

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD DE LA HABANA**

INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGÍA Y RADIOBIOLOGÍA

“Evaluación de factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama en Cuba. Su papel en la terapia personalizada”

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autora: Lic. Rosa Irene Álvarez Goyanes

Tutor: Prof. Titular, Dr. C. Enrique Rengifo Calzado

Asesora: Dr. C. Adriana Carr Pérez

Ciudad de la Habana, 2011

AGRADECIMIENTOS.

A mi esposo, Rolando Camacho por su amor verdadero, por apoyarme e inspirarme siempre en todos mis anhelos y ser para mí un ejemplo de hombre perseverante y capaz.

A mi tutor, el Dr. Enrique Rengifo por brindarme de manera incondicional sus extensos conocimientos sobre el tema, guiarme tan sabiamente durante todo el trabajo, dedicarme gran parte de su tiempo y haber hecho posible la consolidación de este documento.

A Xiomara y Ramón por ser más que compañeros de trabajo, los mejores amigos.

A mis compañeros del Departamento de Control de Calidad del Centro de inmunología Molecular: Milagros, Mercedes y Rancés por el inmenso apoyo y su excelente acogida.

Al grupo Medicina Nuclear Dr. Oliva, Joaquín, Carlos, la Dra. Gilmara y el Dr Casacó.

A Maruchi y Anita por siempre animarme a seguir adelante.

A Adriana por la asesoría de este trabajo.

A mis colegas del Departamento de Anatomía Patológica del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas: Fanny, Maryanis, Suanel, Celia, la Dra. María Caridad y el Dr. Carlos, por haberme recibido en su laboratorio como un integrante más, sin cerrar nunca sus puertas para mí durante tantos años y por su importante apoyo material y espiritual a los proyectos científicos.

Al departamento de Anatomía Patológica del hospital Manuel Fajardo en especial al Dr. Charles y a la Dra. Rebeca por su contribución científica a este trabajo. A Silvia, Ingrid, Gretel y Celia por el apoyo técnico y por haberme hecho sentir en casa.

A los Doctores Sergio Sánchez Sosa, Antonio Llombart Bosh por recibirme en sus departamentos y proporcionarme el acceso a las técnicas novedosas para la caracterización de los tumores mamarios. Al Dr. Isidro Machado apoyarme en el trabajo en el laboratorio.

En el Instituto de Oncología mi mayor agradecimiento es para los integrantes del grupo de Biología celular y banco de tumores: Adanay, Rosamaire, Damian y Milagros. También para la Dra. Sonia del departamento de Anatomía Patológica por su excelente colaboración durante el desarrollo de los proyectos de investigación que han dado origen a este trabajo de tesis. Al Dr. Anasagasti, al Dr. Esteban, a la Lic. Idalmis, a Carmita, Barbarita, y a muchos otros.

A cada uno de los que en los años 80 me iniciaron en el campo de la investigación científica, a mis profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas y a todos los amigos y familiares, especialmente a Silvia, Yolanda y a mi cuñada Hilda, los que por una vía u otra han contribuido a la culminación de este trabajo científico.

A todos, gracias.

A Rolando y a mis padres.

Abreviaturas por orden alfabético.

Ac(s). Anticuerpo(s).

AcM(s). Anticuerpo(s) monoclonal(es).

ASCO. Sociedad Americana de Oncología Clínica (American Society of Clinical Oncology).

BRCA. Cáncer de mama (**BR**east **CA**ncer).

CAP. Colegio Americano de Patólogos.

CDI. Carcinomas ductales invasivos.

CEP. Centrómero.

CK. Citoqueratina.

CLI. Carcinomas lobulillares invasivos.

CIM. Centro de Inmunología Molecular.

DAB. Diaminobencidina.

dm. Dimensión mayor.

EGF. Factor de crecimiento epidérmico humano (Epidermal growth factor).

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Epidermal growth factor receptor).

EGFR 1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (Epidermal growth factor receptor type 1).

EGFR 3. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (Epidermal growth factor receptor type 3).

EGFR 4. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (Epidermal growth factor receptor type 4).

ELISA. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzymatic linked immuno specific antigen).

E. Especificidad.

EUA. Estados Unidos de América.

FDA. Agencia regulatoria para la aprobación del uso medicamentos en humanos (Food and Drug Administration).

FISH. Hibridación in situ fluorescente (Fluorescent in situ hybridization).

GH. Grado histológico.

gp¹⁸⁵. glicoproteína 185.

GN. Grado nuclear.

HAMA. Anticuerpos humanos anti ratón (**H**uman **A**nti-**M**ouse **A**ntibodies).

HER2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo II (Human epidermal growth factor Receptor type II).

hr. Hora.

IHQ. Inmunohistoquímica.

INOR. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología.

(NeuGc). Ácido N-glicolil neuroamínico (glycolyl neuroaminic acid).

(NeuAc). Ácido N-acetil neuroamínico (acetil neuroaminic acid).

nm. Nanómetro.

µm. Micras.

µg. Microgramo.

µL. Microlitro.

mCi. Milicurie.

mL. Mililitro.

mm. Milímetro.

min. Minuto.

mmoL. Milimolar.

MLIN. Uniones múltiples (multiple links).

Px. Peroxidasa.

pag(s). Página(s)

RH. Receptores hormonales.

RE. Receptor de estrógeno.

RP. Receptor de progesterona.

SSTF. Solución salina tamponada con fosfatos.

S. Sensibilidad.

TA. Temperatura ambiente.

^{99m}Tc Tecnecio 99 metaestable.

TMA. Microarreglos de tejidos (Tissue microarray).

TNM. Sistema de estadiamiento de tumores según: el tumor (T), los nódulos (N) y las metástasis (M).

TN. Triple negativos

VPP. Valor predictivo positivo

VPN. Valor predictivo negativo

14F7. Anticuerpo monoclonal anti- (NeuGc)GM3.

⁹⁹Mo/^{99m}Tc. Molibdeno99-tecnecio99 meta-estable.

SÍNTESIS

La identificación de factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama ha permitido aplicar programas terapéuticos personalizados sin lograr, aún, la individualización para todas las pacientes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la frecuencia de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2 junto a la expresión del EGFR1 y del gangliósido NglicolilGM3. En 1 509 pacientes se determinó la frecuencia de expresión de los receptores antes mencionados, que se correlacionaron con las variables morfológicas y generales. Se comparó el reconocimiento del AcM ior egf/r3 con el de un juego diagnóstico- comercial, y el del AcM 14F7 in vitro en tejido fresco e incluido en parafina e in vivo marcado con 99mTc. Se obtuvo la frecuencia en Cuba de estos marcadores pronósticos y predictivos de respuesta, observándose la hormono dependencia del tumor asociada a características menos agresivas. El AcM 14F7 mostró un amplio reconocimiento que no se correlacionó con los factores pronósticos, pero fue capaz de detectar in vivo los tumores primarios de la mama. El ior egf/r3 exhibió un 100% de especificidad y valor predictivo positivo, así como una sensibilidad y valor predictivo negativo de 68 y 73% respectivamente. El reconocimiento de los AcM 14F7 e ior egf/r3 abre una nueva posibilidad terapéutica dirigida contra estos blancos para cáncer de mama.

ÍNDICE

	<i>“Pág.”</i>
INTRODUCCIÓN.	1
Antecedentes.	1
Hipótesis de trabajo.	5
Objetivos.	6
Novedad científica.	7
Importancia práctica.	8
CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	9
1.1 Mama normal.	9
1.2 Cáncer de mama.	11
1.2.1 Clasificación histológica de los tumores epiteliales malignos de la mama.	13
1.2.2 Sistema TNM.	13
1.3 Factores Pronósticos.	14
1.3.1 Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama aceptados en la actualidad.	15
1.4 Gangliósidos.	24
1.4.1 Estructura y localización.	24
1.4.2 Gangliósidos como antígenos tumorales.	26
1.4.3 Función N-glicolilada.	27
1.4.4 Anticuerpos contra gangliósidos.	27
1.4.4.1 Anticuerpo monoclonal 14F7-	28
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
2.1 Muestra de tumores.	29
2.1.1 Datos de la muestra.	29
2.2 Factores pronósticos.	32
2.2.1 Edad.	32
2.2.2 Subtipo histológico.	32
2.2.3 Grado histológico y nuclear.	32
2.2.4 Dimensión mayor del tumor.	33
2.2.5 Ganglios axilares metastásicos.	33
2.2.6 Estadio clínico.	34
2.3 Inmunohistoquímica.	34
2.3.1 Láminas portaobjetos.	34
2.3.2 Cortes de Tejidos.	34
2.3.3 Anticuerpos monoclonales	34
2.3.4 Desenmascaramiento antigénico.	35
2.3.5 Sistemas de detección.	35
2.3.6 Controles.	36
2.3.6.1 Controles Positivos.	36
2.3.6.2 Controles Negativos.	36

2.3.7 Descripción general de la técnica inmunohistoquímica.	36
2.3.8 Especificidades de la técnica según el anticuerpo empleado.	37
2.3.8.1 HER2.	37
2.3.8.2 EGFR y el receptor egf/r3.	38
2.4 Expresión tisular de los RH, de los EGFR tipo 1 y 2 y del (NeuGc)GM3.	38
2.5 Hibridación in situ Fluorescente.	40
2.5.1 Técnica.	40
2.6 Microarreglos tisulares.	42
2.6.1 TMA (Thermo Scientifics, México).	42
2.6.2 TMA (Beecher Instruments, Sun Prairie, Wisconsin, EUA).	43
2.6.2.1 Procedimiento.	44
2.7 Reconocimiento in vivo del AcM 14F7 por inmunocentellografía	44
2.7.1 Marcaje radioactivo del anticuerpo monoclonal.	45
2.7.2 Estudio de Biodistribución.	46
2.7.3 Toxicidad	46
2.7.4 Inmunohistoquímica.	47
3.7.4.1 Procedimiento.	48
2.8 Análisis estadístico.	49
CAPITULO 3. RESULTADOS.	51
3.1 Variables morfológicas y generales.	51
3.2 Inmunohistoquímica.	54
3.2.1 Inmunolocalización tisular de los receptores hormonales.	54
3.2.2 Inmunolocalización tisular de los receptores de la familia del Factor de crecimiento epidérmico humano.	57
3.2.2.1 HER2.	57
3.2.3 Correlación de la expresión del HER2 con los RH.	61
3.2.4 EGFR1.	62
3.2.5 Expresión tisular del anticuerpo monoclonal 14F7.	63
3.3 Biodistribución del 14F7. Estudio inmunocentellográfico.	65
CAPITULO 4. DISCUSIÓN.	68
4.1 Factores pronósticos y predictivos.	69
4.1.1 Factores pronósticos morfológicos y generales para cáncer de mama.	69
4.1.1.1 Subtipo histológico.	69
4.1.1.2 Grado histológico y nuclear.	70
4.1.1.3 Tamaño del tumor.	71
4.1.1.4 Ganglios axilares metastásicos.	71
4.1.1.5 Estadío clínico.	72
4.1.1.6 Edad.	73
4.1.2 Receptores hormonales y HER2.	74
4.1.2.1 Receptor de estrógeno y receptor de progesterona.	74
4.1.2.2 HER2.	77
4.2 Tumores triple negativos y el EGFR1.	80
4.3 Gangliósidos y el anticuerpo monoclonal 14F7.	82

4.4 Discusión general.	84
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	89
Conclusiones.	89
Recomendaciones.	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	91
ANEXO 1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES DE LA MAMA DEL 2003.	117
ANEXO 2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS CÁNCERES DE MAMA SEGÚN EL PATRÓN INMUNOHISTOQUÍMICO.	121
ANEXO 3. SISTEMA TNM DEL 2002.	122
ANEXO 4. FICHA DE DATOS.	128
AUTOBIBLIOGRAFÍA.	129

INTRODUCCIÓN.

Antecedentes.

El cáncer es uno de los procesos más complejos de la naturaleza y resulta el más complicado en la esfera de la medicina por la amplia multicausalidad que incide en su origen, la complejidad de sus mecanismos patogénicos, biomoleculares y la variedad de formas y tipos que pueden originarse en los seres vivos (Tavassoli FA, 2003).

El cáncer de mama es el más frecuente en la mujer a nivel mundial, su incidencia ha aumentado de 572 100 en 1980 a 1.38 millones de casos nuevos en 2008 (Ferlay y cols, 2008). Aunque es más frecuente en los países ricos, las mayores tasas de crecimiento se observan en los países en desarrollo. Igualmente es el cáncer que mayor número de muertes produce en el sexo femenino a nivel mundial: 268 000 muertes anuales / 12.7% de las muertes por cáncer en mujeres (Ferlay y cols, 2008).

En Cuba el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia en la mujer, ha ido creciendo de 1 715 casos en 1994 hasta 2 953 en el 2006. La mortalidad se ubica en el segundo lugar con un 14, 8% (1 357) de las muertes por cáncer en mujeres en el 2008, de las cuales el 35% están comprendidas en el grupo de edad de 50 a 64 años (Anuario estadístico de Cuba, 2009).

La identificación de factores pronósticos y predictivos de respuesta a la terapia en el cáncer de mama, tales como: la edad, el tamaño del tumor, el grado nuclear, el grado histológico, el número de ganglios axilares metastásicos, la expresión de los receptores hormonales y del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2, han permitido

clasificar las pacientes con características similares para seleccionar y aplicar programas terapéuticos de menor o mayor intensidad. Aun así, no se ha logrado un tratamiento individualizado para todas las pacientes debido a la heterogeneidad de la enfermedad que abarca múltiples entidades con características biológicas y un comportamiento clínico marcadamente diferente (Simpson y cols, 2005; Kummel y cols, 2007).

La expresión de los receptores hormonales: receptor de estrógeno y de progesterona, así como del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 en los tumores mamarios, forma parte del estudio sistemático que se realiza a las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama a nivel mundial (Kummel y cols, 2007). Son factores con valor pronóstico y predictivo de respuesta a la hormonoterapia, la inmunoterapia e incluso permiten la selección de mejores esquemas quimioterapéuticos, e incrementan el beneficio cuando se utilizan combinadas estas terapias sistémicas (Kurebayashi y cols, 2007).

En Cuba no se habían reportado estudios de estos receptores por métodos inmunohistoquímicos. Sólo se trabajó la determinación de receptores hormonales en tumores mamarios por métodos bioquímicos en el Instituto de Oncología y Radiobiología en la década de los 80 (Pascual y cols, 1982). Esta técnica de difícil extensión, no sólo por el costo elevado del equipamiento necesario, sino también por la necesidad de emplear hormonas radioactivas y una muestra de tejido tumoral de gran tamaño, se logró extender solamente a la provincia de Santiago de Cuba y se dejó de realizar en la década del 90. Los resultados de este trabajo, constituyeron el único reporte con el que se contaba de la expresión de estas moléculas en los tumores de mujeres cubanas diagnosticadas con cáncer de mama (Pascual y cols, 1982, 1983,

1984), hasta el inicio de la evaluación sistemática de los receptores hormonales por inmunohistoquímica en el presente trabajo.

Otro de los blancos más investigado para la terapia de los tumores malignos, ha sido el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se reporta su sobreexpresión en tumores de diferente localización: cabeza y cuello, colon y recto, pulmón, mama, ovario, próstata, riñón, cerebro, páncreas y vejiga (Laskin y Sandler, 2004). Su implicación en procesos relacionados con la progresión y la metastización de los tumores entre los que se incluyen la invasión, la angiogénesis, la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, lo correlaciona con mal pronóstico (Mendelsohn J., 2002).

En el 20 al 30% de los cánceres de mama se ha reportado la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2) (Slamon y cols 1987-89). Estos estudios fueron el punto de partida de una extensa serie de publicaciones que asociaron la expresión de esta molécula con mayor agresividad del tumor y la clasificaron como un predictor de respuesta a diferentes esquemas de tratamiento, especialmente al utilizar el trastuzumab, anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce el dominio extracelular del HER2, aprobado desde 1998 para su utilización en el tratamiento del cáncer de mama metastásico (Picart y cols, 2005; Jackisch Ch., 2006). Desde entonces y hasta la fecha, los resultados clínicos obtenidos en la predicción de respuesta abarcaron también a la hormonoterapia y la quimioterapia, y fueron estableciendo el valor del conocimiento de su expresión en los tumores mamarios al momento del diagnóstico, convirtiéndolo en un procedimiento estándar en la práctica clínica del cáncer de mama (Taucher S., 2003; Joensuu y cols, 2006).

El cáncer tiene un origen multifactorial, la formación de un tumor es el resultado de mutaciones en los genes que controlan la proliferación y la muerte celular. La heterogeneidad encontrada en las poblaciones de células neoplásicas y la disponibilidad limitada de marcadores biológicos específicos, han contribuido a la alta incidencia y mortalidad por cáncer mantenida durante el tiempo (Thompson y cols, 2007. Petrelli y cols, 2009).

La identificación de moléculas cuya presencia pudiera ser específica, encontrarse aumentada o disminuida en una célula neoplásica es aún en nuestros días, el mayor reto en Oncología por su valor no sólo para el diagnóstico y el pronóstico sino para la selección del tratamiento personalizado de los tumores malignos, que evita el daño sin beneficio que producirían en las pacientes el uso de terapias no adecuadas y mejora significativamente la calidad de vida de las enfermas (Macdonald F., 2003).

En cáncer, la definición de la conducta médica a seguir y la rapidez en la ejecución de los procedimientos es fundamental. Los resultados clínicos obtenidos a través del empleo de los nuevos avances tecnológicos: los anticuerpos monoclonales, la inmunohistoquímica, la biología molecular, y los conocimientos alcanzados a través de ellos: el proyecto de genoma humano y la proteómica, han logrado predecir determinados comportamientos de las neoplasias, establecer el pronóstico de grupos específicos de pacientes, facilitar su seguimiento clínico y seleccionar esquemas terapéuticos más eficaces.

El uso del término terapia personalizada es relativamente nuevo, se maneja en el sentido estricto hace aproximadamente unos 10 años, pero la idea de atacar un blanco molecular

especifico e interferir en su mecanismo de acción no es un nuevo concepto en oncología (Mountzios G. y Soria JCh., 2007).

Los anticuerpos monoclonales (AcMs) constituyen una de las armas inmunológicas más eficaces para el tratamiento de los tumores por su reconocimiento selectivo de un determinado antígeno, que provoca un daño mínimo al tejido colateral sano cercano al tumor. Además de aplicarse solos, se han podido combinar con radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia, lo que ha incrementado sus propiedades terapéuticas (Harries y cols, 2000; Baselga y cols, 2006).

En la actualidad se continúa en la búsqueda de nuevas moléculas que posibiliten la personalización de la terapia. La obtención de anticuerpos monoclonales generados contra posibles dianas terapéuticas y formulaciones vacunales con resultados alentadores en tumores de diferente localización y origen, ha abierto otras perspectivas para la terapia de los tumores malignos. Por estas razones es necesario continuar evaluando nuevos marcadores o combinaciones de ellos que suministren evidencias para lograr la individualización del tratamiento de las pacientes.

Hipótesis de trabajo

Tomando en consideración lo anteriormente planteado nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

“La evaluación por métodos inmunohistoquímicos de los factores pronósticos y predictivos: receptores de estrógeno, de progesterona y el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 en combinación con el receptor del factor de

crecimiento epidérmico tipo 1 y la expresión de la molécula N glicolil GM3, permiten un acercamiento más preciso a la terapia personalizada en el cáncer de mama.”

Objetivos:

General.

Demostrar el papel de los factores pronósticos y predictivos de respuesta a la terapia oncoespecífica en el tratamiento personalizado del cáncer de mama en Cuba.

Específicos.

1. Determinar la frecuencia del receptor de estrógeno (RE), del receptor de progesterona (RP) y del HER2 en mujeres cubanas con cáncer de mama y compararla con la reportada en la literatura en otras poblaciones.
2. Correlacionar la expresión de los RE, RP y del HER2 con los factores pronósticos morfológicos y generales.
3. Determinar el reconocimiento in vitro del anticuerpo monoclonal ior egf/r3 y compararlo contra el juego de reactivos diagnóstico EGFR pharmDx™ de Dako.
4. Evaluar el patrón de reconocimiento in vitro e in vivo del anticuerpo monoclonal 14F7 en cáncer de mama.

Novedad científica:

Está dada por la potencial aplicación de una nueva terapia personalizada en los tumores mamarios triple negativos que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 (EGFR1) y el gangliósido N- glicolilado GM3 [(NeuGc)GM3], a través de anticuerpos monoclonales humanizados producidos en el Centro de Inmunología Molecular, dirigidos contra estas dos moléculas y/o el uso de preparados vacunales cubanos que utilizan como antígeno el factor de crecimiento epidérmico (ligando del EGFR1) y el gangliósido (NeuGc)GM3.

Por primera vez:

1. Se reporta en Cuba la expresión de los RH y del HER2 en tumores mamarios utilizando técnicas inmunohistoquímicas, en una muestra que incluye mujeres de todo el país.
2. Se presenta la biodistribución del gangliósido (NeuGc)GM3 en tumores de mama humanos que suministra nuevas evidencias de su potencial uso como diana terapéutica.
3. Por último, la expresión del EGFR1 en los tumores mamarios triple negativos, detectada con el anticuerpo monoclonal cubano ior egf/r3, posibilita el diagnóstico del receptor en estos tumores, que son agresivos y con pocas opciones de tratamiento.

Importancia práctica:

Para el cáncer de mama, las estrategias terapéuticas actuales son cada día más personalizadas, y están basadas en la expresión de los marcadores tumorales a nivel tisular. La detección y medición de la expresión de estas moléculas resulta indispensable para el manejo clínico de las pacientes.

Este trabajo permite recomendar el esquema de tratamiento más apropiado para las pacientes portadoras de cáncer mamario, lo que unido al potencial uso de las moléculas generadas en Cuba, le confiere un mayor valor y la posibilidad de que todas nuestras pacientes puedan beneficiarse con estas opciones.

Las pacientes incluidas en el estudio tuvieron la posibilidad de recibir una terapia personalizada, que abarcó desde la selección del esquema de quimioterapia, la hormonoterapia, la inmunoterapia, así como la inclusión en los ensayos clínicos que evalúan los nuevos productos biotecnológicos de producción nacional.

La tesis comprende dos momentos, un estudio observacional descriptivo y un ensayo clínico. El primer momento es un estudio observacional descriptivo de serie de casos, con un nivel analítico transversal y una observación. El segundo momento es un estudio experimental constituido por un ensayo clínico controlado fase I-II.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Este capítulo tiene el propósito de presentar los elementos teóricos fundamentales para tratar el problema planteado en la introducción del trabajo. Está estructurado en 4 epígrafes: el primero aborda la histología de glándula mamaria normal, el segundo brinda información sobre el cáncer de mama, el tercero explica los factores pronósticos y predictivos de respuesta a la terapia y el cuarto trata acerca de los gangliósidos.

1.1. Mama normal.

En los humanos la diferenciación embrionaria de la glándula mamaria es igual en el hombre que en la mujer, pero a diferencia de éste en la glándula mamaria femenina ocurren grandes modificaciones estructurales y funcionales relacionadas estrechamente con el estado hormonal y la fisiología del sistema reproductor, lo que la convierte en un órgano complejo (Bland y Copeland, 2004).

Las variaciones de la estructura histológica de la glándula se producen durante: la pubertad, el ciclo menstrual, el embarazo y la menopausia (Junqueira y Carneiro, 1999; Bland y Copeland, 2004; Moinfar F., 2007).

La mama en la mujer adulta está formada por un conjunto de 15 a 20 glándulas exocrinas túbulo alveolares compuestas que forman los lóbulos y están separadas por tejido conjuntivo denso y tejido adiposo. Estas estructuras tienen individualmente una porción secretora y un conducto excretor o galactóforo, se nombran unidad ducto-lobulillar terminal y constituyen la unidad estructural y funcional de la mama (Junqueira y Carneiro, 1999; Bland y Copeland, 2004).

Cada lóbulo está integrado por los lobulillos, los conductos intralobulillares y el conducto terminal, éste llega al segmentario y finalmente se encuentran en el conducto galactóforo. Las ramificaciones van formando una estructura que se asemeja al árbol bronquial. El conducto galactóforo se dilata a nivel de la areola dando lugar al seno galactóforo donde se almacena la leche, posteriormente se estrecha de nuevo para abrirse en la papila a través de un orificio de 0.5 mm de diámetro (Junqueira y Carneiro, 1999).

El epitelio de los conductos es diferente en cada tramo. Los interlobulares están revestidos por epitelio cilíndrico simple, el cual va disminuyendo de altura paulatinamente hasta convertirse en cúbico simple en los conductos excretores intralobulillares más pequeños. Entre el epitelio y la membrana basal siempre se encuentra una capa de células mioepiteliales (Geneser F., 2000).

Los lóbulos están formados por los lobulillos y éstos están rodeados por tejido conectivo laxo muy celular con capacidad de responder a las hormonas y por tejido adiposo. A su vez los lóbulos están separados por tejido conectivo denso. Es de destacar que los lóbulos no son estructuras bien separadas, presentan cierto entrecruzamiento y están sujetos a la piel suprayacente por gruesas bandas de tejido conectivo que se denominan ligamento suspensorio o de Cooper (Junqueira y Carneiro, 1999; Geneser F., 2000; Moïnfar F., 2007).

Las porciones terminales secretoras de la glándula se componen de alvéolos revestidos por epitelio cúbico o cilíndrico con células mioepiteliales ramificadas ubicadas entre el epitelio glandular y la membrana basal, que se diferencian de las encontradas rodeando

los conductos que están menos ramificadas y se disponen en sentido longitudinal. (Geneser F., 2000; Moïnfar F., 2007).

La mama descrita se corresponde a una mujer en edad fértil, no embarazada ni lactante y se denomina mama en reposo (Geneser F., 2000; Bland y Copeland, 2004). El conocimiento de la estructura de la mama normal nos permite comprender el origen de las lesiones benignas y malignas de la mama, fig1.

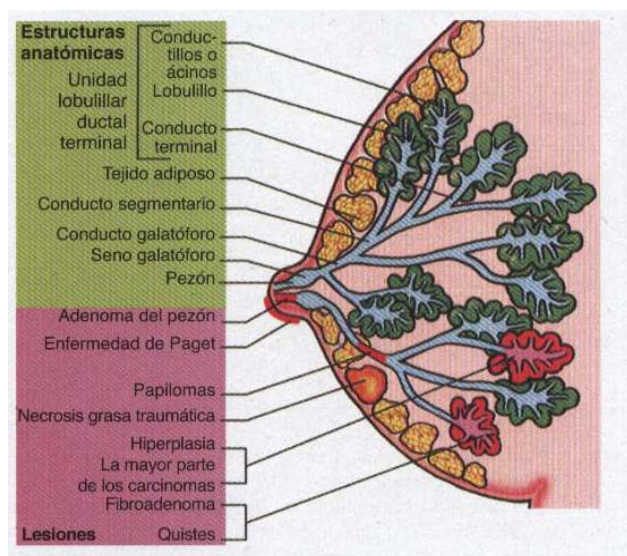


Fig.1 Anatomía de la glándula mamaria vs. Lesiones más frecuentes según su sitio de origen (imagen tomada del Robbins, 1999)

1.2 Cáncer de mama.

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea, que incluye desde neoplasias que responden favorablemente luego del primer tratamiento, hasta tumores de crecimiento rápido, de gran agresividad y resistentes a múltiples modalidades terapéuticas (Tavassoli FA., 2003).

El patrón de incidencia y mortalidad por cáncer en el sexo femenino en Cuba es similar al observado en los países desarrollados. Esta localización tumoral se considera un importante problema de salud en nuestro país (Anuario estadístico de Cuba, 2009).

Los elementos de detección temprana (incluida la detección precoz mediante el pesquisaje en población supuestamente sana principalmente por mamografía), el diagnóstico (especialmente el inmunodiagnóstico) y la tecnología terapéutica utilizada (cirugía, radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia) tienen un efecto importante en el incremento de la supervivencia de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y por tanto, un impacto en la reducción de la mortalidad. Se necesita del análisis renovado de las causas que inciden en su aparición y en su desarrollo, así como de la búsqueda de tecnologías que incrementen la posibilidad del diagnóstico temprano, el estudio de los factores de riesgo y de pronóstico y de la aplicación de terapias más eficaces que permitan la reducción de estos índices en la población (Camacho y cols, 2007).

El desarrollo de la biotecnología a nivel mundial y muy especial en Cuba, nos ha permitido avanzar en la investigación científica, contar con biomoléculas de producción nacional útiles en la experimentación biomédica, en el diagnóstico e incluso en la terapéutica del cáncer (Lage A., 2008, 2009).

Los criterios clínicos, unidos a los medios diagnósticos y a las armas biotecnológicas, juegan un papel importante en el mejoramiento de la calidad de vida del paciente con cáncer y repercuten en los índices de mortalidad por esta enfermedad en nuestro país (Camacho R., 2009; Rodríguez y cols, 2010).

1.2.1 Clasificación histológica de los tumores epiteliales malignos de la mama.

Las características morfológicas y la expresión de los factores pronósticos y predictivos de la respuesta terapéutica en los tumores, evidenció la existencia de diferencias entre tumores con características similares pertenecientes a una misma categoría. El estudio de nuevas moléculas que puedan redefinir estos grupos, ha sido la causa fundamental de la variación de la clasificación de los tumores con una nueva perspectiva.

La clasificación histológica de los tumores mamarios de 1981 se basa en criterios morfológicos e histogenéticos (Rosai J., 1996). Se dividen los tumores en dos categorías fundamentales: carcinoma in situ y carcinoma invasivo, cada uno de los cuales puede ser lobular o ductal. La clasificación del 2003, incluye nuevos subtipos histológicos y se apoya en el estudio inmunohistoquímico (Anexo1) (Ellis y cols, 2003).

La incorporación del perfil de expresión génica del cáncer de mama ha identificado varios subtipos de cáncer mamario por encima de los subtipos de cáncer receptores hormonales positivos y negativos. En esta clasificación molecular los grupos fundamentales son: luminal A y B, el tipo HER2, los basaloides y los inclasificados. Estos tres últimos son esencialmente receptores hormonales negativos. Los subtipos moleculares de cáncer de mama difieren con relación al patrón de expresión génica, características clínicas, el pronóstico y la respuesta al tratamiento (Anexo2) (Schnitt SJ., 2010).

1.2.2 Sistema TNM.

Fue creado por la Agencia Internacional para las Investigaciones en Cáncer (Sobin y Wittekind, 1997). Es el sistema de estadiamiento universalmente empleado que se ha

modificado con el tiempo hasta alcanzar la 7ma edición en el presente año (Sobin y cols, 2010).

El estadiamiento de los pacientes es uno de los procedimientos más importantes para considerar las opciones de tratamiento oncoespecífico. Tiene en cuenta la extensión anatómica del cáncer y se establece a través de la medición de los tres parámetros que definen su nombre. Se asigna la letra T al tamaño del tumor, N al estatus ganglionar y M a las metástasis a distancia. (Sobin y Wittekind, 2002) (Anexo 3).

1.3 Factores Pronósticos.

Los factores pronósticos se han definido como variables que pueden explicar la heterogeneidad asociada al curso y al desarrollo de una determinada enfermedad y a través de su análisis nos permiten predecir el comportamiento futuro de la misma (Arihiro K., 2004).

El cáncer es un evento multidimensional, que incluye el curso, patrón, progresión, duración y final de la enfermedad, donde el pronóstico juega un papel fundamental en las decisiones médicas y en el manejo de la enfermedad a través del análisis de las características individuales del paciente y del tumor (Kurebayashi, y cols, 2007).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, caracterizada por una gran variedad de presentaciones clínicas, tipos histológicos y tasas de crecimiento tumoral. Cualquier tipo de tratamiento empleado también podría tener un efecto diferente de una paciente a otra, en consecuencia el pronóstico individual necesitará del análisis de un amplio

número de factores relacionados con el paciente, con el tumor y hasta con el medioambiente. (Gospodarowicz y cols, 2001).

