



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS VISUAL Y AUTOMATIZADO PARA EVALUACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE KI-67 EN CARCINOMA DUCTAL INVASOR DE MAMA

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

PRESENTA:

JORGE SEBASTIÁN CORONEL MONTERO

DIRECTORA DE TESIS

MYRNA DORIS ARRECILLAS ZAMORA

PROFESOR TITULAR

MARCO ANTONIO DURÁN PADILLA

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Tabla de contenido

1.INTRODUCCIÓN.....	2
2.MARCO TEÓRICO.....	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVO GENERAL.....	17
6. METODOLOGÍA.....	17
8. CONCLUSIONES.....	29
9. BIBLIOGRAFÍA.....	30

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población y la más frecuente entre las mujeres con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente, representando el 25% de los casos de cáncer en mujeres. La incidencia es más alta en países desarrollados varía desde 27 por 100,000 mujeres en África Central, hasta 96 en Europa occidental. (Secretaría de Salud 2015).

Es también la principal causa de muerte por un neoplasia maligna en la mujer en países en vías de desarrollo y la segunda en países desarrollados (después del cáncer de pulmón), las tasas de mortalidad varían significativamente entre los países desarrollados, en donde la mortalidad ha disminuido desde 2002 (BreastCancer.org 2018) y los países subdesarrollados en donde debido a la poca capacidad de respuesta de los sistemas de salud se observa una tendencia de mortalidad ascendente.

En México anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres y una mortalidad de 16.3 casos por 100.000 mujeres. (Secretaría de Salud 2015).

El origen del cáncer de mama es multifactorial e involucra, factores reproductivos, hormonas y dieta. Comienza el viaje etiológico en el útero y continúa durante toda la vida con una variedad de exposiciones que modulan el riesgo en tiempos diferentes. (Lakhani S.R. 2012).

Innumerables estudios han intentado evaluar el pronóstico de los pacientes con carcinoma de mama a partir de parámetros clínicos y patológicos, y en los últimos años han aparecido varias recomendaciones para el uso de diversos factores pronósticos de diversos grupos (Rosen 2014).

La progresión neoplasia al está influenciada por la proliferación de células neoplásicas, que puede estimarse midiendo la expresión del antígeno nuclear Ki-67. En comparación con otros marcadores de proliferación, el Ki-67 es preciso, fácil, económico y consistente en la forma de

determinarlo, lo que lo convierte tanto en un factor pronóstico como factor predictivo ideal.
(Mohammed ZM1 2012)

En la actualidad se disponen de métodos de análisis de imagen que ofrecen la posibilidad de análisis automatizados y precisos de inmunomarcadores, especialmente en tejidos complejos y heterogéneos como la mama. (Rosen 2014).

El objetivo del presente estudio consiste en evaluar la precisión de la evaluación automatizada frente a la evaluación visual de Ki-67.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población y la primera entre las mujeres, con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente, representando el 23% de los casos de cáncer en mujeres y 27 % en de los canceres diagnosticados en países ricos. La incidencia es más alta en países desarrollados; varía desde 27 por 100,000 mujeres en África Central, hasta 96 en Europa occidental. Es también la principal causa de muerte por una neoplasia maligna en la mujer en países en vías de desarrollo y la segunda en países desarrollados (después del cáncer de pulmón) con una defunción cada minuto por esta causa en alguna parte del mundo. (Secretaria de Salud 2015).

Como toda neoplasia de origen epitelial la incidencia del carcinoma de mama aumenta rápidamente con la edad. Las áreas de mayor riesgo son las poblaciones ricas de norte américa y Europa en donde 6% de las mujeres desarrollará carcinoma de mama invasor después de los 75 años. (Lakhani S.R. 2012)

En América Latina, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada con una incidencia de 152,059 casos anuales; una cuarta parte (24.9%) del cáncer en mujeres. Es también la principal causa de muerte por una neoplasia maligna en la mujer latinoamericana, con 43,208 defunciones y tasas de mortalidad promedio de 13, que varía de 5.0 en Guatemala a 22.6 defunciones por 100,000 mujeres en Uruguay.

En México se estima una incidencia anual de 35.4 casos por 100,000 mujeres. En el año 2012, se registraron 5,595 defunciones en mujeres con una tasa cruda de 9.4 defunciones por 100,000 mujeres y un promedio de edad a la defunción de 58.96 años.

2.2 FACTORES DE RIESGO

Se han establecido claramente múltiples factores de riesgo para el desarrollo de carcinoma de mama mientras que otros permanecen cuestionables. La hipótesis más aceptada actualmente es que el denominador común para todos estos factores es una estimulación estrogénica prolongada y potente en una persona genéticamente susceptible. (Collins 2018).

- Historia familiar: Tener un familiar de primer grado diagnosticado de carcinoma de mama triplica el riesgo frente a la población general, aumentando si el familiar fue diagnosticado a edad temprana o si la neoplasia fue bilateral.
- Historia menstrual y reproductiva: Un riesgo aumentado se correlaciona con menarca temprana, nuliparidad, edad avanzada en el primer parto y menopausia tardía. El carcinoma de mama es raro en mujeres ooforectomizadas, el parto a edad temprana tiene un efecto protector prolongado; así mismo la lactancia materna provee un efecto protector bien documentado.
- Hormonas endógenas: La evidencia demuestra un claro enlace entre la concentración de estrógeno y progesterona en mujeres posmenopáusicas y el riesgo de desarrollar carcinoma de mama. Según estudios prospectivos la relación entre la concentración de hormona circulante y el desarrollo de carcinoma de mama es dominante e independiente de otros factores como obesidad. Entre las mujeres premenopáusicas tanto las concentraciones de estradiol como las de testosterona se asocian con un riesgo aumentado de carcinoma de mama mas no así las concentraciones elevadas de progesterona. Los niveles elevados de prolactina tienen una fuerte correlación con el carcinoma de mama positivos para receptores hormonales.
- Hormonas exógenas: Al contrario de lo que se creía previamente el consumo de anticonceptivos orales tiene poca o ninguna relación con el desarrollo de carcinoma de mama, incluso en mujeres que los hayan usado por periodos mayores a 10 años. La terapia

de reemplazo hormonal por otro lado ha demostrado aumentar el riesgo en especial en consumidoras de larga data.

- Obesidad: La relación entre la obesidad y el carcinoma de mama es compleja. Hay una modesta relación inversa entre obesidad (típicamente medido mediante el índice de masa corporal) y carcinoma en mujeres premenopáusicas. En estudios prospectivos se ha descrito solo una débil relación entre obesidad y carcinoma en mujeres posmenopáusicas.
- Actividad física: Se ha demostrado que altos niveles de actividad física ejercen un efecto protector tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas y es independiente de raza y etnia.
- Nutrición: Extensos estudios de cohorte no han mostrado una relación entre hábitos dietéticos nocivos y carcinoma de mama; tampoco se ha podido asociar la ingesta de altas cantidades de frutas y vegetales con una disminución de riesgo; una excepción a esta regla es el consumo de carnes rojas que está comprobadamente asociado a un aumento del riesgo.
- Alcohol: El consumo de alcohol ha sido consistentemente asociado a un aumento de riesgo inclusive a dosis bajas.
- Tabaquismo: La evidencia actual sugiere que hay una relación causal entre el consumo de tabaco (inclusive en fumadoras pasivas) y el carcinoma de mama tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas. (Lakhani S.R. 2012)

2.3 IMAGEN

La mamografía es el principal método de detección de carcinoma de mama en mujeres mayores de 40 años. El carcinoma de mama se manifiesta de manera más frecuente como una masa espiculada con o sin calcificaciones asociadas. Otras formas de manifestación son distorsión arquitectónica, densidades asimétricas focales o calcificaciones únicamente.

