor a 0.05.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS 12.0 y el Windows Excel 2007.

6. RESULTADOS

Se realizaron 874 estudios de inmunoperoxidasa en cáncer de mama en un período de 6 años comprendido del 1º de Enero del 2004 al 31 de Diciembre del 2009 en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital General "Dr. Miguel Silva", de los cuales 764 se trataron de tumores no triple negativos y 110 tumores triple negativos, lo que representa un 13%. De los casos triple negativos, 32 (29.09%) fueron excluidos por no contar con expediente clínico o material histológico para la valoración morfológica del tumor, por tanto fueron evaluados 78 casos (70.9%).

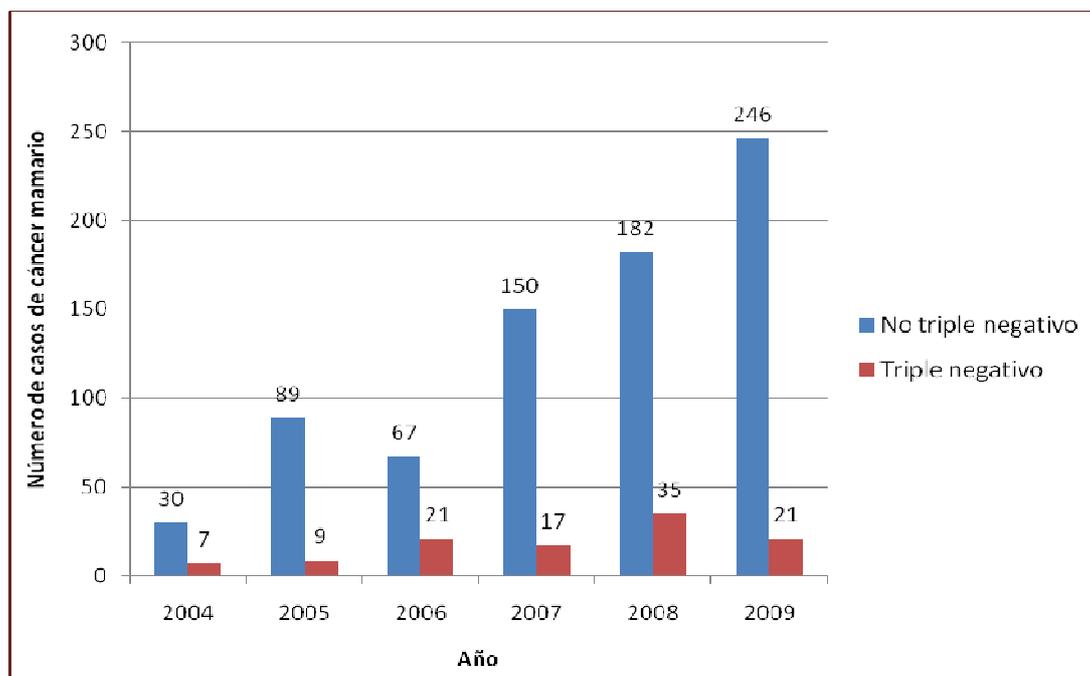


Figura 8. Número de pacientes con cáncer de mama triple negativo y no triple negativo por año.

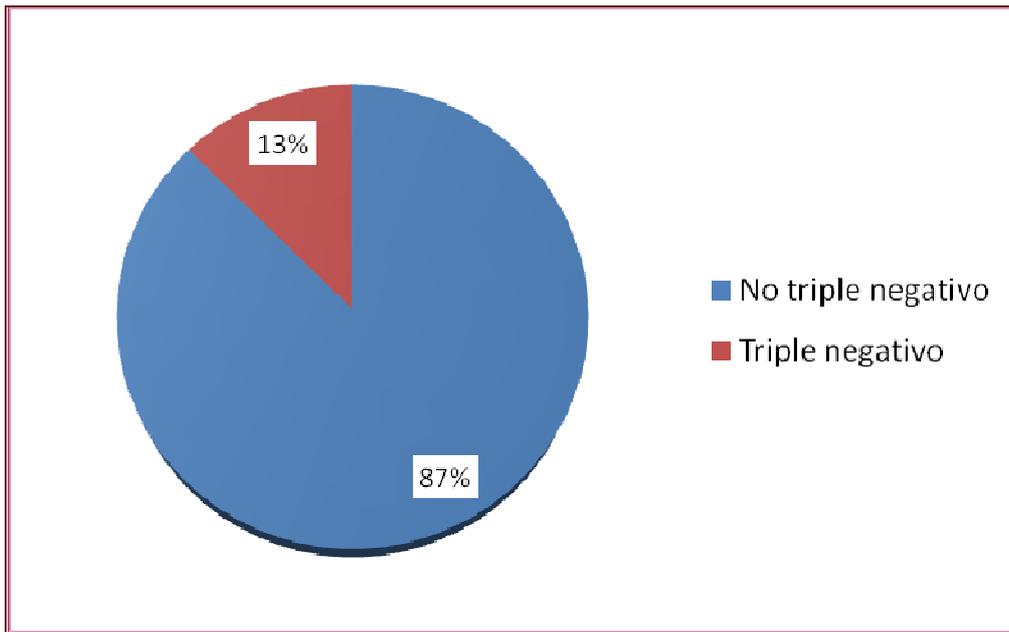


Figura 9. Relación de pacientes con cáncer de mama triple negativo y no triple negativo.

Todos los pacientes con cáncer de mama triple negativo son mujeres y su edad osciló entre 25 y 87 años con una media de 53.1 ± 13.6 años.

