

Facultad De Medicina

CENTRO MEDICO ABC

**“CORRELACION ENTRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN GENICA DE ONCOTYPE DX™
(INDICE DE RECURRENCIA) Y LAS VARIABLES HISTOLÓGICAS E
INMUNOHISTOQUÍMICAS EN EL CARCINOMA MAMARIO”**

**ANALISIS DE LOS PRIMEROS 38 CASOS INFORMADOS EN MEXICO EN EL CENTRO
MEDICO ABC DE LA CD. DE MEXICO.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMIA PATOLOGICA**

PRESENTA:

DR. IKER TRUEBA SALAZAR

**TUTOR DE TESIS:
DR. CARLOS ORTIZ HIDALGO**

MÉXICO D.F.

2011



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. JOSE HALABE CHEREM

JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

DR. CARLOS ORTIZ HIDALGO

JEFE DE PATOLOGIA/TUTOR DE TESIS

DEDICATORIA

A Erika, mi compañera incondicional, la razón de todas mis voluntades y el motivo de mi dedicación. Gracias por tu apoyo eterno y por todo ese cariño tan sentido, tan noble, tan limpio y tan puro. Te amo siempre.

A mi padre, en quien siempre admiré la bondad de sus actos, su amor y esfuerzo por nosotros y su sabiduría en todo y a mi madre por los gratos y valerosos ejemplos del día a día y por todo ese amor sin condiciones.

A mis hermanos Alberto, David y Ainhoa por ser fuente del amor que en toda mi vida existe y por sus ejemplos de nobleza, dedicación y de vida.

Especialmente a Maria Luisa y Pepin, donde quiera que se encuentren, por inculcarme el valor fundamental de la familia. Generaron un amor tan profundo y verdadero que originaron en mí un reto personal para poder lograr algo siquiera parecido a lo que siempre vi en ustedes dos. El agradecimiento es infinito y eterno. Nunca los olvidaré.

A Irene y Miguel por todo su apoyo y su cariño.

A todos mis primos, amigos y todos aquellos que estuvieron pendientes de mis pasos en todo este tiempo.

¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros, los doctores Carlos Ortiz, Beatriz de León, Javier Baquera, Tere Cuesta, Álvaro Padilla, Nayeli Martínez y César Lara por sus enseñanzas; que sepan que admiro mucho su trabajo y toda su dedicación.

Al personal técnico y administrativo del Centro Médico ABC por todo su apoyo durante estos tres años.

Especialmente a la Dra. Isabel Alvarado Cabrero por transmitirme tantos conocimientos pero sobre todo por su humanismo y su apoyo en una dura etapa de mi vida personal.

Al Dr. José Halabe Cherem, por su noble trabajo y dedicación.

A la Dra. Itndehui Mejía; sin su apoyo no habría sido posible este trabajo.

INDICE

I.INTRODUCCION	8
II.RESUMEN	9
III.MARCO TEORICO	10
1. Histología de la glándula mamaria	
2. Patología de la glándula mamaria	11
2.1 Carcinoma de mama	12
2.1.1 Epidemiología	
2.1.2 Características anatomopatológicas del carcinoma de mama	
- Carcinoma ductal	13
- Carcinoma lobulillar	
- Sistema de Scarff-Bloom-Richardson	
2.1.3 Inmunohistoquímica en cáncer de mama	15
2.1.4 Estudio de expresión genética en carcinoma de mama	17
IV.MARCO DE REFERENCIA	25
V.JUSTIFICACION	26
VI.HIPOTESIS	28
VII.OBJETIVOS	29
VIII.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	

IX.MATERIAL Y METODOS	31
9.1 Tipo de investigación	
9.2 Universo de estudio	
9.3 Criterios de inclusión	
9.4 Criterios de exclusión	
X. RESULTADOS	36
XI. TABLAS Y FIGURAS	39
XII. DISCUSION	47
XIII. CONCLUSIONES	49
XIV. REFERENCIAS	57

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de mama actualmente es un verdadero problema de salud pública en México y en el mundo; diariamente hay muchas muertes a causa de esta epidemia. Existen avances en el conocimiento del comportamiento biológico de esta neoplasia, describiéndose nuevas variantes y nuevas clasificaciones desde distintos puntos de vista. Una de estas clasificaciones es la molecular, que mediante los perfiles de expresión genética permite englobar al carcinoma de mama en cinco distintos grupos, cada uno con un comportamiento y pronóstico diferente.

Los avances en el conocimiento del carcinoma de mama aunados al desarrollo de técnicas moleculares han permitido desarrollar nuevas pruebas que dan la oportunidad de predecir el comportamiento y la probable respuesta al tratamiento en cada paciente de forma independiente; de esta manera ahora es posible individualizar el tratamiento del carcinoma de mama.

Una prueba realizada con este fin es el Oncotype Dx™, que evalúa la expresión de 21 genes y mediante métodos semicuantitativos permite obtener una puntuación que cataloga a los carcinomas de mama en tres grupos de acuerdo al riesgo de recurrencia y permite predecir la respuesta al tratamiento antihormonal puro o asociado a quimioterapia.

Recientemente se realizaron estudios prospectivos para su validación; sin embargo y debido a su reciente aplicación en México, no hay trabajos que evalúen el comportamiento de la prueba en la población mexicana; es así que este estudio evalúa los casos de pacientes con carcinoma de mama con receptores de estrógenos positivos y sin metástasis ganglionar, a los que se les realizó la prueba de Oncotype Dx™, para poder determinar el patrón de comportamiento genético en la población Mexicana.

RESUMEN

El cáncer mamario es una entidad heterogénea. Durante su estudio, se incluyen variables de tipo histológico, tamaño tumoral y ganglios afectados. Además, desde hace tiempo se ha añadido la inmunohistoquímica, que mide la expresión de receptores de estrógenos, progesterona y HER2 /neu; esto otorga valores tanto pronósticos como de predicción al tratamiento. Desde hace algunos años se ha intentado estudiar por ingeniería genética, la predicción y recurrencia del cáncer analizando la expresión de genes de manera individualizada; un ejemplo de esto, es el estudio de Oncotype Dx™, validado por la FDA, que mide la expresión de 21 genes y determina predicción y pronóstico de casos individuales, lo que permite la toma de decisiones individuales para un tratamiento óptimo. Realizamos un estudio Observacional, descriptivo, transversal y comparativo de todos los casos del Centro Médico ABC estudiados con Oncotype Dx™ que tenían receptores de estrógenos positivos y ganglios linfáticos negativos. Con estos casos se realizó una correlación entre el índice de recurrencia otorgado por Oncotype Dx™ y las variables clínico-histopatológicas e inmunohistoquímicas tales como el estado de los receptores de estrógenos, progesterona y Her-2/neu así como el valor pronóstico independiente que otorgan variables como el Ki67 y p53 (también medidos por inmunohistoquímica) encontrando que no existe correlación con la edad, pero si existe correlación entre el índice de recurrencia medido por Oncotype Dx™ con el grado histológico y los valores por inmunohistoquímica.

MARCO TEORICO

1. HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Las glándulas mamarias son glándulas tubuloalveolares compuestas ramificadas que se originan por invaginación epidérmica. Hasta antes de la pubertad, tienen características similares en el varón y la mujer y se conforman de conductos de epitelio cúbico de ramificación variable sin formación de lóbulos. A partir de la pubertad en el varón se desarrollan y maduran por acción de las hormonas sexuales femeninas, mientras que en el varón se atrofian¹.

La glándula mamaria está formada por 15 a 25 lóbulos mamarios independientes, separados por tejido conectivo denso, que desemboca a través de los conductos galactóforos (G) en el pezón, formando cada uno una dilatación previa llamada seno galactóforo. Los lóbulos mamarios a su vez se ramifican formando cada uno una dilatación previa llamada seno galactóforo. Los lóbulos mamarios a su vez se ramifican formando varios lobulillos mamarios (L), separados por tejido conectivo denso interlobulillar (D) que contiene además tejido adiposo. (Fig.1)



Fig. 1 Glándula mamaria. HE.

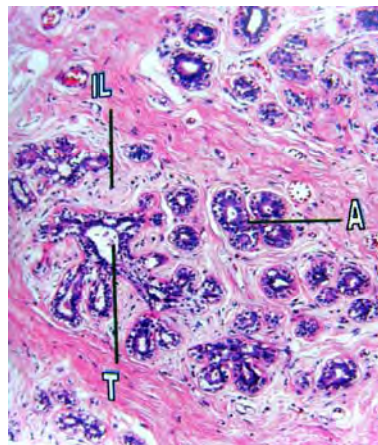


Fig.2 Lobulillo mamario HE.

El lobulillo mamario es la unidad funcional de la glándula mamaria, se denomina también Unidad Ductal Lobular Terminal. Están formados por conductos terminales (T) que finalizan en los acinos o alveolos mamarios (A). Tanto los conductos terminales como los alveolos mamarios están revestido por dos tipos de células: las células epiteliales secretoras (S) cúbicas o columnares en directo contacto con la luz ducto-alveolar; y células mioepiteliales (M) por fuera de las células secretoras (Figs. 2 y 3), son células que ultraestructuralmente tienen características de células epiteliales así como de miofibrillas con capacidad contráctil. Las células de la unidad ductal lobular terminal se encuentran inmersas en un estroma intralobulillar especializado laxo (IL) que consta de una matriz de mucopolisacáridos y colágena con fibroblastos pero sin grasa; este estroma intralobulillar responde a estímulos hormonales a diferencia del tejido interlobulillar que es denso colágeno hipocelular y con tejido adiposo (Fig. 1)

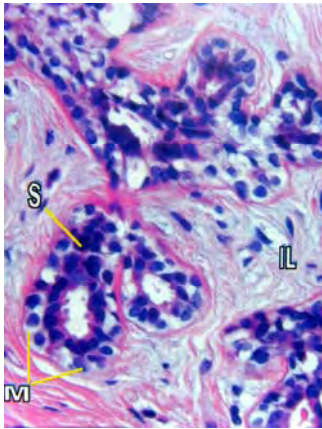


Fig.3 Acino mamario.

2. PATOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria puede ser asiento de diversos procesos patológicos tanto benignos como malignos. Uno de los factores que estimula el desarrollo de lesiones mamarias es el estímulo excesivo estrogénico sea este exógeno o endógeno. Esta hormona produce incremento en la densidad de la glándula mamaria secundario a

procesos hiperplásicos de los lobulillos mamarios. Cuando la hiperplasia desarrolla cambios atípicos se considera como una lesión precursora de cáncer. Se pueden originar también tumores benignos como adenomas tanto de las células secretoras o menos frecuentemente de las células mioepiteliales.

La patología mamaria de mayor importancia es el carcinoma de mama, ya que actualmente se encuentra en ascenso y constituye una de las primeras causas de morbi-mortalidad en mujeres en edad productiva.

2.1 CARCINOMA DE MAMA

2.1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma de mama ocupa el primer lugar en frecuencia de carcinomas en la mujer; en el año 2002 se registraron 1,151,298 casos nuevos de cáncer de mama a nivel mundial, representando el 10% de todos los carcinomas del mundo².