En mujeres jóvenes el ultrasonido es el método de elección, la resonancia magnética nuclear es el método más sensible para diagnóstico pero su uso está confinado a mujeres con alto riesgo (portadoras de mutaciones del BRCA1, BRCA2). (Collins 2018)

2.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Una masa palpable es el signo clínico más frecuente del carcinoma de mama invasor, otros cambios frecuentemente encontrados son retracción cutánea, inversión y descargas del pezón y de manera menos frecuente cambios de color y textura de la piel mamaria; cabe insistir que todos estos signos y síntomas se pueden presentar en neoplasias mamarias benignas por lo que la combinación de evaluación mediante métodos de imagen y biopsia/citología son necesarios para establecer un diagnóstico fidedigno.

2.5 GRADIFICACIÓN

Todos los carcinomas invasores incluyendo el carcinoma de tipo no específico (NOS) son gradificados de rutina mediante la evaluación de la formación de túbulos/glándulas, atipia nuclear y conteo de mitosis. El grado es un poderoso factor pronóstico y múltiples estudios han demostrado una asociación significativa entre el grado histológico y la supervivencia de los pacientes.

MÉTODOS DE GRADIFICACIÓN

Una puntuación numérica que va del 1 al 3 es usada para evaluar cada factor de manera independiente. La formación glandular se evaluó a bajo aumento y en la totalidad de la neoplasia, solo son evaluadas las estructuras que exhiban una luz central bien definida rodeada por células neoplásicas polarizadas. Los puntos de corte para asignar una puntuación son 75% y 10 %.

La atipia nuclear se asigna en referencia al tamaño y forma nucleares de las células epiteliales normales del tejido adyacente. El incremento de la irregularidad nuclear y el número y tamaño

de los nucléolos son características útiles. Los núcleos de grado 1 son de tamaño similar a los de las células epiteliales benignas, muestran atipia mínima con nucléolos poco visibles o ausentes. Los núcleos de grado 2 son de mayor tamaño (1.5 a 2 veces el tamaño de una célula epitelial) con atipia moderada y visible pero con un nucléolo poco visibles. Los núcleos de grado 3 son de mayor tamaño (mayores a 2 veces el tamaño de una célula epitelial normal) con cromatina vesicular, gran variación en tamaño y forma nucleares y con nucléolo prominente.

La evaluación de las mitosis requiere una adecuada preparación de los tejidos y una fijación correcta. Los observadores deben contar únicamente figuras de mitosis definitivas; ignorando núcleos hipercromáticos y picnóticos que más bien representan apoptosis. Para su cuantificación es imperativo conocer el diámetro del objetivo 40x. El campo seleccionado para la cuantificación de mitosis debe realizarse en la periferia del tejido neoplásico al y buscar las áreas con mayor actividad mitótica.

Una vez calculados los valores de cada apartado se suman obteniendo un valor de entre 3 y 9 que se interpretan de la siguiente manera:

- 3 a 5 puntos: grado 1 o bien diferenciado
- 6 a 7 puntos: grado 2 o moderadamente diferenciado
- 8 a 9 puntos: grado 3 o pobremente diferenciado.

2.6 ESTADIAJE

El método más utilizado para la estadificación del carcinoma de mama es el sistema TNM publicado por la “*American joint committee on cancer*” (AJCC) en su octava edición. El sistema recaba información acerca de la extensión del tumor primario (T), la extensión a ganglios linfáticos (N) y las metástasis a distancia (M).

Tanto la clasificación clínica como la patológica se usan para clasificar a los pacientes con carcinoma de mama. El estadio clínico depende de la examinación física y los estudios de imagen,

mientras que el estadio patológico depende del examen microscópico de los tejidos; tanto la escala clínica como la patológica se deben correlacionar para determinar la mejor categoría.

Primary Tumor (T)

- TX** Primary tumor cannot be assessed
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Carcinoma in situ
- Tis (DCIS)** Ductal carcinoma in situ
- Tis (LCIS)** Lobular carcinoma in situ
- Tis (Paget's)** Paget's disease of the nipple NOT associated with invasive carcinoma and/or carcinoma in situ (DCIS and/or LCIS) in the underlying breast parenchyma. Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget's disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget's disease should still be noted
- T4** Tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin (ulceration or skin nodules)
Note: Invasion of the dermis alone does not qualify as T4
- T4a** Extension to the chest wall, not including only pectoralis muscle adherence/invasion
- T4b** Ulceration and/or ipsilateral satellite nodules and/or edema (including peau d'orange) of the skin, which do not meet the criteria for inflammatory carcinoma
- T4c** Both T4a and T4b
- T4d** Inflammatory carcinoma (see "Rules for Classification")

- T1** Tumor \leq 20 mm in greatest dimension
- T1mi** Tumor \leq 1 mm in greatest dimension
- T1a** Tumor $>$ 1 mm but \leq 5 mm in greatest dimension
- T1b** Tumor $>$ 5 mm but \leq 10 mm in greatest dimension
- T1c** Tumor $>$ 10 mm but \leq 20 mm in greatest dimension
- T2** Tumor $>$ 20 mm but \leq 50 mm in greatest dimension
- T3** Tumor $>$ 50 mm in greatest dimension

Distant Metastases (M)

- M0** No clinical or radiographic evidence of distant metastases
- cM0(i+)** No clinical or radiographic evidence of distant metastases, but deposits of molecularly or microscopically detected tumor cells in circulating blood, bone marrow, or other nonregional nodal tissue that are no larger than 0.2 mm in a patient without symptoms or signs of metastases
- M1** Distant detectable metastases as determined by classic clinical and radiographic means and/or histologically proven larger than 0.2 mm

FIGURA 1. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN TNM PARA CARCINOMA DE MAMA. Tomado de: <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/BreastMedium.pdf>

INVASIÓN LINFÁTICA Y VASCULAR

Se define como la presencia de carcinoma dentro de un espacio vascular o linfático pero fuera de la masa tumoral primaria (con frecuencia en la periferia). Aunque la presencia de invasión linfovascular se asocia con extensión a ganglios linfáticos es también un factor pronóstico independiente para recurrencia local, y la presencia de invasión linfovascular y metástasis linfáticas combinadas confieren un peor pronóstico que la presencia de cada una por separado.

La invasión linfovascular puede servir como un reservorio de células neoplásicas no susceptible de remoción quirúrgica además de ser menos susceptible con quimioterapia adyuvante y neoadyuvante.

INVASIÓN A GANGLIOS LINFÁTICOS

La invasión a ganglios linfáticos es el factor pronóstico más importante del carcinoma de mama; se relaciona directamente con el tamaño de la neoplasia, la sobrevida disminuye progresivamente con cada ganglio linfático diagnosticado como positivo para carcinoma.

Las macrometástasis se definen por medir más de 0.2 cm y tienen en sí mismas significado pronóstico. Su diagnóstico requiere la sección de la totalidad del ganglio linfático en cortes delgados (0.2 cm) y la evaluación de un corte representativo por cada bloque. A pesar de esto el no examinar la totalidad del tejido puede resultar hasta en un 40% de falsos negativos.

Las metástasis de menor tamaño se clasifican ya sea como micrometástasis (0.02 a 0.19 cm o más de 200 células neoplásicas) o células neoplásicas aisladas.

El rol de las pruebas moleculares en la práctica diaria todavía no está bien definido ya que el tamaño de las metástasis es incierto y esto puede llevar tanto a falsos positivos como a falsos negativos, en casos de macrometástasis difíciles de detectar como por ejemplo en carcinomas lobulares los estudios de inmunohistoquímica pueden ser de utilidad.

Ni la palpación ni las técnicas de imagen actuales son confiables para el diagnóstico de metástasis ya que lo común es que las metástasis sean pequeñas y en pocos ganglios linfáticos. Los carcinomas se extienden a uno o dos ganglios centinela axilares que se pueden identificar durante las intervenciones con el uso de un trazador radioactivo o colorante. Si no se detecta carcinoma en el ganglio centinela menos del 10 % de pacientes tendrá otros ganglios afectados. La biopsia de ganglio centinela es una técnica útil y de baja morbilidad para separar a pacientes con metástasis de los que no las tienen. La disección axilar no se requiere en pacientes con ganglio centinela negativo y puede no ser necesaria en pacientes con escasa afectación ganglionar. (Lakhani S.R. 2012).