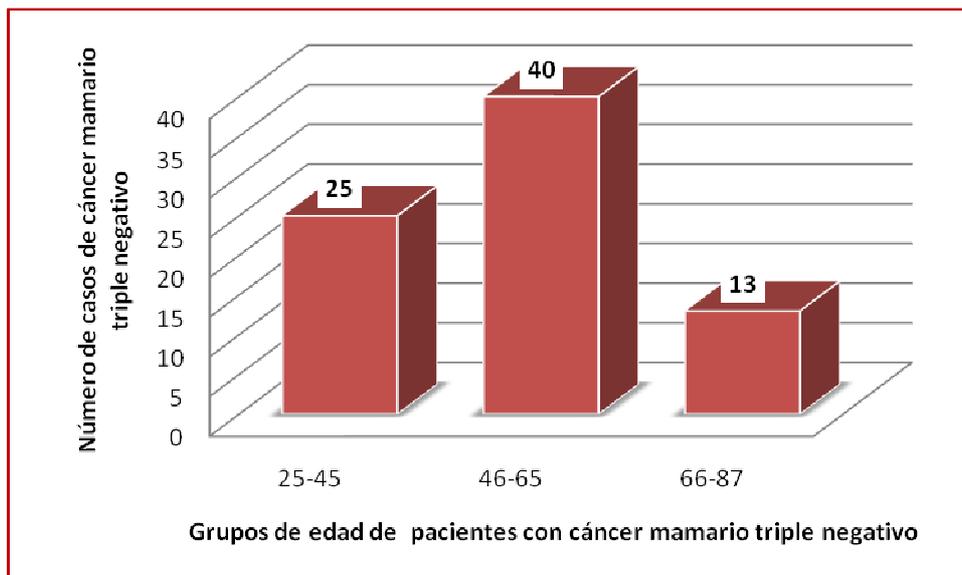


Figura 10. Número de casos por grupo de edad de las pacientes con cáncer de mama triple negativo.

El estadio clínico al momento del diagnóstico de las pacientes triple negativo fue: 2 pacientes (2.6%) en estadio I, 28 pacientes (35.9%) en estadio IIA, 15 en estadio IIB (19.2%), 10 en estadio IIIA (12.8%), 11 en estadio IIIB (14.1%), 3 en estadio IIIC (3.8%), 6 en estadio IV (7.7%), y 3 (3.8%) sin poder establecer el estadio por tratarse de pacientes tratadas fuera de la unidad de oncología (TXFU) donde ya sea el tamaño del tumor o número de ganglios linfáticos metastásicos se desconoce.

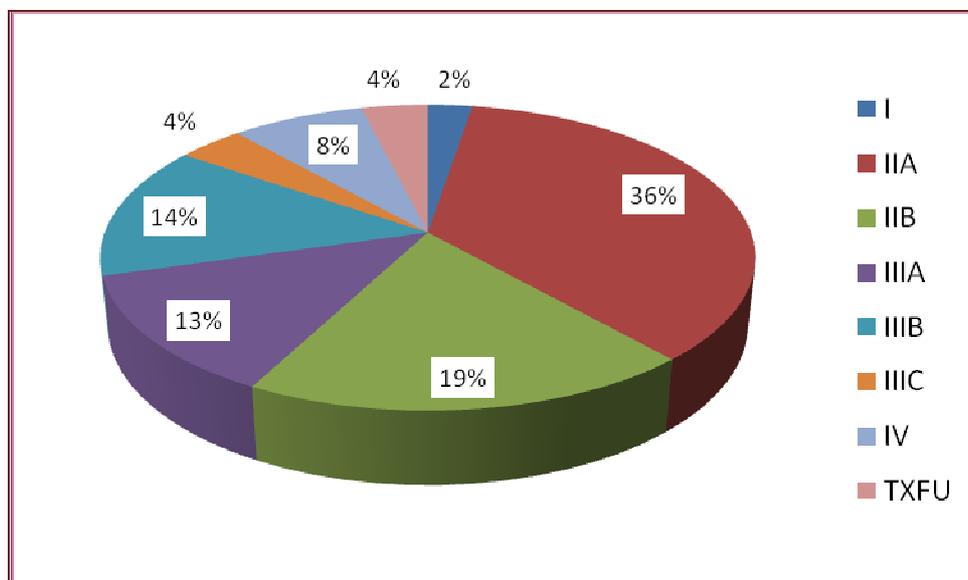


Figura 11. Estadio clínico de las pacientes triple negativo al momento del diagnóstico. TXFU= tratamiento fuera de la unidad de oncología.

El promedio del seguimiento clínico de las pacientes es de 17.8 meses con un mínimo de 0 meses y un máximo de 69 meses.

La sobrevida global media de las pacientes es de 17.8 meses. En 2 (2.5%) pacientes se reportó defunción. 15 pacientes presentaron recaída sistémica lo que representa un 19.2%. De las cuales, 4 de las pacientes presentaron metástasis pulmonares, 2 óseas, 2 óseas y a pulmón, 2 a sistema nervioso central y pulmón, 1 a hígado, 1 a hueso,

pulmón y sistema nervioso central, 1 a pulmón e hígado, 1 a pulmón, hígado y hueso y 1 a sistema nervioso central. La sobrevida libre de recaída tiene una media de 14.2 meses (0-54 meses). 7 pacientes presentaron recaída local lo que representa un 8.9% y la sobrevida libre de recaída local tiene una media de 28.1 meses (5-54 meses).

Una paciente tuvo cáncer de mama asociado a embarazo.

El tratamiento recibido por las pacientes se muestra en el siguiente cuadro, donde el más frecuente corresponde a tratamiento con cirugía, quimioterapia y radioterapia en un 32% de los casos (25/78 pacientes).

Tipo de tratamiento recibido	Frecuencia	Porcentaje
Ninguno	4	5.1
Quimioterapia	5	6.4
Cirugía	4	5.1
Cirugía y terapia antiestrogénica	1	1.3
Cirugía y quimioterapia	18	23.1
Cirugía, quimioterapia y terapia antiestrogénica	6	7.7
Cirugía, quimioterapia y radioterapia	25	32.1
Cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia antiestrogénica	8	10.3
Cirugía, quimioterapia, radioterapia y trastuzumab	4	5.1
Cirugía y radioterapia	3	3.8
Total	78	100

Tabla 3. Frecuencia del tratamiento recibido por las pacientes con cáncer de mama triple negativo.

El promedio de ganglios linfáticos axilares positivos es de 1.8 con un mínimo de 0 ganglios linfáticos y un máximo de 17. Los ganglios linfáticos axilares resultaron con mayor frecuencia negativos (56.3%), seguido por 3 ganglios linfáticos positivos (10.9%), véase tabla 4.