En México, está reportado como la segunda causa de muerte por enfermedad neoplásica en la población femenina mayor de 25 años en el 2002³. Según datos proporcionados por el INEGI, la mortalidad por carcinoma de mama tiene una tendencia ascendente, con una tasa para el 2002 de 15.18 defunciones por 100 000 mujeres de 25 años y más, lo que representa la muerte diaria de aproximadamente 10 mexicanas por cáncer de mama^{4,29}.

2.1.2 CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DEL CARCINOMA DE MAMA

El carcinoma de mama se origina en la unidad ductal lobular terminal y se divide en dos grandes grupos: carcinoma ductal (a partir de los conductos terminales) y carcinoma lobulillar (a partir de los acinos o alvéolos mamarios).

En el carcinoma ductal macroscópicamente se observa una masa de forma estrellada, blanco-gris que retrae el tejido circundante. Se ha descrito un aspecto en “rayas de gis” debido a la elastosis de la pared de los vasos. Histológicamente se observan sábanas, nidos o cordones de células individuales; las formaciones tubulares son prominentes en carcinomas bien diferenciados pero ausentes en tumores pobremente diferenciados y una característica importante es la ausencia de células mioepiteliales y que las células tumorales generalmente son más pleomórficas que en el carcinoma lobulillar. Además el estroma usualmente se observa desmoplásico y puede obscurecer el fondo así como a las propias células. Existen áreas de calcificación hasta en el 60% de los casos y puede haber cantidades variables de necrosis, además de la elastosis en la pared de los vasos ya comentada. Las figuras de mitosis son prominentes y los mastocitos se asocian más con tumores de bajo grado. Las características poco comunes son la presencia de eosinófilos y cristaloides intraluminales.

Las variantes del carcinoma ductal invasor son coriocarcinomatosa, melanótica, mixta, de células gigantes osteoclastica, pleomórfica, rica en glucógeno, inflamatoria, intraquistico papilar, intralinfática y rica en lípidos.

En el carcinoma lobulillar histológicamente se observa el crecimiento de células en filas (patrón en filas indias o linear o en tiro al blanco) de células no cohesivas rodeando conductos y dispersas laxamente sobre una matriz fibrosa. Las células son pequeñas, uniformes, redondas, con cromatina desnuda y nucléolo no visible. Comúnmente existen células en anillo de sello, luces y mucina intracelular así como carcinoma lobular in situ presente hasta en 90% de los casos. Existe estroma fibroso denso en cantidades variables con elastosis perivenosa y periductal; también es posible encontrar infiltrado linfocitario. La formación glandular generalmente no es vista en la forma clásica pero pueden estar preservadas las estructuras glandulares normales. Normalmente se observan menos de 10 mitosis por cada 10 campos de

alto poder y no se observan áreas de necrosis. Para esta variante también se ha recomendado realizar el grado histológico por medio del sistema de Bloom Richardson modificado.

Las variantes del carcinoma lobulillar son la clásica, alveolar, tipo basal, histiocitoide, pleomórfica, en anillo de sello, trabecular, luminal, parecido a linfoepitelioma y medular.

Dentro de la evaluación histopatológica del carcinoma de mama se utiliza el Sistema modificado de Scarff-Bloom-Richardson¹⁴ que define un grado histológico que tiene validez pronóstica importante ya que ha mostrado tener valor para predecir la sobrevida en pacientes con cáncer de glándula mamaria que consta de los siguientes parámetros:

a. Formación de túbulos. Cuando el 75% o más del tumor presenta túbulos se le asigna un punto, entre el 10 a 75% del tumor con formación de túbulos se le asignan dos puntos y el tumor con menos del 10% se le asignan tres puntos.

b. Grado nuclear. Cuando el núcleo de las células neoplásicas es relativamente pequeño, uniforme en tamaño y el patrón de cromatina tiene escasa variación con respecto a un núcleo normal se le asigna un punto (grado nuclear 1). El núcleo mayor que uno normal, con cromatina en grumos, nucléolo aparente, variaciones importantes en tamaño y patrón de cromatina se le asignan dos puntos (grado nuclear 2). El núcleo con marcada variación en forma, tamaño y patrón de la cromatina con dos o más nucléolos aparentes se le asignan tres puntos (grado nuclear 3).

c. Número de mitosis. Sólo se cuentan las figuras mitóticas en metafase, telofase, anafase y no células hipercrómicas o apoptóticas, siempre tomando las áreas más celulares y de mayor actividad mitótica. Los puntos son asignados de acuerdo al área del campo de gran aumento utilizado para cada microscopio y siempre contando el número de mitosis por 10 campos de gran aumento. Por ejemplo para el área de

0.274 mm cuadrados se asigna un punto para 0 a 9 mitosis por 10 campos de gran aumento, dos puntos para 10 a 19 mitosis y tres puntos para 20 o más mitosis por 10 campos de gran aumento. El área del campo de gran aumento se debe determinar para cada microscopio. En base a lo anterior la calificación menor es de tres y la mayor de nueve. Los tumores con calificación de 3 hasta 5 son bien diferenciados (grado 1), aquellos con calificación de 6 y 7 son moderadamente diferenciados (grado 2) y los que obtienen calificación 8 y 9 son poco diferenciados (grado 3). El alto grado histológico se ha relacionado con mayor frecuencia a metástasis, recurrencias tumorales, muerte por enfermedad metastásica, menor intervalo libre de enfermedad y sobrevida global más corta^{12,13}.

2.1.3 INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÁNCER DE MAMA

La determinación de la presencia y número de receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR) en las biopsias de mama se ha convertido en una práctica habitual de evaluación de los pacientes con cáncer de mama¹⁶⁻¹⁸. Existe una excelente correlación entre la positividad para PR y la futura respuesta a la terapia hormonal. Más del 50 % de tumores con ER positivos responderán al tratamiento hormonal, frente a menos del 10 % de tumores con ER negativos. La existencia de ER y PR positivos incrementa la probabilidad de respuesta a la terapia hormonal. Los tumores ER positivos son generalmente mejor diferenciados. Numerosos estudios han confirmado que el periodo libre de enfermedad y la media de supervivencia son mayores en pacientes con tumores ER y PR positivos¹⁹.

Por otro lado, la medición del índice de proliferación realizada mediante diversos procedimientos sobre el tejido con carcinoma de mama, ha mostrado una fuerte correlación con la evolución tumoral. La proliferación de las células tumorales (PCT) se realizaba en un principio con parámetros morfológicos clásicos de crecimiento tumoral como el índice mitótico y el grado histológico, mostrando ambos correlación con la evolución clínica. Posteriormente se desarrollaron métodos más

objetivos de medida del PCT como la incorporación de timidina tritiada al DNA, o la fracción de células en la fase de síntesis (fase S)²⁰. Más recientemente, se emplean anticuerpos contra proteínas expresadas durante la proliferación celular, con el desarrollo de métodos inmunohistoquímicos para cuantificar la proliferación tisular²¹.

El Ki-67 es un antígeno nuclear presente en las fases activas del ciclo celular (G, S, G2, M) y ausente en la fase de descanso celular (G0). El anticuerpo Ki67 trabaja en condiciones óptimas en congelación, sin embargo se han desarrollado anticuerpos que reconocen Ki-67 en tejidos fijados en parafina (MIB-1 y MIB-3)²².

Las ventajas de la inmunohistoquímica son claras: estos marcadores pueden emplearse en tejidos archivados y la valoración puede ser realizada preservando la histología.

Her-2/neu (c-erbB-2) y p53 son los genes más comúnmente usados como factores pronóstico en carcinoma de mama. Her-2/neu (c-erbB-2) es un gen que codifica una proteína con homología para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se ha demostrado que Her-2 está amplificado en los carcinomas de mama y en otros tumores. Slamon et al²³ describieron por primera vez que carcinomas de mama con amplificación para Her-2/neu y metástasis en ganglios linfáticos tienen un mayor índice de recurrencia y una disminución de la supervivencia. En pacientes con ganglios negativos no se encontró esa correlación²⁴. La amplificación se acompaña de altos niveles de proteínas que pueden ser detectadas mediante inmunohistoquímica. Sin embargo existe un 10 % de casos con inmunoexpresión para la proteína, que no muestran amplificación, verosímilmente debido a sobreexpresión del gen²⁵. A veces la pérdida del antígeno después del procesado en formalina y parafina puede minimizarse usando técnicas de rescate antigénico.

Recientemente se ha sugerido que la determinación de Her-2/neu en carcinoma de mama, puede emplearse como herramienta de predicción

de la respuesta a la quimioterapia. La determinación de la expresión de Her-2 es también importante para determinar si es posible el tratamiento con Herceptin²⁶.

Los últimos trabajos reflejan la superioridad diagnóstica del método de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) frente a la detección de HER2-neu con inmunohistoquímica²⁷.

P53 es un antioncogén cuya alteración parece ser el cambio genético más común identificado en tumores. La vida media de la proteína salvaje (normal) es corta (6-30 min.), sin alcanzar niveles suficientemente elevados para que sea inmunohistoquímicamente detectable. Por el contrario, la proteína mutante tiene una extensa vida media y su acumulación permite detectarla mediante inmunohistoquímica. Se han desarrollado un gran número de anticuerpos que reaccionan con la proteína salvaje en su forma mutante, o con ambas. La mayoría de los estudios muestran una correlación entre la positividad para p53 y las alteraciones genéticas en el cromosoma 17p13.1.

La inmunoexpresión de p53 se ha correlacionado con: tumores ER negativos, HER-2/neu positivos, índices de proliferación elevados, grados histológicos altos, intervalo libre de enfermedad corto y media de supervivencia peor²⁴. No se ha observado correlación con el estado de los ganglios²⁸.

2.1.4 ESTUDIO DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CARCINOMA DE MAMA

Desde el punto de vista molecular, se han identificado diversos genes potencialmente involucrados en el control del crecimiento, muerte y diferenciación celular. El estudio de estos genes en diversos tumores ha permitido, por un lado, comprender el comportamiento biológico de las muchas neoplasias y a través de la cuantificación de su expresión, ha sido posible, por otro lado, individualizar el pronóstico y el tratamiento de algunos pacientes³⁰⁻³¹. Respecto al carcinoma mamario, por medio

del estudio de los patrones de expresión de numerosos genes mediante microarreglos de ADN y su correlación con las distintas variaciones fenotípicas se ha realizado una clasificación molecular y se han dividido los carcinomas mamarios en cinco subtipos que son^{31,32}: 1) subtipo con sobreexpresión de Her2/neu, 2) subtipo luminal A, 3) subtipo luminal B, 4) subtipo basal y 5) subtipo «normal» (normal-like). Del subtipo luminal B se ha identificado un pequeño subgrupo denominado luminal C, que tiene comportamiento clínico distinto al luminal B³¹⁻³³. En esta clasificación cada subtipo expresa un determinado grupo de genes; por ejemplo, el subtipo de Her2/neu presenta alta expresión de varios genes localizados en el cromosoma 17q22.24, incluidos ERBB2 y GRB7, y expresión baja o nula de los receptores hormonales de estrógenos. El subtipo luminal A tiene elevada expresión para el gen de los receptores de estrógenos alfa, proteína de unión GATA-3, LIV-1, factor nuclear de hepatocitos alfa y otros. El luminal B presenta expresión baja a moderada de los genes luminales específicos, incluido el de receptores de estrógenos. El subtipo basal presenta sobreexpresión de los genes que expresan las células basales, demostrado por el fenotipo basal con expresión inmunohistoquímica de queratina (CK) 5/6, CK14, CK17, además de que no presenta expresión de receptores hormonales ni de los genes de Her2/neu. El subtipo normal, se le denomina de esta manera porque expresan los mismos genes que el tejido mamario normal, con alta expresión de los genes de las células basales epiteliales y de tejido adiposo, además de una baja expresión del grupo de genes de las células luminales^{31,32,34-37}. Lo anterior confirma, desde el punto de vista molecular, lo heterogéneo del carcinoma mamario.