1.3.1 Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama aceptados en la actualidad (Goldhirch y cols, 2009).

Se reconoce como factor pronóstico a cualquier parámetro conocido en el diagnóstico o después de la cirugía que en ausencia de tratamiento permita predecir el comportamiento futuro de la enfermedad. Factor predictivo es cualquier valor asociado al grado de respuesta al tratamiento específico (Allred DC., 2010, Domínguez y cols, 2001). Se han agrupado en factores inherentes al tumor, biomarcadores y factores relacionados con el paciente.

A. Relacionados con el tumor.

➤ Ganglios axilares metastásicos.

Es el factor pronóstico más importante para las pacientes, se asocia a un mayor riesgo de recidiva local, de diseminación sistémica y a una menor supervivencia (Michaelson y cols, 2003).

La presencia y número de ganglios positivos es un factor pronóstico de importancia. Se consideran 3 grupos entre las pacientes con ganglios axilares metastásicos: 1-3, 4-9 y con 10 y más. A medida que aumenta el número de ganglios metastásicos, el pronóstico es sustancialmente peor y disminuye el intervalo libre de eventos y la supervivencia global (Michaelson y cols, 2003; Arihiro K., 2004).

Las neoplasias de mama especialmente agresivas, se presentan con mayor frecuencia en pacientes con más de 4 ganglios axilares metastásicos y exhiben un mayor número de alteraciones genéticas (Arihiro K., 2004).

La clasificación TNM del 2002 considera que las células tumorales aisladas o pequeños grupos de células no mayores de 0.2 mm se detectan generalmente por IHQ o por métodos moleculares, pero tienen que ser verificadas por hematoxilina eosina (Sobin y Wittekind, 2002), ver anexo 3. En la 7ma edición del 2010, se incluye un criterio adicional para las células tumorales aisladas, que considera que un grupo menor de 200 células en un corte histológico, no es una evidencia de actividad metastásica y que la categoría N continua como pN0 (Sobin y Wittekind, 2010).

➤ **Tamaño tumoral.**

Se considera el segundo factor pronóstico más importante tanto para las pacientes con ganglios axilares positivos como negativos, aunque para estas últimas constituye el factor pronóstico más potente, donde un mayor tamaño tumoral indica una mayor probabilidad de recidiva y menor supervivencia libre de eventos (Rosen PP., 2001; Michaelson y cols, 2002).

La medición precisa del tamaño del tumor permite estadiar y estratificar las pacientes con fines terapéuticos. Las pacientes con el mismo estadio patológico pueden diferir en el pronóstico por el estatus de otros factores como el grado y el subtipo histológico entre otros (Thor y cols, 2001; Michaelson y cols, 2002).

➤ **Grado histológico (GH).**

Constituye un factor pronóstico importante e independiente. Permite estratificar las pacientes en diferentes subgrupos de riesgo de recidiva (Tsuda y cols, 2000; Meyer y cols, 2005). Es un factor más importante que la clasificación histológica y ayuda a explicar el pronóstico favorable en la mayoría de los subtipos histológicos especiales de cáncer de mama (Moinfar F., 2007).

El sistema más recomendado para calcular el grado histológico es el Elston- Ellis (Elston y Ellis, 1991), que es una modificación del Scarff- Bloom- Richardson, que combina la cantidad de túbulos en formación, el pleomorfismo nuclear y la actividad mitótica. Clasifica los tumores en grados I, II y III, en estrecha correlación con la diferenciación tumoral (Ellis y cols, 2003).

➤ **Subtipo histológico.**

Resulta muy importante la aplicación estricta de los criterios diagnósticos necesarios para establecer correctamente este factor pronóstico (Page DL., 2003). En la clasificación del 1981 los carcinomas de la mama pueden ser divididos en dos categorías generales: in situ e invasivos. Ambos pueden ser ductales o lobulares.

Los carcinomas ductales invasivos (CDI) comprenden alrededor del 70-80% de los cánceres de mama y usualmente no están subclasificados, para éstos, el tamaño del tumor y el grado histológico son las variables patológicas más importantes. (Moinfar F., 2007). Los carcinomas lobulares invasivos (CLI) alcanzan hasta un 10% de los cánceres de mama. Son tumores con tendencia a la bilateralidad y a la multicentricidad y tienen un patrón distintivo de metástasis a distancia (Page DL., 2003; Arpino y cols 2004). Se

subclasifican en: clásicos, pleomórficos, alveolares y sólidos. De ellos, sólo la variante clásica tiene un mejor pronóstico que el CDI (sin otra especificación, NOS) con el que se correlaciona por sus similitudes en cuanto a pronóstico, comportamiento biológico y tratamiento. Frecuentemente se presentan ambos subtipos histológicos en un mismo tumor (Arpino y cols 2004).

Los subtipos especiales en su forma pura, constituyen hasta aproximadamente el 22% de los carcinomas ductales invasivos y se subclasifican en mucinosos, medulares, tubulares y papilares (Ellis y cols, 2003). Se asocian con un pronóstico más favorable cuando se comparan con los CDI NOS. En general tienen una baja frecuencia de metastización a los ganglios linfáticos y una alta supervivencia libre de eventos (Page DL., 2003).

La nueva clasificación histológica de los tumores incorpora a la morfología y a la histogénesis una nueva categoría: la histoquímica e inmunohistoquímica (Ellis y cols, 2003).

➤ **Receptores hormonales (RH).**

La determinación de la expresión de los receptores de estrógeno (RE) y de los receptores de progesterona (RP), constituyen procedimientos establecidos en el manejo estándar de las pacientes con cáncer de mama desde la década del 70 y se consideran parte esencial de la evaluación de los nuevos tumores que se diagnostican (Mohsin y cols, 2004; Allred DC, 2010). Su expresión tisular se utiliza fundamentalmente para la selección de la terapia hormonal y de los esquemas de quimioterapia a emplear. (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, 2005).

Durante los primeros 20-25 años la medición de los RH se hizo por técnicas bioquímicas (Pascual y cols, 1982; Allred DC., 2010). El empleo de estas determinaciones en numerosos ensayos clínicos, evidenciaron más que el valor pronóstico, el valor predictivo de respuesta a las terapias hormonales del RE. (Elledge y Allred, 2004; Buzdar y cols, 2004; Howell y cols, 2005; Dowsett y cols, 2005).

Con el desarrollo alcanzado a través de la tecnología de generación de anticuerpos monoclonales, se aumentó la sensibilidad y la especificidad de la técnica inmunohistoquímica (IHQ). Se aprobó su empleo en la evaluación y caracterización de los tumores malignos de mama, colon y recto por el Colegio Americano de Patólogos (CAP) y posteriormente por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) (Fitzgibbons y cols, 2000; Bast y cols, 2001).

En nuestros días el RP se ha redefinido como un marcador predictivo de la actividad del RE, de los factores de crecimiento y además como un marcador indispensable para realizar la indicación de hormonoterapia en las pacientes con cáncer de mama (Konecny y cols, 2003; Pozzone y cols, 2006). Al compararlo con el RE, los estudios que incluyen este receptor son menores, ya que durante un largo período de tiempo se dejó de incluir en el panel de anticuerpos de uso estándar empleados como predictores de respuesta a al terapia hormonal (Moshin y cols, 2004; Viale y cols, 2007; Viale y cols 2008).

La expresión de estos receptores está altamente correlacionada, y resulta en 4 posibles fenotipos, RE+ RP+, RE+ RP-, RE- RP+, RE- RP-, con diferentes respuestas a la hormonoterapia (Bardou y cols, 2003; Cui y cols, 2005).

Se han reportado variaciones en la expresión de los RH dadas por problemas en la fijación de los tumores, el uso de diferentes anticuerpos primarios, de distintos sistemas de detección, disímiles métodos para el desenmascaramiento antigénico y por la variabilidad entre los observadores (Bloom K., 2006; Gown MA., 2008). Incluso los diferentes puntos de corte empleados para definir la positividad de los receptores, han conllevado la confección de nuevas guías por la ASCO y el CAP, aprobándose un nuevo punto de corte para los receptores hormonales donde se establece que un resultado positivo sería un número de células tumorales inmuno marcadas $\geq 1\%$ (Hammond y cols, 2010).

➤ **Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2)**

Es una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa, codificada por un proto-oncogen localizado en el cromosoma 17 (Ross y cols, 2004).

El HER2 forma complejos con el EGFR1, el EGFR3, y el EGFR4 que actúan como receptores para algunos ligandos: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa, la anfiregulina, la heteroregulina, entre otros (ABD El-Rehim y cols, 2004). Su unión al receptor del factor de crecimiento epidérmico desencadena las vías de señalización que activan los procesos de proliferación y diferenciación celular en los tumores (Rueckert y cols, 2005).

Muchos estudios han demostrado que el HER2 se encuentra sobre-expresado en el 20 al 30% de los cánceres de mama (Slamon y cols, 1989; Taucher S y cols, 2003; Jackisch Ch., 2006). Está mayormente asociado con: pacientes jóvenes con tumores negativos al receptor de estrógeno, alto grado histológico y nuclear, alto índice de proliferación

celular, aneuploidía, presencia de ganglios axilares metastáticos, respuesta reducida a la terapia hormonal y a la quimioterapia convencional, menor supervivencia libre de eventos y baja supervivencia global, por lo que se considera un factor de mal pronóstico (Konecny y cols, 2003; Prati y cols, 2005; Huang y cols, 2005).

En el cáncer de mama el HER2 más que por ser un factor pronóstico, se destaca por su valor como factor predictivo de respuesta a la inmunoterapia al emplear el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab (Mortobagyi GN., 2001; Yu D., 2001; Seidman y cols, 2001; Petit y cols, 2001; Ligibel y cols, 2002). También clasifica como predictor de respuesta a la hormonoterapia, especialmente a la disminución de la respuesta al tamoxifen y mejor respuesta a los esquemas terapéuticos que incluyan antraciclinas (Arora y Scholar, 2005).

Un aspecto importante lo constituye la determinación de la expresión de HER2 en tejido. Las técnicas empleadas son la inmunohistoquímica y la hibridación in situ. Esta última puede ser fluorescente o cromogénica. La inmunohistoquímica se utiliza para la localización tisular de la glicoproteína gp185 y la hibridación in situ para determinar el estatus de amplificación del gen. Cuando ambas técnicas se realizan apropiadamente se observa fuerte correlación entre ellas, que puede ser equivalente o complementaria en su utilidad clínica (Press y cols, 2002; Yaziji y cols, 2004; Wolf y cols, 2007).

El grupo discordante entre ambas técnicas lo constituyen los tumores que por IHQ muestran niveles de expresión de HER2 igual a 2+, los cuales pueden o no presentar amplificación génica cuando son evaluados por hibridación in situ fluorescente (FISH). En este grupo la aplicación de este último método es un procedimiento obligatorio para

decidir el empleo de inmunoterapia con el trastuzumab (Rueckert y cols, 2005; Baselga y cols, 2006).

En el consenso de St. Gallen del 2009 se adicionó al valor predictivo de respuesta al trastuzumab, el papel del HER2 como factor pronóstico (Goldhirsch y cols, 2009).

B. Factores pronósticos relacionados con el paciente

➤ Edad

Es catalogado como un factor de mal pronóstico, aunque su valor está enmascarado por otros como son: la frecuencia del pesquiasaje, el estatus menopáusico, y los diferentes esquemas de tratamiento empleados (Brenner y Hakulinen, 2004; Yoshimoto y cols, 2004; Soerjomataram y cols, 2008).

Existen reportes que reflejan una menor supervivencia global para las pacientes menores de 35 años al compararlas con el grupo de mujeres mayores de 75 años, independientemente del estadio tumoral, del estatus de los receptores hormonales y del tipo de tratamiento empleado (Kroman y cols, 2000). Sin embargo, el tratamiento adyuvante disminuye el valor pronóstico negativo de la edad temprana y lo aumenta en las mujeres de mayor edad que presentan enfermedades concomitantes y reciben tratamientos adyuvantes menos agresivos (Louwman y cols, 2005). A pesar de estos resultados, aún no está claro el efecto de este factor en el pronóstico de las pacientes en los grupos de mayor edad. Las contradicciones al parecer se deben fundamentalmente a las diferencias en el tratamiento oncoespecífico empleado (Louwman y cols, 2005).

➤ Herencia

Se conoce que las mujeres con historia familiar de cáncer de mama, tienen un alto riesgo de padecerlo. Desde 1994, una parte del riesgo de enfermarse se le puede atribuir a la susceptibilidad a los genes BRCA1 (BReast CAncer) y BRCA2 (Miki y cols, 1994). Las mutaciones en ambos genes ocurren en aproximadamente en el 5 al 10 % de todos los cánceres de mama y el riesgo estimado reportado para las mujeres de padecer cáncer de mama, constituye el 56% (Peshkin y cols, 2000).

Al compararlo con el cáncer de mama esporádico, el hereditario por lo general tiene peores factores pronósticos tales como: edades tempranas, alto grado histológico, ausencia de receptores hormonales, aneuploidía y alta expresión de marcadores de proliferación. Paradójicamente existen estudios que muestran supervivencia similar entre pacientes con cáncer esporádico y aquellas que presentan mutaciones en los genes BCRA 1 y 2 (Eerola y cols, 2001).

En Cuba se realizó el primer reporte sobre la prevalencia de los genes BRCA1 y BRCA2 en el año 2008. Se estudiaron 307 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y se identificaron ocho mutaciones, siete de BRCA2 y una en BRCA1 que representaron el 2.6% del total, donde se incluía un 10% de cáncer de mama familiar y un 10% de mujeres jóvenes menores de 40 años. Al no encontrar mutaciones poco comunes no fue necesario realizar un tamizaje en la población (Rodríguez y cols, 2008).

Aún después de transcurridos más de 10 años de estudio con estas moléculas, no está claro su papel como indicador pronóstico. Se consideran estos hallazgos precursores de

los estudios de biología molecular para la clasificación histológica de los tumores mamarios (Robson y cols, 2004).

La misión de los factores pronósticos es estratificar los pacientes de la manera más exacta acorde al riesgo. La de los factores predictivos es lograr la mejor predicción de susceptibilidad a los agentes terapéuticos y la de las dianas diagnósticas identificar los blancos potenciales para el tratamiento.

➤ **Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 (EGFR1)**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 se encuentra en la membrana de las células epiteliales mamarias, su función es modular la proliferación celular. Está relacionado con el factor de crecimiento transformante alfa y estrechamente ligado con el HER2. Su sobreexpresión ocurre en algunos tumores mamarios y se asocia con los de crecimiento rápido, con ausencia de receptor de estrógeno y poca respuesta al tamoxifen (Albanell y Ross, 2005; Tsutsui y cols, 2002).

Para el cáncer de mama la significación pronóstica del EGFR1 aún se encuentra en investigación (Dowsett y cols, 2006). Su expresión se ha asociado con tumores RE negativos (Colleoni y cols, 2007; Pintens y cols, 2009) y en un alto por ciento a .los tumores que no expresan los tres marcadores de uso estándar, conocidos como triple negativos (Rakha y cols, 2008; Altundag y cols, 2007).

1.4 Gangliósidos.

1.4.1 Estructura y localización.

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se sintetizan en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi (Huwiler y cols., 2000). Se caracterizan por presentar

residuos de ácido siálico en su estructura y se encuentran formando parte de la membrana plasmática de las células de los mamíferos y de la mayoría de los vertebrados (Fishman y Brady, 1976).

Los gangliósidos difieren entre sí, principalmente en el número y tipo de los monosacáridos y sobre todo, en el número y tipo de ácido siálico. Resultan moléculas esenciales en el mantenimiento de la homeostasia de las funciones biológicas. (Takamizawa y cols., 1986). Algunos pueden inhibir o aumentar la expresión de receptores para hormonas y factores de crecimiento (Hakomori S., 1990).

Durante el ciclo celular se producen notables cambios en la composición de los gangliósidos, lo que también ocurre en otros procesos tales como: la diferenciación celular, la transformación oncogénica y la regresión de tumores, lo cual evidencia la acción regulatoria de estas moléculas sobre las funciones asociadas al crecimiento celular (Hakomori y Kanagi, 1986). Se ha demostrado, además, que favorecen la angiogénesis de los tumores en respuesta a la hipoxia (Yin J., 2006) y que la expresión de gangliósidos como el GM3 protege a las células tumorales de sufrir apoptosis (Kniep B., 2006).

En el hombre los gangliósidos están particularmente representados en el cerebro y en otros tipos celulares derivados de la cresta neural. En los tumores se encuentran especialmente en melanoma, astrocitoma, sarcomas, neuroblastomas, aunque también se han encontrado en: cáncer de pulmón de células pequeñas, tumores de ovario, riñón y mama (Sariola y cols., 1998; Marquina y cols, 1996).

1.4.2 Gangliósidos como antígenos tumorales.

Los cambios cualitativos que sufren los gangliósidos en el desarrollo de los tumores son de gran importancia para la terapia con anticuerpos, pues crean nuevos epitopos que pueden ser reconocidos por ellos. Se ha detectado en tumores la expresión de gangliósidos que no aparecen o se hallan pobremente representados en los progenitores de las células tumorales y en otros tejidos normales (Tsuchida y cols., 1987).

Algunos gangliósidos se ajustan a la definición de antígenos tumor específicos. Los N-glicolilados constituyen antígenos Hanganutziu-Deicher, y fueron descritos inicialmente por la aglutinación de eritrocitos exógenos con anticuerpos heterófilos, presentes en el suero de pacientes tratados con antisueros anti-toxinas obtenidos en caballo (Hakomori y Kannagi, 1986).

Las variantes N-glicoliladas del ácido siálico se expresan en los tejidos normales de la mayoría de los mamíferos, pero son muy difíciles de detectar en los tejidos normales de humanos y de pollos (Kawachi y cols., 1988; Watarai, 1995). El ácido N-glicolil neuramínico (NeuGc) no se expresa naturalmente en humanos debido a la inactivación del gen para la hidroxilasa CMP-Neu5Ac, enzima responsable de la biosíntesis del (NeuGc). (Chou y cols., 1998; Irie y Suzuki, 1998; Olson y Varki, 2003). Se demostró la presencia de pequeñas cantidades de esta variante de ácido siálico en algunos tejidos normales humanos, que según algunos tienen su origen en fuentes exógenas, tales como alimentos procedentes de mamíferos (Tangvoranuntakul y cols, 2003).

Aunque se han observado pequeñas cantidades de NeuGc en tejidos normales, existe un patrón diferencial de expresión de los mismos en los tejidos malignos humanos. Su

presencia ha sido detectada en melanoma, retinoblastoma y otros tumores humanos, mediante sueros anti-Hanganutziu-Deicher obtenidos en pollos, en tumores de células germinales y en cáncer de colon (Watarai y cols., 1995).

A partir de 1995, se realizaron los primeros reportes que mostraban la presencia en los tejidos tumorales mamarios, de cantidades significativamente mayores de gangliósidos que en los tejidos y el suero de los controles normales. (Wiesner y Sweeley, 1995). En 1996 se reportó en carcinomas ductales invasivos mamarios la expresión de gangliósidos inusuales tales como, ácido O-Acetil-N-Acetilneuramínico y ácido N-Glicolilneuramínico (Marquina y cols, 1996).

1.4.3 Función N-glicolilada.

Los ácidos N-acetilneuramínico (NeuAc) y N-glicolil neuramínico, son los más comunes. Los N-acetilados se expresan en los tejidos normales humanos, sin embargo, los N-glicolilados presentes en la mayoría de las especies, no lo están en el pollo ni en el hombre (Hebermam RB., 1992; Watarai y cols., 1995; Tsuchida T., 1987), en el que sólo se expresan gangliósidos N-acetilados (Kawashi y cols., 1988).

Existen evidencias de los gangliósidos N-glicolilados, como antígenos asociados a cánceres humanos, tales como, melanoma, retinoblastoma, cáncer de mama y colon (Watarai y cols., 1995 y Marquina y cols., 1996).

1.4.4 Anticuerpos contra gangliósidos.

Se han generado numerosos anticuerpos monoclonales (AcMs) contra antígenos del tipo gangliósidos de gran utilidad, tanto para el estudio de su localización tisular, de sus

funciones propias (Osawa y cols., 1992), así como para el diagnóstico y la terapia del cáncer (Kawashima y cols., 1993; Minasian y cols, 1995; Zhang y cols, 1998).

El Centro de Inmunología Molecular, ha trabajado en esta dirección y en la actualidad cuenta con un número de AcMs contra gangliósidos con diferentes especificidades, los cuales han proporcionado resultados muy prometedores en Oncología, especialmente para cáncer de mama y pulmón (Vázquez y cols, 1998, Carr y cols., 2000, 2002, 2003).

1.4.4.1 Anticuerpo monoclonal 14F7.

En el Centro antes mencionado se obtuvo el primer anticuerpo monoclonal (AcM) murino de isotipo IgG, que reconoce al gangliósido (NeuGc)GM3 y no reacciona con otros gangliósidos N-acetilados o N-glicolilados, ni con los glicolípidos sulfatados (Carr y cols, 2000).

Estudios inmunohistoquímicos realizados en tumores frescos mostraron un reconocimiento intenso del AcM 14F7 en melanoma y en tumores mamarios (Carr y cols., 2000). La especificidad de este AcM por su antígeno, lo ha convertido en candidato muy atractivo para ser usado en la inmunoterapia de estos tumores (Carr y cols., 2002 y 2003).

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se presentan los elementos metodológicos utilizados para dar respuesta a las interrogantes e hipótesis que aparecen en la introducción.

Este contiene la clasificación del estudio realizado; la operacionalización de cada una de las variables empleadas; los procedimientos utilizados para la realización de las tareas de investigación y los aspectos éticos considerados.

2.1 Muestra de tumores.

Se estudiaron 1 509 tumores malignos mamarios, a través de fragmentos de tejidos fijados en formol al 10% y embebidos en parafina, procedentes de los departamentos de Anatomía Patológica de 22 centros hospitalarios ubicados en 11 de las 14 provincias del país, diagnosticados entre los años 2000 al 2006. Tabla1.

2.1.1. Datos de la muestra.

Se definieron las condiciones para la aceptación/recepción de cada tumor. Conciliándose el envío de un bloque de tejido que incluyera un fragmento tumoral representativo del diagnóstico anatómo patológico emitido, conjuntamente con la lámina coloreada con hematoxilina – eosina para su revisión por al menos un patólogo experimentado y una ficha de datos (Anexo 4), que recogía la información clínico-patológica de la paciente y del tumor.

De las pacientes que presentaban estadios avanzados no operables al momento del diagnóstico, se recibieron los datos del tumor a los cuales se pudo tener acceso mediante la técnica de biopsia con aguja gruesa.

Cuando la información solicitada no estaba completa, se introdujo el caso al estudio y se reportó el dato como faltante. Lo que provocó variación del tamaño de la muestra en cada uno de los factores pronósticos examinados.

Tabla1. Procedencia de los tumores mamarios.

Provincias	Centros Hospitalarios	no. de casos aportados
Pinar de Río	Unidad Oncológica	35
Ciudad Habana	Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología	1000
	Hospital Manuel Fajardo	6
	Hospital Calixto García	12
	Hospital Ramón González Coro	7
	Hospital Luís Díaz Soto	2
	Hospital Julio Trigo	1
	Hospital Carlos J Finlay	3
	Hospital Salvador Allende	1
	Hospital Clínico Quirúrgico Miguel Enriquez	6
	Hospital Joaquín Albarrán	1
	Centro de Investigaciones Medico Quirúrgicas	1
Matanzas	Unidad Oncológica Provincial	125
Villa Clara	Hospital Celestino Hernández Robau	239
Ciego de Ávila	Hospital Antonio Luaces Iraola	18
Camagüey	Hospital María Curie	4
Santi Espíritus	Hospital Camilo Cienfuegos	1
Granma	Hospital Carlos Manuel de Céspedes	17
Holguín	Hospital Vladimir Ilich Lenin	18
Las Tunas	Hospital Ernesto Che Guevara	4
Isla de la Juventud	Hospital Héroes de Baire	1

2.2 Factores pronósticos.

Se analizaron los siguientes:

2.2.1 Edad.

Para RE y RP se estratificó en ≤ 50 y > 50 por ser esta la edad cercana a la menopausia en la mujer cubana. Para el HER2 el punto de corte ~~fu~~ ≤ 40 y > 40 ya que incluía mujeres más jóvenes en ambos grupos.

2.2.2 Subtipo histológico

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (Ellis y cols, 2003). (Anexo 1).

2.2.3 Grado histológico (GH) y grado nuclear (GN):

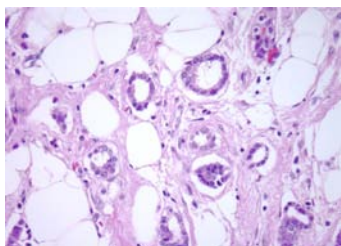
Para establecer el GH se empleó el método de Elston– Ellis (Elston y Ellis, 1991) basado en: presencia de formaciones tubulares celulares, pleomorfismo de los núcleos, frecuencia de las figuras mitóticas hipercromáticas e irregulares.

El sistema de gradación define tres categorías:

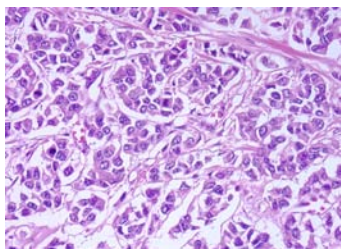
- Tumores de grado I (bien diferenciados), presentan células de apariencia relativamente normal, con bajo índice de proliferación y un comportamiento menos agresivo.
- Tumores de grado II (moderadamente diferenciados) tienen características intermedias entre los grados I y III.
- Tumores de grado III (indiferenciados), con alto índice de proliferación y un comportamiento más agresivo.

El grado nuclear se determinó por el método de Black (Black y Speer, 1957) que evalúa el tamaño y la forma del núcleo, el modelo de la cromatina y el índice mitótico, ver fig.2.

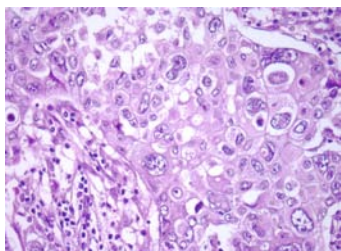
Fig. 2. Patrones histológicos con el grado nuclear según Black y Speer.



Grado nuclear I. Núcleo pequeño, regular con cromatina dispersa y nucléolo ocasional.



Grado nuclear II. Núcleos con características intermedias entre el GN I y el GN III,



Grado nuclear III. Núcleos grandes e irregulares, con cromatina gruesa y nucléolos prominentes.

2.2.4 Dimensión mayor del tumor (dm).

Se identificaron tres grupos con tumores de diferente tamaño: $\leq 20\text{mm}$, entre 21- 49mm y $\geq 50\text{mm}$.

2.2.5 Ganglios axilares metastásicos.

Se establecieron 4 grupos: sin ganglios metastásicos (N0), con 1-3, 4-9 y ≥ 10 .

2.2.6 Estadio clínico.

Se aplicó el sistema TNM (Sobin y Wittekind, 2002). (Anexo 3).

2.3 Inmunohistoquímica.

2.3.1 Láminas portaobjetos.

Se utilizan láminas portaobjetos recubiertas con poli-L-lisina (Menzel GmbH and Co., Braunschweig, Alemania) que aseguran la óptima adhesión del tejido a la lámina.

2.3.2 Cortes de Tejidos.

A partir de los bloques recibidos, se realizaron cortes seriados de tejidos de 4 μm de espesor usando un micrótopo vertical L2530 (Leica, Alemania). Se ubicaron 2 cortes en cada lámina portaobjetos.

2.3.3 AcMs.

Se emplean los AcMs: RE y RP (clones SP1 y SP2, Anacrom Diagnósticos, S.L., España) prediluidos, HER2 (Ac policlonal anti-humano en conejo, juego de reactivos diagnósticos HerceptestTM, Dako, Dinamarca) prediluido, 14F7 (NeuGc)GM3, CIMAB, SA., Cuba) 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ior egf/r3 (AcM murino anti EGFR tipo 1, CIMAB, SA., Cuba) sobrenadante de cultivo y el EGFR (clon 2-18C9 AcM murino anti-EGFR humano, juego de reactivos diagnóstico EGFR pharmDxTM, Dako, Dinamarca).

2.3.4 Desenmascaramiento antigénico.

Se utilizó calor y digestión enzimática. Los tejidos a emplear para la determinación de RE, RP, HER2 y del (NeuGc)GM3, se sumergieron en una solución de citrato de sodio pH 6 y se expusieron al calor en un baño termostataado (Fisher Scientific, EUA) a un rango de temperatura entre 95-100°C durante 30 min, exceptuando al HER2, que se mantuvo durante 40 min. Para detectar el receptor del EGFR1, se reanimó aplicando la enzima proteolítica, proteinasa K (incluida en el juego de reactivos diagnóstico EGFR pharmDx™, Dako) por 5 min en el interior de una cámara húmeda a temperatura ambiente (TA).

2.3.5 Sistemas de detección.

La localización tisular de los RH y del (NeuGc)GM3, se realizó utilizando un sistema ultrasensible, multiespecífico (MLINK, Anacrom Diagnósticos, S.L, España), que incluye un Ac secundario marcado con biotina y un complejo de estreptavidina marcada con peroxidasa (Px).

Para el HER2 utilizamos el Hercep Test™ (Dako, Dinamarca), que contiene un sistema de detección basado en anticuerpos (Acs) anti-conejo marcados con Px unidos a un polímero de dextrán, como agente de visualización.

Los AcMs ior egf/r3 y EGFR1 se trabajaron con el paquete de reactivos diagnóstico EGFR pharmDx™ similar al Hercep Test™, que posee como visualizador un polímero de dextrán unido a anticuerpos anti ratón conjugados con moléculas de Px, el cual elimina la necesidad de la aplicación del Ac secundario y disminuye la manipulación del tejido.

2.3.6 Controles

2.3.6.1 Controles Positivos

Para los AcMs anti- RE, RP, ior egf/r3 y el 14F7 se usaron tejidos mamarios con expresión conocida a los respectivos antígenos. Para el HER2 y el EGFR1, se utilizó en un inicio la lámina suministrada en el paquete de reactivos diagnóstico. En el Hercep TestTM esta lámina contiene tres botones de líneas celulares de cultivo incluidas en parafina, MDA-MB 231, MDA-MB 175 y SK-BR-3, que expresan el marcador tumoral en diferente grado: 0, 1+ y 3+ respectivamente. La lámina control positivo del EGFR1 pharmDxTM incluye dos líneas de cultivo de cáncer de mama con diferente expresión del receptor del EGF, CAMA-1 y HT-29 con 0 y 2+ respectivamente. Posteriormente para ambos marcadores se añadieron como controles alternativos tumores mamarios positivos seleccionados de los anteriormente evaluados.

2.3.6.2 Controles Negativos.

Se empleó solución salina tamponada con fosfato (SSTF) o un AcM no relacionado.

2.3.7 Descripción general de la técnica inmunohistoquímica.

1. Los cortes de tejidos se desparafinaron 1hr en estufa de 60°C, 3 pases de xilol por 10 minutos (min) cada uno.
2. Se hidratan con 4 pases por alcohol a concentraciones decrecientes (absoluto, 100%, 95% y 90%) finalizando en agua bidestilada durante 5 min en cada uno.
3. Lavar con SSTF pH 7.6, 2 veces durante 5 min.
4. Desenmascaramiento antigénico. (ver acápite 2.3.4)
5. Se dejan enfriar los tejidos 20 min.
6. Lavado con SSTF pH 7.6, 2 veces durante 5 min.