Número ganglios linfáticos positivos	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
0	36	46.2	56.3
1	6	7.7	9.4
2	6	7.7	9.4
3	7	9	10.9
4	3	3.8	4.7
5	1	1.3	1.6
6	1	1.3	1.6
10	1	1.3	1.6
12	1	1.3	1.6
16	1	1.3	1.6
17	1	1.3	1.6
Total	65	82.3	100
No valorados	14	17.9	
Total	78	100	

Tabla 4. Número de ganglios linfáticos axilares positivos en pacientes con cáncer mamario triple negativos.

El promedio del tamaño tumoral es de 4.6 cm y osciló entre 0.9cm y 25 cm. El tamaño tumoral más constante fue de 3 cm en un 23% (17/74 pacientes).

El tipo histológico más frecuente de las pacientes con cáncer de mama triple negativo es el carcinoma ductal infiltrante en un 70.5%, el resto se encuentra representado por carcinoma metaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular, comedocarcinoma, carcinoma apócrino, carcinoma lobulillar, carcinoma tubular, carcinoma tubular y carcinoma mucinoso. Véase Tabla 5.

Tipo Histológico	Frecuencia	Porcentaje
Ca apócrino	1	1.3
Ca ductal infiltrante	55	70.5
Ca ductal infiltrante y ca mucinoso	1	1.3
Ca ductal infiltrante y ca tubular	1	1.3
Ca ductal infiltrante y metaplásico	6	7.7
Ca lobulillar infiltrante	1	1.3
Ca medular	1	1.3
Ca metaplásico	2	2.6
Ca poco diferenciado	6	7.7
Ca poco diferenciado y metaplásico	1	1.3
Carcinoma ductal infiltrante y metaplásico	1	1.3
Comedocarcinoma	2	2.6
Total	78	100

Tabla 5. Tipos histológicos de los casos con cáncer de mama triple negativo. Ca= carcinoma.

El grado histológico más frecuente según la clasificación de Scarff-Bloom Richardson (SBR) es el grado II (moderadamente diferenciado) en un 36% (27/75), seguido del grado III (poco diferenciado) en un 34.6% (26/75) y finalmente el grado I (bien diferenciado) en un 29.3% (22/75). Con respecto a los parámetros a evaluar según esta clasificación, la puntuación más frecuente en la formación de túbulos es de 3 en un 49.3%, en la del grado nuclear es de 2 en un 46.7% y en la de número de mitosis es de 3 en un 41.3%.

Según las características morfológicas evaluadas el margen tumoral empujante resultó el más constante en un 60.3% (47/74). En el resto de las características morfológicas, lo más frecuente con respecto a la necrosis estuvo ausente en un 43.6%, del infiltrado inflamatorio linfoplasmacítico el encontrarse presente en una x (de manera focal) en un 46.2%, del patrón sólido es que éste estuviera ausente en un 38.5%, seguido del patrón sólido de

XXX o dominante en un 37.2%. La permeación linfovascular estuvo mayormente ausente en un 80.8%. No se pudieron observar otros patrones en un 89.7%, pero existen algunos con patrón acintado observado en 4 casos, lo que corresponde a un 5.1%. En 2 casos se observó una cicatriz central y en otros 2 necrosis central, lo que representa un 2.6% en cada uno de ellos.

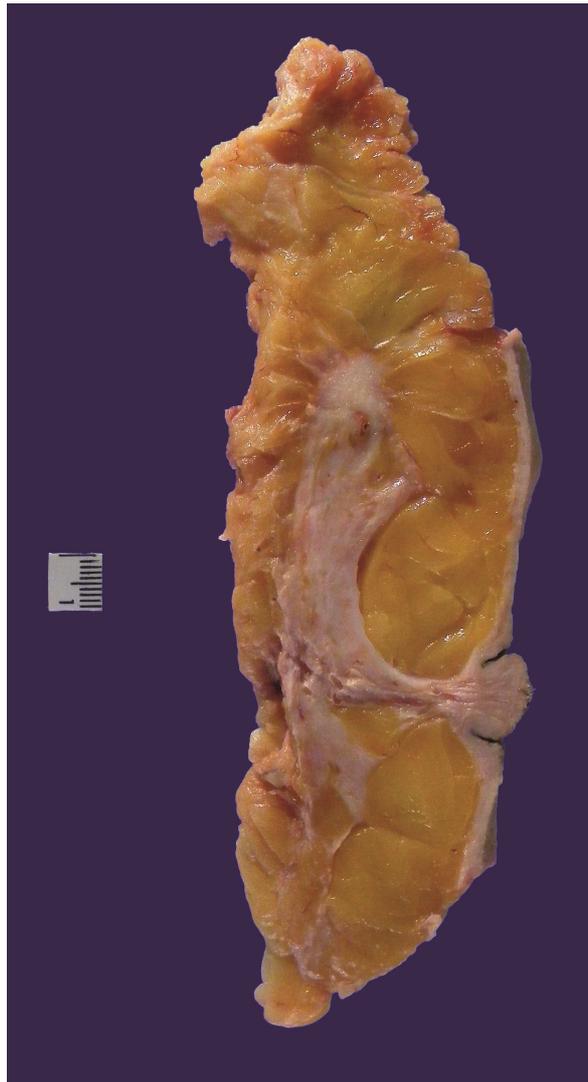


Foto 1. Carcinoma ductal infiltrante en glándula mamaria izquierda. Se observa una lesión irregular de bordes infiltrantes, sólida, blanquecina y firme que mide 1.5cm de diámetro.