2.6 PRUEBAS MOLECULARES PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO / PROGESTERONA, HER2-NEU Y Ki-67.

RECEPTORES DE ESTRÓGENO (ER) Y PROGESTERONA (PR)

Los receptores hormonales constituyen un elemento crucial en la evaluación del carcinoma de mama. Las guías de práctica clínica más recientes recomiendan su determinación en todas las neoplasias primarias de mama y en las lesiones metastásicas si el resultado influenciará el manejo.

El receptor de estrógeno (ER) es un factor de transcripción nuclear activado por el estrógeno. Controla el desarrollo y diferenciación de las células epiteliales normales y neoplásicas. Existen dos formas de ER: ER-alfa codificado por el gen *ESR1* y el ER-BETA codificado por el gen *ESR2*. Aproximadamente 75% de todos los carcinomas de mama son positivos para receptores hormonales. Los carcinomas invasores de bajo grado son por regla general positivos para receptores hormonales, a pesar de esto el estatus no predice potencial metastásico de un carcinoma, pero si es predictivo de un curso más indolente con un tiempo de recurrencia más prologado. La positividad para receptores hormonales es indicativa de respuesta a tratamiento hormonal.

El receptor de progesterona (PR) es un factor de transcripción nuclear que indica una vía estrogénica funcional, como factor pronóstico su utilidad está menos establecida, su negatividad indica un curso más agresivo de enfermedad.

Aproximadamente 50% de los carcinomas invasivos positivos para ER son también positivos para PR, 25% son ER positivos y PR negativos.

Múltiples estudios han demostrado que la presencia de inmunoreactividad en un porcentaje tan reducido como 1 % de las células neoplásicas es suficiente para predecir un beneficio de la terapia endócrina. El reporte adecuado debe indicar el porcentaje aproximado de carcinoma invasor que muestra inmunoreactividad nuclear seguido de la intensidad del marcaje nuclear en una escala

de 1 al 3. Se aceptan dos métodos formales la puntuación Allred y la puntuación H-Score. (Rosen 2014)

HER2-neu

El HER2-neu es un ejemplo por excelencia de una alteración molecular adquirida que promueve el mantenimiento y crecimiento del carcinoma. Tiene un rol sustancial en múltiples vías carcinogénicas: mejora las señales de crecimiento, aumenta la angiogénesis, facilita las mitosis y mejora la capacidad invasora. La inhibición de los receptores membranosos de HER2-neu mediante terapia blanco ha demostrado una mejor sobrevida en pacientes que demuestran sobreexpresión de HER2-neu.

Aproximadamente 20% de los carcinomas de mama invasores con positivos para HER2-neu y es un factor independiente (en ausencia de terapia adyuvante) de mal pronóstico, pobre diferenciación y corta sobrevida.

Los dos métodos de evaluación son la detección de sobreexpresión de HER2-neu mediante inmunohistoquímica y la amplificación de HER2-neu mediante FISH; ambas técnicas tienen ventajas y desventajas. La evaluación mediante IHQ es simple, barata y deja un registro permanente, pero es solo 90% acertada pues depende de múltiples factores preanalíticos y es observador dependiente. La evaluación mediante FISH no es afectada por factores preanalíticos, pero es cara y requiere equipamiento especializado.

Ki-67

La proliferación descontrolada es la característica cardinal de la malignidad, esta puede ser evaluada de varias maneras, incluyendo el conteo de mitosis, incorporación de nucleótidos marcados y medición mediante citometría de flujo de las células en la fase S del ciclo celular. La manera más extendida de la evaluación del Ki-67.

El Ki-67 es un anticuerpo monoclonal murino que reacciona con un antígeno nuclear expresado en células proliferantes pero que está ausente en células quiescentes. La proliferación celular está estrechamente relacionada con el grado de la mayoría de las neoplasias, siendo mayor en carcinomas poco diferenciados (Dowsett M1 y Breas 2011).

PROBLEMAS METODOLÓGICOS EN LA EVALUACIÓN DEL Ki-67

VALIDEZ PREANALÍTICA

Múltiples situaciones preanalíticas afectan de manera adversa la medición del Ki-67. Entre ellas el tipo de biopsia, tiempo de fijación y tipo de fijador. Múltiples estudios sistemáticos de variación interobservador e interlaboratorio concluyeron que los factores que disminuyen la inmunomarcación de Ki-67 y por tanto deben evitarse son: Retraso en la fijación mayor a 80 minutos, uso de etanol o solución de Bouin como fijadores y los protocolos de decalcificación.

INTERPRETACIÓN

El Ki-67 es una proteína nuclear, ocasionalmente se puede observar marcaje citoplasmático o membranoso en especial en el contexto de cambios metaplásicos. Únicamente se debe incorporar la inmunomarcación nuclear a la puntuación de Ki-67 que se define como el porcentaje de células positivas de entre el total de células neoplásicas.

Si la marcación es homogénea se recomienda valorar por lo menos tres campos de alto poder (40x). Si hay heterogeneidad en la inmunomarcación del espécimen la extensión del área de marcación es controversial. Hay dos tipos de heterogeneidad prominentes: un aumento de inmunomarcación hacia la periferia del tumor y “zonas calientes”. En el primer caso se evalúan tres campos en la periferia en donde se considere que la neoplasia es más biológicamente activa. La evaluación de las “zonas calientes” es controversial algunos autores recomiendan darles prioridad en la evaluación, otros recomiendan evaluarlos con otros campos y finalmente otros recomiendan evitarlos.

En los estudios publicados se han evaluado entre 500 y 2000 células neoplásicas. Las recomendaciones actuales de la ASCO recomiendan una evaluación de entre 500 y 1000 células.

MANEJO DE LOS DATOS

Métodos para determinar un punto de corte han sido extensamente discutidos en la literatura, evidencia reciente de estudios multivariados indica que un índice de Ki-67 mayor al 20% se han relacionado con intervalos libres de enfermedad y una sobrevida más cortos. (Bustreo S 2016).

2.7 EVALUACIÓN ASISTIDA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La mayoría de literatura disponible se basa en la evaluación visual de Ki-67 que puede ayudarse del uso de una cuadrícula. El uso de medios digitales de análisis de imagen resulta muy útil ya que en el caso del Ki-67 todas las células se marcan como positivas sin importar la intensidad de la marcación. (Dowsett M1 y Breas 2011)

2.8 CLASIFICACIÓN MOLECULAR

El grupo de Stanford (Perou y cols., 2000; Sorlie, 2004) analizó la expresión de un grupo de genes en muestras de tejido mamario normal y muestras de diferentes neoplasias de mama, observando que las neoplasias se agrupaban en dos grupos principales dependiendo de la positividad o negatividad de los receptores de estrógenos y progesterona (RE y RP) y HER2-neu. Según esta diferenciación se pueden clasificar las neoplasias en:

TIPO LUMINAL

Son receptores hormonales positivos y a su vez se clasifican en:

LUMINAL A

Son neoplasias con receptores hormonales de estrógenos y genes relacionados con los receptores de estrógenos positivos, receptores de progesterona positivos, y HER2 negativos. Son las neoplasias de mejor pronóstico (Rakha y cols., 2008).

Generalmente presentan una actividad proliferativa menor del 14% (Schnitt y Collins, 2009, Cheang y cols., 2009). Se caracterizan por presentar un panel de genes que expresan típicamente las células epiteliales luminales de la mama (RP, GATA, Bcl-2) y expresan citoqueratinas 8 y 18.

LUMINAL B

Son neoplasias con receptores de estrógenos positivos, tienen perfil genético de neoplasias luminales pero, comparados con el tipo Luminal A, tienen un mayor índice de proliferación celular y expresan genes que tienen relación con los subtipos basal-like y HER2-neu. Pueden presentar positividad para HER2-neu o actividad proliferativa mayor del 20%. Tienen peor pronóstico que los tipo luminal A (Rakha y cols., 2008). Tienen un incremento de expresión de genes asociados a HER2-neu (ERBB2 y GRB7), que se han asociado a resistencia al tratamiento con tamoxifeno, y podrían beneficiarse de tratamiento sistémico.