7. Se inhibe la Px endógena con peróxido de hidrógeno (de 30 volúmenes) al 3% en metanol absoluto durante 5 min.
 8. Se lavan los cortes con SSTF, 2 cambios en 5 min.
 9. Se aplica el AcM a la dilución de trabajo durante 30 min.
 10. Se lava con SSTF, 3 cambios en 10 min.
 11. Se aplica el Ac secundario biotinilado 10 min.
 12. Se lava igual que en el paso 10.
 13. Se aplica la estreptavidina- Px durante 10 min.
 14. Se lava igual que en el paso 10.
 15. Se revela la reacción con 3-3 diaminobencidina (DAB) hasta 10 min.
 16. Se lava en agua corriente.
 17. Se contrasta con hematoxilina de Mayer hasta 20 segundos.
 18. Se lava bien en agua corriente hasta azulear.
 19. Los tejidos se deshidratan en alcoholes a concentraciones ascendentes (90%, 95%, 100% y absoluto) durante 5 min y se clarifican 3 veces en xilol por igual tiempo.
 20. Las láminas se montan con un medio permanente, Eukitt (Kinder GmbH & CO).
- Toda la técnica se realiza a TA y en cámara húmeda.

2.3.8 Especificidades de la técnica según el Ac empleado.

2.3.8.1 HER2.

Al utilizarse el HercepTest™, después del paso 10 se pasa al 13, que en este caso es el polímero de dextrán, durante un tiempo de 30 min. El resto continúa igual a lo descrito.

2.3.8.2 EGFR1 y el ior egf/r3.

Se utiliza el EGFR pharmDx™. Se sustituye el paso 3 por post fijación con formalina neutra 10 min, seguida de 2 pases por agua destilada o desionizada, los pasos del 4 al 9 no se realizan, se continúa con el paso 10 y de éste se pasa al 13, que al igual que para el HER2 se corresponde con el polímero de dextrán 30 min. El resto de la técnica se realiza según lo descrito.

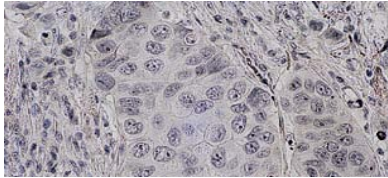
2.4 Expresión tisular de los RH, de los EGFR tipo 1 y 2 y del (NeuGc)GM3.

Los RH y los EGFR tipo 1 y 2, tienen una localización diferente a nivel celular.

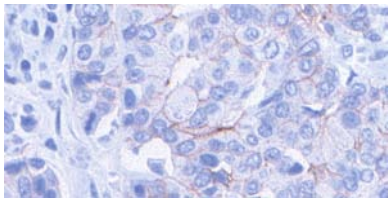
Los RH son proteínas nucleares. Para la evaluación de los tejidos se combinó la intensidad de la reacción con el número de células marcadas. Se definió la positividad con intensidad débil a moderada y número de núcleos marcados $\geq 10\%$ (Harvey y cols, 1999). Siempre se reflejó en el informe el por ciento de células inmunoteñidas, aunque se encontraran por debajo del punto de corte.

Los EGFR son glicoproteínas de membrana. Para el HER2 se cuenta con un sistema establecido para analizar su expresión, el cual establece valores que van desde 0, 1+, 2+ y 3+ que se relacionan con la continuidad e intensidad con que se colorea la membrana citoplasmática de las células, lo que ha proporcionado 4 niveles o señales (Guía para el usuario. Hercep Test™, Dako), que se describen en la fig.3.

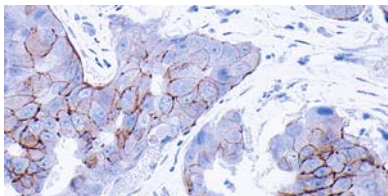
Fig 3. Patrones histológicos donde se muestran los diferentes niveles de expresión del HER2 en membrana.



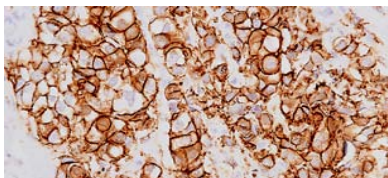
0 No se observa marcaje en la membrana citoplasmática de las células tumorales.



1+ Se observa marcaje débil e interrumpido de la membrana citoplasmática celular, en más del 10% de las células tumorales.



2+ Se observa marcaje débil a moderado y continuo de la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.



3+ Marcaje intenso y continuo de la membrana citoplasmática en más del 10% de las células tumorales.

Se consideran negativos los tumores cuya expresión corresponda con las señales 0 y 1+ y positivos aquellos que hayan sido clasificados como 2+ y 3+. Dentro de este último grupo los tumores 2+ son definidos como discordantes y con sobreexpresión solamente los 3+.

La expresión del EGFR1 a nivel tisular se evalúa similar al HER2, según la intensidad del marcaje y su continuidad en la membrana celular. Se describen como: 0 la ausencia de marcaje, 1+ coloración débil y discontinua de la membrana, 2+ moderada y 3+

intensa ambos con una definición completa de la membrana celular. A diferencia del anti-HER2, se consideran positivos todos los niveles de expresión desde 1+ hasta 3+. El criterio de positividad empleado fue el recomendado en la guía para el usuario EGFR pharmDx™ Dako, un número de células marcadas > 0.

La expresión de este antígeno se evaluó en los tumores negativos para los RH y el HER2 y en un grupo pequeño de tumores con diferentes combinaciones de estos marcadores.

El (NeuGc)GM3, es un glicolípido con expresión en membrana citoplasmática, para su evaluación empleamos el AcM 14F7 tipo IgG1. Consideramos la intensidad del marcaje: 1+ débil, 2+ moderada y 3+ intensa y el porcentaje de células neoplásicas reconocidas se evaluó igual que para el EGFR1, número de células inmunomarcadas >0.

2.5 Hibridación in situ Fluorescente.

Se empleó el HER2 FISH pharm™ (Dako, Dinamarca).

2.5.1 Técnica

1. Desparafinar los cortes de tejidos en estufa a 60°C durante 15 min y pasarlos 2 veces por xilol 5 min.
2. Rehidratar los cortes de tejidos 2 veces en etanol 96% y 70% durante 2 min.
3. Lavar en SSTF por 2 min.
4. Incubar en solución de pre-tratamiento a 95°C 10 min.
5. Refrescar a TA 15 min.
6. Lavar con SSTF 2 veces por 3 min.

7. Aplicar pepsina (entre 2-8°C) durante 10 min a TA.
8. Repetir el paso 6.
9. Deshidratar los tejidos en etanol 70%, 85% y 96% durante 2 min.
10. Dejar secar las láminas completamente en posición vertical a TA.
11. Marcar, empleando la lámina de hematoxilina- eosina, el área infiltrante del tumor y aplicar 10 µl de sonda HER2/CEP-17.
12. Depositar sobre el tejido un cubreobjeto permitiendo la difusión homogénea de la sonda y sellar el borde del mismo con cemento.
13. Colocar las láminas en un hibridizador a 82°C por 5 min.
14. Ubicar las láminas en cámara húmeda para hibridación incubando 14-20 hrs a 45°C.
15. Precalentar 2 couplin de solución de lavado astringente a 65°C por 15 min.
16. Sacar las láminas de la cámara de hibridación, remover el cemento e introducir las en la solución astringente, permitiendo desprender el cubreobjetos sin dañar el tejido.
17. Cambiar las láminas al otro couplin con solución de lavado astringente, durante 10 min.
18. Repetir el paso 6.
19. Deshidratar los tejidos en etanol 70%, 85% y 96% por 2 min.
20. Repetir el paso 10.
21. Aplicar 15 µl de medio de montaje fluorescente sobre el tejido y colocar el cubreobjeto.
22. Las láminas se pueden leer después de 15 min de realizada la técnica y/o hasta 7 días, y conservarse entre 2-8°C.
23. Se analizan sólo las áreas de carcinoma invasivo y se cuentan 20 núcleos por cada tejido. Cuando fuera posible se examinan varias áreas tumorales.

24. El gen está amplificado cuando la relación entre las señales del HER2 (rojas) y las de la sonda CEP-17 (verdes) es ≥ 2.2 .

La lectura de las láminas se realizó en un microscopio de fluorescencia BX 41 U-LH100GAPO, Olympus, EUA.

2.6 Microarreglos tisulares (TMA, Tissue microarrays)

La confección de los TMA se efectuó con dos equipos manuales.

2.6.1. TMA (Thermo Scientific, México).

Incluye un molde para la confección del bloque de parafina y un aditamento para perforar, extraer y depositar el fragmento tisular seleccionado. Fig. 4.

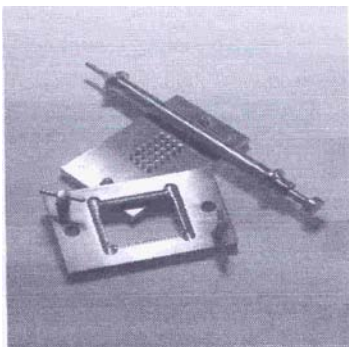


Fig. 4. Equipo para la confección de los TMA de Thermo Scientific, México.

3.6.1.2 Procedimiento

1. Poner la caja plástica del bloque dentro del molde y llenarlo con parafina líquida, dejándolo a TA hasta que se enfríe y solidifique.
2. Liberar el bloque del molde aflojando los tornillos laterales al unísono.
3. Como resultado final, se obtiene un bloque de parafina con 24 pozos de 2 mm de diámetro cada uno.

4. Seleccionar el fragmento de tejido que se va a extraer, marcando en la lámina de hematoxilina-eosina el campo seleccionado y confrontándola con el bloque de tejido, de manera que permita localizar el sitio exacto que se debe perforar.
4. Confeccionar en una plantilla de papel el esquema del bloque.
5. Marcar el bloque de parafina obtenido en un extremo, de manera que permita orientarse para trabajarlo y diagnosticarlo.
6. Depositar el cilindro de tejido extraído en el pozo correspondiente, siguiendo el orden previamente establecido en la plantilla.
7. Después de terminar la confección del bloque, ponerlo en estufa a 37°C 24 hrs
8. Aplanar la superficie y dejar enfriar a TA.

Se confeccionaron 2 bloques de microarreglos tisulares con 24 muestras de tumores mamarios cada uno.

2.6.2. TMA (Beecher Instruments, Sun Prairie, Wisconsin, EUA).

Este equipo a diferencia del anterior consta de 2 agujas continuas, una se emplea para abrir el pozo en el multibloque y la otra para extraer el cilindro tisular del bloque donante y a su vez se utiliza para depositarlo en el lugar designado en el microarreglo que se está confeccionando. Se puede obtener un multibloque con 80 fragmentos tisulares, ver fig 5.

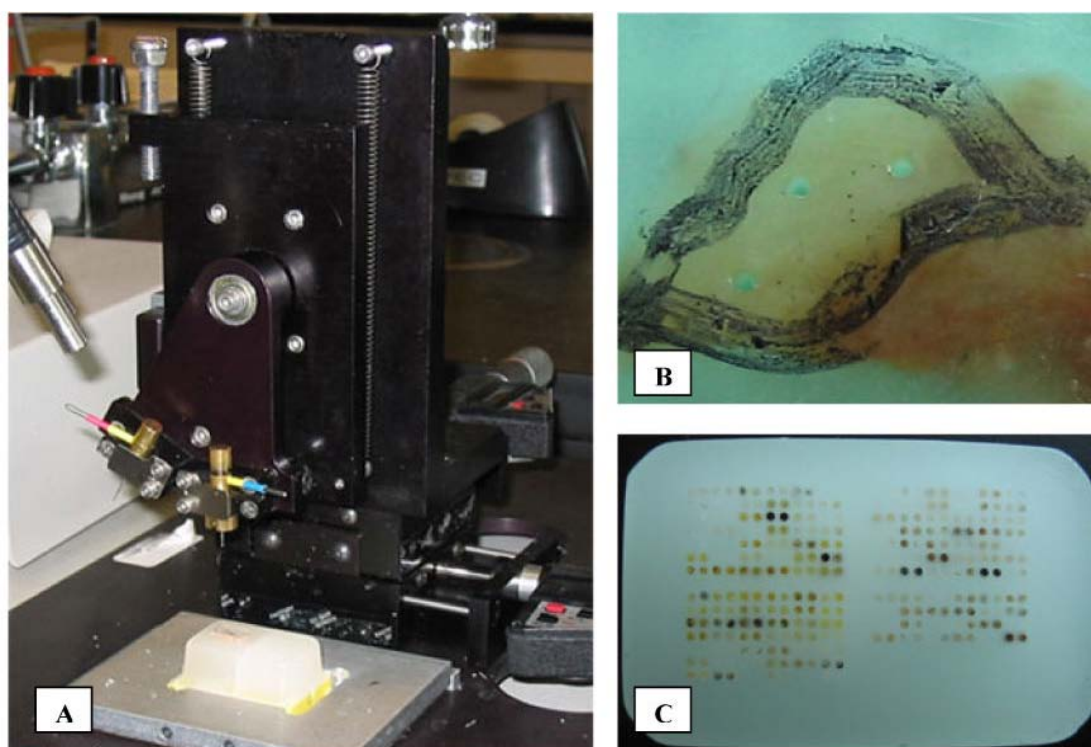


Fig. 5. (A) Equipo de Microarreglos Tisulares de Beecher Instruments (B) Bloque donante con la zona tumoral seleccionada (C) Multibloque confeccionado.

2.6.2.1 Procedimiento.

Es similar al descrito en el acápite 2.6.1, omitiendo los pasos 2 y 3.

Se confeccionaron 3 bloques con 80 fragmentos de tumores mamarios cada uno, para emplearse en el tamizaje del AcM 14F7.

2.7 Reconocimiento in vivo del AcM 14F7 por inmunocentellografía.

Para evaluar la biodistribución se confeccionó un ensayo clínico fase I-II aprobado por el Comité de ética del Instituto de Oncología y Radiobiología y por la autoridad nacional regulatoria cubana (CECMED). Se obtuvo el consentimiento informado de las 14 mujeres que entraron en el ensayo clínico.

Las pacientes incluidas estaban en un rango de 18 a 40 años de edad, con diagnóstico clínico, radiológico y citológico de cáncer de mama, estadio II, vírgenes de tratamiento oncoespecífico, todas procedentes del Instituto de Oncología y Radiobiología. La confirmación histopatológica se realizó después de la inmunocentellografía mediante el estudio de muestras del tumor tomadas durante el acto quirúrgico.

Las pacientes se dividieron en tres grupos. El grupo I recibió 0.3 mg del AcM 14F7 (n=5); el II 1 mg (n=5) y el III 3 mg (n=4), por vía intravenosa y marcado con 30 a 40 mg de ^{99m}Tc .

2.7.1. Marcaje radioactivo del AcM (según Schwarz y Steinstrasser, 1987; Mather y Ellison, 1990).

Los viales contienen 1 mL de solución neutra estéril y apirogénica del AcM con una concentración de 5 mg/mL. El AcM se redujo en exceso de 2 mercaptoetanol 2000 molar (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) durante 30 min a TA. Una vez reducido, el exceso de 2 mercaptoetanol se extrajo en una columna de Sephadex G-25 (Columna de gel filtración, PD-10, Pharmacia, Biotech, Uppsala, Suecia).

La concentración de proteína del AcM se midió en el espectro de luz visible a 280 nm con un espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia, Upsala, Suecia).

El paquete diagnóstico para gammagrafía ósea (Medronato-Sn, CENTIS, Habana, Cuba) se reconstituyó con 5 mL de solución salina gaseada con nitrógeno. A las alícuotas con 0,3; 1 ó 3 mg de AcM 14F7 reducido se les añadió 20, 50 o 120 ul de la

solución del medronato respectivamente, seguido por 30 a 40 mCi de perteneoctato obtenido de un generador estéril ^{99}Mo - ^{99}Tc (GBTec, CENTIS, Habana, Cuba).

Todo el procedimiento de radiomarcaje se realizó en condiciones asépticas en un flujo laminar y el radiofármaco se administró con una pureza radioquímica mayor de 90%.

2.7.2 Estudio de Biodistribución.

Las imágenes del AcM radiomarcado se evaluaron a las 2, 4, 8 y 24 horas posteriores a su administración. Se tomaron vistas laterales de ambas mamas estando las pacientes en posición decúbito prono y con la mama en posición pendular. Se empleó como control negativo, la mama contralateral no tumoral, verificada con anterioridad mediante examen clínico y mamográfico.

La localización y los porcentos de acúmulo del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en los tejidos, se evaluaron a través del análisis visual de las imágenes empleando una cámara gamma SOPHY CAMERA (Sopha Medical, Francia).

2.7.3 Toxicidad

Se realizó un examen físico a las pacientes en los días 7, 14 y 28 y se les indicaron estudios complementarios de hematología y bioquímica sanguínea.

La clasificación de la intensidad de los eventos adversos se realizó de acuerdo a la escala de Criterios Comunes de Toxicidad del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI-CTC), versión 3 (Trotti y cols., 2003).

Por ELISA se analizó la respuesta humana contra los Ac de ratón, conocida como respuesta HAMA (**H**uman **A**ntibody **M**ouse **A**ntigen). Recubriendo las placas de microtitulación con 10 µg/mL de AcM 14F7 durante toda la noche a 4°C, añadiendo diluciones seriadas del suero de las pacientes 2 horas a 37°C, seguido de suero anti IgG/IgM humana conjugado con fosfatasa alcalina para detectar la señal. Posteriormente la presencia o no de la molécula, se visualiza a través del revelado de la enzima mediante una reacción colorimétrica y se lee a 405 nm.

2.7.4 Inmunohistoquímica.

Se realizaron cortes seriados de los bloques de parafina de las pacientes del ensayo, uno se tomó para realizar la colación de hematoxilina-eosina (Lillie RD., 1954) y con el resto se evaluaron los marcadores de uso estándar: RE, RP y HER2 y se analizó el reconocimiento del AcM 14F7. Adicionalmente se tomaron fragmentos de tejido frescos de las 13 pacientes durante el acto quirúrgico, que se mantuvieron en solución salina al 0.9% a 4°C durante no más de 1 hr. Posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su ulterior uso.

Se realizaron cortes seriados a 5 µm en un Criostato Leica SM 1900, (Leica, Alemania). Se recogieron en láminas plus (cargadas positivamente, Dako, Uppsala, Suecia), se dejaron secar al aire durante 1 hr, se envolvieron en papel aluminio y se conservaron a -20°C por un período de hasta 2 meses.

Un corte se tomó para hematoxilina-eosina (Lillie RD., 1954) y el resto para detectar el reconocimiento inmunohistoquímico del AcM 14F7.

Los cortes de tejidos se tiñeron con el AcM 14F7 para comparar su patrón de inmunoreacción en tejidos frescos con el obtenido en los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, y para correlacionar estos resultados con los obtenidos in vivo.

2.7.4.1. Procedimiento.

1. Una vez que las láminas toman temperatura ambiente, se extraen del papel aluminio y se fijan en paraformaldehído al 4% durante 15 min.
2. Se pasan a agua corriente 10 min, agua destilada 5 min.
3. Se inhibe la Px endógena durante 5 min (Dako S2001).
4. Se lavan con SSTF por 10 min, 2 cambios.
5. Se aplica el AcM 14F7 a 1 $\mu\text{g/mL}$ por 30 min.
6. Se lava con SSTF-Tween 20 al 0.2% 5 min (varios pases).
7. Se aplica el Ac anti ratón biotilado (Dako) durante 30 min.
8. Lavado igual que el paso 4.
9. Se aplica estreptavidina-Px (Dako) durante 30 min.
10. Lavado igual que el paso 4.
11. Se revela con DAB (juego de reactivos, Anacrom, Sevilla, España).
12. Se lava con agua destilada.
13. Se contrasta con hematoxilina de Mayer 20 segundos.
14. Se azulea en agua amoniaca 37 mmol/L.
15. Se lava en agua corriente y se monta con Eukitt.

La técnica IHQ en los tejidos fijados en formol al 10% y embebidos en parafina se realizó según lo descrito en el acápite 2.3.7 y 2.4.

2.8 Análisis estadístico.

Los datos recogidos en la ficha de las pacientes, así como los obtenidos en el trabajo, se almacenaron en una base de datos confeccionada en Excel.

Se conformaron grupos de pacientes según la distribución de los factores pronósticos. Esto permitió, una vez obtenida la expresión tisular de los marcadores tumorales, establecer correlaciones y evaluar los resultados de esta información en relación al valor pronóstico y/o predictivo de cada uno de ellos.

Para el procesamiento y análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS, versión 11. Se calcularon las frecuencias y porcentajes de las variables cualitativas agrupadas. Para estudiar la relación entre las diferentes variables de interés, se emplearon tablas cruzadas con las variables tomadas 2 a 2 y se utilizó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) para determinar la posible existencia de asociación entre las mismas bajo la hipótesis H_0 : no hay dependencia, H_1 : hay dependencia. El nivel de significación considerado fue de 0.05. En el caso particular de los marcadores tumorales, HER2 y los RH, se calculó el coeficiente rho de Spearman (r), para determinar la correlación entre 2 variables.

En la comparación del AcM EGFR1 comercial con el producido en Cuba, se calculó la sensibilidad y la especificidad del reconocimiento del ior egf/r3 contra el juego diagnóstico comercial de Dako (Fernández y Pertegas, 2003).

Sensibilidad (S). Definida como la capacidad del AcM ior egf/r3 de reconocer igual número verdaderos positivos que el identificado con el juego diagnóstico de Dako.

$$S = [vp/(vp+fn)] \times 100$$

Especificidad (E). Es la capacidad del AcM ior egf/r3 de reconocer igual número de casos negativos al receptor del EGF tipo 1 que el obtenido al usar el juego diagnóstico de Dako.

$$E = (Vn/(vn+fp)) \times 100$$

Valor predictivo positivo (VPP). Es la probabilidad de que el AcM ior egf/ r3 reconozca los verdaderos positivos evaluados por el AcM de Dako.

$$VPP = Vp/Vp+Fp \times 100$$

Valor predictivo negativo (VPN). Es la probabilidad de que el AcM ior egf/ r3 reconozca los verdaderos negativos evaluados por el AcM de Dako.

$$VPN = Vn/ Fn+Vn \times 100$$

Abreviaturas utilizadas en las fórmulas.

vp= verdaderos positivos para el AcM EGFR1 de Dako.

fp= falsos positivos, son los positivos para el ior egf /r3 y negativos para el de Dako.

fn= falsos negativos, negativos para el ior egf /r3 y positivos por Dako.

vn= verdaderos negativos, son los negativos para el AcM EGFR1 de Dako.

N= tamaño de la muestra estudiada.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS.

En este capítulo se muestran los principales resultados obtenidos en la investigación contiene los factores pronósticos y predictivos de respuesta terapéutica analizados, su expresión y el grado de asociación entre ellos, además la identificación de posibles dianas terapéuticas con el empleo de AcMs cubanos.

3.1 Variables morfológicas y generales.

El número de tumores estudiados para cada uno de los factores pronósticos analizados no fue el mismo por la pérdida de datos aleatoria en cada una de las variables consideradas, lo que implicó un tamaño de muestra que osciló en un rango entre 866 y 1 509.

El diagnóstico anatomopatológico resultó coincidente al ser reevaluado. El estudio evidenció un predominio de los carcinomas ductales invasivos que comprendieron el 74%, seguidos de los carcinomas lobulillares invasivos con un 10% de frecuencia. Los carcinomas invasivos tipos especiales, es decir, medulares, mucinosos y papilares se encontraron en el 4.6% de la muestra, mientras que las variedades raras, como el carcinoma inflamatorio, el metaplásico y la enfermedad de Paget, estuvieron por debajo del 1% (Tabla 2), figs. 6 y 7.

Al analizar la distribución de la muestra por el GN y el GH, en ambos encontramos un mayor por ciento de expresión en el grado II, seguido por el grado III y en el último lugar el grado I (Tabla 2).

En cuanto al tamaño del tumor, la mayoría de los tumores se ubicaron en el grupo que incluía los de dimensión mayor hasta 20 mm (49,2%), seguidos por los de 21 hasta 49 mm (Tabla 2).

La presencia de ganglios axilares metastásicos predominó en las pacientes estudiadas, 53.13%, más de la mitad de la muestra. Estos se observaron prácticamente entre los grupos de 1 a 3 y de 4 a 9 (43.9%), correspondiéndole al grupo de 10 y más ganglios el por ciento más bajo en esta categoría (Tabla 2).

En los estadios clínicos predominó el estadio II, seguido por el I, el III y el IV. Este último con una frecuencia menor del 2% (Tabla 2).

Se consideraron dos grupos de edades, donde el mayor número de pacientes se encontraron representadas en las mayores de 50 años, con un 52.3 % (Tabla.2).

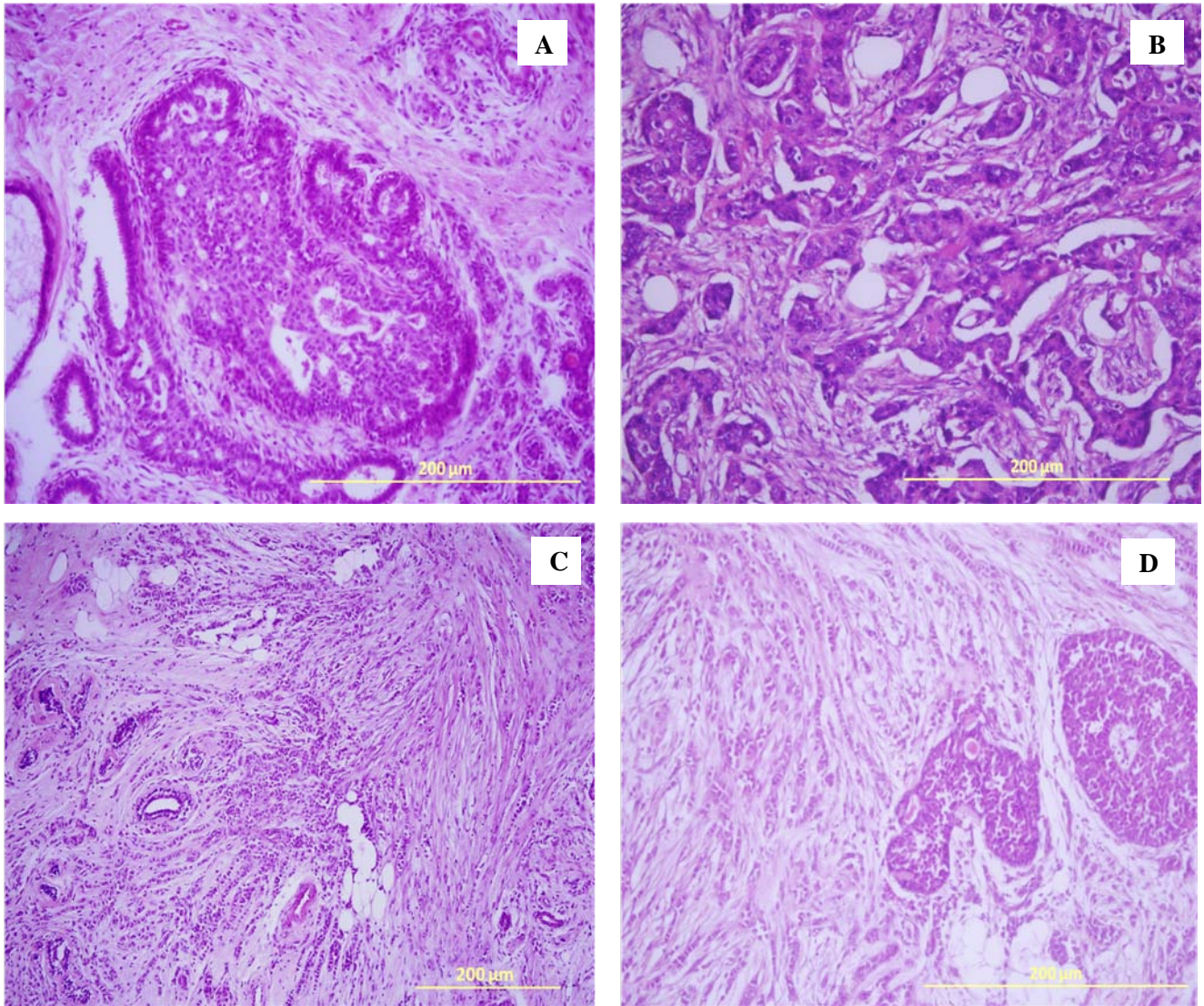


Fig. 6. **A.** Carcinoma ductal in situ. (HE). Note la uniformidad de la población celular y la delimitación de los bordes celulares en la membrana basal. **B.** Carcinoma ductal invasivo clásico. (HE). Glándulas de pequeño tamaño y forma irregular que infiltran el estroma. **C.** Carcinoma lobulillar invasivo. (HE). Células tumorales pequeñas y con relativa uniformidad con crecimiento concéntrico y alineado. **D.** Carcinoma ductolobulillar infiltrante. (HE). Observe áreas de carcinoma lobulillar y ductal.

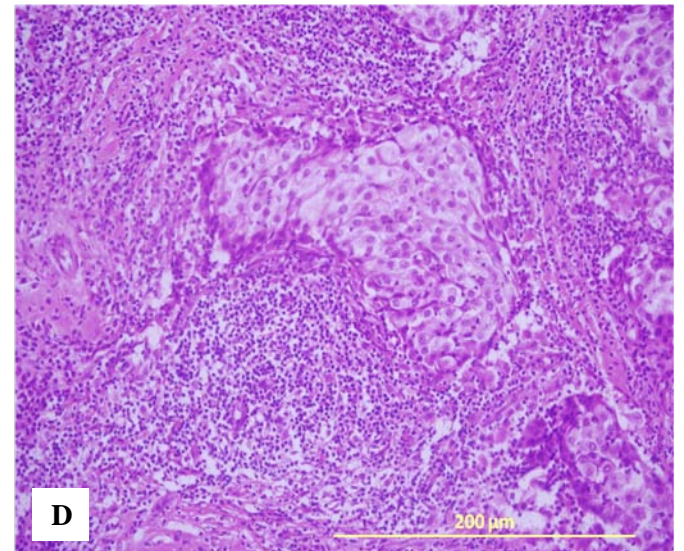
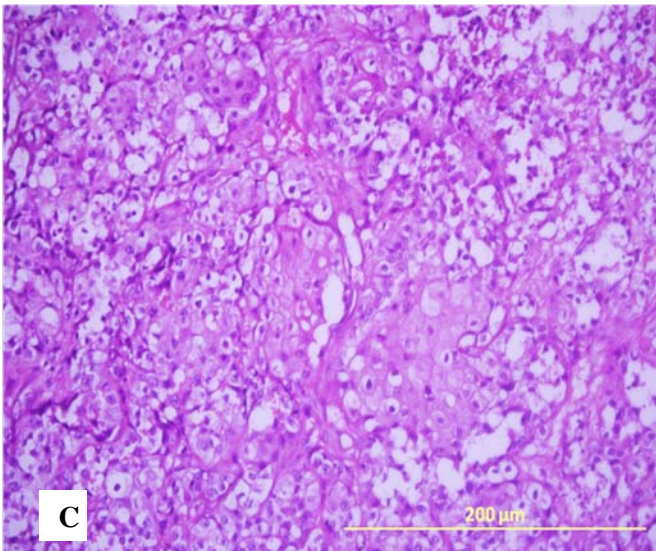
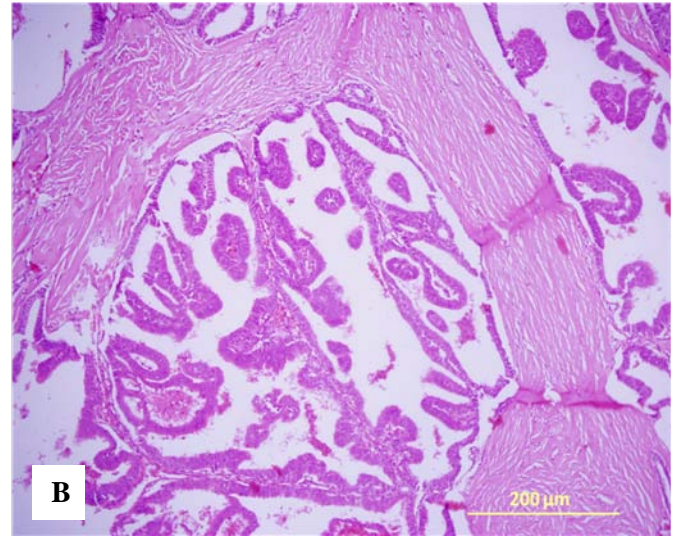
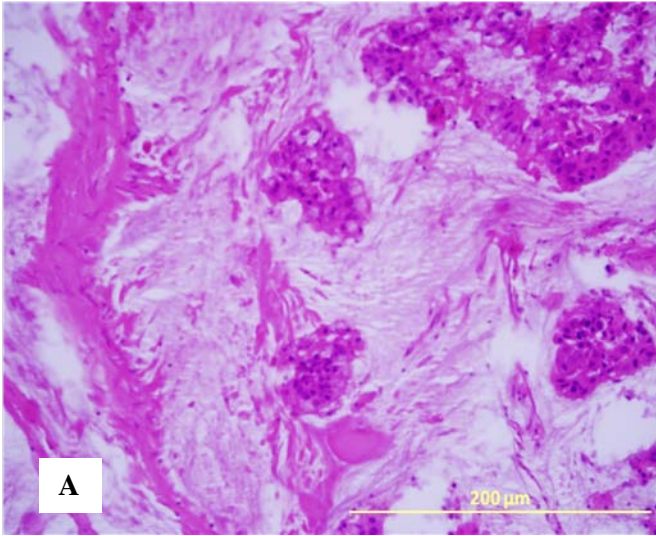


Fig.7 **A.** Carcinoma coloidal. (HE). Nidos sólidos de células bien diferenciadas inmersas en abundante mucina. **B.-** Carcinoma papilar. (HE). Observe las proyecciones papilares con un estroma fibrovascular. **C.** Carcinoma metaplásico adenoescamoso. (HE). Note el componente glandular con células claras y el escamoso con moderada diferenciación. **D.** Carcinoma medular. (H/E). Células tumorales de gran tamaño y escasa diferenciación celular con abundante infiltrado linfoplasmocitario.