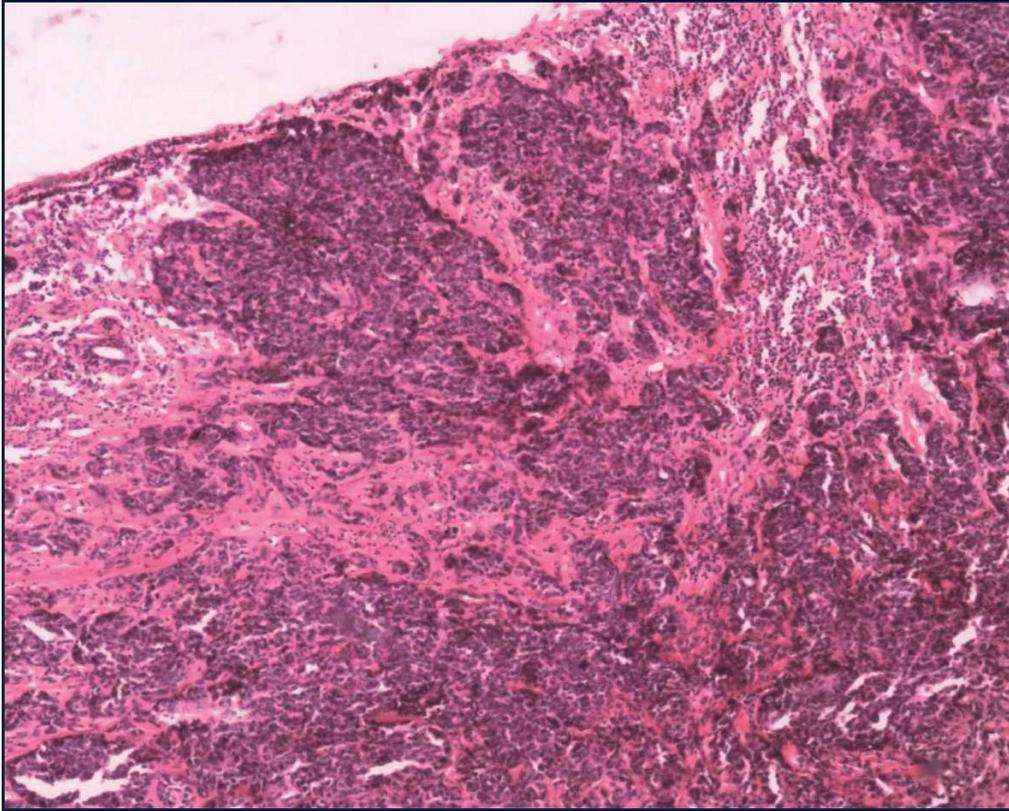


Foto 2. Carcinoma ductal infiltrante grado 3 en la escala SBR, nótese los bordes empujantes de la neoplasia y su patrón sólido predominante.

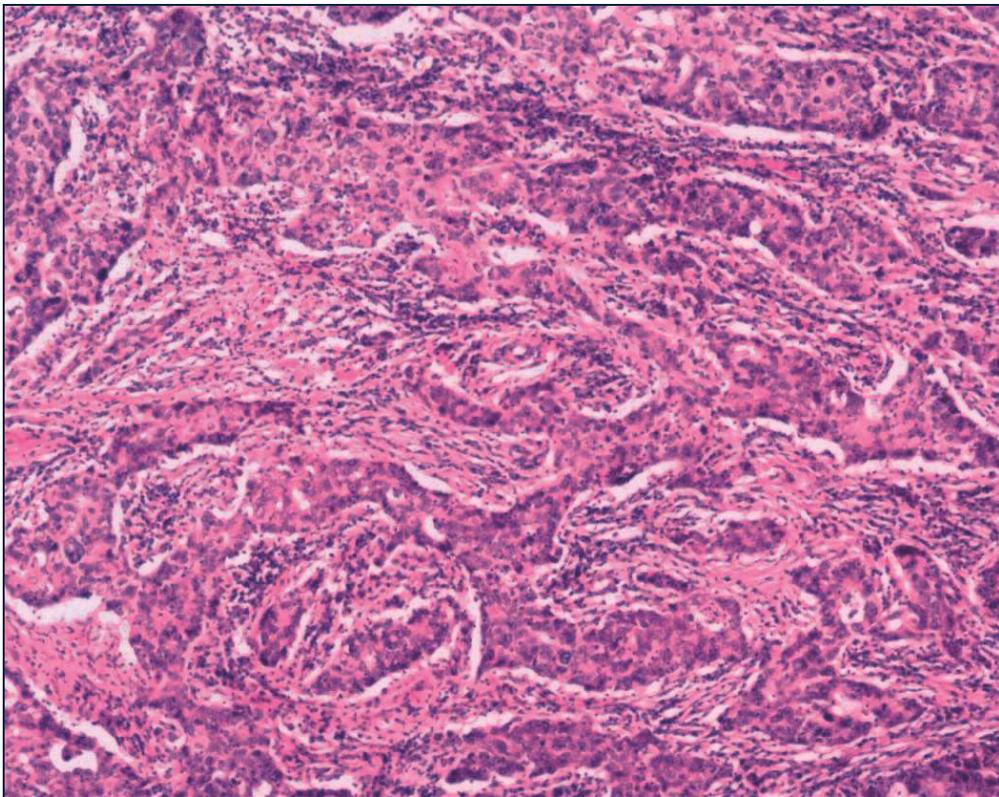


Foto 3. Carcinoma ductal infiltrante grado 2 en la escala de SBR, se observa la disposición trabecular de las células neoplásicas.