TIPO HER2-neu POSITIVO

Son neoplasias con receptores hormonales de estrógenos y progesterona negativos y positividad para HER2-neu. Hay que recordar que no existe total equivalencia entre positividad por inmunohistoquímica y la amplificación del gen HER2-neu, ya que ocasionalmente pueden verse casos positivos con inmunohistoquímica y que no están amplificados con la hibridación. La importancia de este grupo está determinada, además de por sus implicaciones pronósticas, por la posibilidad de tratamiento con bloqueantes del receptor o de la actividad tirosinquinasa del dominio intracelular del mismo.

TIPO TRIPLE NEGATIVO

Son neoplasias negativas para receptores de estrógenos, progesterona y para HER2, y presentan un mal pronóstico. Algunos presentan alteraciones moleculares adicionales como una subregulación de genes implicados en la respuesta inmune TH1 que incluye interleukinas, factores reguladores de IFN y genes relacionados con la apoptosis, incluyendo miembros del receptor TNF.

3. JUSTIFICACIÓN

Como se ha expuesto ampliamente en el marco teórico el carcinoma de mama representa una neoplasia muy frecuente y con una elevadísima tasa de mortalidad. Debido a esto incontables investigaciones se han enfocado al descubrimiento y estudio de factores que ayuden a predecir el comportamiento clínico de una neoplasia, la respuesta a terapia y la sobrevida estimada; entre ellos la cuantificación mediante inmunohistoquímica de Ki-67 como un marcador de proliferación celular juega un papel preponderante. Lastimosamente su evaluación está condicionada por situaciones preanalíticas y en ocasiones variación Inter-observador. El presente trabajo pretende validar el análisis digital de imagen como un auxiliar simple y económico para superar las deficiencias causadas por la subjetividad en la evaluación del Ki-67.

4. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

El método visual es comparable al método automatizado para la evaluación de la inmunoexpresión de Ki-67 en carcinoma ductal invasor de mama en las pacientes atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del año 2017.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la validez del método automatizado frente al visual para la evaluación de la inmunoexpresión de Ki-67 en carcinoma ductal invasor de mama en las pacientes atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del año 2017.

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de carácter analítico y transversal

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se toman en cuenta todas las biopsias incisionales, escisionales, mastectomías y materiales de revisión diagnosticados como carcinoma ductal infiltrante de mama, en el periodo comprendido entre enero y julio del 2017, en la Unidad de Anatomía patológica del Hospital general de Mexico “Dr. Eduardo Liceaga”.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todas las biopsias incisionales, escisionales, mastectomías y materiales de revisión diagnosticados como carcinoma ductal infiltrante de mama que cuenten con determinación de Ki-67 mediante inmunohistoquímica.

6.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cuando no se alcancen los requerimientos preanalíticos y analíticos recomendados
- Ausencia de componente tumoral en la sección histológica
- Presencia de marcado artefacto técnico o de procesamiento

6.6 PROCEDIMIENTOS PARA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Se recabaron 193 biopsias diagnosticadas como carcinoma ductal de mama e inmunomarcadas de rutina para Ki-67 en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. La edad de las pacientes fue entre 23 y 90 años.

Treinta y tres casos fueron descartados por no cumplir con los criterios de inclusión.

Todas las neoplasias fueron fijadas en formalina, un corte histológico fue seleccionado para valoración rutinaria de receptores hormonales, Her2-neu y Ki-67. De los 160 casos 112 fueron inmunomarcados de manera manual y el resto de manera automatizada.

Todos los casos fueron evaluados por un patólogo experto y los resultados de la marcación nuclear sin importar su intensidad fueron informados en la forma de un porcentaje.

La adquisición de imágenes digitales se realizó mediante un microscopio Zeiss Axio Imager M1 con un sistema de procesamiento de imagen Zeiss AxioCam ERc 5, resolución 2560 x 1920 pixeles

y una profundidad de color de 24 bits. Cada laminilla se evaluó con un objetivo de 10x y se seleccionaron las áreas con las mayores densidades de células neoplásicas positivas para Ki-67, usualmente en el frente de invasión neoplásica.

Posteriormente se capturaron dos imágenes digitales en formato JPEG por cada región de interés utilizando el objetivo 10x, tomando en consideración el requisito de por lo menos 1000 células neoplásicas. Cada imagen digital se analizó mediante el plug-in analizador de partículas del software ImageJ (**Fig. 2**) y se determinó que contenía en promedio 633 células neoplásicas. Las imágenes no fueron alteradas de ninguna forma (Contraste, iluminación, etc.) antes de su análisis.

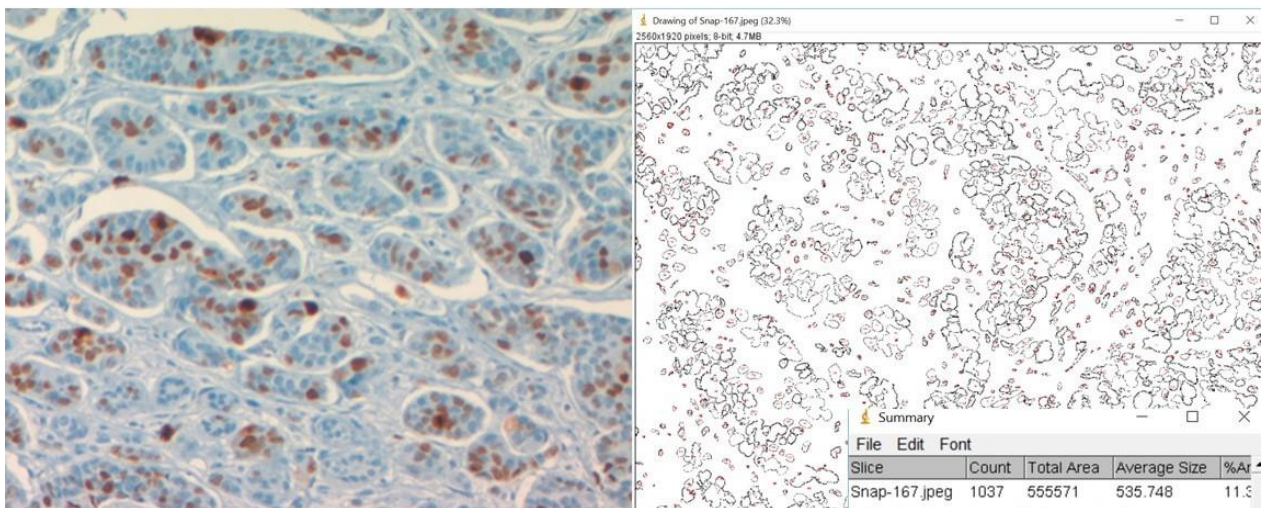


FIGURA 2. CONTEO AUTOMATIZADO DE CÉLULAS EN EL TEJIDO PROBLEMA. Se utilizó la herramienta analizadora de partículas de ImageJ determinando que en el caso puntual la muestra contenía 1037 células neoplásicas.