La importancia práctica de la clasificación molecular del carcinoma de mama radica en el pronóstico de los pacientes. Los subtipos de peor pronóstico son aquellos que tienen sobreexpresión de Her2/neu y los de tipo basal que presentan un menor tiempo de supervivencia y menor tiempo libre de enfermedad. Además el subtipo basal tiene una elevada frecuencia de mutaciones del gen BRCA-1 y TP53³¹⁻³². De los subtipos luminales, el tipo A es el de mejor pronóstico, a pesar de que la

expresión de los receptores de estrógenos sea variable. Los de peor pronóstico son del subtipo B + C, debido a que presentan mayor riesgo de recurrencia³¹. De manera interesante, cada subtipo tiene un comportamiento clínico distinto en cuanto a los sitios de recurrencia. Smid y colaboradores³³ encontraron que los subtipos luminales presentan con mayor frecuencia recurrencia en hueso, a diferencia del subtipo basal que presentó recurrencia en mayor proporción en los pulmones y en el cerebro.

La genética molecular ha desarrollado nuevas técnicas de cuantificación de los perfiles de expresión genética que permiten de manera individualizada determinar el pronóstico y la posible respuesta al tratamiento hormonal y a la quimioterapia.

Uno de los estudios moleculares que ha demostrado de manera independiente validez pronóstica y predictiva es la prueba conocida comercialmente como Oncotype DXTM (Genomic Health, Redwood City, CA, USA), que mediante reacción en cadena de polimerasa-transcripción reversa (RT-PCR) en tejido incluido en parafina, analiza de manera cuantitativa el perfil de expresión de 21 genes, con el que se obtiene un índice o score de recurrencia (*Recurrence Score*) (IR) que determina el pronóstico y respuesta al tratamiento tanto hormonal como con quimioterapia en el grupo de pacientes que presentan positividad a los receptores de estrógenos y ganglios linfáticos negativos³⁸⁻⁴⁰.

En este grupo (receptores de estrógenos positivos y ganglios linfáticos negativos) que constituye aproximadamente el 50% de los carcinomas de mama, los criterios del uso adicional de quimioterapia no son concluyentes, por lo que existen pacientes «sobretreatadas» y «subtratadas».

Hay estudios que indican que de las enfermas que reciben únicamente tamoxifeno, sólo alrededor del 15% tendrán recurrencia de la enfermedad dentro de los siguientes 10 años; por tanto, si se aplica a

todas las pacientes quimioterapia, el 85% estarían sobretratadas y expuestas a los efectos sistémicos y al elevado costo del tratamiento^{38-41,42}. Es por este motivo que se desarrolló el estudio de expresión multigénica de 21 genes (Oncotype DxTM).

Esta prueba fue validada inicialmente en 668 pacientes dentro de un estudio realizado por la NSABP (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel trial B-14*), en el que se hizo un análisis multivariado de edad, tamaño del tumor, grado histológico, estado hormonal y de Her2/neu; se encontró que solamente el grado histológico se correlacionó con el índice de recurrencia y que permitió predecir de manera significativa la recurrencia, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia. Posteriormente, esta prueba fue validada dentro del mismo grupo de estudio como un marcador predictivo para la respuesta a la quimioterapia y al tamoxifeno en 651 pacientes en el grupo NSABP B-20 y en 645 en el grupo B-14³⁹⁻⁴³.

Los 21 genes utilizados en la prueba de Oncotype DX[®] fueron seleccionados de un total de 250 genes estudiados en el carcinoma de mama, mediante tres distintos estudios, en los que los genes que presentaron mayor periodicidad e intensidad de expresión fueron los seleccionados. Es así que el Oncotype DX[®] evalúa 16 genes funcionales o relacionados al carcinoma y cinco genes de referencia, que son divididos en grupos¹¹ (*Cuadro 1*).

Cuadro I. Veintiún genes implicados en el Oncotype DX[®].

Grupo de estrógenos	Grupo de Her2	Grupo de proliferación	Grupo de invasión	Otros	Referencia
ER	GRB7	Ki67	MMP11	GSTM1	Beta-actina
PGR	HER2	STK15	CTSL2	CD68	GAPDH
BCL2		Survivina		BAG1	RPLPO
SCUBE2		CCNB1			GUS
		MYBL2			TFRC

Para efectuar esta prueba se utiliza tejido del carcinoma mamario incluido en bloques de parafina de donde se realiza la extracción de ARN y se aplica la transcriptasa reversa, con la obtención de un ADN complementario (cADN) que es posteriormente sometido a reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde la expresión de cada gen es medido en triplicado y luego, de acuerdo a los cinco genes de referencia, son «normalizados»³⁸. A continuación, con un procedimiento estandarizado mediante fórmulas computarizadas, se mide el índice de recurrencia (IR), cuyos valores van del 0 al 100. Las pacientes se clasifican en tres grupos, el primero incluye las que presentan un índice de recurrencia menor a 18 (riesgo bajo), un grupo con índice de recurrencia entre 18 y 30 (riesgo intermedio) y el tercer grupo con índice de recurrencia mayor o igual a 31 (riesgo alto)⁴¹.

De acuerdo al grupo de riesgo la probabilidad de recurrencia a distancia es de 2.1, 9.2 y 22.1% a los cinco años y de 6.8, 14.3 y 30% a los diez años, en los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, respectivamente⁴⁴. Además, se pudo ver que en las pacientes que recibieron solamente tamoxifeno, el grupo de alto riesgo tuvo un porcentaje de recurrencia a los 10 años de 38.3%, el grupo de riesgo intermedio de 17.8% y el de bajo riesgo de 3.7%. En cambio las enfermas que recibieron combinación de tamoxifeno y quimioterapia tuvieron una recurrencia de 11.1, 10.1 y 5.0% en los grupos de alto, intermedio y bajo riesgo, respectivamente. Estos datos permiten concluir que las pacientes del grupo de bajo riesgo se benefician únicamente con el tratamiento hormonal, ya que no presentaron mejoría en el tiempo de recurrencia si se asoció con quimioterapia. En cambio, en el grupo de riesgo alto, el mayor beneficio se obtuvo con la asociación de tratamiento hormonal y quimioterapia. El grupo problema es el intermedio, en el que el uso adicional de quimioterapia no demostró datos estadísticos significativos ni suficientes para su implementación⁴²⁻⁴⁴.

De acuerdo con Sparano y Paik⁴⁴, hasta febrero del presente año se han realizado más de 40,000 casos y en el 25% de éstos el índice de recurrencia modificó el tratamiento, principalmente relacionado con terapia hormonal. Actualmente, en los Estados Unidos, el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) está realizando un estudio de validación clínica prospectiva relacionado con los perfiles de expresión de estos 21 genes y su relación con la respuesta al tratamiento. En este estudio, denominado TAILORx (*Trial Assigning Individualized Options for Treatment*), utilizan distintos rangos en relación a los originales, donde a las pacientes con índice de recurrencia menor de 11 se les administra tratamiento hormonal, a las pacientes con índice de recurrencia mayor de 25 se les agrega quimioterapia y a las pacientes que tienen el índice de recurrencia entre 11 y 25, de manera aleatoria, se les administra hormonoterapia sola o combinada con quimioterapia⁴³⁻⁴⁶.

El costo de este estudio es elevado; sin embargo, hay trabajos que demuestran que el tratamiento guiado por el índice de recurrencia permite un ahorro global significativo comparado con el uso rutinario de tamoxifeno y quimioterapia combinados⁴³⁻⁴⁷.

En resumen, recientemente se ha demostrado la utilidad de los estudios de genética molecular tanto en la comprensión de la biología de las células neoplásicas como en el pronóstico y tratamiento individualizado en el carcinoma de mama.

Existen en la literatura, algunos intentos por correlacionar las variables clínicas e histopatológicas estándar, con los resultados del IR obtenido del Oncotype DxTM, Flanagan y colaboradores, hicieron la correlación utilizando variables como edad, tamaño del tumor, formación tubular, grado nuclear e inmunohistoquímica para ER, PR y HER2neu, reportando en el análisis univariado que existe una correlación significativa de estas variables con el IR, mientras que en el análisis multivariado, todas las variables excepto edad y tamaño del tumor, mostraron una correlación significativa con el IR del Oncotype DXTM⁶.

Tradicionalmente, la toma de decisiones sobre el tratamiento se basa en una combinación de factores de riesgo clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos, y existen varios intentos por realizar clasificaciones del cáncer de mama por inmunohistoquímica³. Carey y colaboradores utilizaron 5 marcadores inmunohistoquímicos (Receptores de estrógeno (ER*), Receptores de progesterona (PR), HER2neu, HER1 y citoqueratina 5/6) para ello⁵.

Actualmente, el desarrollo de técnicas de medicina genómica han permitido el desarrollo de herramientas de expresión génica y/o expresión molecular, que han proporcionado un perfil más preciso de esta enfermedad. Basados en esto, muchos autores consideran que la clasificación molecular del cáncer de mama, puede ser una herramienta más poderosa que la clasificación histopatológica e inmunohistoquímica utilizada actualmente como estándar.

En los últimos 6 años, un número de estudios pronósticos y predictivos han difundido la complejidad y el extenso panorama del cáncer mamario.

Estos estudios han usado una amplia variedad de formatos que toman en cuenta diversas variables como el aspecto familiar de la entidad, estudios de inmunohistoquímica e hibridización in situ por fluorescencia que establecen las bases de los estudios moleculares del cáncer mamario no manejados morfológicamente, esto es, echando mano de la ingeniería genética por medio de reacciones en cadena de polimerasa múltiples en tiempo real y perfiles genómicos por microarreglos¹⁰.

En una revisión hecha por Jeffrey S. Ross, del departamento de patología y del laboratorio de medicina *Albany Medical College* de Nueva York, estudió 14 ensayos de estudios de multigenes para su validación científica, utilidad clínica actual, estatus de aprobación

* Por sus siglas en inglés Estrogen Receptor

regulatoria y estimación del costo beneficio de cada uno de ellos. De todos estos estudios, se informó que el Oncotype Dx™ tiene ciertas ventajas sobre los otros estudios dado su lanzamiento temprano, por las facilidades que ofrece de pago en Estados Unidos y ello ha tenido una amplia aceptación. De igual manera, la facilidad para el manejo del tejido es un punto a favor ya que se utilizan bloques de parafina. Entre otras ventajas, destacan su habilidad para servir como índice pronóstico y predictivo para ciertos agentes hormonales y de quimioterapia, relación costo-beneficio demostrado por un estudio publicado y un alto incremento del ritmo de estudios clínicos de validación prospectiva.