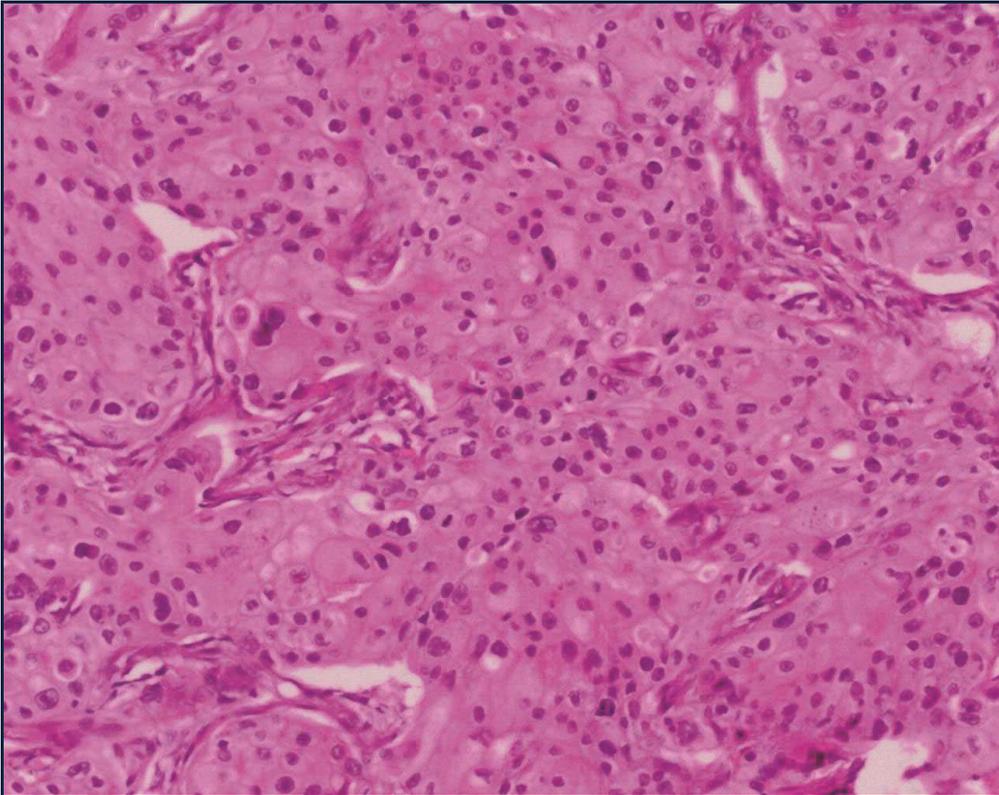


Foto 4. Carcinoma metaplásico (escamoso).

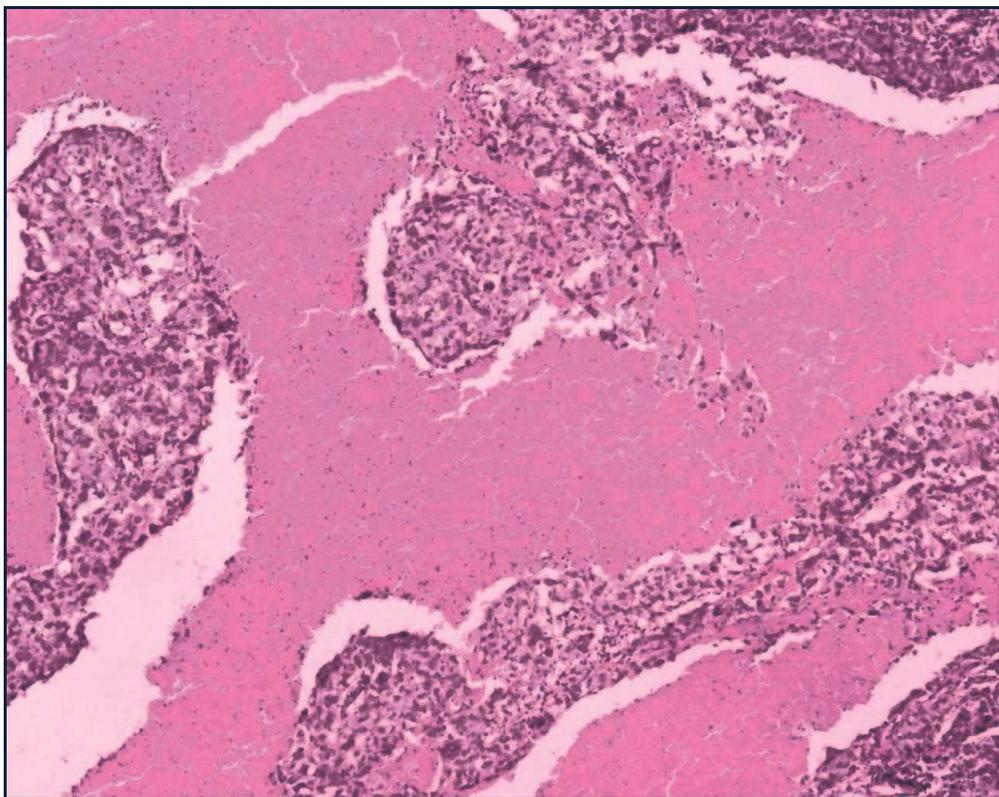


Foto 5. Carcinoma ductal infiltrante grado 2 en la clasificación de SBR. Nótese la gran cantidad de necrosis tipo geográfico.

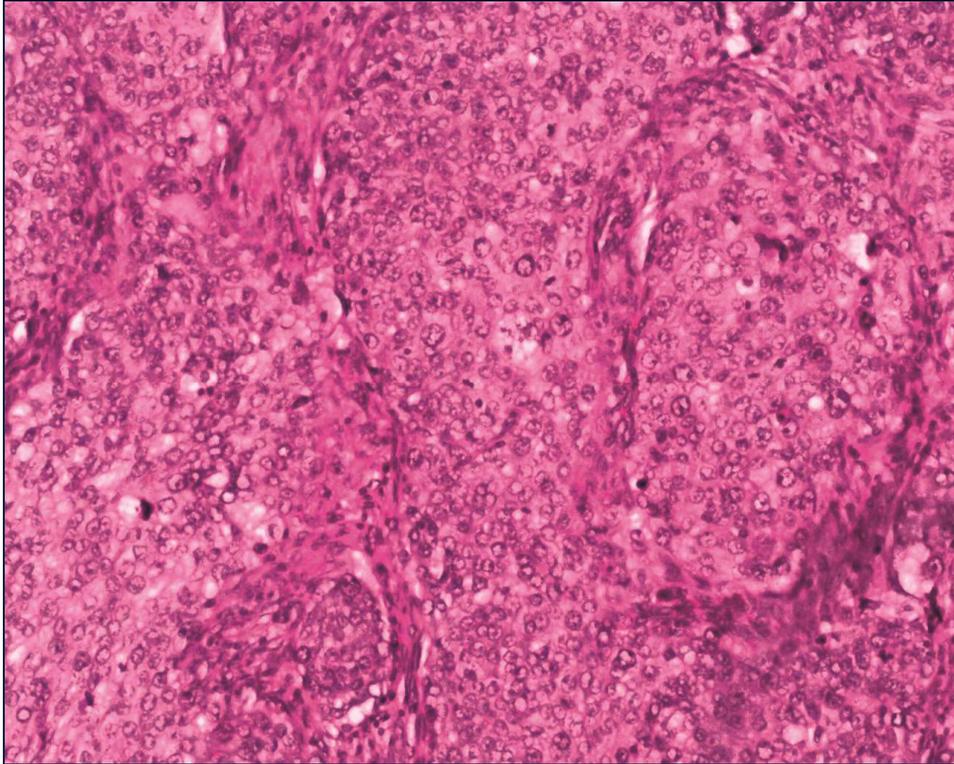


Foto 6. Carcinoma ductal infiltrante grado 3 en la clasificación de SBR. Las células neoplásicas malignas tienen un patrón sólido, el pleomorfismo es moderado y se observan gran cantidad de mitosis.