Tabla 2. Características de la muestra estudiada.

n (%)	
Tumores malignos de mama	1 509
Subtipo Histológico	1 509 (100.00)
Carcinoma Ductal Invasivo	1 123 (74.42)
Carcinoma Lobulillar Invasivo	158 (10.47)
Carcinomas Mixtos	124 (8.21)
Carcinoma Papilar	17 (1.12)
Carcinoma Medular	18 (1.19)
Carcinoma Mucinoso	34 (2.25)
Carcinoma Metaplásico	6 (0.40)
Carcinoma Inflamatorio	2 (0.13)
Carcinoma Ductal In Situ	15 (1.00)
Carcinoma Lobulillar In Situ	8 (0.53)
Enfermedad de Paget	4 (0.27)
Grado nuclear	1 009 (66.9)
I	200 (19.82)
II	518 (51.3)
III	291 (28.84)
Grado Histológico	939 (62.2)
I	130 (13.8)
II	518 (55.16)
II	291 (31.00)
Dimensión mayor tumor	866 (57.3)
≤ 20mm	400 (46.18)
21- 49mm	393 (45.38)
≥ 50	73 (8.42)
Ganglios axilares metastásicos	1 016 (67.3)
0	475 (46.75)
1-3	262 (25.78)
4-9	185 (18.20)
≥ 10	94 (9.25)
Estadio Clínico	1 006 (67.3)
I	232 (23.06)
II	603 (59.94)
III	155 (15.40)
IV	16 (1.59)
Edad de las pacientes	1 229 (81.4)
< 50	575 (46.78)
≥ 50	654 (53.21)

3.2 Inmunohistoquímica.

3.2.1 Inmunolocalización tisular de los receptores hormonales.

Los RH en los tumores mamarios malignos exhibieron su patrón nuclear característico como se muestra en la fig. 8. Se expresaron en el 53 y 49% de los casos para el RE y el RP respectivamente Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de la expresión de los RH en los tumores mamarios malignos.

	n	Positivo (%)	Negativo (%)	no útiles (%)
RE	1509	743 (53.0)	658 (47.0)	108 (7.15)
RP	1509	588 (49.0)	617 (51.0)	300 (19.8)

Al relacionar el RE con el resto de los factores pronósticos evaluados, se evidenció que al aumentar el estadio clínico, el tamaño tumoral, el grado nuclear y el grado histológico, disminuye la positividad al RE en la muestra de tumores estudiados ($p < 0.05$ χ^2). El grupo de edad de 50 y más años presentó mayor expresión del RE ($p < 0.05$ χ^2).

Por otra parte se observó que la expresión de RE tiende a disminuir a medida que se hace mayor el número de ganglios axilares metastásicos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas, ver Tabla 4.

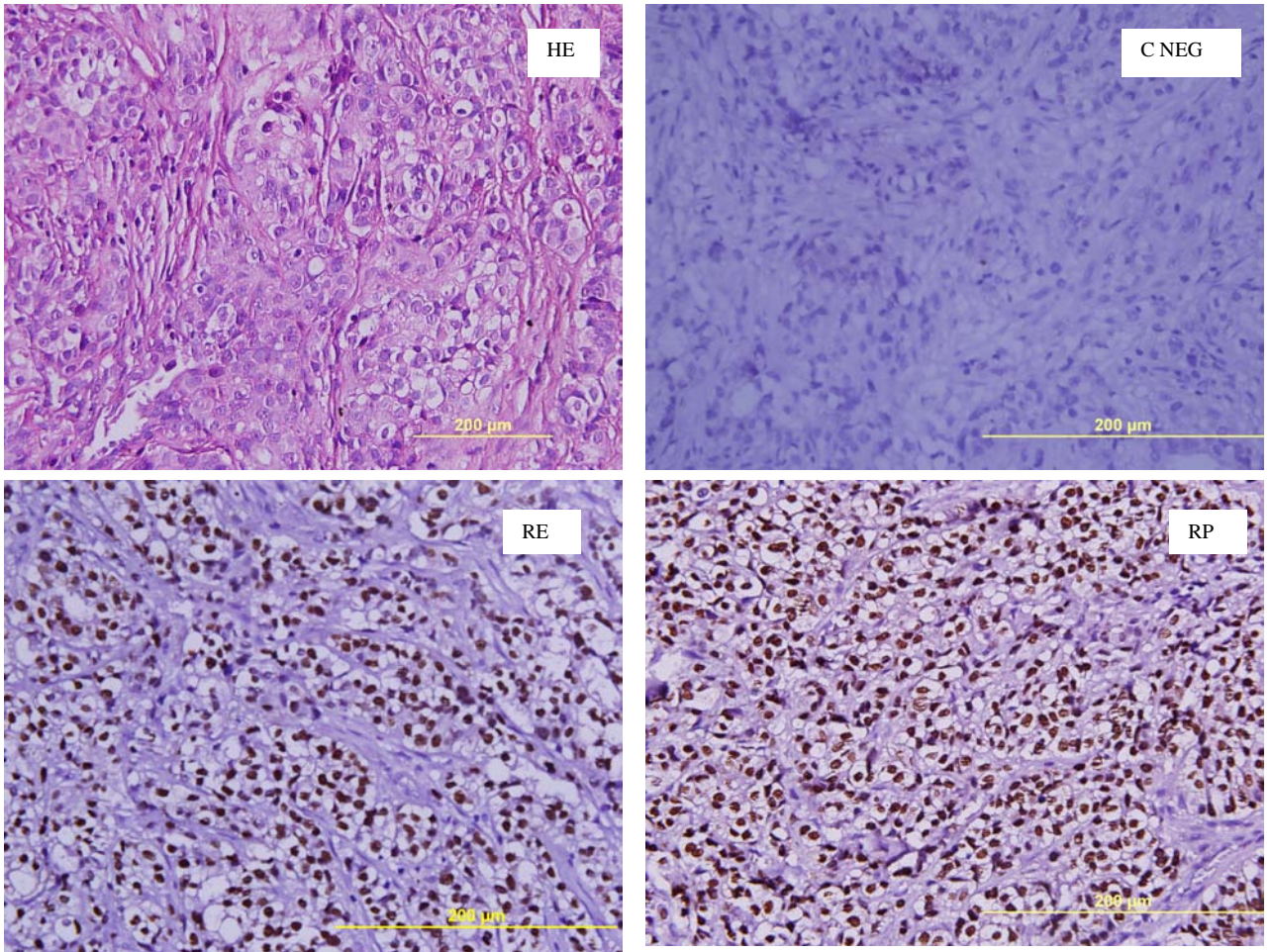


Fig. 8. Note la inmunolocalización nuclear e intensa de RE y RP

Tabla 4. Expresión tisular del RE en relación con los factores pronósticos.

<i>Factores pronósticos</i>	<i>n</i>	<i>RE</i>		<i>p</i>
		<i>Positivo n(%)</i>	<i>Negativo n(%)</i>	
Edad	1 174			0.04*
< 50		266 (48.3)	284 (51.6)	
≥ 50		360 (57.6)	264 (42.3)	
Dimensión mayor del tumor	866			0.001*
≤ 20		261 (65,2)	139 (34,7)	
21- 49		211 (53.6)	182 (46.3)	
50 ó mas		27 (36.9)	46 (63.0)	
Ganglios axilares metastásicos	967			0.308
0		262 (57.2)	196 (42.7)	
1-3		150 (60.7)	97 (39.3)	
4-9		91 (52.0)	84 (48.0)	
10 o más		39 (44.8)	48 (55.2)	
Grado Nuclear	977			0.001
I		125 (65.4)	66 (34.5)	
II		291 (58.1)	210 (41.9)	
III		119(32.6)	166(45.4)	
Grado histológico	915			0.014
I		79 (62.2)	48 (37.7)	
II		288 (56.8)	219 (43.2)	
III		127 (45.2)	154 (54.8)	
Estadio clínico	988			0.015
I		137(62.2)	83(37.3)	
II		339(58.1)	245(41.9)	
III		58(34.5)	110(65.5)	
IV		5(31.2)	11(68.8)	

p< 0.05 χ^2

Similar comportamiento se confirma para el RP, su relación con los factores pronósticos evaluados, mostró que al aumentar el estadio clínico, el tamaño tumoral, el grado nuclear y el grado histológico, disminuye la positividad al RP en la muestra de tumores estudiados ($p<0.05 \chi^2$). La edad y el número de ganglios metastásicos no mostraron correlación estadísticamente significativa ($p>0.05\chi^2$).

Tabla 5. Expresión tisular del RP en relación a los factores pronósticos.

<i>Factores pronósticos</i>	<i>n</i>	<i>RP</i>		<i>p</i>
		<i>Positivo n(%)</i>	<i>Negativo n(%)</i>	
Edad < 50 ≥ 50	1 174	293(53.1) 311(49.8)	257(46.8) 313(50.2)	0.260
Dimensión mayor del tumor ≤ 20 21- 49 ≥ 50	866	200(50.0) 174(44.4) 23 (16.8)	200(50.0) 218(55.6) 50(36.5)	0.000
Ganglios axilares metastásicos 0 1-3 4-9 ≥ 10	967	76(16.6) 137(55.5) 105(60.0) 29(33.3)	381(83.4) 109(44.4) 70(40.0) 57(66.6)	0.216
Grado Nuclear I II III	977	98(51.3) 250 (50.0) 125(44.0)	93 (48.7) 250(50.0) 160(56.0)	0.000
Grado histológico I II III	915	70(55.2) 278(54.9) 122(43.4)	57(44.8) 228(45.1) 159(56.6)	0.002
Estadio clínico I II III IV	988	141(64.3) 310(53.0) 45(26.6) 11(66.6)	79(35.7) 275(47.1) 123(73.3) 5(33.3)	0.000

p< 0.05 χ^2

Al correlacionar los RH entre sí, encontramos que sus expresiones muestran una frecuencia diferente en cada una de las combinaciones posibles. Se observó un mayor por ciento al co-expresarse ambos receptores (38%), le siguió la combinación donde ambos RH resultaron negativos (28%). El 23% resultó RE+ RP- y solamente en 136 tumores (11%), se presentó la combinación RE- RP+ (Tabla 6).

Tabla 6. Correlación de la expresión de los RH.

Región	Expresión de RP		Total n(%)
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Positivo	459 (37.96)	276(22.83)	735(60.79)
RE			
Negativo	136(11.35)	338(27.96)	474(39.21)
Total (%)	595 (49.21)	614(50.79)	1 209(100)

3.2.2 Inmunolocalización tisular de los receptores de la familia del Factor de crecimiento epidérmico humano.

3.2.2.1 HER2.

Se localizó a nivel de la membrana citoplasmática de las células tumorales mamarias, con intensidades comprendidas entre 0, 1+, 2+ y 3+, como se muestra en la fig. 9.

Resultaron útiles 1 483 (98.2%) tumores. El 76.3% fueron negativos (0 y 1+), mientras que el 23.7% de los tumores se observaron positivos (2+ y 3+). El 16.8% del total de los tumores estudiados mostraron niveles de sobreexpresión (3+) del HER2 (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de la expresión del HER2 en la muestra de tumores mamarios.

Muestra		HER2			
n	(%)	Intensidad de marcaje	n	(%)	
1483	98.2	0	748	50.4	
		1+	384	25.9	
		2+	102	6.9	
		3+	249	16.8	

0,1+

tumores negativos, 2+ discordantes, 3+ positivos.

La relación del HER2 con el resto de los factores pronósticos morfológicos y clínicos, mostró que el aumento del grado nuclear, del grado histológico y de la dimensión mayor del tumor se asocia con una mayor expresión de este marcador tumoral ($p < 0.05 \chi^2$). Por otra parte, se observó que los tumores de las mujeres menores de 40 años de edad presentan mayor expresión de esta molécula ($p < 0.05 \chi^2$). La correlación con el estadio clínico y con el número de ganglios axilares metastásicos, no alcanzó niveles de significación estadística ($p > 0.05 \chi^2$) (Tabla 8).

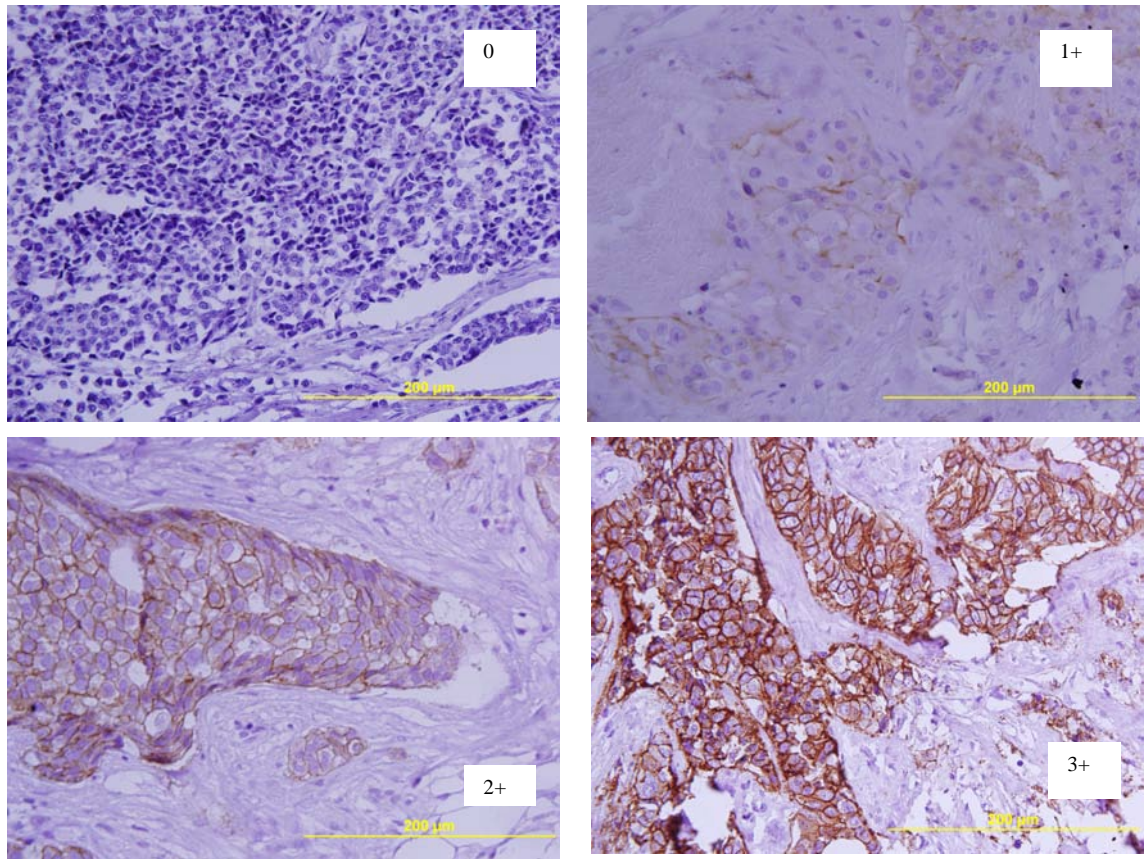


Fig. 9 En la muestra estudiada se observaron los cuatro patrones de tinción establecidos para la evaluación tisular del HER2.

Tabla 8. Expresión del HER2 en relación a los factores pronósticos.

<i>Factores pronósticos</i>	<i>n</i>	<i>HER2</i>		<i>p</i>
		<i>Negativo(0y1)</i> <i>n (%)</i>	<i>Positivo(2+ y 3+)</i> <i>n (%)</i>	
Edad	1 181			0.0424
≤ 40		134(70.1)	57(29.8)	
> 40		763(77.1)	227(22.9)	
Dimensión mayor del tumor	851			0.0002
≤ 20		326(83.8)	63(16.1)	
21- 49		281(72.6)	106(27.3)	
≥ 50		52(69.4)	23(30.6)	
Ganglios axilares metastásicos	917			0.2716
0		304(73.7)	108(26.2)	
1-3		195(79.6)	50(20.4)	
4-9		137(78.7)	37(21.2)	
10 y más		63(73.2)	23(26.7)	
Grado Nuclear	989			0.0006
I		161(77.7)	46(22.2)	
II		391(78.3)	108(21.6)	
III		188(66.4)	95(33.5)	
Grado histológico	913			0.0035
I		106(83.4)	21(16.5)	
II		392(77.3)	115(22.6)	
III		193(69.2)	86(30.8)	
Estadio clínico	978			0.6852
I		175(79.2)	46(20.8)	
II		444(76.5)	136(23.4)	
III		120(74.1)	42(25.9)	
IV		12(75.0)	3(18.8)	

p < 0.05 χ^2

Del grupo de tumores HER2 2+, 10 fueron seleccionados para determinar la amplificación génica mediante la técnica de Hibridación in situ fluorescente. En 8 tumores la relación HER2(rojo) / CEP 17(verde) se mantuvo en el rango normal, < 2.2 sin observarse amplificación del gen, mientras que en los dos casos restantes se observó amplificación de gen con una relación HER2/ CEP 17 \geq 2.2 en cada uno de los núcleos celulares analizados Tabla 9, fig. 10.

Tabla 9. Amplificación génica del HER2 empleando FISH.

Biopsia	HER2 / IHQ	HER2 / Cep 17	Promedio de copias HER2	Gen Amplificado
03-7632	2+	1.14	2.052	NO
04-2403	2+	1.01	2.025	NO
05-4596	2+	1.14	2.125	NO
06-7633	2+	1.22	2.475	NO
04-5424	2+	1.02	1.850	NO
06-7759	2+	1.77	3.195	NO
06-2905	2+	3.31	5.975	SI *
06-1014	2+	1.01	2.025	NO
06-3267	2+	1.22	2.475	NO
06-9087	2+	1.90	3.429	NO
03-4677	1+	1.01	1.795	NO
03-2243	1+	1.14	2.125	NO
04-3678	1+	1.02	1.850	NO
04-5372	1+	1.25	3.325	NO
05-3423	1+	1.00	2.010	NO
06-2424	2+	4.6	16.925	SI*

* HER2/CEP 17 \geq 2.2

La expresión del HER2 se reanalizó según las regiones geográficas de procedencia de los tumores mamarios, considerando al Instituto de Oncología y Radiobiología (INOR) como una región independiente. Los por cientos de positividad se ubicaron en el rango comprendido entre 20 y 30, en todas las regiones del país. En los tumores del INOR se

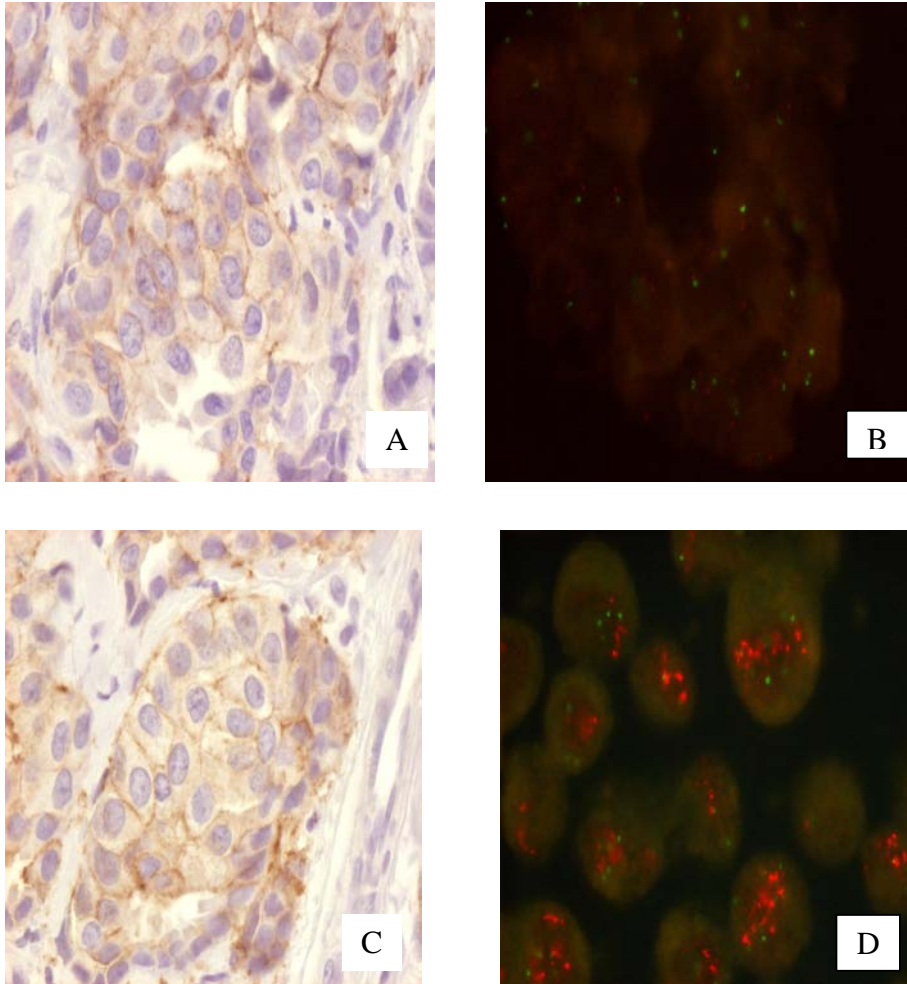


Fig.10 A. Tumor mamario HER2 2+ por inmunohistoquímica (40X)
B. Células tumorales sin amplificación génica por FISH (HER2/Cep 17= 1)
C. Tumor 06-2925 HER2 2+ por inmunohistoquímica (40X), D. Células tumorales con amplificación génica por FISH (HER2 / Cep 17> 2.2).

obtiene la expresión más alta de positividad (25.7 %), aunque sin alcanzar niveles de significación estadística ($p= 0.0611$) (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de la expresión del HER2 en los tumores mamarios según regiones geográficas.

Región	Expresión de HER2						Total	
	0, 1+	n	(%)	2+, 3+	n	(%)	n	(%)
INOR		658	(74.3)	227	(25.7)		885	
Occidente		170	(80.1)	42	(19.9)		212	
Centro		187	(80.0)	48	(20,4)		235	
Oriente		116	(76.8)	35	(23.1)		151	
Total		1 131	(76.3)	352	(23.7)		1483	(100%)

$p < 0.05 \chi^2$

4.2.3 Correlación de la expresión del HER2 con los RH.

Al analizar la expresión combinada de los tres receptores, encontramos que la combinación del RE₊ RP₊ y HER2₋ resultó la más frecuente (56.2%) fig. 11., a continuación se ubicó la combinación donde los tres receptores resultaron negativos (triple negativos) (19.9%) fig. 12., seguida de RE₋ RP₋ y HER2₊ (13.7%) fig. 13. y por último, la más baja frecuencia correspondió a la expresión positiva de los tres receptores (10.1%) fig. 14., (Tabla 11). El coeficiente de Spearman $r = -1$, indicó la existencia de correlación inversa entre los RH y el HER2.

Tabla 11. Correlación de la expresión de HER2 con RH.

	RH				Total	
	Positivo	n	(%)	Negativo	n	(%)
Positivo		122	(10.1)	166	(13.7)	288 (23.8)
HER2						
Negativo		680	(56.2)	241	(19.9)	921 (76.2)
Total		802	(66.3)	407	(33.6)	1209 (100%)

3.2.4 EGFR1.

Exhibió un marcaje de membrana con una distribución y un patrón de intensidad similar al descrito para el HER2.

La evaluación de la expresión del EGFR1 en los tumores triple negativos con el juego de reactivos diagnóstico EGFR pharmDx™ de Dako, mostró un 56,2% de tumores negativos, 20.3% con marcaje 1+, 5.9% resultaron 2+ y el 17.3% restante mostró una intensidad 3+ que delimita completamente la membrana citoplasmática.

Al utilizar el AcM anti EGFR1, ior egf /r3 (CIMAB, S.A) encontramos un reconocimiento equivalente al obtenido con el anticuerpo del juego diagnóstico de Dako. Se mantuvo invariable el por ciento de tumores con marcaje de 2+ y 3+ (fig. 15.). La diferencia entre ambos AcMs radicó en la ausencia del reconocimiento por el AcM cubano del grupo de los tumores que mostraron expresión del EGFR1 con intensidad 1+ con el AcM de la Dako, lo que se aumentó el número de tumores negativos detectados por el AcM ior egf/r3, ver Tabla 12.

Tabla 12. Reconocimiento de los AcMs anti EGFR1 en los tumores mamarios triple negativos.

<i>Inmunomarcaje tisular</i>	<i>Anticuerpos Monoclonales</i>	
	<i>EGFR1</i> <i>n (%)</i>	<i>ior egf/ r3</i> <i>n (%)</i>
0	135 (56.2)	185 (76.5)
1+	50 (20.3)	0 (0.0)
2+	14 (5.9)	14 (5.9)
3+	42 (17.3)	42 (17.3)

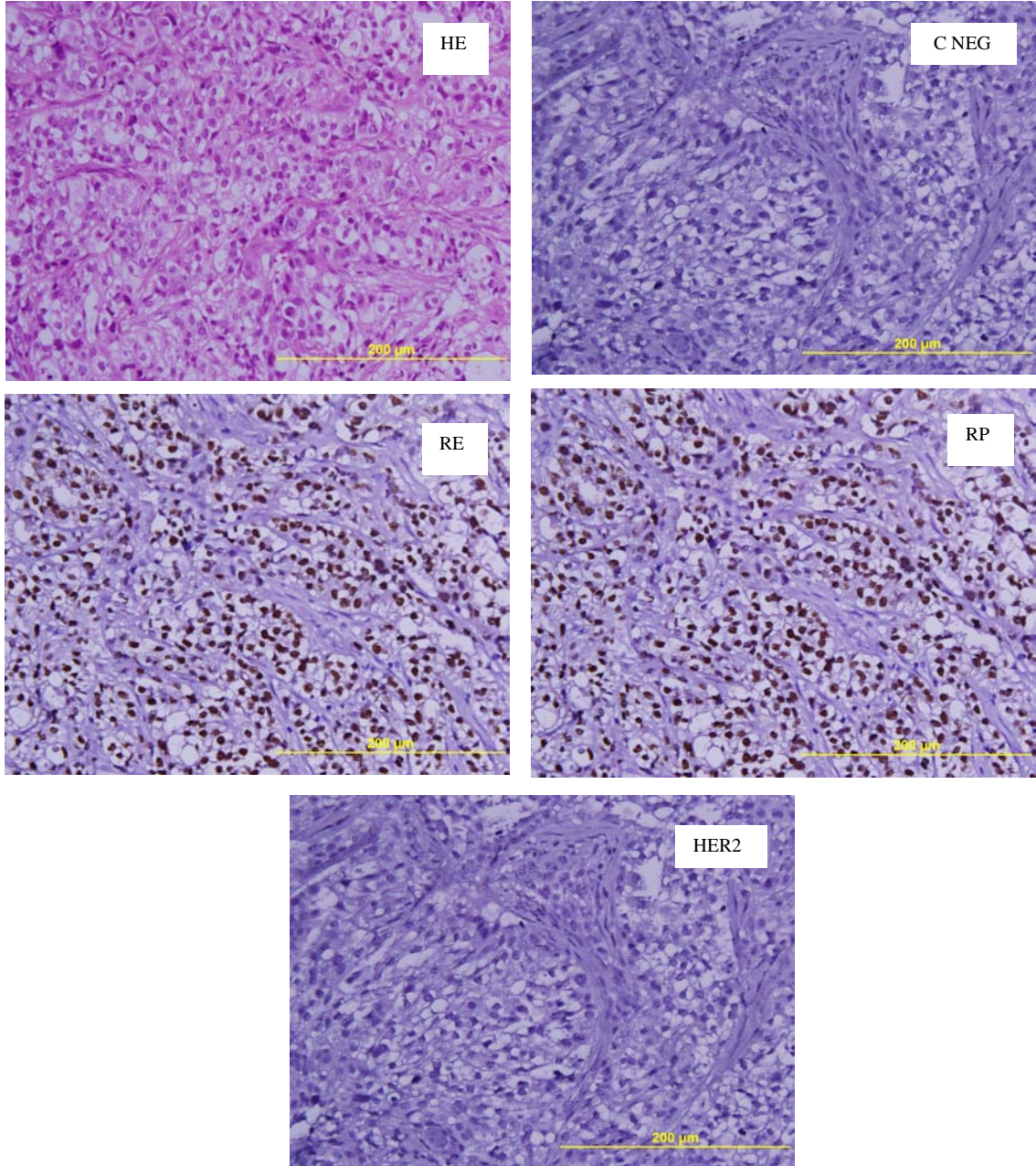


Fig. 11 Obsérvese inmunoreacción en los núcleos de los cortes de tejidos correspondientes a RE y RP, mientras que el de HER2 no presenta reacción (RE+RP+HER2-)

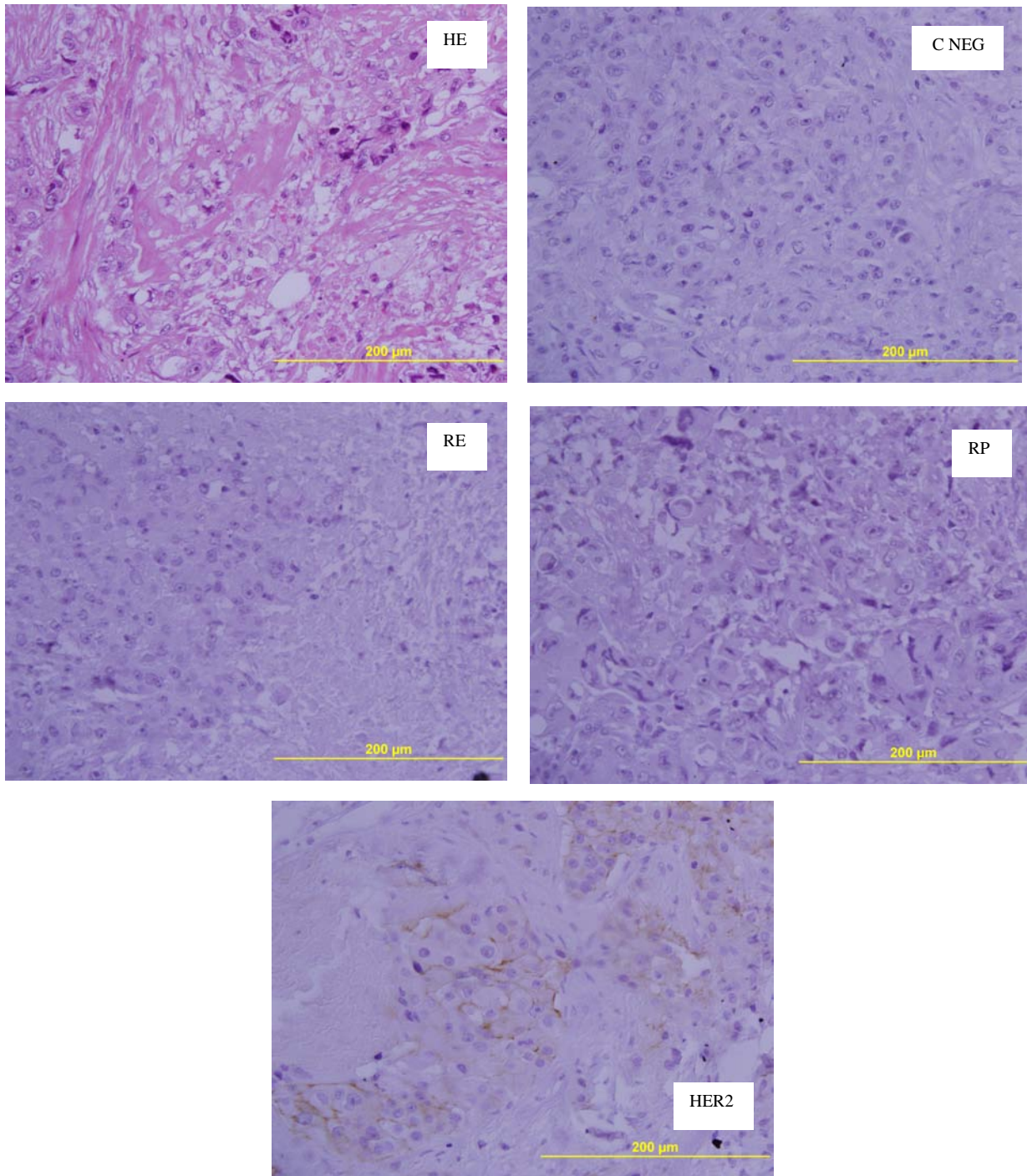


Fig.12 Imágenes correspondientes a un tumor que no expresa ninguno de los tres receptores estudiados (Triple negativo).