También se ha reportado una correlación significativa entre el IR del Oncotype DX™ y la presencia de Ki67 por inmunohistoquímica, observándose además, que algunos tumores con IR bajos, muestran Ki67 elevados, que podrían indicar otro subgrupo de pacientes que aún con riesgos bajos, presentan recurrencia de la enfermedad^{7,8}.

MARCO DE REFERENCIA

El Oncotype Dx™ es un estudio PCR-TR validado por la *Food and Drug Administration* (FDA) que estudia la expresión de 21 genes relacionados con el carcinoma de mama, divididos en 6 grupos, que permite predecir el comportamiento y recurrencia a distancia de la enfermedad, además de predecir la probable respuesta al tratamiento quimioterapéutico. Los pacientes candidatos a realizar esta prueba deben presentar células neoplásicas positivas a los receptores de estrógenos y que no tengan metástasis ganglionar.

En el estudio realizado por Melina Flanagan⁶ se observó que de todos los carcinomas mamarios, el 50% tienen ER positivos y ganglios linfáticos negativos y el 50% tienen ER negativos y ganglios linfáticos positivos. Las pacientes con ganglios linfáticos positivos tradicionalmente se envían a quimioterapia, ya que se sabe que tener ganglios linfáticos positivos es un factor de mal pronóstico y si no se envían a quimioterapia la recurrencia posterior a la resección quirúrgica a 10 años es muy alta. Por otro lado, las pacientes con ganglios linfáticos negativos aunque ER positivos no son una población que esté bien estudiada en cuanto a tratamiento y por lo tanto no se sabe a ciencia cierta cuál es la terapéutica a seguir: si solamente darles inhibidores de ER o agregar a quimioterapia. Es entonces que en muchos de estos casos se comenzó a utilizar desde hace ya tiempo el uso de quimioterapia en este grupo de pacientes, sin embargo estudios posteriores demostraron que hasta un 85% de estas pacientes podrían estar sobretratadas⁹ (es decir, no necesitan quimioterapia) y que es suficiente tratarlas con Tamoxifen u otros inhibidores de ER para que respondan; por otro lado en el mismo estudio se demostró y que solamente el 15 % de estas pacientes tienen recurrencia a 10 años y entonces este 15 % sería el grupo de pacientes que necesitan quimioterapia, por lo tanto el objetivo del Oncotype Dx™ es detectar a las pacientes que se encuentran dentro de este menor porcentaje (15%) y para esto se utiliza el índice de recurrencia.

Melina Flanagan y colaboradores concluyen por un lado que esta prueba tiene costos elevados, que los estudios realizados están sesgados, que es posible que las variables clínico patológicas permitan otorgar la misma información e incluso predecir el comportamiento de la neoplasia.

Actualmente se utilizan como datos clínicos la edad de las pacientes y el tamaño del tumor y como datos histológicos/inmunohistoquímicos el grado histológico, estado de los ganglios y estado de los ER, PR y Her2 (medidos por inmunohistoquímica).

Uno de los problemas que se presentan llegados a este punto es que no se sabe a ciencia cierta si el grado histológico es un valor lo suficientemente objetivo como para poder hacer un score, ya que es una evaluación subjetiva (dada por el patólogo).

JUSTIFICACION

No existe un solo estudio en nuestro país que describa la utilidad de las nuevas pruebas diagnósticas de expresión de multigenes dentro de la gran inmensidad de tópicos que abarca el cáncer mamario. Es de extrema importancia tener presentes los nuevos estudios que probablemente sean parte de la medicina del futuro, como lo es el Oncotype Dx™, el cual está teniendo cada vez mayor aceptación y validez como un estudio de uso cotidiano, sin embargo es necesario que tanto el clínico, como el oncólogo y el patólogo en un equipo multidisciplinario tengan los conocimientos necesarios para estudiar un grupo de pacientes específico y en qué subgrupo de estas pacientes va a ser necesario echar mano de la ingeniería genética al utilizar este tipo de estudios.

Mientras más conocimiento exista de los nuevos estudios de medicina genómica en el cáncer mamario, pero sobre todo, del conocimiento que cada especialista tenga en relación con las indicaciones y/o criterios precisos para su uso, mayor será el beneficio de las pacientes afectadas.

Debido a que el centro médico ABC ha sido uno de los centros pioneros en hacer este tipo de pruebas en nuestro país, quisimos también ser los primeros en reproducir la información existente en la literatura acerca del uso de esta prueba, que si bien por un lado es prometedora, por otro es preciso que los médicos vinculados con ella tengan más conocimientos necesarios para discernir cuándo es estrictamente necesario usarla y por otro lado quisimos demostrar que los estudios actualmente utilizados de inmunohistoquímica pueden ser de gran utilidad antes de usar otras pruebas diagnósticas.

HIPÓTESIS

H_0 Las variables clínicas e histopatológicas realizadas en las pacientes con biopsia de cáncer de mama, permiten pronosticar su respuesta a tratamiento igual que la prueba Oncotype DxTM.

H_1 Las variables clínicas e histopatológicas realizadas en las pacientes con biopsia de cáncer de mama, no permiten pronosticar su respuesta a tratamiento igual que la prueba Oncotype DxTM.

OBJETIVOS

PRINCIPAL

Determinar la relación entre el índice de recurrencia medido mediante cualificación genética (Oncotype Dx™) y el grado histológico y expresión inmunohistoquímica de marcadores pronóstico y predictivos en el carcinoma de mama.

SECUNDARIOS

Determinar en qué tipo de pacientes podría existir mayor beneficio con el estudio de Oncotype Dx™ para la personalización del tratamiento y la mejoría del pronóstico.

Comparar el grado histológico con el índice de recurrencia (IR)

Determinar la relación entre la expresión de HER2, Ki67 y p53 y el índice de recurrencia.

Definir los tipos de pacientes que se beneficiaron con el resultado de Oncotype.

Comparar los valores determinados por cuantificación genética y los valores emitidos por inmunohistoquímica

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La administración de quimioterapia en pacientes con carcinoma de mama RE positivos y ganglios linfáticos negativos en ocasiones es universal, esto genera mayores gastos en los casos donde la paciente no lo necesite, y además mayores efectos adversos. Hay un porcentaje de este grupo de pacientes que no se beneficia con la quimioterapia coadyuvante, y con el advenimiento de los estudios moleculares, se fueron creando estudios que permiten predecir el comportamiento y la

respuesta terapéutica del carcinoma de mama, sin embargo estos estudios tiene un costo elevado y es por eso que intentamos que una buena parte de esas pacientes que no necesitan la quimioterapia adyuvante, por que de antemano sabemos que no recurrirán, no tengan que llevar a cabo un estudio tan costoso que además no les ofrecerá un mayor beneficio, por lo tanto, el objetivo del Oncotype Dx™, es reconocer este grupo y evitar exponerlas a los efectos de los fármacos de quimioterapia.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de Investigación

Se trata de un estudio observacional, retrospectivo, transversal, comparativo.

Universo

Fueron revisados del archivo del servicio de patología del Centro Médico ABC de la Ciudad de México, todos los casos de pacientes con carcinoma mamario a quienes les fue realizado estudio de expresión de multigenes Oncotype Dx™ en el período comprendido entre enero de 2008 y octubre de 2009. Todos los casos seleccionados fueron receptor de estrógenos positivos y ganglios linfáticos negativos.

Criterios de inclusión:

1. Carcinoma de mama ductal o lobulillar invasor, RE positivos y ganglios axilares negativos, con cualquier grado histológico.
2. Que también se haya realizado estudio de Oncotype.
3. Que el comité de Investigación y Ética Institucional haya autorizado la revisión de expedientes.

Criterios de exclusión

1. Todas las pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión.
2. Aquellos cuyo expediente se encontrara incompleto.

Variables a evaluar

Las variables utilizadas fueron las siguientes:

- Cínicas:
 - Edad.- en años
- Histopatológicas:
 - Grado histológico
 - Grado nuclear
 - Formación de túbulos
 - Mitosis
 - Inmunohistoquímica:
 - Receptor de Estrógenos.- en porcentaje
 - Receptor de Progesterona.- en porcentaje
 - HER2/neu.- positivo o negativo
 - Ki67.- porcentaje de expresión de
 - P53.- en porcentaje
- Oncotype:
 - Índice de recurrencia:
 - Riesgo Alto
 - Riesgo intermedio
 - Riesgo Bajo
- Valores de cualificación genética de RE, RP y HER2

Para la cuantificación del grado histológico se revisaron todas las laminillas teñidas en forma rutinaria con H&E, con un microscopio

Olympus BX-40 de 5 cabezas, gradificando con el ocular de 40x y un diámetro de campo de 0.44 plan: 40x/0.6. El grado histológico fue reportado utilizando la escala de Bloom Richardson modificada, como bien diferenciado, moderadamente diferenciado o poco diferenciado dependiendo de la interpretación de 4 patólogos experimentados y en forma consensual; la asignación de grado se realizó tomando en cuenta la formación tubular, el grado nuclear y el conteo de mitosis, cada uno con una puntuación de uno a tres y posteriormente sumando las puntuaciones de cada uno con el siguiente criterio: 3-5 bien diferenciado, de 6-7 moderadamente diferenciado y 8-9 poco diferenciado.

Del reporte de inmunohistoquímica se obtuvieron los siguientes datos: receptores de estrógenos, receptores de progesterona, HER2neu, Ki-67 y p53. . Todas las pacientes seleccionadas tenían ER positivos, la técnica de inmunohistoquímica utilizada para receptores ER y PR fue mediante clonas IDS y RBT22 y con dilución 1:40 y 1:50, marca DAKO y BIO-SB, respectivamente y los resultados fueron reportados de forma cualitativa por medio del porcentaje de tinción. Para HER/2neu se utilizó la clona RBT-HER2, con dilución 1:400 marca BIO-SB; el resultado fue considerado como positivo cuando presentó una inmunomarcación >3 o por medio de amplificación con FISH (criterio para FISH positivo). Para p53 se utilizaron clonas DO-7 con dilución 1:200, marca DAKO y para Ki 67 la clona fue MIB-1 con una dilución de 1:200 y marca DAKO. Los datos del índice de recurrencia (IR) de la prueba Oncotype Dx™ fueron también obtenidos del expediente clínico, de acuerdo al reporte original del fabricante en EUA. El IR clasifica a los tumores en tres categorías de riesgo: bajo (0-17), intermedio (18-30) y alto (31-100).

Recopilación de datos

La recopilación de datos se realizó por medio de una base de datos (páginas 33 y 34) creada para este trabajo en programa Excel de Windows (versión 2007) y fueron capturadas por el propio investigador.