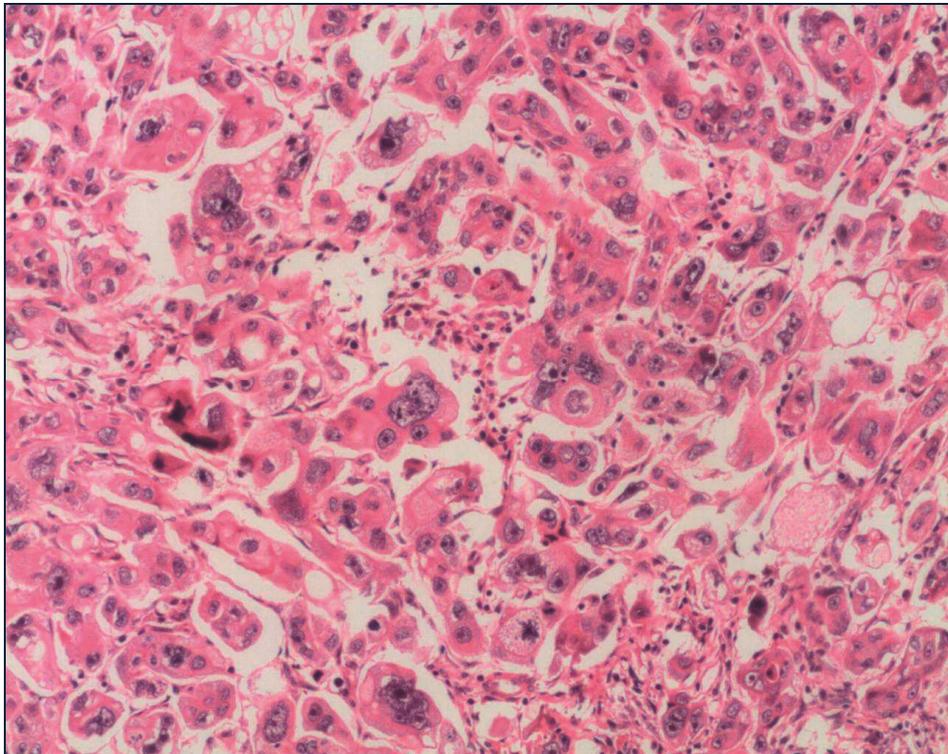


Foto 7. Carcinoma medular. La atipia nuclear es acentuada y los nucléolos son prominentes.

51 de los 78 casos (65.38%) de cáncer de mama triple negativo contaron con bloque de parafina para la realización de la tinción con el anticuerpo CK 5/6 mediante la técnica de inmunohistoquímica. 39 resultaron positivas y 12 negativas, lo que representa un 76.4% y un 23.5% respectivamente.

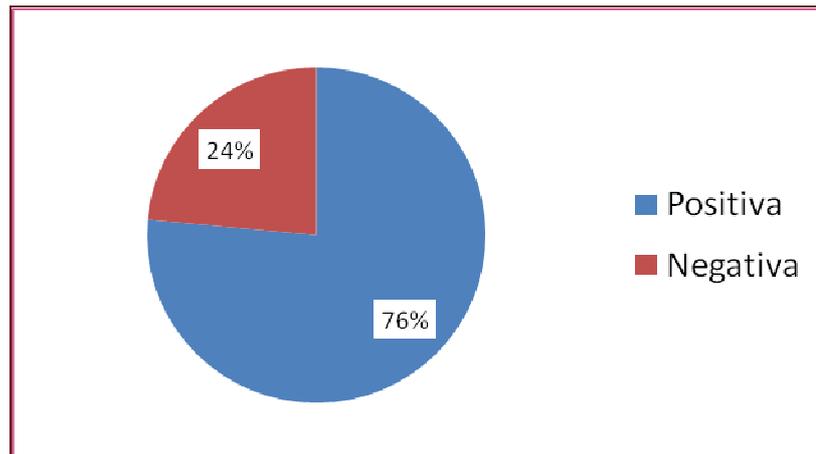


Figura 12. Porcentaje de casos de cáncer de mama TN positivos y negativos para CK 5/6.

No existe diferencia en la sobrevida global de las pacientes con cáncer de mama triple negativo y las de tipo basal ($p=0.484$), así como tampoco en sus características morfológicas ($p= > 0.05$).