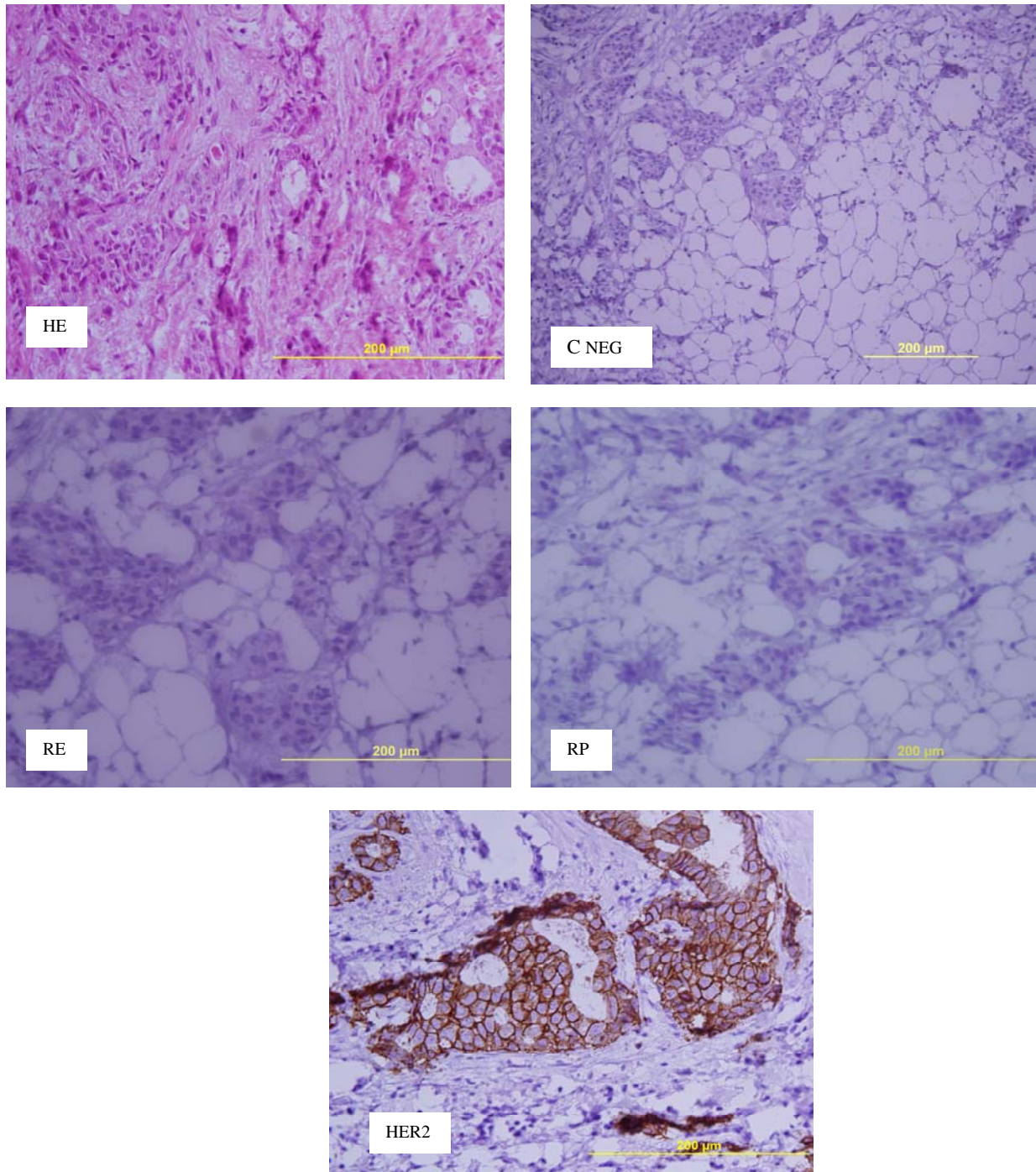


Fig. 13. El HER2 muestra un intenso marcaje de la membrana citoplasmática (3+). No se observa reacción en los cortes correspondientes al RE y el RP. (RE-RP-HER2 3+).

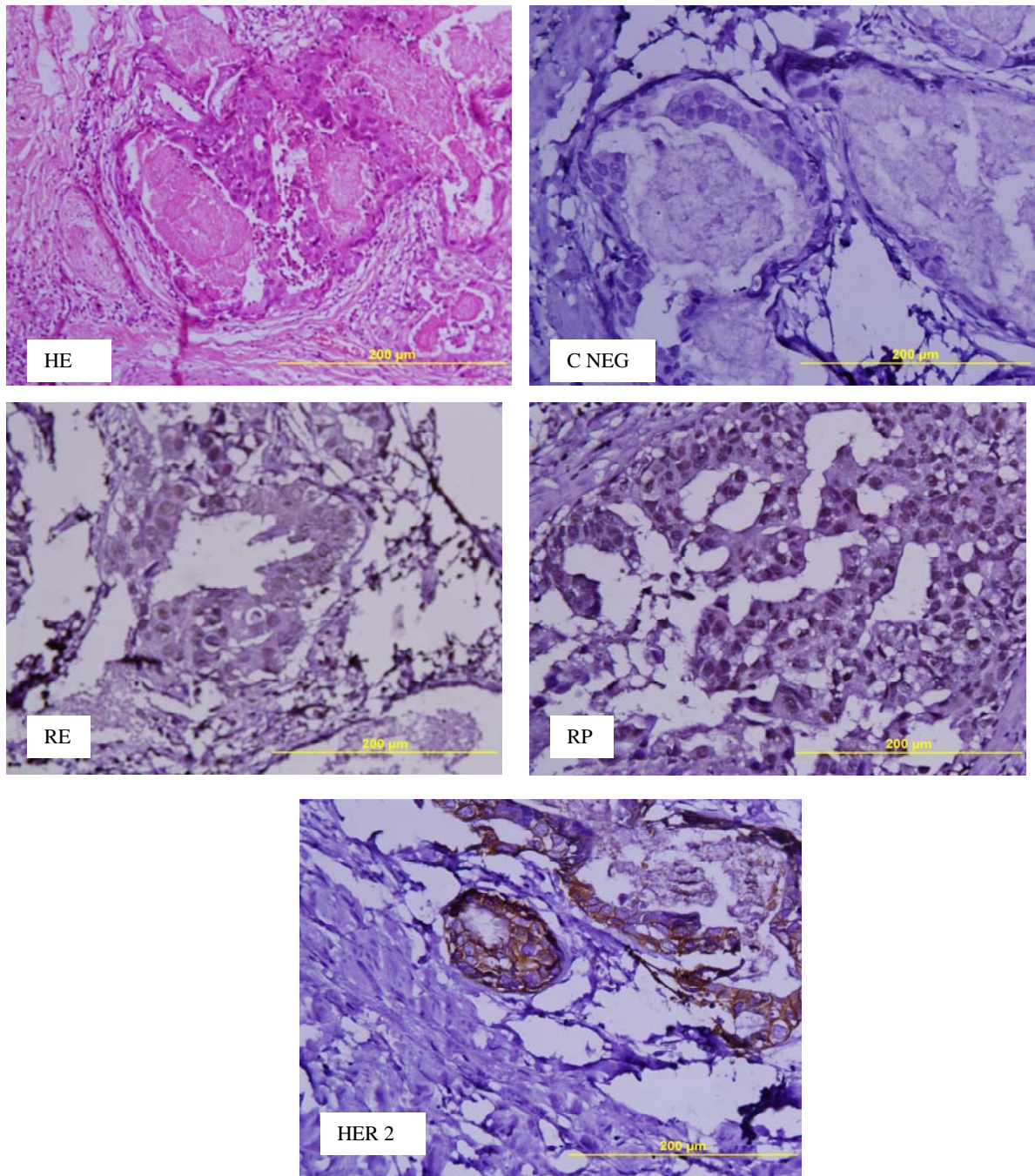


Fig. 14 Se observa tumor mamario con expresión de los tres receptores. (Triple positivo) RE+ RP+ HER2 3+. Adviértase el marcaje nuclear para el RE y RP y la delimitación completa e intensa de la membrana citoplasmática en el HER2.

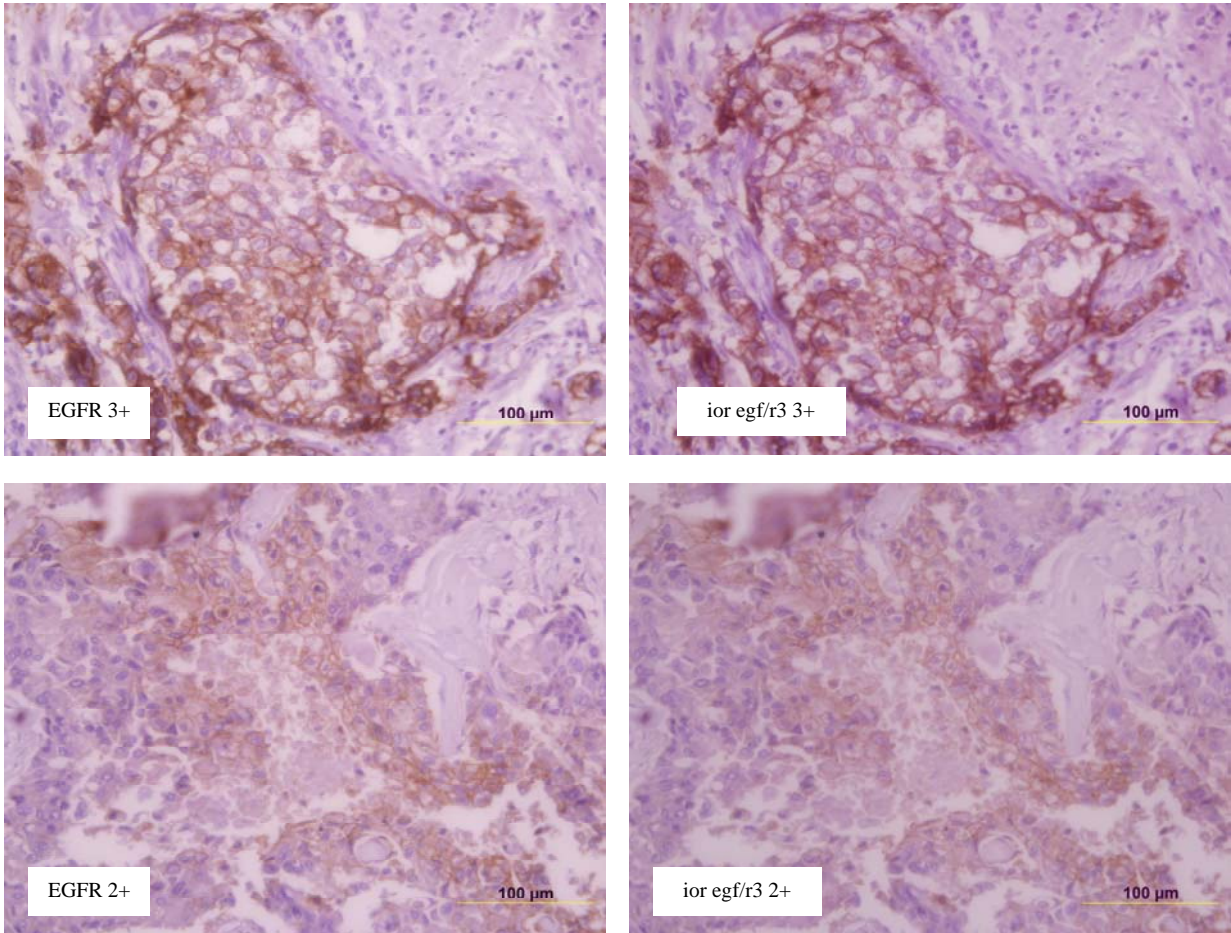


Fig. 15 Se muestra el reconocimiento de los AcMs: ior egf/r3 y EGFR de Dako. Véase el marcaje similar de ambos a nivel tisular (3+), sólo el ior-egf/r3 exhibe una pequeña diferencia en la intensidad en los tumores 2+.

El cálculo de la sensibilidad y la especificidad del AcM ior egf/r3 cubano comparado con el de Dako, alcanzó valores de 68 y 100% respectivamente, el VPN fue de 73% y el VPP alcanzó el 100%.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de EGFR1 en un grupo de 50 tumores con diferentes combinaciones de los RH y del HER2. Los tumores EGFR1 positivos con intensidad 3+ se encontraron siempre asociados a tumores RE negativos, independientemente del estado del RP y del HER2, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Expresión del receptor del EGFR1 en tumores mamarios con diferentes combinaciones de los marcadores.

<i>Combinaciones</i>	<i>EGFR1</i>				Total
	0	1+	2+	3+	
RE+/RP+ / HER2 0	5				5
RE+/RP+ / HER2 1+	5	-	-	-	5
RE+/RP- / HER2 0	4	1			5
RE+/RP- / HER2 1+	5				5
RE+/RP- / HER2 3+	4	-	-	-	4
RE-/RP+ / HER2 0	5	-	-	1	6
RE-/RP+ / HER2 1+	4	-	-	1	5
RE-/RP+ / HER2 3+	8	-	-	2	10
RE-/RP- / HER2 3+	4			1	5

3.2.5 Expresión tisular del AcM 14F7.

El reconocimiento tisular del AcM 14F7 en 240 tumores mamarios fijados en formol al 10% e incluidos en parafina, se localizó en el citoplasma de más del 95% de las células tumorales con una intensidad de moderada a intensa en el 100% de las neoplasias de mama estudiados.

El empleo de los TMA resultó de utilidad para el tamizaje del AcM 14F7, al facilitar el análisis de un gran número de casos en un corto tiempo (fig. 16.). No se encontró correlación del reconocimiento inmunohistoquímico del AcM 14F7 con los factores pronósticos analizados, ver tabla 14.

Tabla 14. Distribución de los factores pronósticos de los tumores en relación al reconocimiento del 14F7.

<i>Factores pronósticos</i>	<i>n</i>	<i>14F7 Positivo n(%)</i>
Edad < 50 >50	240	127(53.0) 113(47.0)
Dimensión mayor del tumor < 20 21- 49 50 ó mas	240	120(50.0) 107(44.4) 13(16.8)
Ganglios axilares metastásicos 0 1-3 4-9 10 y más	240	23(9.7) 84(35.0) 96(40.0) 37(15.3)
Grado Nuclear I II III	240	99(41.2) 111(46.3) 30(12.5)
Grado histológico I II III	240	77(32.2) 122(50.9) 41(16.9)
Estadio clínico I II III IV	240	79(33.0) 127(53.0) 23(9.4) 11(4.6)

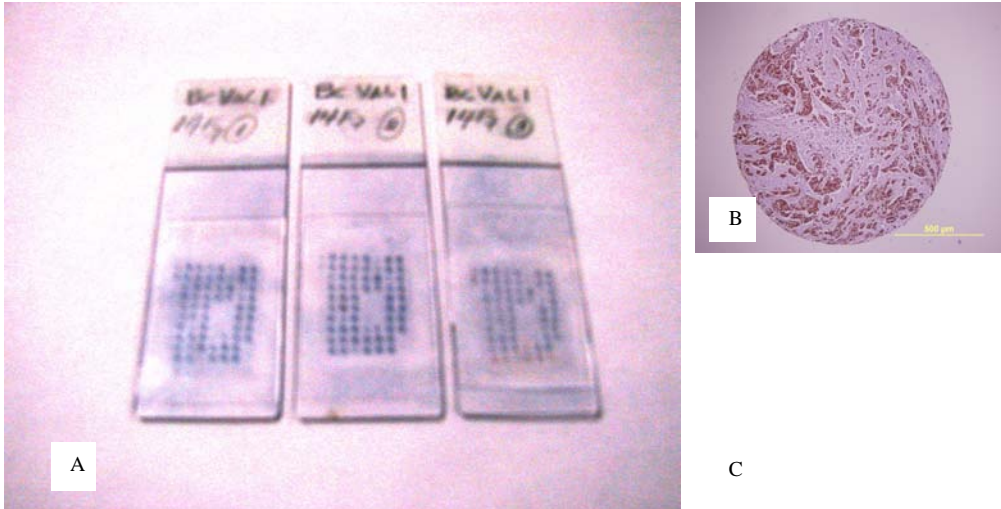


Fig. 16 Bloque de microarreglos tisulares (TMA) de tumores malignos mamarios. A. Obsérvese los cortes de tejidos del multibloque de 80 fragmentos. B y C. Imagen microscópica del reconocimiento del AcM 14F7.

3.3 Biodistribución del 14F7. Estudio inmunocentellográfico.

La pureza radioquímica del AcM radioconjugado fue mayor de 93%. Al compararse los resultados de la Inmunocentellografía con los de la histopatología, se encontró que: en el grupo I (0.3 mg) de los 5 pacientes estudiados, 2 se consideraron falsos negativos por no visualización del tumor mamario, una paciente no consintió operarse, por lo que no se obtuvieron resultados histopatológicos ni inmunohistoquímicos. Todos los tumores del grupo II (1mg) acumularon el radioconjugado en el tumor mamario (verdaderos positivos). Del grupo III (3 mg) sólo un tumor acumuló el radiofármaco, de los tres restantes, dos fueron falsos negativos y 1 verdadero negativo con diagnóstico histopatológico de enfermedad fibroquística de la mama Tabla 15.

Tabla 15. Hallazgos histológicos, radioinmunocentellográficos e inmunohistoquímicos en las pacientes incluidas en el estudio.

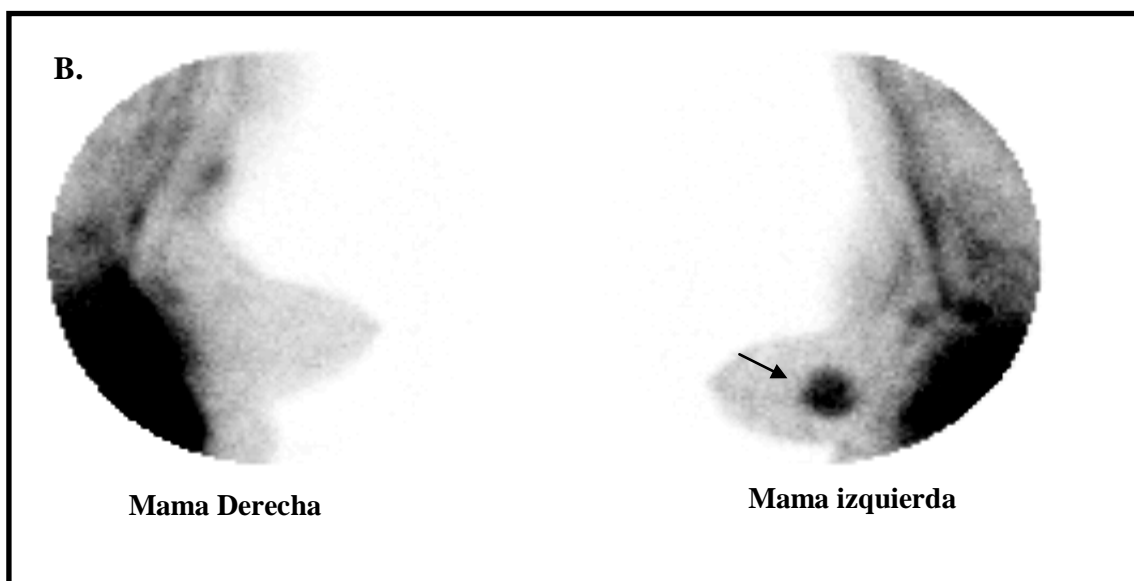
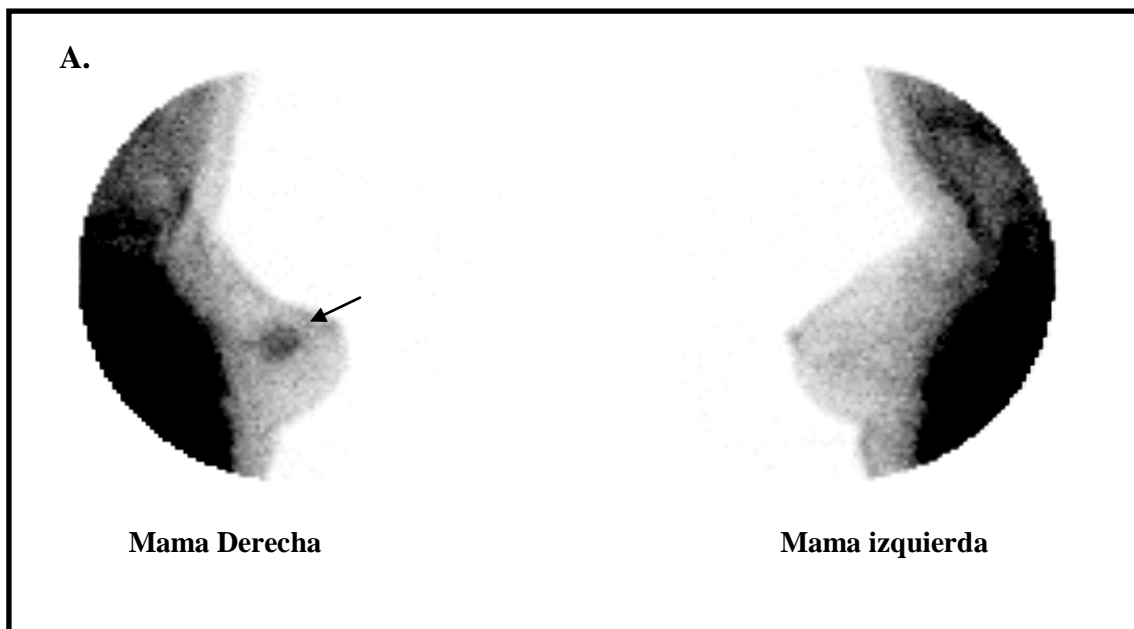
Pacientes (Grupo)	RIC	HP	RIC/HP	14F7	HER2	RE
1(I)	Positivo	CDI	VP	2+	0	+
2(I)	Positivo	CDI	VP	2+	0	+
3(I)	Positivo	NA	NA	NA	NA	NA
4(I)	Negativo	CLI	FN	2+	0	+
5(I)	Negativo	CDI	FN	1+	3+	+
6(II)	Positivo	CDI	VP	1+	0	+
7(II)	Positivo	CDI	VP	3+	0	-
8(II)	Positivo	CDI	VP	/2+	1+	+
9(II)	Positivo	CDI	VP	2+	3+	+
10(II)	Positivo	CDI	VP	2+	0	+
11(III)	Negativo	CDI	FN	2+	1+	+
12(III)	Negativo	CLI	FN	2+	0	+
13(III)	Negativo	EFQ	VN	0	0	+
14(III)	Positivo	CDI	VP	2+	0	+

Leyenda. VP verdadero positivo; FN falso negativo; VN verdadero negativo; NA no aplicable. CDI carcinoma ductal Invasivo, CLI carcinoma lobular invasivo y EFQ Enfermedad fibroquística

El estudio IHQ mostró reconocimiento del AcM 14F7 en todos los cánceres mamarios, fue interesante observar la ausencia de tinción en la enfermedad fibroquística (lesión benigna). En tejido fresco marcó la membrana citoplasmática y/o el citoplasma en más del 95% de las células tumorales (Fig.17B y C.), en el tejido fijado en formol e incluido

en parafina se observó fundamentalmente marcaje citoplasmático, aunque en un número reducido de casos se evidenció inmunotinción de membrana citoplasmática (fig. 17D y E.) Tabla 15.

En la Fig. 18. se observa la inmunolocalización del tumor mamario por el ^{149}Tc , nótese la especificidad del marcaje que se correlaciona con la imagen IHQ . Fig.18A y B. Fig 18. Imagen de la biodistribución in vivo del ^{149}Tc A) Dosis 0.3 mg, B) Dosis 1 mg.



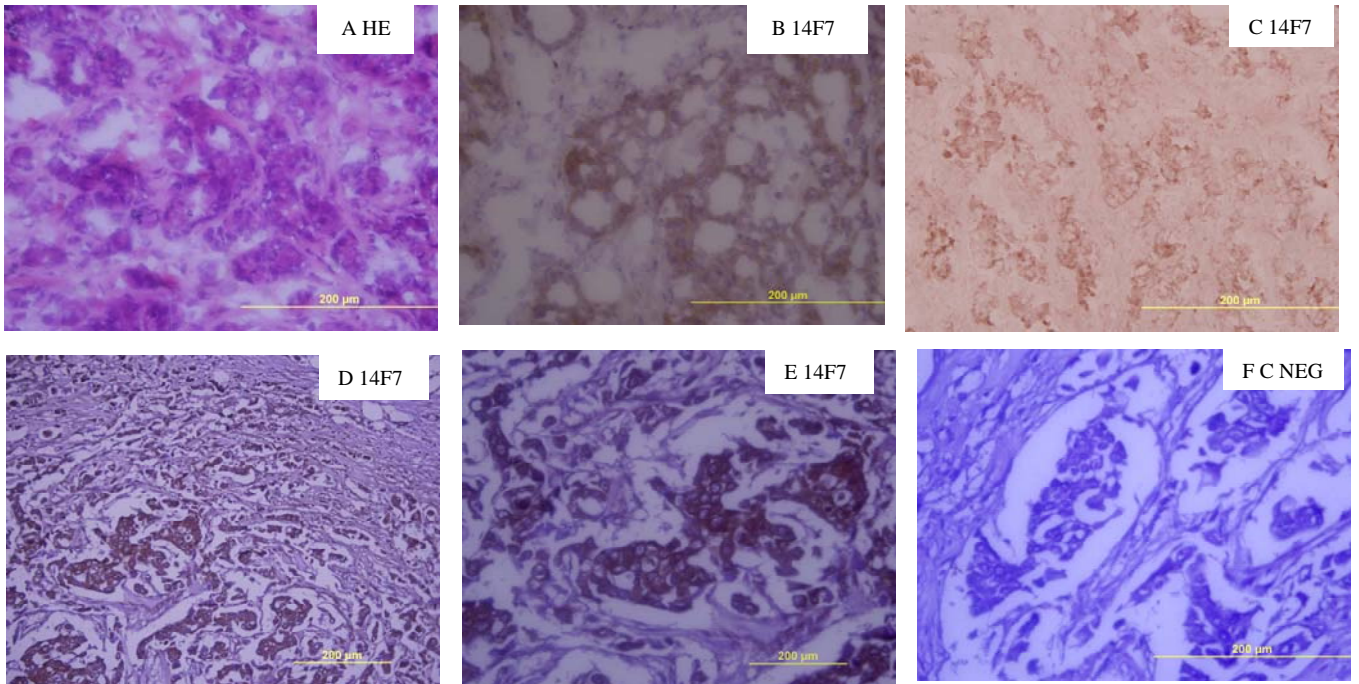


Fig. 17 Se observa el reconocimiento tisular del AcM 14F7 en tejido fresco. A. muestra el tumor coloreado con HE. B. inmunotinción con el AcM contrastada con hematoxilina de Mayer. C. inmunotinción sin contrastar. Nótese el marcaje del citoplasma y de la membrana citoplasmática que se aprecia mejor sin el contraste del tejido. Las siguientes imágenes se corresponden con el tejido tumoral mamario incluido en parafina: D y E AcM 14F7 con un marcaje citoplasmático intenso que en algunos grupos de células tumorales también delimita la membrana. F anticuerpo no relacionado como control negativo.

El 92.3% de los 13 tumores evaluados en este ensayo clínico resultaron RE positivos, y de ellos el 85% también fueron HER2 negativos, ver tabla 15.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.

En este capítulo se discuten los principales resultados de la investigación realizada, siguiendo el orden de presentación del capítulo precedente. Se basa en la comparación de hallazgos entre los estudios aquí presentados y los realizados por otros autores. A esto se le adiciona la experiencia clínica y la bibliografía consultada.

En cáncer, el conocimiento preciso de la extensión de la enfermedad y de las características biológicas de la misma, constituye el arma más valiosa para determinar el pronóstico y la conducta terapéutica a emplear (Singletary y cols, 2002; White y cols., 2003; Wilkinson y cols, 2003).

El diagnóstico y el tratamiento son definiciones de trascendental importancia, a su vez el pronóstico tiene un impacto relevante en los resultados del tratamiento y en la selección del esquema más conveniente (Gospodarowicz y cols, 2001; Hayes DF., 2005).

El análisis de los factores pronósticos es un proceder esencial. El hecho de presentar un tamaño de muestra diferente para cada uno de ellos en este estudio, no fue un problema porque se consideró la muestra con la que se realizó la hipótesis una submuestra al azar de la muestra total, con un tamaño lo suficientemente grande para utilizar las pruebas de hipótesis paramétricas y obtener una potencia adecuada. El efecto de la pérdida de datos si existiera, entonces implicaría una pérdida de potencia en los casos que se acepte H_0 . En particular en este trabajo sólo se acepta H_0 en el 16,6 % de todas las pruebas realizadas. En los análisis ejecutados con el menor valor del tamaño de muestra, como

fue el diámetro mayor del tumor, se alcanzaron correlaciones de significación estadística. Los reportes de la literatura coinciden con estos resultados mostrados en este trabajo (Gospodarowicz y cols, 2001; Taucher y cols, 2003; Foo y cols, 2005; Traina y cols, 2006; Arriagada y cols, 2006).