	EDAD	DX	RE ONC	RE IHQ	RP ONC	RP IHQ	HER2 ONC	HER2 IHQ	G H D I O S	IR	Ki-67	P53
1	37	DUCTAL	9.1	48.71%	8.2	68.26%	11.8	POSITIVO 3+	2	53	POSITIVO 70%	NEGATIVO
2	55	DUCTAL	8.6	93.02%	<3.2	NEGATIVO 1.208%	11	POSITIVO 3+	3	60	POSITIVO 40%	POSITIVO 1+
3	49	DUCTAL	11.6	85.13%	6.4	90.77%	8.6	NEGATIVO 1+	3	9	POSITIVO 10%	NEGATIVO
4	42	DUCTAL	8.3	71.63%	8	85.64%	9.2	NEGATIVO 0	1	11	POSITIVO 25%	POSITIVO 2+3%
5	73	DUCTAL	10.2	100%	9.4	100%	8.8	NEGATIVO	1	11	POSITIVO 10%	NEGATIVO
6	49	MIXTO	11.1	80%	7.0	80%	9.8	NEGATIVO 1+	2	12	POSITIVO 5%	POSITIVO 2+70%
7	40	DUCTAL	6.7	47.94%	5.8	76.23%	8.6	POSITIVO 2+	3	43	POSITIVO 70%	POSITIVO 3+30%
8	43	DUCTAL	9.9	89.17%	7.7	74.46%	9.2	NEGATIVO 1+	1	20	POSITIVO 5%	POSITIVO 1+40%
9	80	DUCTAL	7.0	48.71%	7.6	85.18%	8.9	NEGATIVO 1+	1	22	POSITIVO 20 %	POSITIVO 2+30%
10	44	DUCTAL	10.5	POSITIVO	9.0	POSITIVO	8.2	NEGATIVO 1+	2	24	POSITIVO 35%	POSITIVO 2+15%
11	62	DUCTAL	10.8	94.60%	6.1	50.06%	9.1	NEGATIVO 1+	2	14	NEGATIVO 3%	POSITIVO 1+ 2%
12	53	DUCTAL	9.7	90.38%	5.0	50.39%	10.0	POSITIVO 2+	1	25	POSITIVO 5%	POSITIVO 1+30%
13	46	DUCTAL	10.9	99.35%	7.2	86.54%	9.3	POSITIVO 2+	3	15	POSITIVO 10%	NEGATIVO
14	60	LOBULR	9.5	85.46%	4.2	87.40%	9.7	NEGATIVO 1+	1	16	POSITIVO 8%	POSITIVO 1+10%
15	46	DUCTAL	8.1	82.83%	5.1	30.61%	8.5	NEGATIVO	1	19	POSITIVO 5%	NEGATIVO
16	59	DUCTAL	11.1	96.49%	8.1	91.82%	8.7	NEGATIVO 1+	1	11	NEGATIVO 3%	NEGATIVO
17	56	DUCTAL	10.2	82.1%	7.5	54.56%	8.6	POSITIVO 2+	1	10	NEGATIVO 3%	POSITIVO 80%
18	46	DUCTAL	9.1	98.17%	7.3	97.91%	9.6	POSITIVO 2+	2	11	POSITIVO 20%	POSITIVO 30%
19	40	DUCTAL	9.4	85.98%	8.5	98.20%	9.3	NEGATIVO 0+	2	10	POSITIVO 20%	POSITIVO 15%
20	51	DUCTAL	8.5	4.07%	5.0	6.68%	>13	POSITIVO 2+	3	51	POSITIVO 20%	POSITIVO 60%
21	62	DUCTAL	10.7	44.41%	7.1	40.36%	9.8	NEGATIVO 1+	1	12	POSITIVO 1%	POSITIVO 1+10 %
22	49	DUCTAL	7.3	74.70%	6.5	83.74%	12.8	POSITIVO 3+	1	45	POSITIVO 80%	POSITIVO 3+60%
23	33	DUCTAL	8.7	93.89%	6.1	91.66%	12.4	POSITIVO 2+	2	36	POSITIVO 20%	NEGATIVO
24	25	DUCTAL	7.8	92.72%	4.8	83.93%	11.8	POSITIVO 3+	2	51	POSITIVO 10%	POSITIVO 70%
25	53	DUCTAL	10.8	79.58%	9.3	90.21%	8.9	NEGATIVO 1+	1	12	POSITIVO 5%	NEGATIVO
26	37	DUCTAL	9.3	42.83%	4.6	47.2%	12.8	NEGATIVO 1+	1	46	POSITIVO 10%	NEGATIVO
27	65	DUCTAL	6.4	3.87%	5.6	8.85%	9.3	NEGATIVO 1+	1	28	POSITIVO 10%	POSITIVO 2+20%
28	66	DUCTAL	9.2	92.08%	8.5	87.03	9.0	NEGATIVO 0+	1	18	POSITIVO 2%	NEGATIVO

29	64	DUCTAL	9.6	83.98%	7.6	98.32%	9.1	NEGATIVO 1+	1	7	POSITIVO 30%	POSITIVO 2+10 %
30	59	LOBULAR	10.0	88.41%	6.1	59.37%	9.8	NEGATIVO 1+	1	14	POSITIVO 3%	POSITIVO 1+80 %
31	57	DUCTAL	10.3	97.16%	6.3	59.80%	10.2	NEGATIVO 1+	1	23	POSITIVO 5%	NEGATIVO
32	41	DUCTAL	9.2	80.29%	5.4	46.20%	11.7	POSITIVO 2+	2	41	POSITIVO 50%	NEGATIVO
33	57	DUCTAL	10.4	90.22%	9.0	93.42%	9.4	NEGATIVO O+	1	16	POSITIVO 20%	POSITIVO 3+ 90%
34	37	DUCTAL	4.6	2.242%	4.6	7.404%	7.7	NEGATIVO O+	3	43	POSITIVO 30%	POSITIVO 1+ 5%
35	47	DUCTAL	10.8	97.03%	>10	91.97%	10	NEGATIVO 1+	1	3	POSITIVO 5%	POSITIVO 1+ 50%
36	50	DUCTAL	10.0	80.33%	8.7	83.61%	9.2	NEGATIVO O+	1	13	POSITIVO 3%	POSITIVO 1+ 5%
37	40	DUCTAL	9.4	85.98%	8.5	98.20%	9.3	NEGATIVO O+	2	10	POSITIVO 20%	POSITIVO 1+ 15%
38	57	DUCTAL	10.2	82.1%	7.5	54.56%	8.6	POSITIVO 2+	2	10	NEGATIVO 3%	POSITIVO 80%

Tabla 1. Características de las pacientes que cumplieron los criterios de inclusión.

Análisis Estadístico

Se realizó estadística descriptiva para todas las variables.

Se realizó correlación entre el IR y las variables clínico-patológicas utilizando el coeficiente de correlación del producto-momento de Pearson (r) y el coeficiente de determinación (r^2) para variables continuas (edad, valor de RE, RP y p53 por inmunohistoquímica, puntuación de Nottingham y grado histológico de Nottingham) y el coeficiente de correlación de Spearman (r_s y r_s^2) para variables cualitativas (formación de túbulos, grado nuclear, conteo de mitosis, Ki-67 y HER-2/neu) con análisis de 2 colas, con un valor de $p < 0.05$ para considerarlo significativo. Para el modelo de predicción del índice de recurrencia del Oncotype Dx™ se realizaron múltiples modelos de regresión lineal con todas las variables, utilizando un enfoque escalonado y con una probabilidad de aceptación de 0.05 y de

eliminación de 0.1. También se crearon modelos para incluir la puntuación de Nottingham final en vez de cada uno de sus componentes y estos modelos fueron probados para la interacción entre variables. Todos los análisis de datos fueron realizados utilizando la versión 16.0 de SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)

El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación y Bioética del Centro Médico ABC.

Resultados

Se revisaron un total de 52 expedientes de carcinoma mamario entre enero de 2008 y septiembre de 2009, de los cuales, se excluyeron 14 casos ya que no contaban con alguno de los marcadores de ER, PR, Her2, por inmunohistoquímica o por expresión génica. También se excluyeron los casos que no contaban con marcadores de inmunohistoquímica para Ki67 o p53, quedando una muestra (n) total de 38 casos RE positivos, ganglios linfáticos negativos.

La tabla 1 resume todas las características de las pacientes que cumplieron criterios de inclusión.

La edad promedio general de las pacientes fue de 50.78 años (rango de 25-80 años), la media de la edad agrupada de acuerdo al IR fue de 54.14 para el grupo de IR bajo, 55.42 para el grupo de IR intermedio y de 40.5 para el grupo de IR alto.

21 casos fueron grado histológico 1 (Nottingham) (55%), 11 fueron Grado Histológico 2 (Nottingham)(29%), y 6 fueron Grado 3 (Nottingham) (16%). (Tabla 1)

En cuanto al IR, 20 casos fueron IR bajo (52.6%), 8 casos IR intermedio (21%) y 10 casos IR alto (26.3%), valores muy parecidos a los encontrados en la graduación de Nottingham. (Tabla 1)

Sobre el subtipo histológico, 35 (92%) pacientes tuvieron tipo ductal, 2 (5%) lobular y 1 (3%) mixto (figura 1); específicamente en el subtipo

ductal, 17 pacientes presentaron un IR bajo (49%), 8 IR intermedio (23%) y 10 IR alto (28%). (Tabla 2)

Sobre los componentes de la graduación de Nottingham, en cuanto a formación tubular, obtuvimos 8 casos 1 (21%), 12 casos 2 (31%) y 18 casos 3 (47%), sobre el grado nuclear, 10 casos fueron 1 (26%), 19 casos fueron 2 (50%) y 8 casos fueron 3 (21%), en cuanto al conteo de mitosis 27 fueron 1 (71%), 5 fueron 2 (13%) y 8 fueron 3 (21%).

Sobre los resultados de inmunohistoquímica, RE y RP 100% positivos como lo establecido en los criterios de inclusión.

Sobre Her2/neu, 4 fueron 3+ (10.5%), 9 fueron 2+ (23.6%), 17 fueron 1+ (44.7%) y 8 fueron 0 (21%)

Para Ki-67, 35 casos fueron positivos (92%) y para p53 24 casos positivos (63%)

Sobre la correlación entre el índice de recurrencia de Oncotype Dx™ (utilizando el rango de valores de 0-100) y las otras variables observamos que:

Con respecto a la edad obtuvimos una r de -0.416 ($p < 0.01$), el grado nuclear con una r de 0.381 ($p < 0.01$), RE con una r de -0.416 ($p < 0.01$), RP con una r de -0.494 ($p < 0.01$), Her2/neu con una r de 0.452 ($p < 0.01$) y Ki67 con una r de 0.339 ($p < 0.05$)

Sobre la formación tubular obtuvimos una r de 0.143 ($p > 0.05$), conteo de mitosis con una r 0.224 ($p > 0.05$) y p53 con una r de 0.339 ($p > 0.05$).

Lo anterior mostró que la edad, el grado nuclear (1-3), la puntuación de inmunohistoquímica para RE, RP, HER-2/neu y Ki-67, tienen una correlación con el índice de recurrencia de Oncotype Dx™ estadísticamente significativa y que, esta no se observó en la formación tubular (1-3), el conteo de mitosis (1-3) y para p53 (Tabla 3).