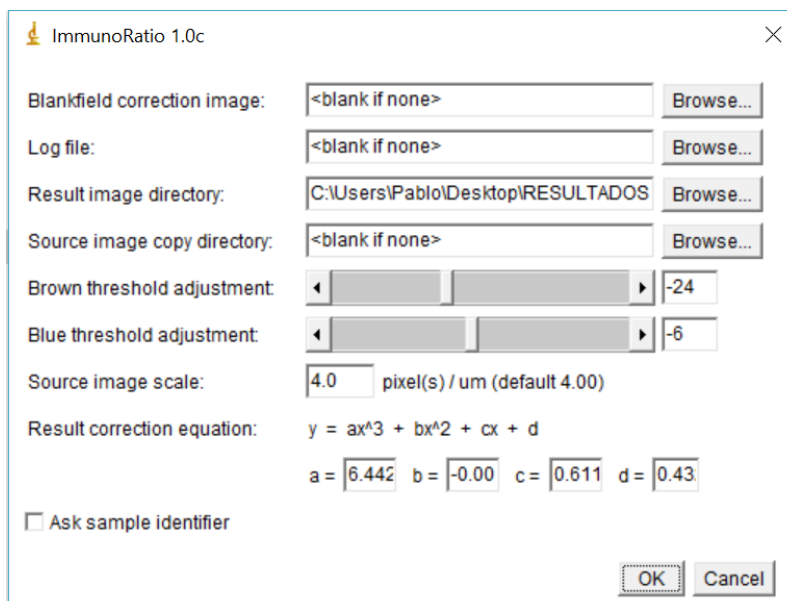


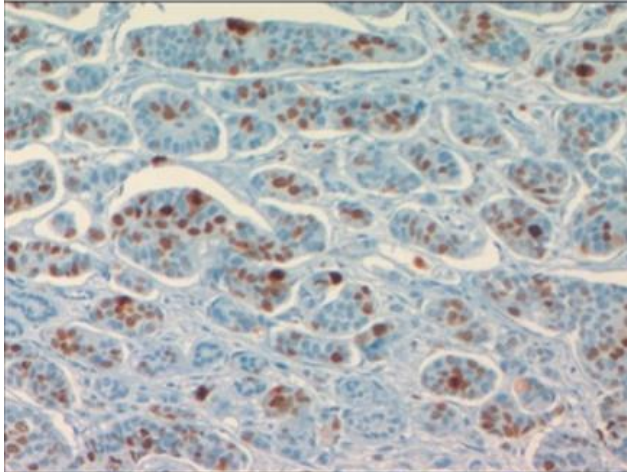
Figura 3. Parámetros de configuración del Plug-In ImmunoRatio.

6.7 PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS DE DATOS

El método de análisis de imagen se realizó mediante el software ImageJ en su versión de software 1.51 J8 (desarrollado por Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), el motor Java 1.6 (64 bits) y el plug-in ImmunoRatio v.1.0c (desarrollado por Vilppu Tuominen y Jorma Isola, Cancer Biology Research Group, University of Tampere, Finlandia). La elección de este software fue deliberada ya que es gratuito, ampliamente distribuido e independiente de plataformas propietarias. Todo el procesamiento se realizó en una PC dual-core (2.4 GHz), 8 Gb de memoria RAM corriendo en Windows 10.

Cada imagen se analizó de manera individual ajustando los límites de marrón a -24 (en una escala de +100 a -100), los límites de azul a -6 (en una escala de +100 a -100) y la escala de tamaño a 4 micras por pixel (**Fig. 3**). Los resultados (**Fig. 4**) obtenidos del análisis se agregaron a la base de datos previamente obtenida.

ImmunoRatio
Sample ID: Snap-166.jpeg
Date: 13.6.2018 22:19
DAB / nuclear area: 13.7%



ImmunoRatio
Sample ID: Snap-167.jpeg
Date: 13.6.2018 22:19
DAB / nuclear area: 16.0%

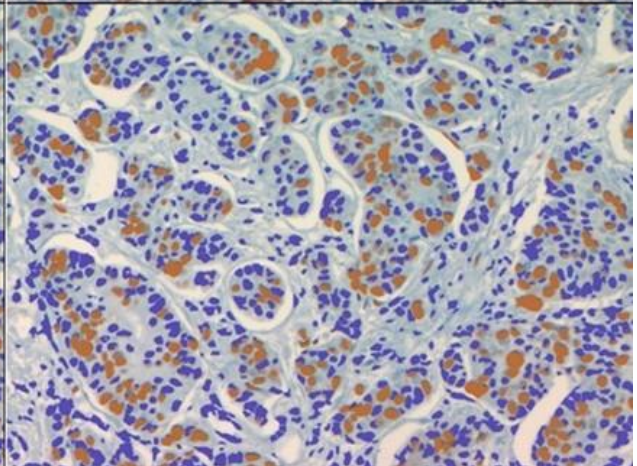
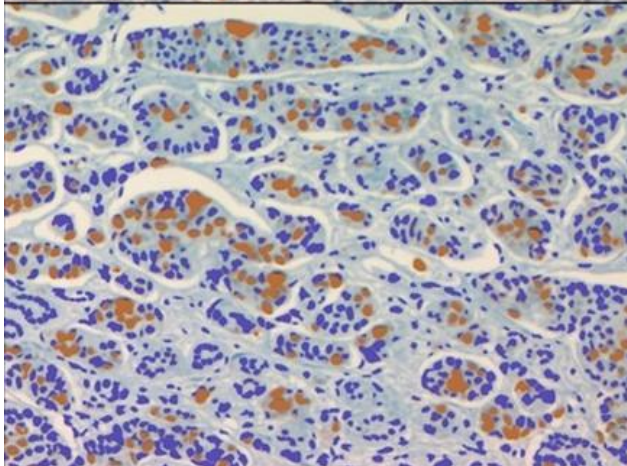
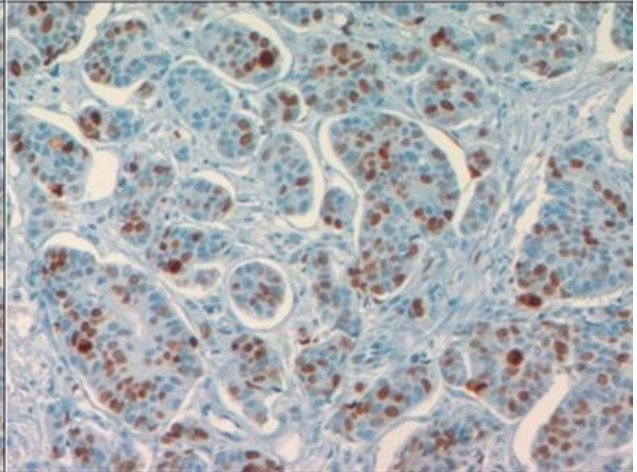


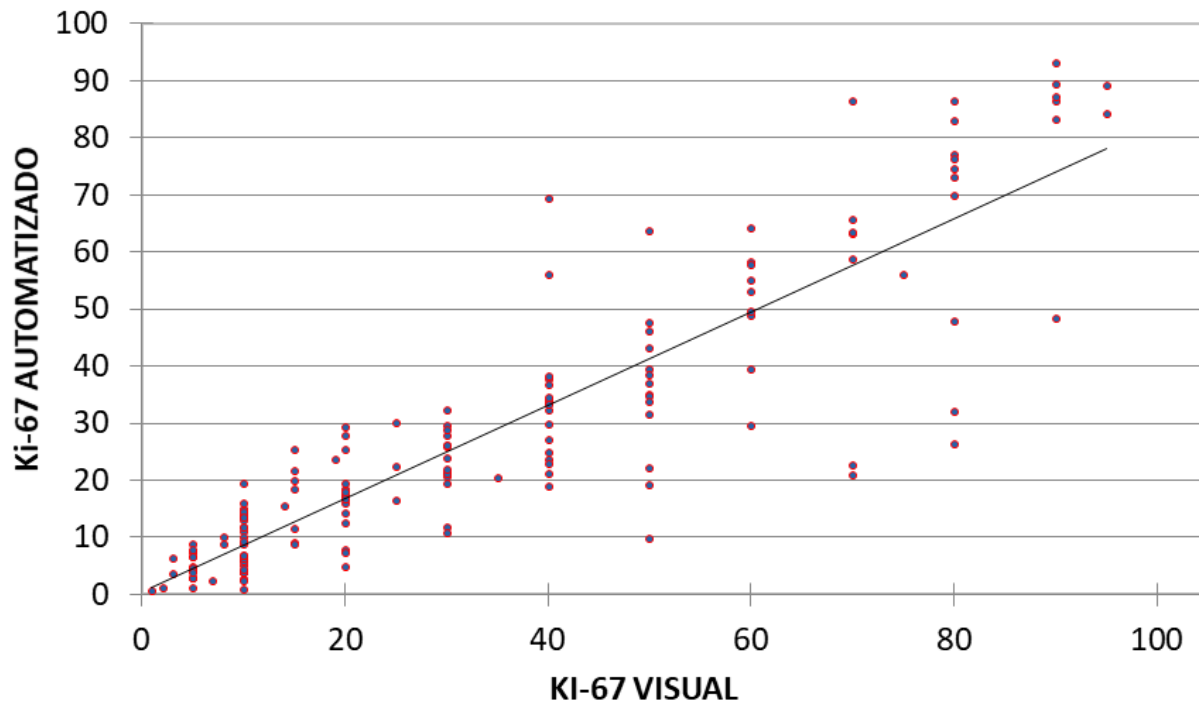
Figura 4. Resultados del análisis automatizado de Ki-67