4.1 Factores pronósticos y predictivos.

4.1.1 Factores pronósticos morfológicos y generales para cáncer de mama.

4.1.1.1 Subtipo histológico.

En la distribución de los subtipos histológicos de la muestra estudiada los CDI NOS fueron los más abundantes, seguidos de los CLI invasivos. Los tipos especiales de carcinomas invasivos que incluyen los carcinomas medulares, los mucinosos y los papilares se encontraron en una frecuencia mucho menor y las variedades raras como son el carcinoma inflamatorio, el metaplásico y la enfermedad de Paget estuvieron muy escasamente representadas. De manera general, la distribución encontrada se corresponde con las cifras reportadas para otras series (Viale G., 2005).

El subtipo histológico se ha clasificado como un factor pronóstico importante, aunque la información más valiosa la suministra cuando se asocia con el GH. Se sabe que para los CDI NOS, que representan aproximadamente el 70% de las neoplasias mamarias, el GH y el tamaño del tumor constituyen las variables más importantes (Soerjomataram y cols, 2008).

El CLI se considera generalmente igual que el CDI_{NOS} por presentar un comportamiento similar en cuanto al pronóstico, características biológicas y el tratamiento (Page DL., 2003; Arpino y cols. 2004). De los subtipos de CLI existentes,

sólo el patrón clásico está considerado de mejor pronóstico cuando se compara con el CDI_{NOS} (Gospodarowicz y cols, 2001; Bland and Copeland, 2004).

Existen controversias entre los diferentes grupos de expertos en cuanto al papel del subtipo histológico como factor pronóstico. Los datos de la literatura muestran que los subtipos histológicos más favorables son los CDI tipos especiales, pero la baja proporción en que se presentan, influye en la significación estadística del análisis desestimando su valor como factor pronóstico (Fitzgibbons y cols, 2000, Domínguez y cols, 2001, Goldhirsch y cols, 2009).

En la guía cubana de diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama, al igual que en otros grupos de expertos, el subtipo histológico no se incluye en el grupo de factores pronósticos (Camacho y cols, 2007, Goldhirsch y cols, 2005).

4.1.1.2 Grado histológico y nuclear.

En la presente serie encontramos un predominio del grado histológico y nuclear II y III, lo que clasifica la muestra con un nivel de riesgo de intermedio a alto. Estos factores pronósticos definen la extensión microscópica de la enfermedad y su análisis permite clasificar las pacientes a través de una relación directa entre su aumento y el aumento del riesgo de aparición de recidivas tumorales. Se observa una mayor supervivencia libre de eventos asociada a un menor grado histológico (Vincent-Salomon y cols, 2001; Frkovic-Grazio y Bracko, 2002; Warwick y cols, 2004; Arriagada y cols, 2006). Se ha visto que alrededor del 10% de los tumores de bajo grado tienen un período de recurrencia a 5 años, en tanto que el 30% de los de alto grado recurren en el mismo período de tiempo (White y cols, 2003).

4.1.1.3 Tamaño del tumor.

Los datos de este trabajo evidencian el predominio de tumores con un tamaño de mediano a pequeño, T2-T1 respectivamente, en más de la mitad de la muestra. Algunos autores consideran que en los tumores pequeños (T1) y de bajo grado nuclear, no se observan metástasis axilares y se asocian a grupos de mejor pronóstico, donde pudiera no ser necesario el vaciamiento axilar (Domínguez y cols, 2001).

El tamaño del tumor es un indicador pronóstico importante para las pacientes con cáncer de mama (Vorgias y cols, 2001; Arriagada y cols, 2006), y más aún para aquellas que no presentan metástasis ganglionares, donde este factor se comporta como la variable más potente para predecir recaída (Wilkinson y cols, 2003).

4.1.1.4 Ganglios axilares metastásicos.

Las pacientes con ganglios axilares metastásicos se encontraron en más de la mitad de la muestra. Su número es un factor pronóstico importante para establecer la conducta terapéutica en los tumores primarios de la mama (Warwick y cols, 2004) y aumenta el riesgo añadido de muerte (Aebi y cols, 2000). Se ha visto que alrededor del 70% de las pacientes con ganglios axilares metastásicos, presentarán enfermedad recurrente en un período no mayor de 10 años, y tendrán una disminución de la supervivencia relacionada con el número de ganglios metastásicos encontrados al momento del diagnóstico (Arriagada y cols, 2006).

En este estudio no tuvimos información de la existencia de micrometástasis, pero es importante señalar, que éstas se reportan en aproximadamente el 10% de las pacientes

con ganglios axilares negativos. Por considerarse este grupo de buen pronóstico (Ollila y Stizemberg., 2001), este tipo de información debería estar siempre disponible.

La aplicación de la tecnología del ganglio centinela, primer ganglio de drenaje del tumor, ha contribuido a la reclasificación de los tumores mamarios mediante la detección de los focos de micrometástasis empleando técnicas inmunohistoquímicas y ha disminuido la necesidad de realizar el vaciamiento ganglionar axilar (Veronesi y cols, 2003). El sistema TNM, ha incorporado nuevos epígrafes especiales que hacen referencia a las metástasis de pequeño calibre. Se ha incluido un grupo N0 de no afectación ganglionar cuando los grupos de células tumorales aisladas muestran un diámetro entre 0,2- 2 mm (Sobin y Wittekind, 2002).

4.1.1.5 Estadio clínico.

En la muestra predominó el estadio II. Al relacionarlo con los factores pronósticos y predictivos, su aumento se correlacionó con la disminución de la expresión tisular de RE y RP. No ocurrió lo mismo con el HER2, que no mostró correlación. En un cuarto de las pacientes de esta muestra pertenecientes al INOR, se evidenció que las diagnosticadas en los estadios tempranos I y II, tuvieron una mejor supervivencia libre de eventos que las del estadio III (Hernández R, 2008).

El estadio clínico es la forma resumida de expresar el pronóstico y se establece a través de la medición del tamaño del tumor (T), el número de ganglios axilares metastásicos (N) (Node) y las metástasis a distancia (M). Los cuales definen de manera anatómica la extensión de la enfermedad y se comportan individualmente como factores pronósticos,

pero su análisis como un todo, incrementa el poder clasificatorio de estas variables (Sobin y Wittekind., 2002).

4.1.1.6 Edad.

Las mujeres mayores de 50 años presentaron mayor expresión de los RH, evidenciando la relación entre el estatus menstrual y la dependencia hormonal del tumor. Para el HER2, el grupo de las mujeres con edad \leq de 40 años fue el que mayormente sobreexpresó esta molécula, no se asoció a la hormono dependencia y lo que habla a favor de la existencia de un mecanismo diferente de regulación de la proliferación celular en los tumores mamarios de este grupo.

Los resultados del análisis de la edad son muy controversiales, se ha definido como un factor pronóstico independiente, cuyo efecto está frecuentemente enmascarado por factores como: el estatus menopáusico, los diferentes esquemas de tratamiento y las enfermedades asociadas, entre otros (Soerjmataram y cols, 2008). El grupo de mujeres más jóvenes se considera con mayor probabilidad de que a su enfermedad se le asocien factores pronósticos negativos. Sin embargo, el tratamiento adyuvante disminuye el valor pronóstico negativo de la edad temprana y lo aumenta en las mujeres de mayor edad que presentan enfermedades concomitantes y reciben tratamiento adyuvante menos agresivo (Han y cols, 2004; Foo y cols, 2005).

En estudios que involucran grandes series de pacientes, se ha observado que las mujeres menores de 40 años de edad portadoras de cáncer de mama, generalmente presentan mayor riesgo de recidiva local (Zhou y cols, 2007; Bollet y cols, 2007), de aparición de

metástasis (Voogd y cols, 2001), desarrollan tumores menos diferenciados y muestran una menor expresión de receptores hormonales (Maggard y cols, 2003).

A pesar de estos resultados, aún no está claro el efecto de este factor en el pronóstico de las pacientes.

4.1.2 Receptores hormonales y HER2.

En el presente estudio se reporta por primera vez la expresión del RE, RP y el HER2 en las mujeres cubanas con cáncer de mama por inmunohistoquímica.

4.1.2.1 Receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

El RE se expresó en más de la mitad de los tumores estudiados, valor muy cercano al único reporte anterior existente realizado por Pascual y cols obtenido con el empleo del método bioquímico en la década de los 80 (Pascual y cols, 1983, 1984).

Se conoce que la expresión de este marcador es diferente en algunos grupos poblacionales. En las mujeres austriacas se ha reportado en el 80.6% (Joslyn SA., 2002), las norteamericanas blancas no hispanas tienen una expresión de 63,9% y las negras de 48.3% (Chu y cols, 2001). Por otro lado, las tailandesas presentan 53.4% (Lertsanguansinchai y cols, 2002) y las chinas tienen un rango de expresión entre 53% y 61.6%, según el estado pre y post menopáusico (Chow y HO., 2000). En algunos países la expresión de los RH está por debajo del 50%, como en el Medio Oriente. El Líbano reporta un 43% (Abadjian y Antoun., 1996), en Iraq 34.2% (al-Alwan y cols, 2000), en Arabia Saudita 33.3% (Samir y cols, 1995) y en Nigeria (África) se reporta 24% (Ikpatt y Ndoma-Egba, 2003).

Alrededor del 50 al 85% de los cánceres de mama son RE+ (Fulford y cols, 2002). La determinación de este receptor resulta indispensable, no solamente por su valor pronóstico, sino por su indiscutible valor predictivo de respuesta a la hormonoterapia, que se ha mantenido a través del tiempo (Jakesz R., 2004; Harris y cols, 2005; Ariazi y cols, 2006). Los tumores mamarios hormonosensibles son el blanco de los análogos de las hormonas luteinizantes, de las progestinas, de los estrógenos, andrógenos y especialmente de los antagonistas estrogénicos, entre los cuales el tamoxifen ha sido durante décadas y sigue siendo, la primera línea de tratamiento de los tumores primarios y de las metástasis que expresan los RH (Jordan VC., 2003).

En la muestra analizada el RE se correlacionó con factores de buen pronóstico como son: bajo grado nuclear e histológico, menor tamaño tumoral y menor número de ganglios axilares metastásicos. De manera general, las pacientes en estadios clínicos más tempranos mostraron una mayor expresión de este marcador. No se encontró relación con el número de ganglios metastásicos, aunque se observó una tendencia a la disminución de éstos en las pacientes cuyos tumores expresaban el RE.

El análisis de la correlación entre el RE y el subtipo histológico mostró en los CDI tipos especiales (carcinoma papilar y mucinoso) un elevado por ciento de positividad, así como en la enfermedad de Paget y en algunos casos de CDI_{NOS} y CLI en los cuales se asoció generalmente con GN y GH altos. Es de destacar la ausencia de expresión tisular del RE en el carcinoma medular. Estos resultados concuerdan totalmente con los reportes de expresión de este marcador para los diferentes tipos histológicos (Arihiro K., 2004).

En este estudio, encontramos la expresión de RP en alrededor de la mitad de la muestra. En otras poblaciones el RP se ha reportado en un rango que incluye valores desde 13.9 a 61.3% en los tumores primarios y metastásicos de la mama (Lertsanguansinchai y cols, 2002; Ikpatt y Ndoma-Egba., 2003). Al igual que para el RE, se observó una correlación inversa entre el RP y algunos de los factores morfológicos. La expresión del RP disminuyó al aumentar el tamaño tumoral, el grado nuclear e histológico.

El RP perdió su carácter de factor predictivo independiente en la década del 90 (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, 1992). En los años 2000 se retomó su estudio y la pérdida de su expresión se relacionó con un aumento en la señalización de los factores de crecimiento y de la agresividad del tumor (Baum y cols 2002, 2003; Bardou y cols, 2003; Cui y cols, 2005). La existencia de aproximadamente un 8% de pacientes RE- que responden a la hormonoterapia (Ikpatt y Ndoma-Egba., 2003), renovó el interés de estudiar la expresión tisular del RP y su relación con el espectro de respuesta a la terapia oncoespecífica.

En nuestros días, se ha restablecido la importancia del RP, redefiniéndose como un marcador predictivo de la actividad del RE, de los factores de crecimiento y además como un marcador indispensable para realizar la indicación de hormonoterapia en las pacientes con cáncer de mama (Konecny y cols, 2003; Pozzone y cols, 2006).

Los RH mostraron una correlación lineal directa, donde los mayores por cientos de expresión se encontraron cuando los dos receptores fueron positivos, seguido por la combinación donde ambos RH resultaron negativos y se encontró un grupo muy pequeño, RE - / RP+, el cual es muy controversial pero de innegable existencia. Las

frecuencias de estas combinaciones se corresponden con las reportadas a nivel internacional (Winstanley y cols, 1991, Arpino y cols, 2005, Dowsett y cols, 2006).

Este estudio mostró, que más de un tercio de los tumores mamarios de las mujeres cubanas tienen co-expresión de los RH, en tanto que una cantidad similar expresan al menos uno de estos dos receptores, por lo que el beneficio de la hormonoterapia sería posible en más de las dos terceras partes de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama en Cuba. En los tumores mamarios de la población blanca norteamericana está muy bien estudiada la expresión tisular de los RH, se reporta el 63.9% de los tumores con expresión de ambos RH y adicionalmente el 16.4% con al menos la expresión de uno de estos receptores, lo que prevé respuesta hormonal en el 80.3% de las pacientes pertenecientes a este grupo poblacional (Li y cols, 2002). Situación muy similar a la encontrada en este trabajo.

En la actualidad se considera que la presencia de ambos RH en un mismo tumor, aumenta la posibilidad de respuesta a los tratamientos hormonales hasta un 80% (Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group, 2005). Lo que reafirma la importancia de la determinación de RP en los tumores mamarios.

4.1.2.2 HER2.

Al analizar la expresión del HER2, el valor obtenido se incluye dentro del rango reportado internacionalmente para esta molécula (Taucher y cols, 2003; Sughayer y cols, 2006; Ayadi y cols, 2008). Los tumores con expresión 2+ constituyen el valor discordante por IHQ, para este grupo esta técnica es insuficiente para correlacionar la expresión de la proteína en la membrana citoplasmática con la amplificación del gen y

requieren de la realización de FISH. La aplicación de esta última tecnología en un pequeño número de tumores de este grupo 2+, evidenció su capacidad diagnóstica y facilitó la indicación de inmunoterapia con trastuzumab a las pacientes cuyos tumores presentaban amplificación del gen HER2, ratificando la necesidad de la aplicación de FISH para lograr mejor individualización del tratamiento.

Resultó interesante no sólo estimar el rango de positividad/sobreexpresión de este marcador en la muestra, sino también conocerlo en las diferentes regiones del país. Al concentrar la muestra en tres regiones fundamentales y considerar al INOR como una región independiente, encontramos un rango de expresión en cada una de las provincias estudiadas comprendido dentro de los valores reportados, lo que habla de un comportamiento semejante en todo el país.

El HER2 se expresó mayormente en el grupo de mujeres jóvenes y se correlacionó con el aumento del GN, el GH y del tamaño del tumor. No se encontró correlación con el estadio clínico y el número de ganglios axilares metastásicos, a pesar de ser este último el factor pronóstico más importante. Los resultados con relación a los ganglios axilares metastásicos son controversiales (Taucher y cols, 2003; Hayes DF., 2005; Almasri y Al Hamad., 2005).

En cuanto al subtipo histológico del tumor, el carcinoma ductal invasivo por ser el de mayor frecuencia, se relacionó con una mayor expresión del HER2 al igual que ocurre en otros estudios (Masood y Bui., 2002; Verdu y cols, 2005). El carcinoma medular mostró un por ciento de positividad elevado para HER2, lo que coincide con su característica de ser una entidad histológica de mayor agresividad y peor pronóstico. En

la enfermedad de Paget, la sobreexpresión de HER2 se reporta con alta frecuencia y en esta muestra se comportó de igual forma.

La sobreexpresión de la molécula de HER2 está reportada en tumores más agresivos, que se caracterizan por tener un alto índice de proliferación celular, mayor grado nuclear e histológico y ausencia de RH, por lo que se ha catalogado como un marcador de mal pronóstico cuya presencia es indicadora de un alto índice de recurrencia (Traina y cols, 2006). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio.

Al analizar la expresión combinada de los tres receptores, se confirmó la correlación negativa reportada para estos marcadores (Traina y cols, 2006; Selvarajan y cols, 2006). El RE+ RP+ y HER2-, fue el grupo más frecuente, a continuación se ubicaron los tumores con los tres receptores negativos conocidos como triple negativos, le siguió la combinación RE- RP- y HER2+ y por último, la de más baja frecuencia correspondió a la expresión positiva de los tres receptores.

Los resultados de esta serie, coinciden con numerosos estudios que reflejan una correlación inversa entre el HER2 y los RH, especialmente con el RE (Traina y cols, 2006; Selvarajan y cols, 2006). La sobreexpresión de HER2 explica la pérdida o la baja expresión de RE en mujeres portadoras de cáncer de mama HER2+, el crecimiento del tumor y las pobres respuestas clínicas a los tratamientos con Tamoxifen. (Chung y cols, 2002; Pietras RJ., 2003).

4.2 Tumores triple negativos (TN) y el EGFR1.

Los tumores TN se caracterizan por tener un comportamiento clínico agresivo y por no admitir las terapéuticas dirigidas contra una diana específica (Cleator y cols 2007), cuentan con la quimioterapia como la única opción de terapia sistémica. Su rango de aparición se encuentra entre el 10 y el 20% de todos los cánceres de mama (Haffty y cols, 2006; Carey y cols, 2007; Dent y cols, 2007; Rakha y cols, 2007; Tischkowitz y cols, 2007; Bauer y cols, 2007; Morris y cols, 2007). Otros autores refieren valores fuera de este rango hasta 22% (Cazzaniga y cols, 2007, Rhee y cols. 2007). Estas diferencias se han atribuido mayormente a los disímiles procedimientos empleados para la determinación del RE, RP y el HER2 (Kurebayashi J., 2009).

El estándar de oro de la clasificación molecular de los tumores lo constituye la técnica de microarreglos génicos (Rakha y cols, 2008), pero sus múltiples desventajas: el uso de tejido fresco, la complejidad del equipamiento necesario y su alto costo, han impedido que haya sido introducida como un arma diagnóstica de rutina para el manejo del cáncer de mama. La posible solución se ha encontrado al extrapolarla a la IHQ (Tang y cols, 2009).

La clasificación molecular ha dividido a los tumores mamarios en 5 grupos fundamentales, dos de ellos caracterizados por la expresión de RE (Luminal A y B) y los tres restantes sin expresión de RE (HER2, Basaloide (basal like) e inclasificados) (Sorlic y cols, 2001; van de Rijn y cols, 2002; Nielsen y cols, 2004; Brenton y cols, 2005).

Los tumores TN y los basaloides tienen una gran similitud por lo que con frecuencia se identifican como el mismo subtipo (Dent y cols, 2007; Diaz y cols, 2007). El panel IHQ descrito por Nielsen que incluye la determinación de la expresión de la citoqueratina (CK) 5/6 y del EGFR1, es el más aceptado para diferenciarlos (Nielsen y cols, 2004).

Al trabajar los tumores triple negativos de la muestra se encontró expresión del EGFR1 en casi la mitad del grupo evaluado, lo que concuerda con los valores reportados de expresión de esta molécula que oscilan entre el 13 y el 52% para este grupo de tumores (Altundag y cols, 2007; Colleoni y cols, 2008; Rakha y cols, 2008; Yamamoto y cols, 2009; Pintens y cols, 2009). El análisis de un pequeño grupo de tumores no TN seleccionados de la muestra analizada, mostró positividad al EGFR1 siempre que no se expresaba el RE, independientemente del estatus de los otros dos receptores. Se ha reportado la sobreexpresión de EGFR1 en tumores no triple negativos y estos hallazgos se han relacionado con tumores mamarios negativos al RE y con características clínico-patológicas adversas, tales como alto grado nuclear e histológico (Albanell y Ross, 2005; Tsutsui y cols, 2002; Colleoni y cols, 2008; Pintens y cols en el 2009).

En este trabajo, se evaluó la expresión del EGFR1 con el AcM murino ior egf/r3 (CIMAB, S.A) y se comparó con los resultados obtenidos al emplear el juego de reactivos diagnóstico comercial EGFR pharm DXTM de Dako. El AcM murino ior egf/r3 cubano mostró una especificidad máxima dada por el reconocimiento de todos los tumores con intensidad 2+ y 3+ y una sensibilidad alta que no alcanzó el valor máximo, por el no reconocimiento de los que expresaban débilmente el EGFR1. Estas diferencias no influyeron en la detección de la sobreexpresión de la molécula, lo que evidenció el valor predictivo positivo del AcM cubano y su posible empleo como

herramienta diagnóstica efectiva de la sobreexpresión del EGFR1 en los tumores mamarios.

4.3 Gangliósidos y el AcM 14F7.

Son glicoesfingilípidos que contienen ácido siálico y están expresados en la membrana celular de los vertebrados. Han despertado gran interés durante más de 20 años como blancos potenciales para la inmunoterapia y el diagnóstico, dado su papel en el crecimiento tumoral (Stults y cols, 1989).

Los ácidos neuroamínicos en su forma Nacetilada (NeuAc) y Nglicolilada (NeuGc) son los más frecuentes tipos de ácido siálico encontrados en los vertebrados. En general, el (NeuGc) no se expresa en tejidos normales de humanos y pollos (Diaz y cols, 2009) y se ha reportado que anticuerpos generados contra esta molécula reconocen algunos tumores humanos (Carr y cols, 2000).

Recientemente se han encontrado niveles altos de (NeuGc)GM3 en cáncer de mama humano, utilizando la técnica de espectrofotometría de masa y cromatografía de gas (Marquina y cols, 1996). Hallazgo que convirtió a esta molécula en un blanco atractivo para la terapia del cáncer de mama.

El AcM 14F7 se une específicamente al gangliósido (NeuGc)GM3 y no reconoce ningún otro Nglicolil, Nacetil, ni otro glicolípido sulfatado como se demostró por ELISA y por inmunotinción en cromatogramas de capa fina (Marquina y cols, 1996).

La evaluación del AcM 14F7 en tumores mamarios frescos y fijados en formol al 10% e incluidos en parafina, reconoció casi la totalidad de las células tumorales con una intensidad que varió de moderada a intensa en todos los casos evaluados. Razón por la cual no se correlacionó con ninguno de los factores pronósticos estudiados. Previos reportes han confirmado que el AcM 14F7 reconoce específicamente al NeuGcGM3 y que esta molécula no se expresa en tejido fresco adulto normal humano (Carr y cols, 2000), lo que constituyó la primera evidencia in vitro de su potencial utilidad como diana terapéutica.

El estudio de la distribución in vivo del 14F7 ^{99m}Tc en pacientes con cáncer de mama demostró que su administración por vía endovenosa a dosis hasta de 3 mg es bien tolerada, al igual que se ha documentado para otros AcMs (Iznaga y cols, 1998). Los mejores resultados se alcanzaron en el grupo que recibió la dosis de 1mg, donde se observó una correspondencia entre los resultados de la Inmunocentellografía con la histopatología, que se evidenció con el reconocimiento de todos los tejidos tumorales, tanto in vivo como in vitro, como se espera de una molécula heterófila al hombre.

Los resultados de la evaluación inmunohistoquímica del AcM en tejidos frescos y en los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, fueron diferentes. Los tejidos frescos exhibieron un reconocimiento bien definido de la membrana citoplasmática que se correlaciona con la distribución in vivo del AcM 14F7, que logra una imagen nítida del tumor. En el tejido fijado es posible que ocurra extracción del gangliósido durante el procesamiento para su inclusión en parafina, lo que pudiera explicar que la expresión en membrana se reduzca en algunos tumores y en otros esté ausente. La biosíntesis del gangliósido ocurre en el retículo endoplasmático rugoso, de ahí pasa al complejo de

Golgi para expresarse en la membrana citoplasmática (Huwiler y cols., 2000), lo que justificaría su reducción o pérdida de expresión a nivel de la membrana y apoyaría su permanencia en el citoplasma celular.

El empleo de la inmunocentellografía con el AcM 14F7 pudiera ser un método atractivo para seleccionar pacientes de cáncer de mama tributarias de tratamiento con la vacuna contra el gangliósido heterófilo NeuGcGM3, la cual ha demostrado incrementar la inmunogenicidad del gangliósido tolerado en las pacientes (Mesa y cols, 2004, Lage y cols, 2005). Sin embargo, sería interesante aumentar la casuística a fin de poder calcular la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de este método.

Los tumores de las pacientes incluidas en el ensayo in vivo, al ser evaluados por IHQ con los marcadores de uso estándar para cáncer de mama en su inmensa mayoría fueron RE+ y HER2-, tributarios de tratamiento hormonal.

4.4 Discusión General.

En el cáncer de mama, la cirugía y/o la radioterapia constituyen el tratamiento de la enfermedad local, mientras que la quimioterapia, la terapia endocrina y la biológica, por separado o combinadas entre sí, tributan al tratamiento de la enfermedad sistémica (Tavasoli F.A, 2003).

Los factores pronósticos se han utilizado durante toda la historia natural del cáncer mamario: en la quimioprevención, en los tratamientos neoadjuvantes, quirúrgico y adyuvante, así como en la enfermedad recurrente (Pegram y cols, 2004; Piccart y cols, 2005). Dentro de ellos, los morfológicos: el tamaño del tumor, el número de ganglios

axilares metastásicos y las metástasis a distancia, son los que definen de manera anatómica la extensión de la enfermedad, y se evalúan a través del sistema TNM (Sobin y Wittekind, 2002).

Para esta serie, la edad se estratificó en dos grupos diferentes. Las mujeres del grupo de mayor edad presentaron mayor expresión de los RH, evidenciando la relación entre el estatus menstrual y la dependencia hormonal del tumor. Sin embargo, para el HER2, el grupo de las mujeres más jóvenes fue el que mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión del marcador.

Los receptores hormonales, RE y RP, fueron los primeros marcadores de cáncer de mama aprobados por el comité de patólogos americanos para ser evaluados por inmunohistoquímica y son moléculas que han mantenido su valor pronóstico y predictivo de respuesta a la terapia a lo largo de los años.

El RE es un débil marcador pronóstico de los resultados clínicos, pero es un fuerte factor predictivo de la respuesta basada en la terapia con tamoxifeno. La expresión de los RE durante mucho tiempo se consideró que estaba presente en dos tercios de los cáncer de mama, estudios más recientes sugieren que su incidencia puede estar cercana al 70% (Nadji y cols, 2005). El estatus de los RE está fuertemente influenciado por el grado histológico, casi todos los grados tumorales I son RE positivos (Nadji y cols, 2005; Anderson y cols, 2002; Gown MA., 2008).

En la actualidad el análisis del RP está validado clínicamente y se asocia independientemente con la supervivencia libre de eventos y la supervivencia global (Bardou y cols, 2003; Gown MA., 2008).

El conocimiento de la sobreexpresión de HER2 en los tumores mamarios, reagrupa a las pacientes como de peor pronóstico y tributarias de una terapia más personalizada. El HER2 es uno de los factores predictivos de respuesta a la oncoterapia establecido más recientemente para el cáncer de mama (Bast y cols, 2001). Su valor radica fundamentalmente en la aplicación del Trastuzumab en la enfermedad metastásica (Slamon y cols, 2001) y en tiempos más recientes en su utilización en el tratamiento adyuvante (Piccart y cols, 2005). Además, constituye un indicador de resistencia a los esquemas de tratamiento que no contienen antraciclinas, como el CMF (Ciclofosfamida, Metotrexate, 5 Fluoracilo) y de mejor respuesta a los inhibidores de aromatasa que al tamoxifen (Menard y cols, 2001; Ellis y cols, 2001), lo cual refuerza la necesidad de su determinación en el cáncer de mama.

Desde hace casi dos décadas la determinación del perfil génico de los tumores ha ido aportando evidencias que han propiciado el cambio de la clasificación histológica hacia una perspectiva diferente, la clasificación molecular (Tang y cols, 2009). Las desventajas del alto costo y la complejidad de esta tecnología, han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas que permitan obtener resultados comparables de una manera más sencilla (Reis-Filho y cols, 2008). Es la inmunohistoquímica la que ha logrado con pocos marcadores determinar el perfil génico de los tumores. (Nielsen y cols, 2004).

Por esta nueva clasificación los tumores se dividen en 5 grupos fundamentales (Brenton y cols, 2005, Tang y cols, 2009), de los cuales dos son RE+ (Luminal A y B) tributarios de tratamiento hormonal y considerados de buen pronóstico. Un grupo HER2 positivo que puede beneficiarse de la inmunoterapia con el AcM Trastuzumab tanto en el tumor primario como en el metastásico y son tumores agresivos de mal pronóstico. Los llamados triple negativos por otras clasificaciones, que aquí se subdividen en basaloides y en no clasificados. Los basaloides (basal like) son tumores TN pero presentan expresión de las CK basales 5/6 y pueden o no expresar el EGFR1 y finalmente el grupo no clasificado que se corresponde con tumores también triple negativos y que a su vez son CK5/6 y EGFR1 negativo (Tang y cols, 2009).

Estos dos últimos grupos poseen muy pocas posibilidades terapéuticas, están limitados sólo al uso de la quimioterapia con muy pobres resultados clínicos (Carey y cols, 2007), los que son EGFR1 positivos pudieran beneficiarse con la inmunoterapia pasiva y activa contra este blanco y con la terapia basada en el (NeuGc)GM3. El grupo de los no clasificados pudiera ser beneficiado con el uso de esta última opción terapéutica.

En resumen los factores pronósticos validados actualmente son el RE, RP y el HER2, entre otros potenciales blancos terapéuticos se encuentra el EGFR1. Para el país esta molécula reviste una especial importancia por contar con un AcM murino cubano que ha demostrado en el desarrollo de este trabajo y al ser comparado con el estándar de oro de la Dako una especificidad y un VPP de 100%, una sensibilidad de 68% y un VPN de 73%, valores que pueden mejorarse con el desarrollo del producto. La existencia de su contrapartida humanizada permitirá implementar ensayos clínicos con esta molécula y evaluar su efecto terapéutico en el grupo de tumores triple negativos que expresan el

EGFR1. Este anticuerpo viene utilizándose en otras localizaciones tumorales con buenos resultados en ensayos clínicos en Cuba y en el mundo (Crombet y cols, 2003). Además se cuenta con preparados vacunales obtenidos por inmunización con el ligando del receptor como una forma de inmunoterapia activa, que logra la producción de anticuerpos que bloquean la unión ligando – receptor (Rodríguez y cols, 2010).

Igualmente al poseer el AcM 14F7 murino para el diagnóstico *in vitro*, la posibilidad de emplearlo marcado con ^{99m}Tc en inmunocentellografía para la localización *in vivo* del tumor, su contrapartida quimérica y/o humanizada para ser empleada en la inmunoterapia pasiva y el preparado vacunal usando como antígeno la molécula (NeuGc)GM3, tendrían las pacientes incluidas en estos dos últimos grupos de muy escasas opciones terapéuticas, otras posibilidades potenciales de tratamiento personalizado.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

CONCLUSIONES.