De forma similar, tanto la puntuación de Nottingham (1-9) como el grado histológico, los cuales están determinados por el conteo de la formación tubular, del grado nuclear y del conteo de mitosis, también

se correlacionaron significativamente con el índice de recurrencia con una r de 0.441 ($p < 0.01$) y 0.946 (< 0.01) respectivamente.

Las figuras 2 y 3 muestran la correlación entre la puntuación del índice de recurrencia y el grado de Nottingham, así como de la puntuación de inmunohistoquímica para receptores estrogénicos y de progesterona, respectivamente.

Para los modelos de regresión lineal, se realizaron múltiples escenarios y de ellos, solo el valor de receptores estrogénicos, HER-2/neu y Ki-67 mostraron una correlación significativa con el Oncotype Dx™ (Tabla 4). Este modelo constituye la ecuación de regresión: $IR = 10.302 - 0.215 (RE) + 11.180 (HER-2/neu) + 15.863 (Ki-67)$ con una R de 0,789 y una R^2 de 0,62 indicativa de que el modelo completo representa el 62% de la variabilidad de los datos. De todos los modelos creados, incluyendo modelos en donde se incluyó el grado histológico de Nottingham y la puntuación de Nottingham en vez de cada uno de sus componentes, este fue el que tuvo una R^2 con mayor significancia. Aunque la edad del paciente tuvo una correlación estadísticamente significativa en el análisis bivariado, no mostró significancia como predictor en el modelo de regresión lineal.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Distribución de casos según grado histológico de Nottingham e IR.

GRADO HISTOLOGICO		INDICE DE RECURRENCIA ONCOTYPE Dx™	
1	21	BAJO	20
2	11	INTERMEDIO	8
3	6	ALTO	10

Tabla 2. Estadística descriptiva de las variables de acuerdo a la categoría del Índice de Recurrencia (IR) del Oncotype Dx^{MR}

	Índice de Recurrencia del Oncotype Dx ^{MR}		
	Bajo (n=20)	Intermedio (n=8)	Alto (n=10)
Edad (media)	54.14	55.42	40.5
Subtipo histológico n(%)			
Ductal	17 (85)	8 (100)	10 (100)
Lobular	2 (10)	0	0
Mixto	1 (5)	0	0
Formación Tubular n (%)			
1	4 (20)	3 (38)	1 (10)
2	5 (25)	4 (50)	3 (30)
3	11 (55)	1 (12)	6 (60)
Grado Nuclear n (%)			
1	9 (45)	2 (25)	0
2	9 (45)	5 (63)	5 (50)
3	2 (10)	1 (12)	5 (50)
Conteo de mitosis n (%)			
1	16 (80)	7 (88)	4 (40)
2	2 (10)	1 (12)	2 (20)

3	2 (10)	0	4 (40)
Inmunohistoquímica positivos n (%)			
RE	20 (100)	6 (8)	8 (80)
RP	20 (100)	7 (88)	10 (100)
HER2neu			
3+	0	0	4 (40)
2+	4 (20)	1 (12)	4 (40)
negativo 1+	11 (55)	5 (63)	1 (10)
negativo 0	5 (25)	2 (25)	1 (10)
Ki-67	17 (85)	8 (100)	10 (100)
P53	15 (75)	5 (63)	4 (40)

Tabla 3. Correlación bivariada entre el IR de oncotype DX™ y las variables clínicas e histopatológicas

	r	r ²	p
Edad	-0.416	0.173	< 0.01*
Formación Tubular ^a	0.143	0.020	0.39
Grado Nuclear ^a	0.381	0.145	< 0.01*
Conteo de mitosis ^a	0.224	0.050	0.17
RE	-0.416	0.173	< 0.01*
RP	-0.494	0.244	< 0.01*
HER-2/neu ^a	0.452	0.204	< 0.01*
Ki-67 ^a	0.339	0.115	<0.05
P53	-0.041	0.002	0.8
Puntuación Nottingham (1-9)	0.441	0.194	< 0.01*
Grado Histológico Nottingham (1-3)	0.946	0.895	< 0.01*

*p <0.05 estadísticamente significativa

**p<0.01 estadísticamente significativa

Tabla 4. Análisis de regresión lineal para la predicción del IR del Oncotype DX™

	β	error estándar	p
Constante	10.302	8.195	0.217
RE	-0.215	0.057	0.001
HER2neu	11.180	1.829	< 0.001
Ki-67	15.863	6.168	0.01
R = 0.789,	R ² = 0.622		

Tabla 5. Relación entre el IR de oncotype DX™ y el Grado histológico de Nottingham

	Índice de Recurrencia del Oncotype Dx			
	Bajo	Intermedio	Alto	Total
Grado histológico de Nottingham				
1	12	7	2	21
2	6	1	4	11
3	2	0	4	6
Total	10	8	20	38

Figura 1. Subtipos histológicos.

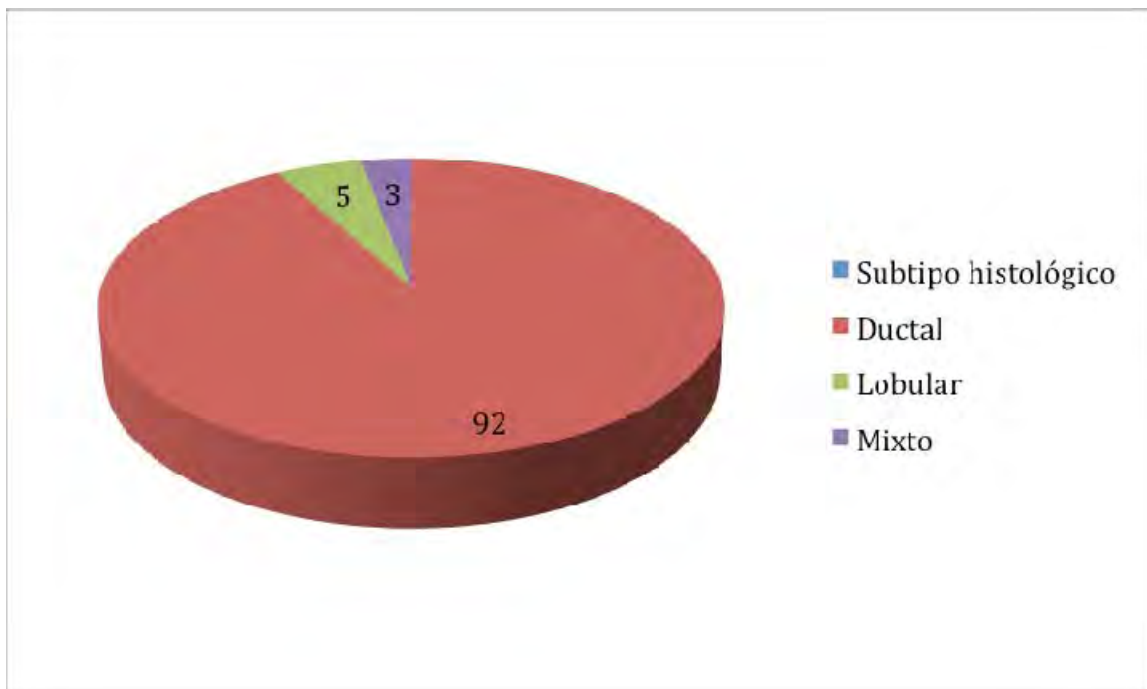


Figura 2. Correlación entre el índice de recurrencia (IR) del Oncotype DX™ y el grado histológico de Nottingham. $r = 0.946$ y $r^2 = 0.985$ ($p < 0.01$)

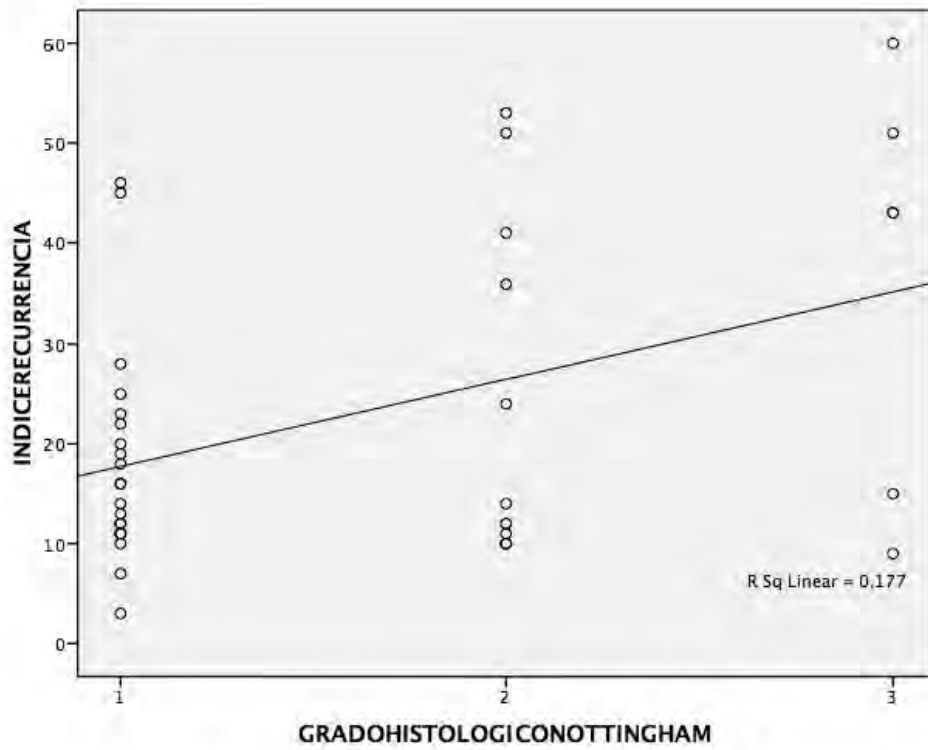
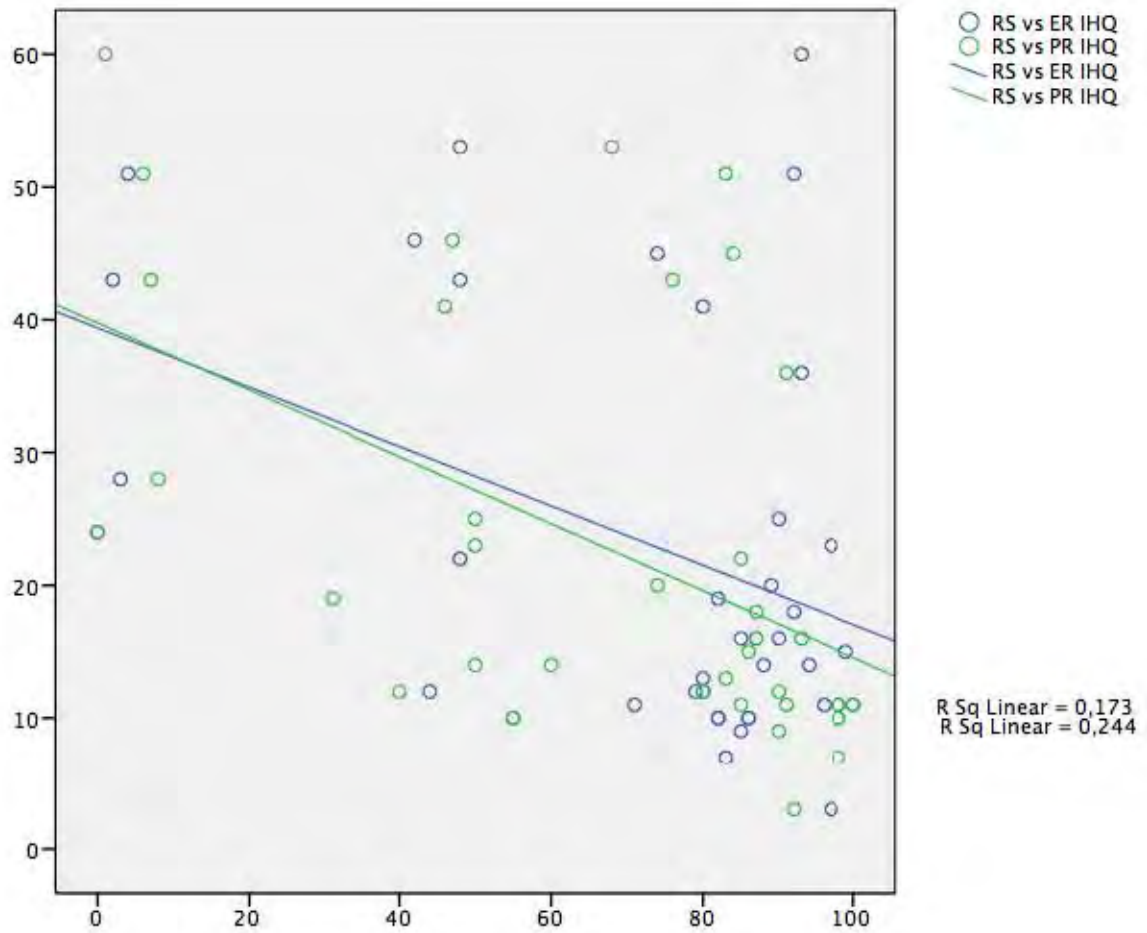