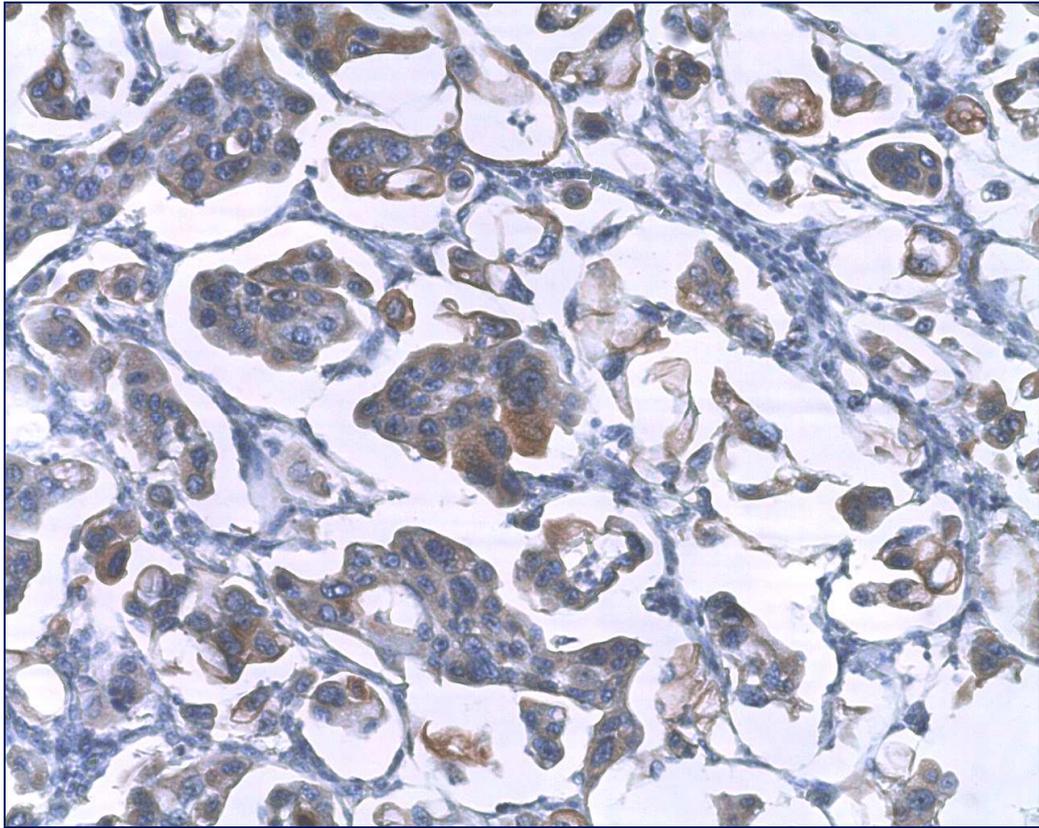


Foto 8. Tinción de inmunohistoquímica con anticuerpo CK 5/6. Nótese su positividad citoplásmica en 30% de las células neoplásicas.

7. DISCUSION

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial. En nuestro país y nuestro medio no es la excepción, pues el número de casos ha ido en aumento, lo que se ve reflejado en este estudio al verse incrementado el número de casos por año de cáncer de mama para estudio de inmunohistoquímica. La explicación a este suceso podría corresponder a una mayor y mejor cobertura de atención médica de las pacientes y a una mejor educación en la salud.

El estándar de oro para determinar el tipo de cáncer mamario según la clasificación molecular es el estudio genético lo cual no se encuentra disponible en gran cantidad de centros de atención y tiene un costo elevado. Sin embargo ahora con la técnica de inmunoperoxidasa es posible identificar el tipo molecular del que se trata un tipo de tumor en específico. Ya han sido estandarizados para el reporte histopatológico receptores de estrógenos, progesterona y Her2-neu, los cuales representan factores pronósticos y predictores. En los últimos años se ha puesto singular atención a un tipo de cáncer de mama que resulta negativo para los anticuerpos ya citados y que se caracteriza por tener en general un mal pronóstico y una escasa disponibilidad de tratamientos médicos bien protocolizados. Este tipo de tumores son un grupo complejo heterogéneo que incluye en su mayoría tumores de fenotipo

basal, que aunque no se ha definido con precisión qué tipo de marcadores de inmunohistoquímica lo definen, uno de los mayormente aceptados es aquel positivo para CK 5/6, que es el utilizado en este estudio.

Los tumores malignos de mama triple negativos en nuestro medio representan un 13% de los casos y el 87% restante aquellos no triples negativos. Esta cifra coincide con otros estudios ya publicados (8-37%).^{8,9,28-30} La edad promedio de las pacientes con cáncer de mama triple negativo es de 53.1±13.6 años, lo cual coincide también con otros estudios.^{5,28,31} El estadio clínico al momento del diagnóstico de cáncer mamario más frecuente es el IIA en un 35.9% (28/78 pacientes). El promedio de seguimiento clínico de las pacientes es de 17.8 meses con un mínimo de 0 meses y un máximo de 69 meses. La sobrevida global media de las pacientes es de 17.8 meses y sólo 2 de 78 pacientes se reportaron con defunción (2.5%). 15 de 78 pacientes presentaron recaída sistémica (19.2%), de los cuales el pulmón es el órgano mayormente afectado, lo que sugiere que este tipo de tumores tienden a dar metástasis por vía hematológica.⁴¹ La sobrevida libre de recaída tiene una media de 14.2 meses. 7 de 78 pacientes presentaron recaída local (8.9%) con una sobrevida libre de recaída local media de 28.1 meses. A pesar de que el seguimiento de las pacientes no fue mayor a 5 años, la recaída local y sistémica ocurrió dentro de este periodo de tiempo en algunas pacientes.

El tratamiento recibido con mayor frecuencia a las pacientes con cáncer de mama triple negativo fue el que combina cirugía, quimioterapia y radioterapia en un 32% (25/78 pacientes). El promedio de ganglios linfáticos axilares positivos es de 1.8 y del tamaño tumoral de 4.6cm.

El tipo histológico más frecuentemente observado es de carcinoma ductal infiltrante en un 70.5%, lo cual coincide con lo ya reportado en otros estudios.^{13,28} El grado histológico según la clasificación de Scarff-Bloom Richardson más frecuentemente encontrado es el grado II en un 36%, frecuencia que no corresponde con los trabajos ya publicados.^{28,37} La única característica morfológica más constante en este tipo de tumores es el borde tumoral empujante en un 60.3% de los casos, sin embargo sí se encontraron algunas otras características ya descritas en este tipo de tumores,^{5,36,37} aunque en pocos casos, como es el patrón acintado, presencia de una cicatriz /necrosis central, necrosis extensa, infiltrado linfocítico estromal y presencia de elementos metaplásicos.

76.4% de las pacientes con cáncer de mama triple negativo resultaron positivas para la inmunotinción CK 5/6 (39/51 casos), que corresponde a la mayor parte de los casos de cáncer de mama triple negativo, lo que concuerda con los datos ya publicados.^{5,12,14,15} En cuanto a la sobrevida global y las características morfológicas de ambos grupos, uno de cáncer de mama triple negativo y otro de cáncer de mama de tipo basal, no observamos diferencias estadísticamente significativas. Hay que señalar que las publicaciones previas al respecto son muy variadas^{11,12} y coincide con lo citado sólo en algunas de ellas.^{5,13,28,37}

Las limitaciones de este estudio consistieron en la falta de expedientes clínicos, falta de laminillas o bloques de parafina, corto seguimiento clínico de las pacientes, ausencia de alguna de las variables en determinados casos y que el grupo de casos de cáncer de mama triple negativo es relativamente pequeño.