6.8 ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo a los Artículos 16, 17 y 23 del capítulo I, título segundo: De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos. El presente proyecto de retrospectivo, documental sin riesgo, que no amerita consentimiento informado. Los investigadores Confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifica su realización así como que contamos con la capacidad para llevarlo buen término nos comprometemos a mantener una estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad a salvaguardar la confidencialidad de los datos personales de los participantes, pondremos del bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo y nos conducirá muy de acuerdo a los estándares éticos de aceptados a nivel nacional e internacional Según lo establecido con la Ley General de salud, las pautas éticas internacionales para la investigación y experimentación biomédica en seres humanos de la OMS así como la declaración de Helsinki.

7. RESULTADOS

Gráfico 1. Correlación (Pearson) entre la evaluación visual y la automatizada de la inmunoexpresión de Ki-67 en pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del 2017.

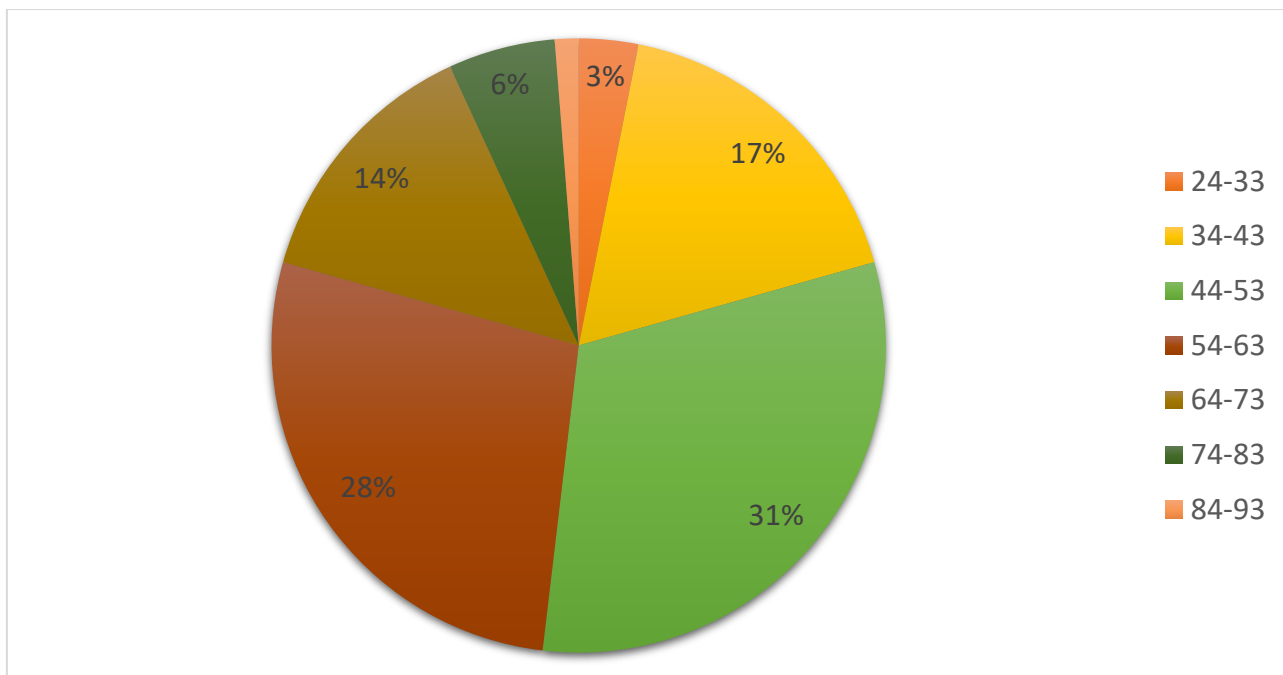


Fuente: Base de datos

En la muestra analizada se observó una correlación positiva ($r=0.8$) entre la evaluación visual y la automatizada de Ki-67. Para la evaluación visual el valor máximo expresado fue 95.0%, el mínimo 1%, con una media de 33.9 %; para la evaluación automatizada el valor máximo fue 93.20 %, el mínimo 0.7 % con una media de 28.09%.

El coeficiente de variación entre los dos métodos de evaluación fue de 24.03%.

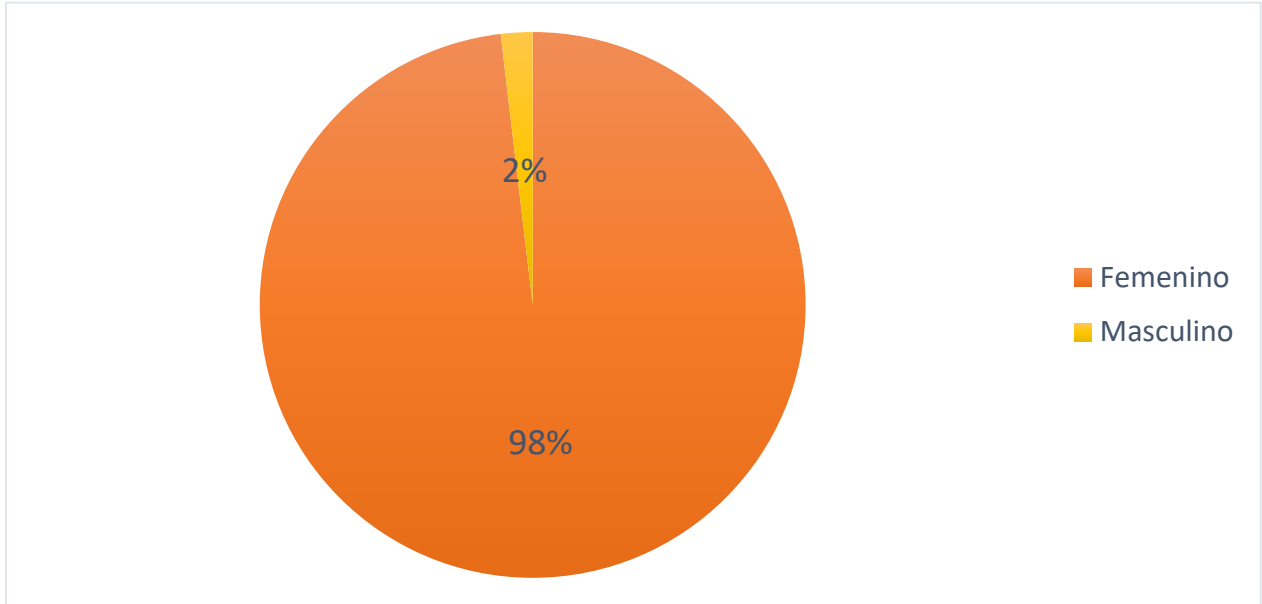
Gráfico 2. Distribución de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del 2017 según edad.