Figura 3. Correlación entre el IR del Oncotype DX™ y el porcentaje de RE y RP por inmunohistoquímica. $r = -0.416, -0.494$ y $r^2 = 0.173, 0.244$ respectivamente ($p < 0.01$).



DISCUSION

Dado que existen pocos datos sobre el uso de quimioterapia adyuvante en carcinomas mamarios que tienen receptores estrogénicos positivos y ganglios linfáticos negativos, se hizo necesario realizar un estudio en nuestro país con estas características.

Se ha informado que el IR es un factor pronóstico en pacientes posmenopáusicas tratadas con tamoxifen que tienen tumores con receptores estrogénicos positivos y ganglios linfáticos axilares positivos y que la quimioterapia no sería beneficiosa si estas pacientes tuvieran un IR bajo⁴⁸.

A pesar de que algunos autores consideran que el grado histológico de Nottingham tiene baja reproducibilidad en particular para pleomorfismo nuclear y el conteo de mitosis⁶⁻¹², nosotros creemos que este problema puede ser importantemente disminuido cuando se la gradificación se lleva a cabo de manera conjunta por patólogos experimentados, como lo hicimos en este estudio (grado interobservador).

Las guías recientes de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) indican que Oncotype Dx™ puede ser utilizado para individualizar el tratamiento del cáncer de mama y poder predecir qué pacientes se podrían beneficiar más con tamoxifeno o con quimioterapia adyuvante²⁰.

Al igual que lo informado por Flanagan y col. nuestro estudio indica que el estudio de Oncotype Dx™ podría quedar reservado para los casos en que es difícil hacer una toma de decisiones clínicas basándose en la histopatología y el estudio de los receptores.

CONCLUSIONES

Para carcinomas mamarios con ganglios linfáticos positivos, o para tumores con características desfavorables tales como la invasión vascular, el grado nuclear o histológico alto, la sobreexpresión de Her-2/neu y negatividad para receptores de estrógenos y de progesterona, el uso de quimioterapia adyuvante está bien establecida⁶. Sin embargo, existen pocos datos sobre el uso de quimioterapia adyuvante en carcinomas mamarios que tienen receptores estrogénicos positivos y ganglios linfáticos negativos. Basándose en la recurrencia a distancia en pacientes que han recibido tamoxifen, se ha estimado que hasta el 85% de estas pacientes podrían estar sobretratadas⁶.

Oncotype DxTM, es uno de los estudios que ha demostrado predecir la recurrencia del tumor en carcinoma mamario con ganglios linfáticos negativos y receptores de estrógenos positivos. Este es un estudio que utiliza RT-PCR en tejido incluido en parafina y analiza la expresión de 21 genes. La expresión de estos genes determina una puntuación (puntaje de recurrencia de enfermedad a distancia) que va de 0 a 100 y clasifica a las pacientes en una de tres categorías; riesgo bajo, intermedio y alto⁶. El IR fue el factor pronóstico independiente más importante en

el análisis multivariado, independiente de la edad y del tamaño del tumor ($p < 0.001$)⁹. Además el IR predice los beneficios de la quimioterapia específicamente de la ciclofosfamida, metotrexate y fluoruracilo. Ha sido informado que el IR es también factor pronóstico en pacientes posmenopáusicas tratadas con tamoxifen que tienen tumores RE positivos y ganglios linfáticos axilares positivos y que la quimioterapia no es de beneficio si estas presentan un IR bajo⁴⁸.

La edad de las pacientes, el grado histológico, la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona y el HER-2/neu así como el estado de los ganglios linfáticos, son las características clínicas e histopatológicas convencionales que actualmente se utilizan para la evaluación del riesgo en carcinoma mamario. Estos se han utilizado en diversos estudios de indicadores pronósticos entre los que se encuentran el índice pronóstico de Nottingham, los criterios de St. Gallen, las guías de consenso NIH y la página de internet “Adjuvant Online” (www.adjuvantonline.com). El grado histológico de Nottingham es el sistema de gradación mas aceptado y toma en cuenta la formación de túbulos, el grado nuclear y el conteo de mitosis, mismos que tienen puntuaciones de 1 a 3. El grado histológico es un parámetro clínicamente aceptado y está incluido en las guías de consenso para toma de decisiones de tratamiento. Una de las ventajas del grado histológico de Nottingham es que es sencillo de aplicar y tiene valor pronóstico en el carcinoma mamario^{12,17-19}. Sin embargo, algunos

autores consideran que este tiene una baja reproducibilidad en particular para pleomorfismo nuclear y el conteo de mitosis⁶⁻¹².

El informe de patología del carcinoma mamario también debe incluir el análisis de los receptores de estrógenos y progesterona para la predicción de la respuesta a la terapia hormonal, y la expresión del Her-2/neu por inmunohistoquímica (y en ocasiones por determinación por FISH) para predecir la posible respuesta al Herceptin®.

Tanto los receptores de estrógenos, progesterona y Her2/neu, y el conteo de mitosis, son la expresión morfológica de algunos de los genes estudiados por el Oncotype Dx™.

Dada la correlación entre las variables clínico-patológicas y el pronóstico clínico, y que el índice de recurrencia obtenido del Oncotype Dx™ ha demostrado tener valor predictivo en un subgrupo de pacientes con carcinoma mamario; Flanagan y col. sugirieron que los factores de riesgo histopatológicos podrían ser predictores significativos del índice de recurrencia de Oncotype Dx™. En nuestro análisis de 38 casos de carcinoma mamario, el grado histológico de Nottingham, el estado por inmunohistoquímica de receptores de estrógenos, progesterona y del HER-2 /neu mostraron, al igual que el estudio de Flanagan y col., estar correlacionados significativamente con el índice de recurrencia de Oncotype Dx™.

El índice de recurrencia de Oncotype Dx™ puede predecirse con la ecuación de regresión $IR = 10.302 - 0.215 (RE) + 11.180 (HER-2/neu) + 15.863 (Ki-67)$ con una R de 0,789 y una R² de 0,62 indicativa de que el modelo completo representa el 62% de la variabilidad de los datos. De

todos los modelos creados, incluyendo modelos en donde se incluyó el grado histológico de Nottingham y la puntuación de Scarff-Bloom Richardson en vez de cada uno de sus componentes, este fue el que tuvo una R^2 con mayor significancia. Aunque la edad del paciente tuvo una correlación estadísticamente significativa en el análisis bivariado, no mostro significancia como predictor en el modelo de regresión lineal.

Curiosamente, el rango de puntuaciones del índice de recurrencia para los casos con grado histológico 1 fue de 3 a 46, para el Grado 2 fue de 10 a 53 y para el grado 3 fue de 9 a 51. Así, para los casos de grado 1, los 6, que tenían una puntuación de recurrencia intermedia en lugar de baja aún estaban en el rango más bajo del rango de la categoría intermedia (índice de 20 a 28). Cabe mencionar que para los casos de grado 3, hubo 2 que tuvieron índices de recurrencia bajos (con índices de 9 y 15 respectivamente).

Los casos de grado 2, en cambio, tuvieron un amplio rango de índices de recurrencia que parecen impredecibles.

Las guías recientes de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) para el uso de marcadores tumorales en el cáncer de mama, incluye una larga la discusión del análisis de los estudios de expresión génica que incluyen el Oncotype DxTM. Estas guías indican que Oncotype DxTM "puede" ser utilizado para individualizar el tratamiento del cáncer de mama y poder predecir a las pacientes que se pudieran beneficiar más con tamoxifeno o la quimioterapia adyuvante²⁰. Es importante saber si la información adicional proporcionada por estas pruebas moleculares, independientemente de los marcadores histopatológicos tradicionales, es suficiente para justificar el gasto.

Algunos estudios recientes han comparado los marcadores tradicionales con los nuevos hallazgos moleculares han descubierto que ambos son similares (Flanagan). Eden et al, demostraron que los marcadores convencionales del índice pronóstico de Nottingham son similares a los marcadores de expresión de genes para predecir la supervivencia libre de metástasis. Igualmente en un análisis de pacientes con cáncer mamario tratados con ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluoruracilo; Nimeus-Malmstrom encontró que los datos de expresión de genes no otorgan predicción de la recurrencia a distancia diferente al que otorga el índice pronóstico de Nottingham. Otros investigadores igualmente han concluido que, aunque los marcadores moleculares para la evaluación del riesgo de carcinoma mamario incluyendo el Oncotype Dx™, tienen un enorme utilidad potencial, hasta el momento no han sido suficientemente validados en la práctica clínica²⁴.

El IR está siendo evaluado en el estudio clínico prospectivo llamado TAILOR x (Trial Assigning Individualized Options for Treatment), avalado por el NIH donde participan el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), el North American Breast Cancer Intergroup, y el National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP), ha sido diseñado para valorar la utilidad del Oncotype Dx™ en la toma de decisiones clínicas²⁵. Este estudio incluirá 11,000 pacientes con RE y/o RP positivos, Her2/neu negativo y ganglios linfáticos axilares negativos con tamaño tumoral entre 1.0 y 5.0 cm o 0.5 a 1.0 cm que presenten

características desfavorables (grado nuclear o grado histológico intermedio o poco diferenciado o invasión vascular)⁴⁹.