1. La expresión del RE, RP y del HER2 en los tumores mamarios de mujeres cubanas se reporta por primera vez empleando la técnica de inmunohistoquímica. Su frecuencia se incluye dentro del rango reportado internacionalmente.
2. La hormono-dependencia del tumor se asoció a: bajo grado nuclear e histológico, menor tamaño tumoral, mayor edad de las pacientes, y a los estadios clínicos tempranos, mientras que los tumores no hormono-dependientes se asociaron a: sobreexpresión de HER2, mayor tamaño tumoral, alto grado nuclear e histológico y mayor frecuencia en las mujeres jóvenes.
3. El AcM 14F7 mostró una expresión ampliamente distribuida e intensa en los tumores mamarios y no se encontró correlación con los factores pronósticos.
4. In vivo el AcM 14F7 ^{99m}Tc demostró ser bien tolerado sin evidencias de toxicidad y capaz de detectar los tumores primarios de la mama.
5. El AcM ior egf/r3 murino al ser comparado con el juego de reactivos diagnóstico comercial de la Dako, reconoció del EGFR1 en los tumores triple negativos con una máxima especificidad y valor predictivo positivo, así como una sensibilidad y valor predictivo negativo altos.
6. El reconocimiento de los AcMs 14F7 e ior egf/r3 en los tumores Triple Negativos, abre una nueva posibilidad terapéutica dirigida contra estos dos blancos.

RECOMENDACIONES

1. Continuar los ensayos clínicos en cáncer de mama para la evaluación de los AcMs: 14F7 quimérico o humanizado, el Nimotuzumab (versión humanizada del ior egf/r3) y de los preparados vacunales, estratificando las pacientes acorde a los grupos determinados por los estudios inmunohistoquímicos.
2. Preparar un juego de reactivos diagnóstico cubano para la determinación tisular del EGFR a partir del AcM murino ior egf/ r3 que pueda sustituir el de la Dako.
3. Extender los estudios inmunohistoquímicos hacia algunos de los hospitales de otras provincias con un panel mínimo de AcM suficientes y necesarios para la evaluación de las pacientes portadoras de cáncer de mama.
4. Implementar un laboratorio donde se realice de manera centralizada la evaluación de la amplificación del gen HER2, por técnicas de hibridación in situ fluorescente, lo que permitiría rescatar pacientes que podrían ser tributarias de tratamiento personalizado con el AcM humanizado Trastuzumab.
5. Establecer un Sistema de Control y Garantía de Calidad para los procesos y los reactivos empleados evaluado en un laboratorio central, que dictamine la calidad de los resultados obtenidos y emitidos por cada uno de los laboratorios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. **Abadjian G. and Antoun R.** Breast carcinoma an evaluation of hormone receptors and pS2, erb-B2, P-glycoprotein and Ki-67 markers. *J Med Liban* 44: 10-15, 1996.
2. **ABD el- Rehim DM.,** Pinder SE., Paish CE., et al. Expression and coexpression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 91(8): 1532-42, 2004.
3. **Aebi S.,** Gelber S., Castiglione-Gertsch M., et al. Is chemotherapy alone adequate for young women with oestrogen receptor-positive breast cancer? *Lancet* 355: 1869–74, 2000.
4. **Albanell J. and Ross J.** Epidermal growth factor receptor and other growth factors and receptors. in: Ross, J.S, G.N. Hortobagyi (eds.), *Molecular oncology of breast cancer*. pp. 259-61. Jones and Bartlett Publishers: Sudbury, 2005.
5. **al-Alwan NA.,** al-Kubaisy W., al-Rawaq K. Assessment of response to tamoxifen among Iraqi patients with advanced breast cancers. *East Mediterr Health Journal* 6: 475-82, 2000.
6. **Almasri NM. and Al Hamad M.** Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan. *Breast Cancer Res* 7: 598-604, 2005.
7. **Allred DC.** Issues and update: evaluating estrogen receptor alfa, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol* 23: s52-s59, 2010.

8. **Altundag K.**, Harputluoglu H., Aksoy S., et al. Potential chemotherapy options in the triple negative subtype of breast cancer. *J Clin Oncol.* 25: 1294-95, 2007.
9. **Anderson WF.**, Chatterjee N., Ershler W., et al. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Breast Cancer Res Treat* 76: 27–36, 2002.
10. **Anuario Estadístico del Ministerio de Salud Pública de Cuba.** www.infomed.sld.cu/servicios/estadística, 2009.
11. **Ariazi EA.**, Ariazi JL., Codera F., et al. Estrogen receptor as therapeutic agent in breast cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 181-202, 2006.
12. **Arihiro K.** Pathological approach to evolving prognostic and predictive factors in breast cancer. *Breast cancer* 11(4): 349-55, 2004.
13. **Arriagada R.**, Le MG., Dunant A., et al. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinic pathological factors and the risk of death in each 5-year period. *Cancer* 106: 743–750, 2006.
14. **Arora A. and Scholar EM.** Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp. Ther* 315: 971-79, 2005.
15. **Arpino G.**, Bardou VJ., Clark GM., et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumour characteristics and clinical outcome *Breast Cancer Res* 6(3): 149-56, 2004.
16. **Arpino G.**, Weiss H., Lee AV., et al. Estrogen receptor positive, progesterone receptor negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Nat Can Inst* 97 (17): 1254-60, 2005.

17. **Avadi L.**, Khabir A., Amori H., et al. Correlation of HER-2 over expression with clinical-pathological parameters in Tunisian breast carcinoma. *W J Surg Oncol* 6: 100-112, 2008.
18. **Bardou VJ.**, Arpino G., Elledge RM., et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases, *J. Clin. Oncol.* 21: 1973-79, 2003.
19. **Baselga J.**, Seidman, AD., Rosen PP., et al Her2 over expression and paclitaxel sensivity in breast cancer. Therapeutic implications. *Oncology* 11: 43-8, 2006.
20. **Bast RC.**, Ravdin P., Hayes DF., et al. Update recommendations for the use of tumour markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines for the American Society of Clinical Oncology. *J Clin. Oncol* 19: 1865-78, 2001.
21. **Bauer KR.**, Brown M., Cress RD., et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* 109: 1721-28, 2007.
22. **Baum M. and Buzdar A.** The current status of aromatase inhibitors in the management of Breast cancer. *Sur Clin North Am* 83: 973-94, 2003.
23. **Black MM. and Speer FD.** Nuclear structure in cancer tissues. *Surg Gynecol Obstet* 105: 97-102, 1957.
24. **Bland KI. and Copeland EM.** (ed.) *The Breast, comprehensive management of benign and malignant disorders.* 3rd ed. vol 1: 19-64, 2004.

25. **Bollet MA.**, Sigal-Zafrani B., Mazeau V., et al. Age remains the first prognostic factor for loco-regional breast cancer recurrence in young (<40 years) women treated with breast conserving surgery first. *Radiother Oncol.* 82(3): 272-280, 2007.
26. **Bloom K.** Data presented at: United States and Canadian academic of Pathology. Proceeding of the Annual Meeting. Atlanta, USA 11-17, 2006.
27. **Brenner H. and Hakulinen T.** Are patients diagnosed with breast cancer before age 50 ever cure? *J Clin. Oncol* 22: 432-38, 2004.
28. **Brenton JD.**, Carey LA., Ahmed AA., et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 23: 7350-60, 2005.
29. **Buzdar A.**, Vergote I., Sainsbury R. The impact of hormone receptor status on the clinical efficacy of the new- generation aromatase inhibitors: a review of data from the first line metastatic disease trials in postmenopausal women. *Breast J* 10: 211-17, 2004.
30. **Camacho R.** Targeting cancer with the resources at hand. *Medicc Review*, summer 11: 13-15, 2009.
31. **Camacho R.**, Marinello JJ., Soriano JL., et al. Guía de diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama Monografía. Versión Electrónica. Enero (V-1 a) Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Habana. Cuba, 2007.
32. **Carey LA.**, Dees EC., Sawyer L., et al. The triple negative paradox: primary tumours chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 13: 2329-34, 2007.

33. **Carr A.**, Mullet A., Mazorra Z., et al. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-Glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 19(3): 241- 47, 2000.
34. **Carr A.**, Mesa C., Arango MC., et al. In vivo and in vitro anti-tumor effect of 14F7 monoclonal antibody. *Hybridoma and Hybridomics*. 21: 6-11, 2002.
35. **Carr A.**, Rodríguez E., Arango MC, et al. Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *J Clin Oncol*; 21(6): 1015-21, 2003.
36. **Cazzaniga ME.**, Mustacchi G., Pronzato P., et al. Pathological characteristics and clinical outcome in triple-negative breast cancer (BC) patients (PTS): Results from the NORA study. *Journal of Clinical Oncology. ASCO Annual Meeting Proceedings Part I*. 25(18): 11014, 2007.
37. **Chou H.**, Takematsu H., Díaz S., et al. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo- Pan divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 11751-56, 1998.
38. **Chu KC.**, Anderson WF., Fritz A., et al. Frequency distributions of breast cancer characteristics classified by estrogen receptors and progesterone receptor status for eight racial/ethnics groups. *Cancer* 92: 37-45, 2001.
39. **Chung Y.**, Sheu M., Yang S., et al. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between HER-2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 97: 306–312, 2002.
40. **Chow LW. and Ho P.** Hormonal receptor determination of 1052 Chinese breast cancers. *J Surg Oncol* 75: 172-75, 2000.

41. **Cleator S.**, Heller W., Coombes RC. Triple negative breast cancer, therapeutic options. *Lancet Oncol.* 8: 235-44, 2007.
42. **Colleoni MG.**, Viale D., Zahrieh D., et al. Expression of ER, PgR, HER1, HER2, and response: a study of preoperative chemotherapy. *Annals of Oncology* 19: 465-72, 2008.
43. **Crombet T.**, Casaco A., Iznaga N. Monoclonal antibody h-R3 Drugs of the Future 28 (9): 847-53, 2003.
44. **Cui X.**, Schiff R., Arpino G., et al. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J. Clin. Oncol* 23: 7721-35, 2005.
45. **Dent R.**, Trudeau M., Pritchard KI., et al. Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13: 4429-34, 2007.
46. **Diaz KL.**, Cryns VL., Symmans WF., et al. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profile to clinical practice. *Adv Anat Pathol* 14: 419-30, 2007.
47. **Diaz SL.**, Padler-Karavani V., Ghaderi D., et al. Sensitive and specific detection of the non-human sialic acid N-Glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products. *PLoS ONE* www.plosone.org January 4(1): 4241-51, 2009.
48. **Domínguez MA.**, Marcos M., Meiriño R., et al Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama temprano *anales@fnavarra.es* S1, 2001.
49. **Dowsett M.**, Houghton J., Iden C., et al . Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor,

- progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol* 17: 818-26, 2006.
50. **Dowsett M.**, Cuzick J., Wale C., et al. Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: a hypothesis-generating study. *J. Clin. Oncol* 23: 7512-17, 2005.
51. **Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group.** Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. *Lancet* 339: 75-81, 1992.
52. **Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group.** Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365: 1687-1717, 2005.
53. **Eerola H.**, Vabteristo P., Sarantaus I., et al. Survival of breast cancer patients in BCRA1, BCRA2, and non –BCRA1/2 breast cancer families: a relative survival analysis from Finland. *Int J Cancer* 93: 368-72, 2001.
54. **Elledge RM. and Allred DC.** Clinical aspects of estrogen and progesterone receptors. En: Harris J.R, Lippman M.E., Morrow. M., Osborne C.K (eds). *Diseases of the breast*, vol, 3rd edn. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 602-17, 2004.
55. **Ellis MJ.**, Coop A., Sigh B., et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for erb B-1 and/or erb B-2 positive, estrogen receptorpositive primary breast Cancer. Evidence of Phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 19: 3808-16, 2001.
56. **Ellis IO.**, Schnitt SJ., Sastre-Garau X., et al. Invasive breast carcinoma,

- Tavassoli FA. And Devilee P., EDS, World Health Organisation Classification of Tumors, Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs, IARC Press, Lyon, p 13-59, 2003.
57. **Elston CW. and Ellis JO.** Pathological prognostic factors in breast cancer, Experience from a long study with long- term follow- up. *Histopathology* 19: 403-10, 1991.
58. **Ferlay J., Shin HR., Bray F., et al.** Globocan 2008. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base no10 (internet),Lyon, France: International Agency of Research on cancer, 2010. Available from <http://globocan.iarc.fr>, 2010.
59. **Fernández S y Pertegas S.** Pruebas diagnósticas: Especificidad y sensibilidad. *Cad Aten Primaria* 10: 120-24, 2003.
60. **Fishman PH. and Brady RO.** Biosynthesis and function of gangliosides. *Science* 194: 906-15, 1976.
61. **Fitzgibbons PL., Page DL., Weaver D., et al.** Prognostic factors in Breast cancer. College of of American Pathologists Consensus Statement 1999, *Arch Pathol Lab Med* 124: 966-78, 2000.
62. **Foo CS., Su D., Chong CK., et al.** Breast cancer in young Asian women: study on survival. *ANZ J Surg* 75(7): 566-72, 2005.
63. **Frkovic-Grazio S. and Bracko M.** Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol* 55: 88–92, 2002.
64. **Fulford LG., Ryan DA., Lakhani SR.** Pathology of breast cancer in *International Handbook of Breast Cancer* (ed)Stephen Johnston. London, UK. 15-26, 2002.

65. **Geneser F.** Glándulas mamarias. Histología sobre bases moleculares 3ra edición (ed) Médica panamericana, Buenos Aires, Argentina p 679-84, 2000.
66. **Goldhirsch A.,** Glick JH., Gelber RD., et al. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005 *Annals of Oncology* 16: 1569– 83, 2005.
67. **Goldhirsch A.,** Ingle JN., Galber RD., et al Thresholds for therapies highlights of the St Gallen International Expert onsensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 20: 1319-29, 2009.
68. **Gospodarowicz MK.,** Henson DE., Huther RVP., et al Prognostic factors in cancer. UICC. (Second ed). Wiley-Liss, NY, USA, 2001.
69. **Gown MA.** Currents issues in ER and HER2 testing by IHQ in breast cancer. *Mod Pathol* 21:s8-s15, 2008.
70. **Guía para el usuario Hercep Test™.** Juego de reactivos diagnóstico para inmunohistoquímica, Dako, 2010.
71. **Guía para el usuario EGFR pharmDx™.** Juego de reactivos diagnóstico para inmunohistoquímica, Dako, 2010.
72. **Haffty BG.,** Yang Q., Reiss M., et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 24: 5652-57, 2006.
73. **Hakomori S.** Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J. Biol. Chem* 265: 187-13, 1990.
74. **Hakomori S. and Kannagi R.** Carbohydrate antigen in higher animals en *Handbook of experimental Immunology*, 4, Applications of immunological

methods in biological science. Ed por D. H. Weir y L. A. Herdenberg. Blackwell Scientifics Pub. Inc., Boston, USA, 1986.

75. **Hammond EMH.**, Allred DC., Dowsett M., et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guidelines recommendations for immunohistochemical testing of estrogen/progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol and Arch Pathol Lab Med* 134(7): 48-72, 2010.
76. **Han W.**, Kim SW., Park IA., et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer* 4: 82-90, 2004.
77. **Harris EER.**, Christensen VJ., Hwang WT., et al. Impact on concurrent versus sequential Tamoxifen with radiation in early breast cancer patients undergoing breast conservation treatment. *J Clin Oncol* 23: 11-16, 2005.
78. **Harvey JM.**, Clark GM., Osborne CK., et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 1474-81, 1999.
79. **Hayes DF.** Prognostic and predictive factors revisited *The Breast* 14: 493–499, 2005.
80. **Heberman RB.** Tumor immunology. *JAMA* 268: 2935-39, 1992.
81. **Hernández R.** Asociación del HER2/ neu con características anatómo patológicas en pacientes con cáncer de mama. INOR 1995-2005. (Tesis de terminación de residencia en Oncología). Ciudad Habana, 2008.

82. **Howell A.**, Cuzick J., Baum M., et al. Results of ATAC (Arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 305: 60-62, 2005.
83. **Huang NJ.**, Neven P., Drijkoningen M., et al. Association between tumor characteristic and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1 362 women with primary operable breast cancer. *J Clin Pathol* 58: 6111-16, 2005.
84. **Huwiler A.**, Kolter T., Pfeilschifter J., et al. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485: 63-99, 2000.
85. **Ikpat O.F. and Ndoma-Egba R.** Oestrogen and progesterone receptors in Nigerian breast cancer: relationship to tumor histopathology and survival of patients. *Cent Afr J Med* 49: 122-26, 2003.
86. **Irie A. and Suzuki A.** CMP-Neu-acetylneuraminic acid hydroxylase is exclusively inactive in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 248: 330-333, 1998.
87. **Iznaga-Escobar N.**, Torres LA., Morales A., et al. Technetium-99m-labeled anti-EGF-receptor antibody in patients with tumor of epithelial origin: I. Biodistribution and dosimetry for radioimmunotherapy. *J Nucl Med* 39(1): 15-23, 1998.
88. **Jackisch Ch.** HER-2-positive metastatic breast cancer optimizing trastuzumab-based therapy. *The Oncologist* 11: s34-41, 2006.
89. **Jakesz R.**, Kaufmann M., Gnant M., et al. Benefit of switching post menopausal women with hormone sensitive early breast cancer to anastrozole after 2 years of adjuvant tamoxifen ; combined results from 3224

- women enrolled in the trial 8 and the ARNO95 trial (abstract 2) 27 th Annual San Antonio Breast cancer symposium, 7-11, 2004.
90. **Joensuu H.**, Kellokumpu PL., Bono P., et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with and without trastuzumab for breast cancer N Engl J Med 354: 809-20, 2006.
 91. **Jordan VC.** Is tamoxifen the rosetta stone for breast cancer? J. Natl. Cancer Inst. 95(5): 338-40, 2003.
 92. **Joslyn SA.** Hormone receptors in breast cancer: racial differences in distribution and survival. Breast Cancer Res Treat 73: 45-59, 2002.
 93. **Junqueira LC and Carneiro J.** Histología Básica. Texto y atlas. 4ta edicion. (ed.) Masson, S.A, Barcelona, Madrid, p 433-37, 1999.
 94. **Kawachi S.**, Saida, T., Huara, H., et al. Heterophile Hanganutziu-Deicher antigen in gangliosides fraction on human melanoma tissues, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol 85: 831- 36, 1988.
 95. **Kawashima I.**, Ozawa H., Kotani M., et al. Characterization of ganglioside expression in human melanoma cells: immunological and biochemical analysis. J Biochem 114: 186-91, 1993.
 96. **Kniep B.** 9-O-acetyl GD3 protects tumor cells from apoptosis. Int J Cancer 119 (1): 67-73, 2006.
 97. **Konecny G.**, Pauletti G., Pegram M., et al. Quantitative association between HER2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor positive primary breast cancer. J Natl Cáncer Inst 95: 142-153, 2003.
 98. **Kroman N.**, Jensen MB., Wohlfahrt J, et al. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer population based study. BMJ 320: 474-478, 2000.

99. **Kummel S.**, Rezai M., Kimmig R., et al. Dose –dense chemotherapy for primary breast cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.* 19:75-81, 2007.
100. **Kurebayashi J.** Current clinical trials of endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 14: 200-14, 2007.
101. **Kurebayashi J.** Possible treatment strategies for triple negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast Cancer* 16: 275-80, 2009.
102. **Lage A.** Connecting immunology research to public health: Cuban biotechnology. *Nat Immunol* 9(3): 329- 32, 2008.
103. **Lage A.** Transforming cancer indicators beg bold new strategies from biotecthnology. *Medicc Review.* Summer 11: 8-12, 2009.
104. **Lage A.**, Pérez R., Fernández L.E. Therapeutic cancer vaccines: at midway between immunology and pharmacology. *Current Cancer Targets* 5: 611-27, 2005.
105. **Laskin JJ and Sandler AB.** Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumors. *Cncer Treat Rev* 30: 1-17, 2004.
106. **Lertsanguansinchai P.**, Chottetanaprasith T., Chatamra K., et al. Estrogen and progesterone receptors status in Thai female breast cancer patients: an analysis of 399 cases at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J med Assoc Thai* 8(Suppl 1): s193-202, 2002.
107. **Li CI.**, Malone KB., Daling JR., et al. Different in breast cancer hormone receptor status and histology by race,and ethnecity among women 50 years of age and older. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 601-07, 2002.

108. **Ligibel JA. and Winer EP.** Trastuzumab chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 29(suppl 11): 38-43, 2002.
109. **Lillie RD.** Histopathologic technic and practical histochemistry. Blakiston Company, New York, 114. 1954.
110. **Louwman WJ., Janssen-Heinjen ML., Houterman S., et al.** Less extensive treatment and inferior prognosis for breast cancer patient with comorbidity: a population based study. *Eur J Cancer* 41: 779-85, 2005.
111. **Macdonald F.** Oncogenes. Molecular biology in cellular pathology. John Crocker and Paul G. Murray (eds) John Wiley and Sons Ltd, England, p 79, 2003.
112. **Maggard MA., O'Connell JB., Lane KE., et al.** Do young breast cancer patients have worse outcomes? *J Surg Res* 1: 109-113, 2003.
113. **Marquina G., Waki H., Fernández LE., et al.** Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56: 5165-71, 1996.
114. **Masood S. and Bui MM.** Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech* 59: 102-08, 2002.
115. **Mather JS and Ellison D.** Reduction-mediated technetium-99 m labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 31: 692-97, 1990.
116. **Meyer JS., Alvarez C., Milikowski C., et al.** Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system v proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod. Pathol.* 18: 1067-78, 2005.
117. **Menard S., Valagussa P., Pilotti S., et al.** Response to cyclophosphamide, metrotrexate, and fluorouracil in Lymph node-positive Breast Cancer

- according to HER2 overexpression and other tumor biological variables. *J Clin Oncol* 19: 329-35, 2001.
118. **Mendelsohn J.** Targeting the epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *J Clin Oncol* 20 (18 suppl): 1s-13s, 2002.
119. **Mesa C.,** Leon J., Rigley K., et al. Very small proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. *Vaccine* 22: 3045-52, 2004.
120. **Michaelson JS.,** Silverstein M., Wyatt J., et al. Predicting the survival of patient with breast carcinoma using tumor size. *Cancer* 95: 713-23, 2002.
121. **Michaelson JS.,** Silverstein M., Sgroi D., et al. The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality. *Cancer* 98: 2133-43, 2003.
122. **Miki Y.,** Swensen J., Shattuck-Eidens D., et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science* 266: 66-771, 1994.
123. **Minasian LM.,** Yao TJ., Steffens TA., et al. A phase I study of anti-GD3 ganglioside monoclonal antibody R24 and recombinant Human macrophage-colony stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 75: 2251-57, 1995.
124. **Mohsin SK.,** Weiss H., Havighurst T., et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Modern Pathol.* 17: 1545-54, 2004.
125. **Moinfar F.** Essentials of diagnostic breast pathology. A practical approach. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, cap 1, 1-5 y 180-84, 2007.
126. **Morris GJ.,** Naidu S., Topham AK., et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian

- patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and end results database. *Cancer* 110: 876-84, 2007.
127. **Mortobagyi GN.** Overview of treatment results with trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 28: 43-4, 2001.
128. **Mountzios G and Soria JCh.** Targeted therapies in Oncology. Giuseppe Giaccone and Jean- Charles Soria (eds), New York, 2007.
129. **Nadji M.,** Gómez-Fernández C., Ganjei-Azar P., et al. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol* 123: 21–27, 2005.
130. **Nielsen TO.,** Hsu FD., Jensen K., et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res* 10: 5367–74, 2004.
131. **Ollila DW. and Stizemberg KB.** Breast cancer sentinel node metastases: Histopathologic detection and clinic significance. *Cancer Control* 8(5): 407-13, 2001.
132. **Olson MV. and Varki A.** Sequencing the chimpanzee genome: insights into human evolution and disease. *Nat. Rev. Genet.* 4: 20–28, 2003.
133. **Osawa H.,** Kotani M., Kawashima Y., et al. Generation of one set of monoclonal antibodies specific for b-pathway ganglio-series gangliosides. *Bioch. Biophys. Acta.* 1123: 184-90, 1992.
134. **Page DL.** Special types of invasive breast cancer, with clinical implications. *Am J Surg Pathol.* 27: 832-35, 2003.

135. **Pascual MR.**, Lazo R., Fernández LE., et al. A. Clinical factors related to the present of estrogen receptors in breast cancer: A pronostic stratification analysis. *Neoplasia* 29: 453-58, 1982.
136. **Pascual MR.**, Rodríguez M., Zayas A., et al. Factors associated with prognosis in human breast cancer.II. Multivariate stratification analysis. *Neoplasia* 30: 485- 90, 1983.
137. **Pascual MR.**, Macias A., Lage A., et al. Factors associated with prognosis in human breast cancer. V. The simultaneous use of estrogen and progesterone receptor measurements for prediction of short-term relapse. *Neoplasia* 32: 247- 51, 1984.
138. **Pegram MD.**, Konecny GE., O' Callaghan C., et al. Rational combinations of Trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 96: 739-40, 2004.
139. **Peshkin BN.**, Demarco T., Brogan B., et al. BRCA1/2 testing: complex themes in result interpretation. *Proceedings of ASCO.New Orleans Meeting*: 2632A, 2000.
140. **Petit T.**, Borel C., Ghnassia JP., et al. Chemotherapy response of breast cancer depends on HER2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting. *Clin Cancer Res* 7: 1577-81, 2001.
141. **Petrelli N.**, Winer EP., Brahmer J., et al. Clinical cancer advances 2009: Major research advances in cancer treatment, prevention and screening. A report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* (<http://jco.ascopubs.org>) doi 10. 1200/JCO 26-6171, 2009.

142. **Piccart- Gebhart MJ.**, Procter M., Leyland-Jones B., et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER 2 positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 353: 1659-72. 2005.
143. **Pietras RJ.** Interactions Between Estrogen and Growth Factor Receptors in Human Breast Cancers and the Tumor- Associated Vasculature. *The Breast Journal* 9(5): 361–373, 2003.
144. **Pintens S.**, Neven P., Drijkoningen M., et al. Triple negative breast cancer: a study from the point of view of basal CK 5/6 and HER1. *J. Clin. Pathol.* 62: 624-28, 2009.
145. **Prati R.**, Apple SK., He J., et al. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J* 11, 6: 433-439, 2005.
146. **Press M.**, Spaulding B., Groshen S., et al. Comparison of different antibodies for detection of progesterone receptor in breast cancer. *Steroids* 67: 799-813, 2002.
147. **Pozzone F.**, Montemurro F., Maggiorotto C., et al. Clinical outcome of adjuvant endocrine treatment according to RP and HER2 status in early breast cancer. *Ann Oncol* 17: 1631-36, 2006.
148. **Rakha EA.**, El-Sayed MF., Green AR., et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 109: 25-32, 2007.
149. **Rakha EA.**, Reis-Filho JS., Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* 26 (15): 2568-81, 2008.
150. **Reis-Fihlo JS. and Tun ANJ.** Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 52: 105-18, 2008.
151. **Rhee J.**, Oh S., Oh D., et al. Does triple-negative breast cancer (TNBC) have distinct clinicopathologic characteristics and prognostic significance?

- Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 25(18): 21088, 2007.
152. **Robbins.** Patología estructural y funcional. 6ta edición. Mc Graw- Hill (ed), 2000.
153. **Robson ME.,** Chappuis PO., Satagopan J., et al. A combined analysis of outcome following breast cancer: differences in survival based on BCRA1/BCRA2 mutation status and administration of adjuvant treatment. Breast Cancer Res 6: R8-R17, 2004.
154. **Rodríguez PC.,** Rodríguez G., González G., et al. Clinical development and perspectives of CIMAvax EGF, Cuban vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. MEDICC Rev. Winter 12(1): 17-23, 2010.
155. **Rodríguez RC.,** Esperon AA., Ropero R., et al. Prevalence of BCRA1 and BCRA2 mutations in breast cancer patients from Cuba. Fam cancer 7(3): 275-79, 2008.
156. **Rosai J.** Surgical Pathology. (Ed.) 8, Vol 2: 1565- 68, 1996.
157. **Rosen PP.** Invasive duct carcinoma. Rosen PP ed, Rosen's breast pathology, 2nd ed, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 325-64, 2001.
158. **Ross JS.** Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. Mol. Cell Proteomics 3: 379-98, 2004.
159. **Rueckert S.,** Ruelb I., Kahlert S., et al. A monoclonal antibody as an effective therapeutic agent in breast cancer: Trastuzumab. Expert Opin Biol Ther 5(6): 853-66, 2005.
160. **Samir S Amr.,** Abdul Rahman M., Sadi. H., et al. Spectrum of breast diseases in Saudi Arab females: A 26 year pathological survey at Dhaaran Health Center. Ann Med Saudi 15: 125-32, 1995.

161. **Sariola H.**, Aufderheide E., Bernhard H., et al. Antibodies to self surface ganglioside GD3 perturb inductive epithelial-mesenchymal interactions. *Cell*, 54: 235-45, 1988.
162. **Schnitt SJ.** Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 23: s60-s64, 2010.
163. **Schwarz A and Steinsträsser A.** A novel approach to Tc-99m-labelled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 28: 721 (abstract), 1987.
164. **Seidman AD.**, Fornier MN., Esteva FJ., et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification, *J Clin Oncol* 19: 2587-95, 2001.
165. **Selvarajan S.**, Wong KY., Khoo KS., et al. Overexpression of c-erbB2 correlates with nuclear morphometry and prognosis in breast carcinoma in Asian woman. *Pathology* 38: 528-33, 2006.
166. **Simpson PT.**, Reis-Filho JS., Gale T., et al. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205: 248-54, 2005.
167. **Singletary SE.**, Allred DC., Ashley P., et al. Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. *Journal Clin. Oncol* 20:36-28, 2002.
168. **Slamon DJ.**, Godolphin W., Jones LA., et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-12, 1989.
169. **Slamon DJ.**, Leyland –Jones B., Shak S., et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344: 783-92, 2001.

170. **Sobin LH. and Wittekind, Ch.** (eds) TNM classification of malignant tumors, 5th ed. New York, International Union Against Cancer, Wiley-liss. 123-30, 1997.
171. **Sobin LH. and Wittekind, Ch.** (eds) TNM classification of malignant tumors, 6th ed. New York, International Union Against Cancer, Wiley-liss. 131-41, 2002.
172. **Sobin LH., Gopodarowicz M., Wittekind, Ch.** (eds) TNM classification of malignant tumors, 7th ed. New York, International Union Against Cancer, Wiley-liss. 123-30, 2010.
173. **Soerjomataram I., Louwman MWJ., Ribot JG, et al.** An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Can Res Treat* 107: 309-30, 2008.
174. **Sorlie T., Perou CM., Tibshirani R., et al.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 98: 10869–74, 2001.
175. **Stults CLM., Sweeley CC., Matcher BA.** Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods Enzymol* 179: 167–214, 1989.
176. **Sughayer MA., Al-Khawaja MM., Massarweh S., et al.** Prevalence of hormone receptors and HER2/neu in breast cancer in Jordan. *Path Oncol Res* 12: 83-6, 2006.
177. **Takamizawa K., Iwamori M., Kozaki S., et al.** TLC-Immunostaining characterization of Clostridium botulinum type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids. *FEBS Lett* 201: 229- 34, 1986.

178. **Tang P.**, Skinner KA., Hicks DG. Molecular classification of breast carcinomas by Immunohistochemical Analysis. Are we ready?. *Diagn Mol Pathol.* 18(3): 125-32, 2009.
179. **Tangvoranuntakul P.**, Ganneux P., Díaz S., et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12045-50, 2003.
180. **Taucher S.**, Rudas M., Mader RM., et al. Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer* 98: 2547-53, 2003.
181. **Tavassoli FA.** Pathology of the Breast. Stamford (CT): Appleton and Lange, 2003.
182. **Thompson A.**, Brennan K., Cox A., et al. Evaluation of the current knowledge limitations in breast cancer research: a gap analysis. *Breast Cancer Res* 10: R26 (doi: 10.1186/bcr1983), 2008.
183. **Thor AD and Jeruss JS.** Prognostic and predictive markers in breast cancer. In: Bonadona G, Hortobgyi G y Gianni M (eds). *Textbook of Breast Cancer. A Clinical Guide to Therapy Second Edition.* UK: Martin Dunitz; p 64-83, 2001.
184. **Traina A.**, Agostara B., Marasá L., et al. HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 1089: 159-67, 2006.
185. **Tischkowitz M.**, Brunet JS., Begin LR., et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 7: 134-39 2007.