8. CONCLUSIONES

El cáncer de mama triple negativo es un grupo heterogéneo y complejo que es importante identificar en la práctica de rutina por el pronóstico adverso y opciones limitadas de tratamiento a las pacientes. En nuestro medio estos casos han ido en aumento al igual que los estudios de inmunoperoxidasa solicitados para cáncer mamario, por lo que es importante tener este grupo de pacientes en cuenta.

Existen ciertas características morfológicas ya descritas en este tipo de tumores triple negativos que pueden ser identificadas mediante tinciones convencionales al estudio de microscopía de luz que pudieran en determinado momento orientarnos se trate de un caso triple negativo o bien tipo basal, por lo que sugerimos el estudio adicional de estos casos además de con los marcadores ya estandarizados, con el anticuerpo CK 5/6 para células basales que tenemos disponible en nuestro laboratorio.

En este estudio se corroboró que las pacientes con cáncer de mama tanto triple negativo como aquellas tipo basal representan un grupo complejo con un pronóstico adverso que requiere de atención especial debido a que hasta la fecha no es posible ofrecer un tratamiento estandarizado ni blanco efectivo.

Aunque no existieron diferencias significativas pronósticas ni morfológicas entre los tumores triple negativos y los de fenotipo basal, es importante conocer que en un futuro algunos marcadores basales pueden representar blancos terapéuticos.

9. REFERENCIAS

1. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola H, Langer A, Frenk J. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública Mex* 2009; 51; 335-344.
2. Porter PL. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Pública Mex*; 2009; 51; 141-146.
3. Palacio LS, Lazcano E, Ellen-Leigh B, Hernández M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1970 y 2006. *Salud Pública Mex* 2009; 51; 208-219.
4. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007; 109; 1721-1728.
5. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer. Review. *Pathology*. 2009; 41; 40-47.
6. Piña OS, Ortiz HC. Biomarcadores como factores pronósticos y predictivos en carcinoma de glándula mamaria. Criterios actuales de interpretación por inmunohistoquímica. *Patología*; 2006; 44; 45-59.
7. Da Silva L, Clarke C, Lakhani SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 2007; 60; 1328-1332.
8. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406; 747-752.
9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98; 10869-10874.

10. Kreike B, Van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, Van de Vijver J. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast cancer Res* 2007; 9.
11. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7; 134.
12. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1368-1376.
13. Jumppanen M, Grubbe SS, Kauraniemi P, Tanner M, Bendahl P, Lundin M, et al. Basal-like phenotype is not associated with patients survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R16.
14. Tan DSP, Marchió C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M. et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111:27-44.
15. Bertucci F, Finetti P, Cevera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J. Cancer* 2008; 123:236-240.
16. Liu Hui, Fan Qinhe, Zhang Zahihong, Li Xiao, Yu Huiping, Meng Fanqing. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. *Human Pathology* 2008; 39:167-174.

17. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109; 25-32.
18. Foulkes WD, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. Brief Report. *Breast Cancer Res Treat*; 2008; DOI 10.1007/s10549-008-0102-6.
19. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J. Clin. Oncol.* 2008 26:2568-2581.
20. Moinfar F. Is basal-like carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology* 2008; 75:119-131.
21. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2004; 10; 5367-5374.
22. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AHS, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology* 2007; 50; 434-438.
23. Rodriguez-Pinilla SM, Rodriguez-Gil Y, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Martín-Guijarro MDC, Hernández L, et al. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:501-508.
24. Simon R, Panussis S, Maurer R, Spichtin H, Glatz K, Tapia C, et al. Kit (CD117)-positive breast cancers

- are infrequent and lack Kit gene mutations. *Clin Cancer Res* 2004; 10:178-183.
25. Diaz LK, Cryns VL, Symmans F, Sneige N. Triple Negative Breast Carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to Clinical Practice. *Adv Anat Pathol*; 2007; 14; 419-427.
 26. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A et al. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res*. 2004; 64; 3037-3045.
 27. Tang P, Wang J, Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same?. *Human Pathology*; 2008; 39; 506-513.
 28. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J. Pathol.* 2006; 208; 495-506.
 29. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006; 49; 22-34.
 30. Jones C, Ford E, Gillett C et al. Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10;5988-5997.
 31. Buys DLJ, Zarate A. Carcinoma mamario con inmunofenotipo similar al de las células basales. Estudio morfológico y perfil de expresión inmunohistoquímica en 54 casos triple negativos. *Patología*. 2008; 46(4):303-8.

32. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295:2492-502.
33. Gluz O, Leidtke C, Gottschalk N. Triple negative breast cancer-current status and future directions. *Annals of Oncology* 20:1913-1927. 2009.
34. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population based study. *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:439-43.
35. Luck AA, Evans AJ, James JJ et al. Breast carcinoma with basal phenotype: mammographic findings. *AJR AMJ Roentgenol* 2008; 191:346-51.
36. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, Fukutomi T, Hirohashi S. Large, central acellular zones indicating mioepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastasis. *Am J Surg Pathol* 2002; 24 (2):197-202.
37. Kuroda H, Ishida F, Nakai M, Ohnisi K, Itoyama S. Basal cytokeratin expression in relation to biological factors in breast cancer. *Hum Pathol* 2008; 39: 1744-1750.
38. Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 2006; 19; 264-271.
39. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast cancer Res* 2005; 7:143-148.
40. Van der Groep P, Bouter A, Van der Zanden R, Siccama I, Menko FH, Gille JJP, Van Kalken C, et al. Distinction between hereditary and sporadic breast

cancer on the basis of clinicopathological data. *J Clin Pathol* 2006; 59:611-617.

41. Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, Coleman KA, Yoder BJ et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK 5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1097-1104.
42. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res.* 2007; 9; R24.
43. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res.* 2007; 9; R4.
44. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Lellokumpu-Lehtinen P, Malmstrom P, Wilking N, Bergh J, Isola J. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1485-4191.
45. Carey LA, Dees EC, Sawyer L et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13; 2329-2334.
46. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (6): 5678-5685.
47. Haffty BG, Yang Q, Reiss M et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively

- managed triple negative early-stage breast cancer. J. Clin. Oncol. 2006; 24; 5652-5657.
48. Korshing E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecher W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. J Clin Pathol 2008;61:553-560.
49. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res 2007; 13(15):4429-4434.
50. Collett K, Stefansson IM, Eide J, et al. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1108-12.