Fuente: Base de datos

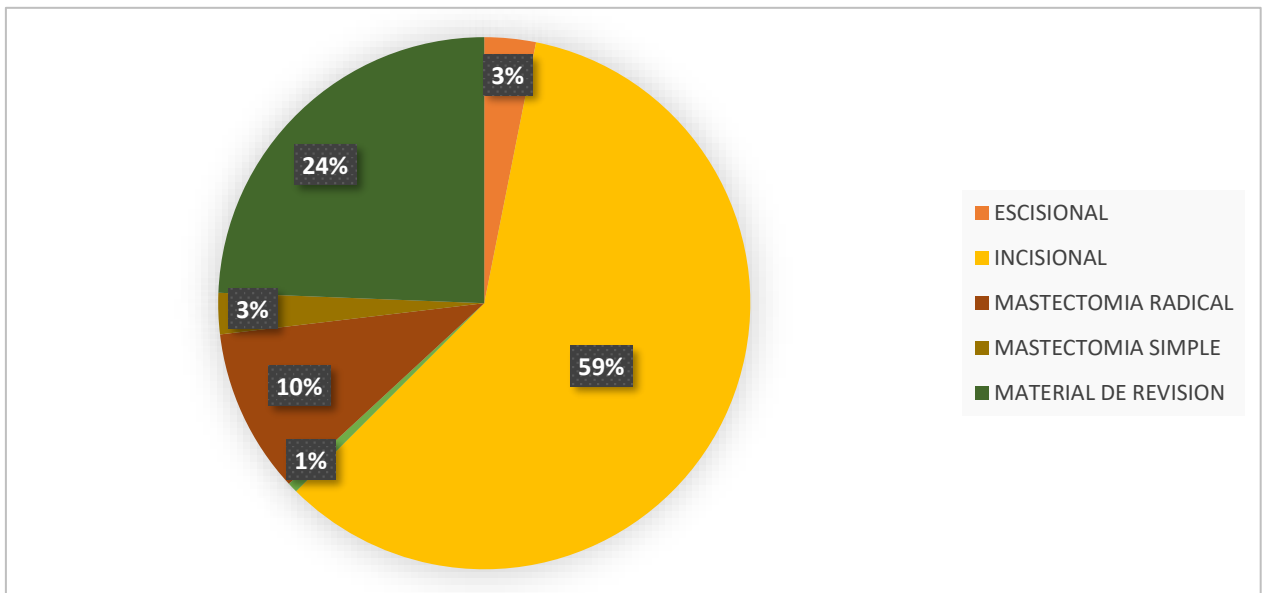
En la muestra analizada (n=160) se observó que entre los 44 y 63 años se diagnosticaron 94 (59%) de casos de carcinoma ductal infiltrante de mama, entre los 34 y 43 años se diagnosticaron 34 casos (17%), entre los 64 y 73 años se diagnosticaron 22 casos (14%), las mayores de 84 años y las menores de 24 representaron 1 y 3 % respectivamente.

Gráfico 3. Distribución de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del 2017 según sexo.



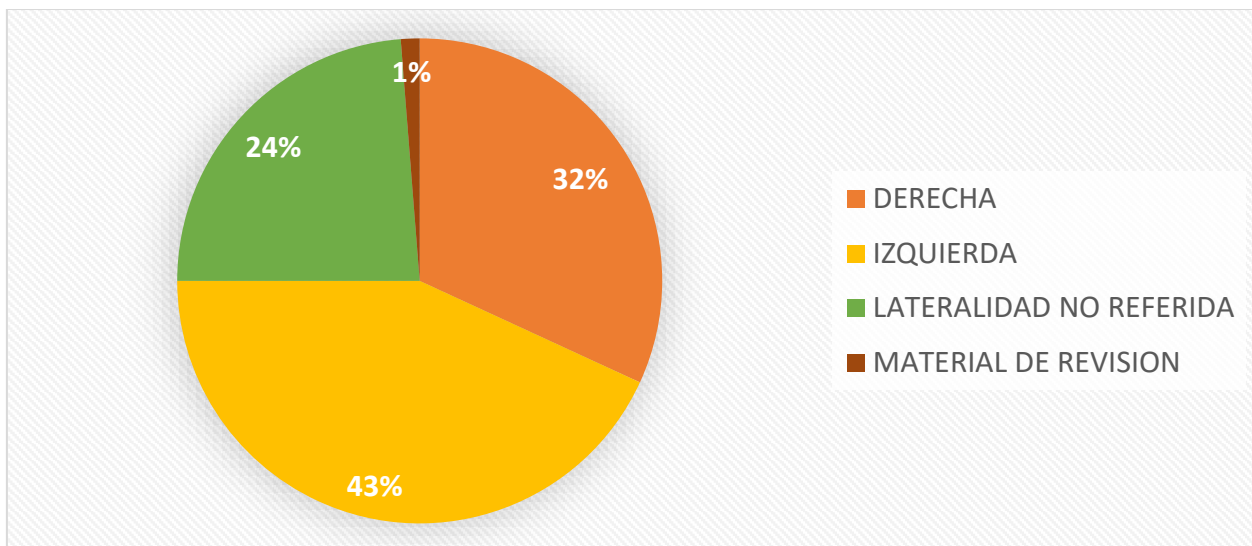
Fuente: Base de datos

Gráfico 4. Distribución de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del 2017 según procedimiento realizado.



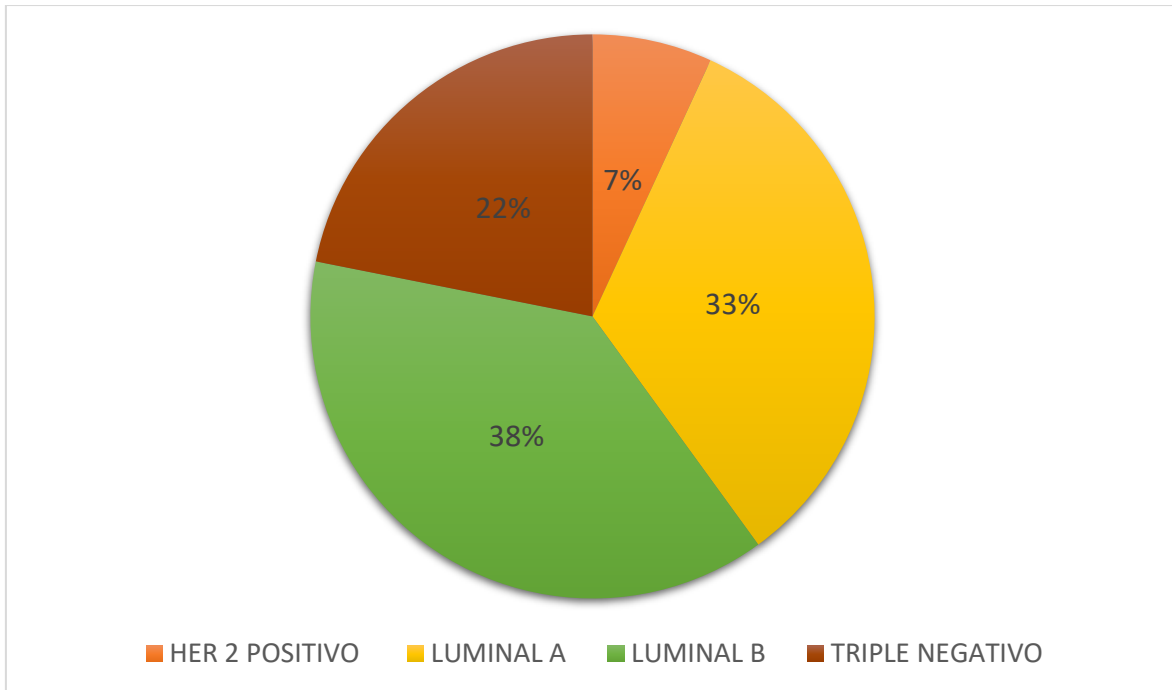
Fuente: Base de datos

Gráfico 5. Distribución de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del 2017 según lateralidad del espécimen.