La definición de bajo, intermedio y alto grado son diferentes en este estudio TAYLOR x. Aquellas pacientes que tengan IR bajo (<de 10) recibirán únicamente anti estrógenos. Las pacientes con IR de 11 a 25 podrán recibir terapia hormonal y recibir (o no) quimioterapia y aquellas con IR alto (> de 25) recibirán terapia hormonal y quimioterapia⁵⁰. Este estudio está diseñado para clarificar la utilidad de Oncotype DxTM y evitar el sobre tratamiento de aquellas pacientes que pueden beneficiarse de terapia hormonal únicamente y reducir el sobretratamiento⁴⁹.

Hay muchas preguntas aún sobre la validación clínica del Oncotype DxTM, como ¿qué tan reproducible es el índice de recurrencia? ¿Este es afectado por la respuesta inflamatoria o la celularidad del tumor? ¿Es afectada por las diferencias en las técnicas de fijación de tejidos, tales como se puede encontrar en diferentes hospitales? Cronin et al³⁸, estudio el problema de la reproducibilidad, del Oncotype DxTM haciendo cinco niveles de cada uno de tres bloques de parafina de diferentes áreas del tumor y encontraron correlación en la expresión de los 16 genes, tanto entre cada uno de los bloques así como entre las diversas áreas del mismo bloque. Sin embargo, este estudio incluyó sólo a dos pacientes, y es el único publicado sobre esta cuestión. Interesantemente, en relación al posible efecto de la inflamación en el índice de recurrencia, un estudio sugiere que en algunos casos, el alto índice de recurrencia puede estar más relacionado a la respuesta

inflamatoria peritumoral más que al tumor en sí mismo. El índice de recurrencia mide un grupo de genes proliferativos, por lo que no es extraño que la inflamación (que es altamente proliferativa) pueda elevar el índice de recurrencia. Hay que considerar que la prueba de Oncotype Dx™ puede ser realizada en tejido extirpado con inflamación secundaria a la biopsia previa, por lo que puede, en teoría alterar el resultado del índice de recurrencia. Hasta hoy no hay estudios que hayan evaluado el efecto de la celularidad del tumor sobre el índice de recurrencia y tampoco hay datos publicados con respecto al efecto en que las diversas técnicas de fijación pueden influir en el índice de recurrencia.

Al igual que lo informado por Flanagan y col. nuestro estudio indica que el estudio de Oncotype Dx™ podría quedar reservado para los casos en que es difícil hacer una toma de decisiones clínicas basándose en la histopatología y el estudio de los receptores. Queda aún esperar a definir el mejor algoritmo para su uso de Oncotype Dx™. De acuerdo a los resultados obtenidos por Flanagan y col, y los nuestros, no es necesario realizar Oncotype Dx™ cuando el grado de Nottingham es de 1 o de 3, ya que el índice de recurrencia dado por Oncotype Dx™ correlaciona con el grado de Nottingham.

En conclusión, la expresión génica es una nueva tecnología desarrollada para ayudar a evaluar el riesgo y la predicción del comportamiento del carcinoma mamario.

Oncotype Dx™ es una de estas nuevas tecnologías validadas en pacientes cuyos carcinomas expresan receptores de estrógenos y

tienen ganglios linfáticos axilares negativos. El IR dado por Oncotype Dx™ puede ser de ayuda para predecir cual paciente puede beneficiarse o no de quimioterapia adyuvante. Hay estudios que comparan los resultados de Oncotype Dx™ y los parámetros histopatológicos clásicos⁶. En este estudio presentamos la correlación entre la las variables histopatológicas de 38 casos de carcinoma mamario y el índice de recurrencia de Oncotype Dx™ así como un modelo multivariado que predice el índice de recurrencia. Por los resultados obtenidos en el estudio de Flanagan y col. y el nuestro, se ha sugerido que en lugar de realizar Oncotype Dx™ en todos los carcinoma mamarios con ganglios linfáticos axilares negativos y receptores estrogénicos positivos, este deba de ser realizado en los casos que tengan un grado 2 de Nottingham así como casos dudosos donde sea difícil tomar una decisión clínica basándose en los estudios de histopatología y de los receptores. Conforme los estudios genéticos en desarrollo (TAYLORx) mejoren la habilidad para predecir recurrencia, el tratamiento será “personalizado” en el carcinoma mamario.

REFERENCIAS

1. Padilla, Álvaro. Atlas de Histología...tu ayudante personal, 3ª Ed., EDOBOL, La Paz, Bolivia, 2008.
2. Gradishar WJ. The future of breast cancer: the role of prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89: S17-S26.
3. Ernesto José Zepeda-Castilla, Edgar Recinos-Money Mario Cuéllar-Hubbe, Carlos Daniel Robles-Vidal, Eduardo Maafs-Molina. Clasificación del cáncer de mama. *Cir Ciruj* 2008; 76 87-93.
4. www.inegi.gob.mx
5. Carey L, Perou C, Livasy C, Dressler L, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* 2006; 295:2492–2502.
6. Flanagan Melina *et al.* Histopathologic variables predict oncotype DX recurrence score. *Modern Pathology* (2008) 21, 1255-1261.
7. Gwin, Katja. Pinto, Marguerite. Tavassoli, Fattaneh A. Complementary value of the Ki-67 proliferation index to the oncotype DX recurrence score; *International Journal of Surgical Pathology*. 17(4):303-10, 2009 Aug.
8. Guarneri, V. Piacentini, F. Ficarra, G. Frassoldati, A. D'Amico, R. Giovannelli, S. Maiorana, A. Jovic, G. Conte, P. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts the risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. *Annals of Oncology*. 20(7):1193-8, 2009 Jul.

9. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of Tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl Med* 2004; 351: 2817-2826
10. Jeffrey S. Ross, Christos Hatzis, W. Fraser Symmans, Lajos Pusztai, Gabriel N. Hortobágyi. Commercialized Multigene Predictors of Clinical Outcome for Breast Cancer *The Oncologist* 2008;13:477-493 www.TheOncologist.com
11. Pérez et al, *Cancerología* 3 (2008): 7-17
12. Hopton DS, Thorogood J, Clayden AD y cols. Histological grading of breast cancer: significance of grade on recurrence and mortality. *Eur J Surg Oncol* 1989; 15: 25-31
13. Thoressen S. Histological grading and clinical stage at presentation in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1982; 46: 457-458
14. Simpson JF, Page DL. Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am J Clin Pathol* 1994; 102 (suppl 1): S3-S8
15. Andersen J, Thorpe SM, King WJ, Rose C; Christensen I, Rasmussen BB, Poulsen HS. The prognostic value of immunohistochemical estrogen receptor analysis in paraffin-embedded and frozen sections versus that of steroid-binding assays. *Eur J Cancer* 1990, 26: 442-449.
16. Hilf R, Feldstein ML, Savlov ED, Gibson SL, Seneca B. The lack of relationship between estrogen receptor status and response to chemotherapy. *Cancer* 1980, 46: 2797-2800.
17. Wittliff JL. Steroid hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 1984, 53: 630-643.

19. Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER +) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol* 2001 Apr; 12(4): 525-533.
20. Bracko M, Us-Krasovec M, Cufer T, Lamovec J, Zidar A, Goehde W. Prognostic significance of DNA ploidy determined by high-resolution flow cytometry in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2001 Feb; 23(1): 56-66.
21. Taylor CR, Cote RJ. *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2nd ed., 1994.
22. González-Vela MC, Garijo MF, Fernández F, Val-Bernal JF. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. *Histol Histopathol* 2001 Apr; 16(2): 399-406.
23. Slamon D, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, 235: 177-182.
24. Korkolis D, Ardavanis A, Yotis J, Kyroudi A, Gorgolis V, Kittas C. HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathologic parameters, p53 oncoprotein and cathepsin D. *Anticancer Res* 2001 May; 21 (3C): 2207-2212.
25. Sutterlin MW, Haller A, Gassel AM, Peters K, Caffier H, Dietl J. The correlation on c-erbB-2 oncoprotein and established prognostic factors in human breast cancer. *Anticancer Res* 2000 Nov; 20 (6D): 5083-5088.

26. Bermont L, Algros MP, Baron MH, Adessi GL. Relevance of p185HER-2/neu oncoprotein quantification in human primary breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2000 Sep; 63(2): 163-169.
27. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue based detection of the Her-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000, 18: 3651-3664.
28. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli MG, Marrano D. Quantitative p21 (walf-1) / p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer* 2001 Mar 20; 95(2): 128-134.
29. Piña OS, Ortiz HC. Biomarcadores como factores pronósticos y predictivos en carcinoma de glándula mamaria. Criterios de interpretación por inmunohistoquímica. *Patol Rev Latinoam* 2006; 44: 45-59.
30. Tang P, Wang J, Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are the same? *Hum Pathol* 2008; 39: 506-513.
31. Sorlie T, Perou M, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguishes tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869–10874.
32. Perou C, Sorlie T, Eisen M, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–52.
33. Smid M, Wang Y, Zhang Y et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 2008; 68: 3108-1114.

34. Fadare O, Tavassoli F. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancer: A critical appraisal. *Adv Anat Pathol* 2007; 14: 358–373.
35. Da Silva L, Clarke C, Lakhani S. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1328–1332.
36. Banerjee S, Reis J, Ashley S et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol* 2006; 59: 729–735.
37. Moll R, Franke W, Schiller D et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11–24.
38. Cronin M, Sangli C, Liu M et al. Analytical validation of the Oncotype Dx™ genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem* 2007; 53: 1084–1091.
39. Flanagan M, Dabbs D, Brufsky A, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX™ recurrence score. *Mod Pathol* 2008; 1-7.
40. Paik S, Shak S, Tang G et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-1826.
41. Paik S, Tang G, Shak S et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor- positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3726-3734.

42. Fang L, Xu X, Zhai Y et al. Integrated gene expression profile predicts prognosis of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008 (Epub ahead of print)
43. Lyman G, Cosler L, Kuderer N, Hornberger J. Impact of a 21-gene RT-PCR assay on treatment decisions in early-stage breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 1011-1018.
44. Sparano J, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 721-728.
45. Dobbe E, Gurney K, Kiekow S et al. Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65: 23-28.
46. Marchionni L, Wilson R, Wolff A et al. Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Ann Intern Med* 2008; 148: 358-369.
47. Hornberger J, Cosler L, Lyman G. Economic analysis of targeting chemotherapy using a 21-Gene RT-PCR assay in lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive, early-stage breast cancer. *Am J Manag Care* 2005; 11: 313-324.
48. Albain K, Barlow W, Shak S et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal, node positive, RE positive breast cancer. [abstract] Presentado en: 30th annual San Antonio Breast Cancer Symposium: December 13-16 2007;San Antonio Tx. Abstract 10
49. Swain SM, A step in the right direction. *J Cancer Oncol* 2006;23:1-2