186. **Trotti A.**, Colevas AD., Setser A., et al. Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 3: 176-81, 2003.
187. **Tsuchida T.**, Ravindranath MH., Saxton, RE., et al. Gangliosides of human melanoma: altered expression in vivo and in vitro. *Cancer Res* 47: 1278-81, 1987.
188. **Tsuda H.**, Takarabe T., Akaski-Tanaka S., et al. Evaluation of histopathological criteria for identifying node negative breast cancer with high risk of early recurrence in the NSAS-BC protocol study. *Breast cancer* 7: 201-09, 2000.
189. **Tsutsui S.**, Ohno S., Murakami S., et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 71: 67-75, 2002.
190. **van de Rijn M.**, Perou CM., Tibshirani R., et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am. J. Pathol* 161: 1991– 96, 2002.
191. **Vázquez AM.**, Pérez A., Hernández AM., et al. Syngeneic Anti-Idiotypic Monoclonal Antibodies to an Anti-NeuGc-Containing Ganglioside Monoclonal Antibody. *Hybridoma* 17: 527- 32, 1998.
192. **Verdú M.**, Colomer A., Román R., et al. Protocolo del estudio molecular del oncogén HER2/neu en el carcinoma de mama. *Clin Transl Oncol* 7(11): 504-11, 2005.

193. **Veronesi U.**, Paganelli G., Viale G., et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 349: 546–53, 2003.
194. **Viale G.** Histopathology of primary breast cancer. *The Breast* 14: 487-92, 2005.
195. **Viale G.**, Reagan MM., Maiorano E., et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial compared letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol* 25: 3846-52, 2007.
196. **Viale G.**, Reagan MM., Maiorano E., et al. Chemoendocrine compared with endocrine adjuvant therapies for node-negative breast cancer: predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors-International Breast Cancer Study. *J Clin Oncol* 26: 1404-10, 2008.
197. **Vincent-Salomon A.**, Carton M., Zafrani B., et al. Long term outcome of small size invasive breast carcinomas independent from angiogenesis in a series of 685 cases. *Cancer* 92: 249–56, 2001.
198. **Voogd AC.**, Nielsen M., Peterse JL., et al. Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin. Oncol.* 19(6): 1688-97, 2001.
199. **Vorgias G.**, Koukouras D., Paleogianni V., et al. Prognostic significance of factors affecting disease free interval and overall survival for Stage II breast

- cancer in Greece. A multivariate cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95: 100–104, 2001.
200. **Warwick J.**, Tabar L., Vitak B. et al Time-dependent effects on survival in breast carcinoma: results of 20 years of follow-up from the Swedish Two-County Study. *Cancer* 100: 1331–36, 2004.
201. **Watarai Sh.**, Kushi Y., Shigeto R., et al. Production of monoclonal antibodies directed to Hanganutziu-Deicher active gangliosides, N-glycolylneuraminic acid- containing gangliosides. *J. Biochem* 117: 1062-69, 1995.
202. **White J.**, Morrow MM., Moughan J., et al Compliance with breast conservation standards for patients with early stage breast carcinoma. *Cancer* 97: 893-904, 2003.
203. **Wiesner DA. and Sweeley CC.** Circulating gangliosides of breast Cancer patients. *Int J Cancer* 60: 294-99, 1995.
204. **Wilkinson NW.**, Shahryarinejad A., Winston JS., et al. Concordance with breast cancer pathology reporting practice guidelines. *J Am Coll Surg* 193: 38-43, 2003.
205. **Winstanley J.**, Cooke T., George WD., et al. The long term prognostic significance of oestrogen receptor analysis in early carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 64(1): 99-101, 1991.
206. **Wolff AC.**, Hammond ME., Schwartz JN., et al. American Society of clinical Oncology/College of American Oncologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin. Oncol* 25: 118-45, 2007.

207. **Yamamoto Y.**, Ibusuki M., Nakano M., et al. Clinical significance of basal-like subtype in triple negative breast cancer. *Breast Cancer* 16: 260-67, 2009.
208. **Yaziji H.**, Goldstein LC., Barry TS., et al. HER2 testing in breast cancer using parallel tissue based methods. *JAMA* 291: 1972-77, 2004.
209. **Yin J.** Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.* 15(6): 2937-45, 2006.
210. **Yoshimoto M.**, Tada K., Hori H., et al. Improvement in the prognosis of japanese breast cancer patients from 1946 to 2001 an institutional review. *Jpn J Clin Oncol* 34: 457-62, 2004.
211. **Yu D.** Mechanisms of erbB-2 mediated paclitaxel resistance and trastuzumab-mediated paclitaxel sensitization in erbB-2 overexpressing breast cancer. *Semin Oncol* 28 (suppl 16): 12-17, 2001.
212. **Zhang S.**, Zhang H., Reuter VE., et al. Expression of potential target antigen for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. *Clin. Cancer Res.* 4: 295-302, 1998.
213. **Zhou P.**, Gautam S., Recht A. Factors affecting outcome for young women with early stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 101(1): 51-57, 2007.

ANEXO 1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES DE LA MAMA (ELLIS Y COLS, 2003).**Tumores epiteliales:**

Carcinoma ductal invasivo, sin otra especificación

- Carcinoma de tipo mixto
- Carcinoma pleomórfico
- Carcinoma con células gigantes osteoclasticas
- Carcinoma con características coriocarcinomas
- Carcinoma con características melanóticas

Carcinoma lobular invasivo

Carcinoma tubular

Carcinoma cribiforme invasivo

Carcinoma medular

Carcinoma mucinoso y otros tumores con abundante mucina:

- Carcinoma mucinoso
- Cistadenocarcinoma mucinoso y Carcinoma mucinoso de células columnares
- Carcinoma de células en anillo de sello

Tumores neuroendocrinos:

- Carcinoma neuroendocrino sólido
- Tumor carcinoide atípico
- Carcinoma de células pequeñas o en avena
- Carcinoma neuroendocrino de células grandes

Carcinoma invasivo papilar

Carcinoma invasivo micropapilar

Carcinoma apocrino

Carcinoma metaplásico:

- Carcinoma metaplásico epitelial puro:
 - Carcinoma de células escamosas
 - Adenoarcinoma con metaplasia escamosa
 - Carcinoma Adenoescamoso
 - Carcinoma mucoepidermoide
- Carcinoma metaplásico mixto epitelial/mesenquimal

Carcinoma rico en lípidos

Carcinoma secretor

Carcinoma oncocítico

Carcinoma adenoideo quístico

Carcinoma de células acinares

ANEXO 1. (cont.).

Carcinoma de células claras rico en glucógeno

Carcinoma sebáceo

Carcinoma inflamatorio

Neoplasia lobular:

- Carcinoma lobular in situ

Lesiones proliferativas intraductales:

- Hiperplasia ductal usual
- Atipia epitelial plana
- Hiperplasia ductal atípica
- Carcinoma ductal in situ

Carcinoma microinvasivo

Neoplasias papilares intraductales:

- Papiloma central
- Papiloma periférico
- Papiloma atípico
- Carcinoma papilar intraductal
- Carcinoma papilar intraquístico

Proliferaciones epiteliales benignas:

- Adenosis con sus variantes incluidas:
 - Adenosis esclerosante
 - Adenosis apocrina
 - Blunt duct Adenosis
 - Adenosis microglandular
 - Adenosis adenomioepitelial
- Cicatriz radial/ lesión esclerosante compleja

Adenomas:

- Adenoma tubular
- Adenoma de la lactancia
- Adenoma apocrino
- Adenoma pleomórfico
- Adenoma ductal

Lesiones mioepiteliales:

- Mioepiteliosis

ANEXO 1. (cont.).

- Adenosis adenomioepitelial
- Adenomioepitelioma
- Mioepitelioma maligno

Tumores mesenquimales:

- Hemangioma

- Angiomatosis
Hemangiopericitoma

Hiperplasia pseudoangiomatosa estromal

Miofibroblastoma

- Fibromatosis (agresiva)

Tumor inflamatorio miofibroblástico

Lipoma

- Angiolipoma

Tumor de células granulares

- Neurofibroma
- Schwannoma
- Angiosarcoma
- Liposarcoma
- Rabdomiosarcoma
- Osteosarcoma
- Leiomioma
- Leiomiosarcoma

Tumores fibroepiteliales:

- Fibroadenoma
- Tumor fillodes
 - Benigno
 - Borderline
 - Maligno

Sarcoma estromal periductal de bajo grado

Hamartoma mamario

ANEXO 1. (cont.)

Tumores del pezón:

- Adenoma del pezón
- Adenoma siringomatoso
- Enfermedad de Payer del pezón

Linfomas malignos:

- Linfoma difuso de células B grandes
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma extranodal de zona marginal de células B de tipo MALT

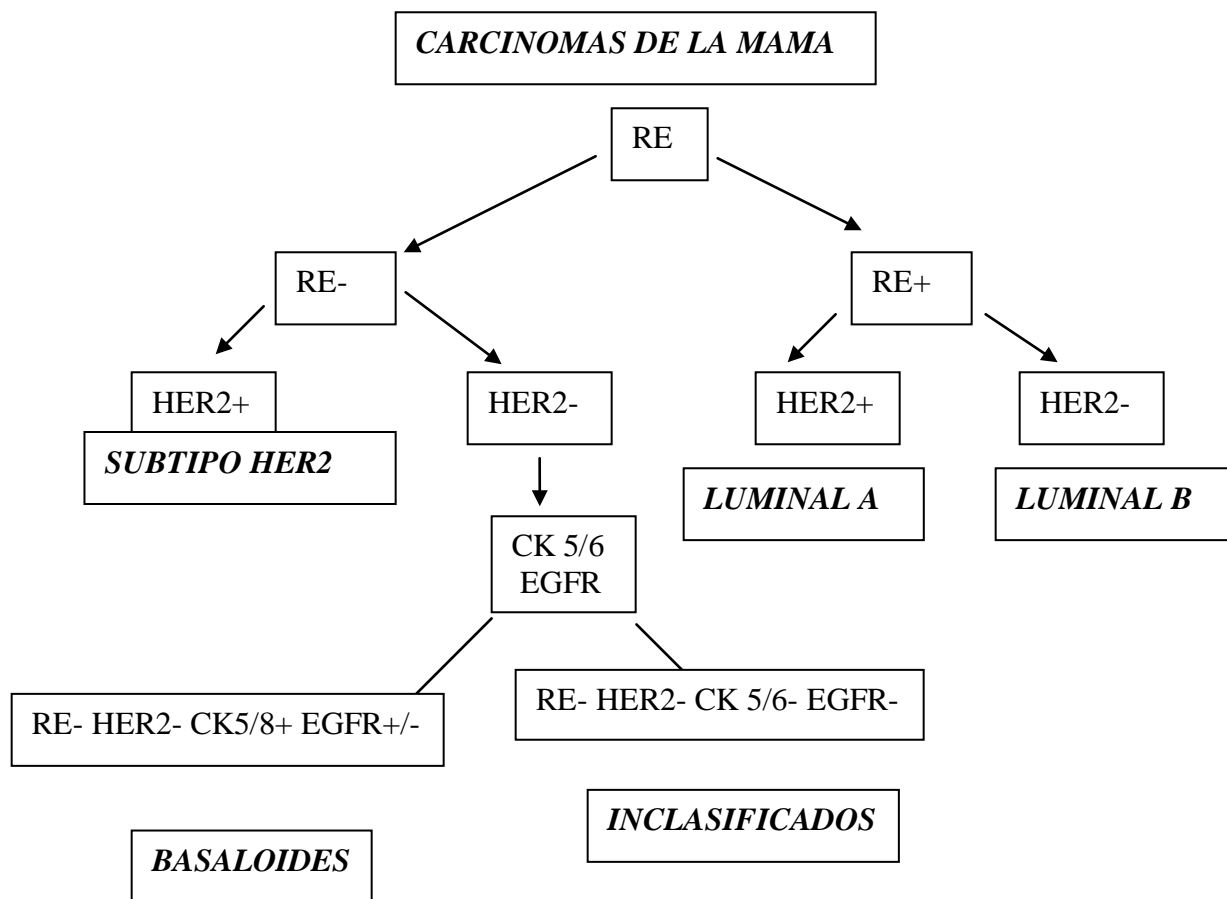
Linfoma folicular

Tumores metastásicos

Tumores de la mama masculina:

- Ginecomastia
- Carcinoma Invasivo y carcinoma In situ

ANEXO 2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS CÁNCERES DE MAMA SEGÚN EL PATRÓN INMUNOHISTOQUÍMICO.



ANEXO 3. SISTEMA TNM (Sobin y Wittekind, 2002).**Tumor primario (T)**

TX	El tumor primario no puede ser evaluado.
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Carcinoma Ductal in situ
Tis (LCIS)	Carcinoma Lobular in situ
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin tumor
	Nota: La enfermedad de Paget asociada con un tumor está clasificada según el tamaño del tumor.
T1	Tumor ≤ 2 cm en su mayor dimensión.
T1mic	Microinvasión ≤ 0.1 cm en su mayor dimensión.
T1a	Tumor > 0.1 cm pero no > 0.5 cm en su mayor dimensión.
T1b	Tumor > 0.5 cm pero no > 1 cm en su mayor dimensión.
T1c	Tumor > 1 cm pero no > 2 cm en su mayor dimensión.
T2	Tumor > 2 cm pero no > 5 cm en su mayor dimensión.
T3	Tumor > 5 cm en su mayor dimensión.
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica o piel
T4a	Extensión a la pared torácica, no incluye músculo pectoral.
T4b	Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos cutáneos satélites confinado a la misma mama.
T4c	Ambos T4a y T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio.

Microinvasión es la extensión de la lesión más allá de la membrana basal, a los tejidos adyacentes, sin ningún foco mayor que 0,1 cm en su mayor dimensión. Si se encuentran múltiples focos, solamente se utilizará el de mayor dimensión para clasificarlo. No puede usarse la suma de múltiples focos de microinvasión. No obstante, la presencia de múltiples focos de

ANEXO 3. (Cont.)

microinvasión puede notificarse.

La fijación a la piel, retracción del pezón u otros cambios cutáneos, excepto los incluidos T4d, pueden tener lugar en T1, T2, T3 sin afectar la clasificación.

Carcinoma inflamatorio: Induración difusa de la piel de la mama, con aspecto erisipeloide, usualmente sin masa tumoral francamente palpable.

Ganglios linfáticos regionales. (N)

NX	Ganglios linfáticos regionales que no pueden ser evaluados (ej. pueden haber sido previamente extirpados).
N 0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N 1	Ganglio(s) linfático(s) metastásico(s) movibles en región axilar homolateral.
N 2	Metástasis en ganglios linfáticos axilares homolaterales unidos o adheridos o en mamaria interna homolaterales (clínicamente*) sin evidencia clínica de ganglio axilar metastásico.
N 2a	Metástasis en ganglios linfáticos adheridos a otros ganglios o a alguna otra estructura.
N 2b	Metástasis en ganglios mamaros internos homolaterales (sólo en apariencia clínica*) y sin evidencia clínica de metástasis a ganglios axilares homolaterales
N 3	Metástasis en ganglios infraclaviculares homolaterales, o en ganglios homolaterales de la mamaria interna en apariencia clínica con ganglios metastásicos axilares homolaterales (clínica); o metástasis en ganglios homolaterales supraclaviculares con o sin ganglios axilares o de ganglios de la mamaria interna.
N3a	Metástasis en ganglio (s) infraclavicular (es) homolateral (es) y ganglio (s)

ANEXO 3. (Cont.)

- axilar (es).
- N3b Metástasis en ganglio(s) mamario(s) interno(s) homolateral(es) y ganglio(s) axilar(es) ipsilateral(es).
- N3c Metástasis in ganglio(s) supraclavicular(es)

Ganglios linfáticos regionales .(pN+)

- PNx Ganglios linfáticos que no pueden ser evaluados (ej. previamente resecaados o no resecaados para estudios anatomopatológicos).
- pN0 Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales histológicamente comprobado, adicionando examen a células tumorales aisladas*.
- pN0(i-) Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales histológicamente demostrado, negativo a la inmunohistoquímica (IHQ).
- pN0(i+) Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales histológicamente demostrado, positivo a la IHQ, en una agrupación de células > 0.2 mm.
- pN0(mol-) Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales histológicamente demostrado, con hallazgos moleculares negativos en estudio de reacción en cadena de la polimerasa (RT- PCR).
- pN0(mol+) Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales histológicamente demostrado, con hallazgos moleculares positivos en estudios de RT- PCR.
- pN1mi Sólo micrometástasis (ninguno > 2.0 mm)
- pN1 Metástasis entre uno y tres ganglios axilares y/o ganglios mamaros internos con enfermedad microscópica detectada por disección de ganglio centinela pero no clínicamente aparente*.
- pN1a Metástasis en uno de tres ganglios axilares.
- pN1b Metástasis en ganglio mamario interno con enfermedad microscópica detectada por disección de ganglio centinela, pero no clínicamente aparente *.
- pN1c Metástasis en uno de tres ganglios axilares y mamario interno con enfermedad

ANEXO 3. (Cont).

- microscópica detectada por disección de ganglio centinela, pero no clínicamente aparente ***.
- pN2 Metástasis en cuatro de nueve ganglios axilares o en apariencia clínica* en ganglios internos mamarios en ausencia de ganglio axilar metastásico.
- pN2a Metástasis en cuatro a nueve ganglios axilares (al menos de tamaño > 2.0 mm)
- pN2b Metástasis clínicamente aparente* en ganglios mamarios internos en ausencia de ganglios axilares.
- pN3 Metástasis en 10 o más ganglios axilares, o ganglios infraclaviculares, o clínicamente aparente* en ganglio mamario interno en presencia de ganglios axilares positivos, o en más de tres ganglios axilares con metástasis microscópicas en ganglios mamarios internos clínicamente negativos, o ganglios homolaterales supraclaviculares.
- pN3a Metástasis en 10 o más ganglios axilares (al menos de tamaño > 2.0 mm) o metástasis en ganglios infraclaviculares.
- pN3b Metástasis en mamaria interna homolateral en apariencia clínica * en presencia de uno o más ganglios axilares positivos,
o en más de tres ganglios axilares con enfermedad microscópica en mamaria interna detectada por disección de ganglio centinela pero no clínicamente aparente *.
- pN3c Metástasis en ganglios homolaterales supraclaviculares.

Metástasis a distancia

- Mx Metástasis a distancia que no pueden ser evaluadas.
- M0 No existen metástasis a distancia.
- M1 Metástasis a distancia

Abreviaturas:

IHQ: Inmunohistoquímica

RT- PCR reacción en cadena de la polimerasa reverso transcriptasa.

ANEXO 3. (Cont).

ANEXO 3. (Cont).

* Clínicamente aparente: se define como detección por estudios imagenológicos (excluyendo linfogammagrafía) o por examen físico.

** La clasificación esta basada en la disección del ganglio axilar. Con o sin ganglio centinela: clasificación basada solamente en disección de ganglio centinela con subsiguiente disección de ganglio axilar está designado (sn) por ganglio centinela (ej. pNo (i+) (sn).

Células tumorales aisladas están definidas como simples células tumorales o pequeñas agrupaciones de células no mayor de 0.2mm, usualmente detectada solamente por IHQ o métodos moleculares, los cuales pueden ser verificados con tinción de hematoxilina y eosina.

Células tumorales aisladas usualmente no muestran evidencias de actividad metastásica (ej. Proliferación o reacción del estroma)

No apariencia clínica: se define como no detección por estudios de imágenes (excluyendo linfogammagrafía) o por examen clínico.

*** Está asociado con más de tres ganglios positivos, ganglios mamaros internos son clasificados como pN3b como reflejo carga tumoral.

ANEXO 3. (Cont).

Estadios agrupados. ESTADIAMIENTO Sistema TNM (resumido)

0	Tis	N0	M0
I	T1*	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
IIIA	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IIIC	Cualquier T	Cualquier N	M1
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

.

ANEXO 4. FICHA DE DATOS.

1. Nombre y apellidos de la paciente.
2. Nombre del Centro Hospitalario donde se atiende la paciente.
3. Provincia de procedencia.
4. Nombre del médico de asistencia
5. HC
6. Edad de la paciente
7. pTNM y el Estadio clínico post quirúrgico
8. Fecha de la cirugía
9. Número de Biopsia
10. Diagnóstico de histopatológico del tumor que incluya:
 - GH y el GN
 - Número de ganglios axilares resecados / Número de ganglios axilares metastásicos
 - Dimensión mayor del tumor.
11. Resumen de HC con la descripción del curso clínico de la enfermedad y el estado actual de la paciente.

Importante: cada boleta debe acompañarse de 1 bloque que contenga un fragmento tumoral representativo y la lámina de Hematoxilina-eosina correspondiente al bloque enviado. La selección y revisión del bloque es responsabilidad del médico anatómo patólogo del hospital.

AUTOBIBLIOGRAFÍA.

Publicaciones relacionadas con el tema .

Internacionales.

1. **RI. Álvarez**, X. Escobar, R. Camacho, et al. Hormone Receptors and Other Prognostic Factors in Breast Cancer in Cuba. MEDICC Review (EUA-Cuba), 12(1): 36-40, 2010.
2. **RI. Álvarez**, X. Escobar, R. Camacho, y cols .Prevalencia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo II en Cáncer de Mama en Cuba. Rev. Mexicana de Cancerología, 4: 135-41, 2009.
3. **RI. Álvarez**, X. Escobar, R. Camacho, y cols. Receptores hormonales y otros factores pronósticos en Cáncer de Mama en Cuba. Rev. Mexicana de Cancerología. 3(1):19-27, 2008.
4. **RI. Álvarez**, X. Escobar, R. Camacho, et al. Estrogen receptor and HER2 in a sample of cuban breast cancer patients. MEDICC Review (EUA-Cuba) 5: 2- 3, 2003.
5. JP. Oliva, Z. Valdés, A. Casacó, G. Pimentel, J. González, **RI. Álvarez**, et al. Clinical evidences of GM3(Neu Gc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labeled with ^{99m}Tc. Breast Cancer Research and Treatment (2005) DOI 10. 1007/s 10549- 005- 9064-0, 2005.
6. L. Llanes, **RI. Álvarez**, MC. Arango, et al. Relationship between IL-10 and tumors markers in breast cancers patients. The Breast 15(4): 482- 89, 2006.
7. **RI. Álvarez**, A. Fernández, JV. Gavilondo. Anticuerpos Monoclonales que reconocen células de mama, pulmón y colon. Memorias II Sem. Cubano sobre Biotecnología. II parte, 145-50. (ed) Inst. de Cooperación Iberoamericana, Madrid, 1988.

8. **RI. Álvarez**, A. Fernández, JV. Gavilondo, et al. Mouse monoclonal antibodies that react with human breast, lung and colon cells. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research*. 5,4. 1986.
9. CM. Pereda, HM. Rodríguez, **RI. Álvarez**, y cols. Péptidos Sintéticos de dominios funcionales del Receptor de Estrógeno humano para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales. *Gaceta Mexicana de Oncología* 3(2): 26-32, 2004.
10. AR. Ortiz, BR. Tormo, HM. Rodríguez, **RI. Álvarez**, et al. Immunohistochemical study of anti-estradiol IOR-E6 monoclonal antibody in paraffin embedded breast cancer tumors. *Rev. Mex. del Inst. Nac. de Cancerología*. 44(2): 68- 71, 1998.
11. C. García, **RI. Álvarez**, K. Torres. Caracterización preliminar de un anticuerpo monoclonal murino pan leucocitario obtenido a partir de inmunización con la línea celular Jurkat. *Memorias II Sem. Cubano sobre Biotecnología*. II parte, 161-65. Editor: Inst. de Cooperación Iberoamericana, Madrid, 1988.
12. AM. Barral, G. Pérez, **RI. Álvarez**, et al. Development of an experimental system for the study of Transforming Growth Factor beta. *Advances in Modern .Biotechnology*. 2: 159, 1994.
13. MC. Arango, ME. Faxas, **RI. Álvarez**, y cols. Déficit de la actividad NK en pacientes con cáncer de mama avanzado. *Rev. Mexicana de Cancerología* 4, 2008.
14. MC. Arango, ME. Faxas, **RI. Álvarez**, y cols. Compromiso del sistema inmune en pacientes con Cáncer de Mama. *Rev. Mexicana de Cancerología*. 4, 2008.
15. **RI. Álvarez, (colaborador)**. ATLAS (Adjuvant Tamoxifen, Longer Against Shorter): International randomised trial of 10 versus 5 years of adjuvant

tamoxifen among 11 500 women – plans for publication of preliminary results in summer of 2010. Clinical Trial service United Epidemiology Studies Unit. (To be submitted).

Nacionales.

1. MC. de Armas, M. González, F. Briñis, X. Escobar, **RI. Álvarez** y cols. Cáncer de mama: Determinación de factores pronósticos. Rev. Investigaciones Médico-quirúrgicas. 1(1): 57, 2009.
2. HM. Rodríguez, **RI. Álvarez**, C. Pereda y cols. Receptor de estrógeno y otros marcadores pronósticos relacionados con el cáncer de mama. Rev Cubana de Medicina, 42: 6, 2003.
3. CM. Pereda, HM. Rodríguez, M. Alfonso, **RI. Álvarez** et al. Design and synthesis of peptides that mimic the binding ligand domain of the human estrogen receptor. Their use as immunogen in generation of monoclonal antibodies. Rev. Cub. de Farmacia. 13(2): 126, 2001.
4. CM. Pereda, G. Pérez, M. Alfonso, **RI. Álvarez** y cols. Caracterización de anticuerpos policlonales a un dominio específico de los receptores de estrógeno y progesterona. Rev. Cub. de Oncología. 22: 27, 1999.
5. CM. Pereda, HM. Rodríguez, M. Alfonso, **RI. Álvarez** y cols. Generación de anticuerpos policlonales contra un dominio específico del receptor de estrógeno y progesterona. Rev. Cub. de Oncología. 22: 27, 1999.
6. **RI. Álvarez**, A. Fernández, T. Rodríguez, y cols. Anticuerpos monoclonales anti citoqueratinas. Rev. CENIC. 19: No especial, 71, 1988.
7. **RI. Álvarez**, R. Pérez, A. Velandia, y cols. Híbridos que reconocen un marcador tumoral en el líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario. Revista Cubana de

- Investigaciones Biomédicas. No. Especial; 147, 1991.
8. HM. Rodríguez, AJ. Machado, Al. Mayea, **RI. Álvarez**, y cols. Generación de anticuerpos monoclonales contra el Estradiol. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. No. Especial; 147, 1991.
 9. JV. Mainardi, JL. Bello, **RI. Álvarez**, et al. New anti tumor drugs: An experimental system for initial screening. Rev. Cubana de Farmacia, 17: 174-81, 1983.
 10. A. Fernández, C. Hermida, JV. Gavilondo, C. García y **RI. Álvarez**. Utilización de líneas celulares de cáncer mamario humano en la obtención de Anticuerpos Monoclonales que reconocen tejido tumoral. Rev. Interferón y Biotecnología. 3(2): 125-38, 1986.
 11. A. Alerm, I. Vega, OM. Rodríguez, M. Martínez, O. Torres, **RI. Álvarez**, y cols. Generación de un híbrido murino anti-hepatitis B. Biotecnología Aplicada. Vol. 10, No. 2, p.80, 1993.
 12. HM. Rodríguez, **RI. Álvarez**, R. Gómez y cols. Generación de un anticuerpo monoclonal contra la enzima Tiorredoxina. Rev. Cub. de Oncología 9(2): 45, 1994.
 13. HM. Rodríguez, **RI. Álvarez**, R. Gómez y cols. Generación de anticuerpos monoclonales contra el virus del papiloma humano. Rev. Cub. de Oncología 10(2): 35-39, 1994.
 14. **RI. Álvarez**, HM. Rodríguez, MÁ. Ríos y cols. Caracterización citohistológica del anticuerpo monoclonal IOR-HPV1. Rev. Cub. de Oncología. 22: 26, 1999.

Presentaciones del tema en los siguientes eventos científicos Internacionales

1. **RI. Álvarez.** Frecuencia de expresión de RE y HER2 en cáncer de mama. 9no Congreso Cubano de Oncología, 2^{da} Conferencia Internacional de Física Médica. Cuba, octubre 2003.
2. **RI. Álvarez.** Expresión del HER2 en una muestra de pacientes con cáncer de mama. 9no Congreso Cubano de Oncología, 2^{da} Conferencia Internacional de Física Médica. Cuba, octubre 2003.
3. **RI. Álvarez.** Determinación del receptor de estrógeno en pacientes con cáncer de mama provenientes de 5 provincias del país 9no Congreso Cubano de Oncología, 2^{da} Conferencia Internacional de Física Médica. Cuba, octubre 2003.
4. CM. Pereda, **RI. Álvarez,** y cols. Obtención de títulos de anticuerpos contra el receptor de estrógeno utilizando péptidos sintéticos. 9no Congreso Cubano de Oncología, 2^{da} Conferencia Internacional de Física Médica. Cuba, octubre 2003.
5. L. Llanes, **RI. Álvarez,** y cols. The relation of cytokines and T-cell activation proteins with tumors markers in breast cancer. 16th International Congress on Anti-cancer Treatment, France, 2005
6. **RI. Álvarez.** Expresión de Factores Pronósticos y Marcadores tumorales en Cáncer de Mama. Estudio de 500 casos cubanos. Encuentro Regional de Oncología. Simposio de HER2, Panamá, 2005
7. **RI. Álvarez.** Relación entre la expresión de Factores inmunológicos y factores pronósticos del tumor en pacientes con cáncer de mama. XXV Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Anatomía Patológica. Cuba, 2005.

8. **RI. Álvarez.** Expresión de RE y HER2. Su influencia en la selección del tratamiento del cáncer de mama. 1er Simposio Interdisciplinario de Cáncer de Mama. Cuba, junio 2006.
9. **RI. Álvarez.** Resultados del trabajo con HER2 neu en Cuba. Curso- Taller Internacional. Métodos de Estudio del Factor de Crecimiento Epidérmico HER2 en Cáncer de Mama. Cuba, febrero 2007.
10. L. Llanes, **RI. Álvarez,** et al. Association of IL-10 with tumour markers and pronostic factors in early breast cancer patients. XIII Congreso de Internacional de Inmunología. Francia, 2007
11. L. Llanes, **RI. Álvarez,** et al. IL-10 association of pronostic factors in early breast cancer patients. XIII Congreso de Inmunología, Brasil, 2007
12. **RI. Álvarez.** Marcadores tumorales situación según el sitio de inclusión en Cuba. Taller Nacional de Ensayos clínicos con vacunas. NGlicolil GM3 en Cáncer de Mama Adyuvante y metastásico. Cuba, junio 2008.
13. **RI. Álvarez.** Actualización de los marcadores tumorales según el sitio de inclusión en Cuba. Taller Nacional de Ensayos clínicos con vacunas. NGlicolil GM3 en Cáncer de Mama Adyuvante y metastásico. Cuba, mayo 2009.
14. **RI. Álvarez.** Expresión del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano tipo II en Cuba. X Congreso Nacional de Oncología, I Congreso Internacional de Mastología. Junio 2009.
15. **RI. Álvarez.** Expresión de Receptores hormonales en Cuba. X Congreso Nacional de Oncología, I Congreso Internacional de Mastología. Junio 2009.
16. **RI. Álvarez.** HER2 en Cáncer de Mama. Curso- Taller Internacional, Cuba, 2009.