Fuente: Base de datos

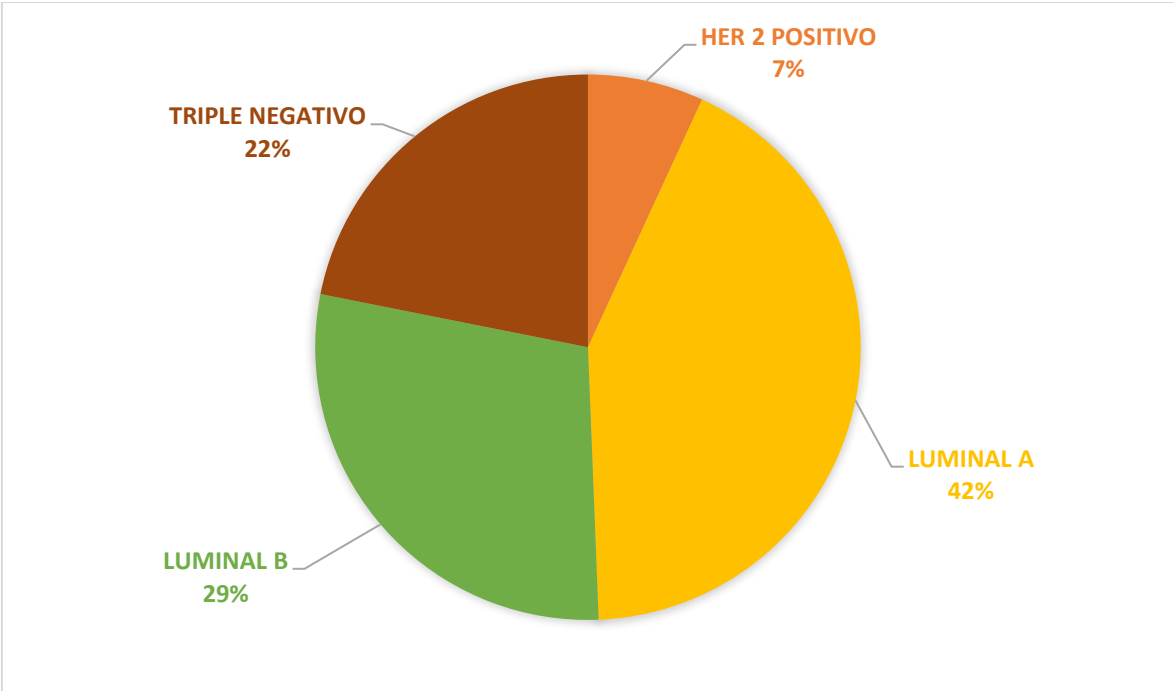
Gráfico 6. Distribución de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del 2017 según clasificación molecular asignada por evaluación visual.



Fuente: Base de datos

Dentro de la clasificación molecular del carcinoma de mama se observó que la categoría Luminal B fue la que se asignó con más frecuencia (61 casos) seguida de la categoría Luminal A (53 casos), en tercer lugar, de frecuencia se ubicó la categoría triple negativo con 35 casos, la categoría Her2-neu positivo se asignó en 7 casos.

Gráfico 7. Distribución de pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama atendidas en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero a julio del 2017 según clasificación molecular asignada por evaluación automatizada.



Fuente: Base de datos

Durante la evaluación automatizada del Ki-67 se encontraron 17 casos controversiales en donde los valores obtenidos mediante análisis automatizado cambiarían el grupo molecular asignado. Se noto además que los porcentajes de los grupos moleculares asignados mediante evaluación computarizada se acercan más a los reportados en la literatura internacional frente a los obtenidos por evaluación visual.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio, la pregunta principal era si la determinación de la inmunoexpresión de Ki-67 por metodologías visuales y automáticas podría considerarse equivalente. La principal medida de resultado fue la paridad entre la evaluación de tinción automática, en comparación con los métodos de evaluación visual. El acuerdo entre los métodos fue bueno, que se determinó utilizando enfoques estadísticos estándar (Coeficiente de Pearson: 0.8), lo que sugiere que el software ImmunoRatio es un método adecuado para evaluación de índices de proliferación.

Nuestros datos corroboran los hallazgos publicados por Remes et al.(2012), quien informó que el software ImmunoRatio es un método adecuado para evaluar el índice de proliferación en neoplasias neuroendocrinas.

El uso del método automatizado para determinar el índice de proliferación tiene ventajas sobre los métodos manuales. En primer lugar, se trata de un sofisticado método de análisis de imágenes que permite el cálculo de múltiples parámetros de forma rápida, precisa y confiable. Las evaluaciones asistidas por computadora no se ven afectadas por los errores del evaluador, y los resultados de las fotomicrografías se analizan exactamente de la misma manera en cada ocasión. El método automatizado no requiere evaluación por un experto o experiencia previa en el conteo de células, y el tiempo de conteo de células es mínimo sin posibilidad de fatiga del evaluador. Estos son factores clave que pueden afectar el conteo de células cuando se usan métodos convencionales. ImmunoRatio genera montajes visuales informativos que se pueden evaluar fácilmente; además, es una aplicación de acceso abierto que se puede usar de manera predeterminada con el plugin ImageJ. Sin embargo, el método automatizado también tiene algunas desventajas, incluido el requisito de fotomicrografías con calidad y contraste adecuados y una técnica inmunohistoquímica adecuada. Además, este método puede verse afectado por la intensidad de la tinción de Ki-67, que varía de acuerdo con la fase del ciclo celular. Este método también es incapaz de diferenciar las células neoplásicas de las células no neoplásicas con núcleos positivos para Ki-67, lo que puede causar errores en los resultados del índice de proliferación.

9. BIBLIOGRAFÍA

BreastCancer.org. <http://www.breastcancer.org>. 9 de Enero de 2018.

http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics (último acceso: 3 de junio de 2018).

Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, et al. «Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up.» *Breast cancer Research and treatment*, 2016: 157: 363-371.

Collins, L. «Breast.» En *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, de J., Ackerman, L. V, Golblum, J., Lamps, L., Rosai, 36 (1434-1512). Philadelphia, PA: Elsevier, 2018.

Dowsett M1, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF, y International Ki-67 in Breas. «Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group.» *Journal of the National Cancer Institute*, 2011: 103(22):1656-64.

Fletcher, Christopher D.M. «Diagnostic histopathology of neoplasia s.» 1057-1129. Londres: Livingston Imprint, 2014.

Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. (Eds.). *WHO Classification of Tumours of the Breast*. Lyon: IARC, 2012.

Mohammed ZM1, McMillan DC, Elsberger B, Going JJ, Orange C, Mallon E, Doughty JC, Edwards J. «Comparison of visual and automated assessment of Ki-67 proliferative activity and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer.» *British Journal of Cancer*, 2012: 106, 383 – 388.

Rosen, Paul Peter. «Invasive Ductal Carcinoma: Assessment.» En *Rosen's breast pathology*, de Edi Brogi, Frederick C. Koerner, Paul P. Rose Syed A. Hoda, 436-490. Philadelphia, PA 19103 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2014.

Secretaria de Salud. «Prevención y control del cancer de la mujer 2013-2018.» *Centro nacional de equidad de genero y salud reproductiva*. 08 de Septiembre de 2015.

http://cneqsr.salud.gob.mx/contenidos/descargas/cama/PrevencionyControldelCancerdeLaMujer_2013_2018.pdf (último acceso: 03 de 06 de 2018).

Faratian D, Kay C, Robson T, Campbell FM, Grant M, Rea D, Bartlett JMS (2009) Automated image analysis for high-throughput quantitative detection of er and pr expression levels in large-scale clinical studies:the team trial experience. *Histopathology* 55: 587– 593

Fasanella S, Leonardi E, Cantaloni C, Eccher C, Bazzanella I, Aldovini D,Brabantini E, Morelli L, Cuorvo LV, Ferro A, Gasperetti F, Berlanda G, Dalla Palma P, Barbareschi M (2011) Proliferative activity in human breast cancer: ki-67 automated evaluation and the influence of different ki-67 equivalent antibodies. *Diagn Pathol* 6(Suppl 1): S7

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715, 1984.

Park D, Kåresen R, Noren T and Sauer T: Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch* 451: 11-18, 2007.

Aleskandarany MA, Green AR, Benhasouna AA, et al: Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive and triple-negative biologic classes of breast cancer. *Breast Cancer Res* 14: R3, 2012.

