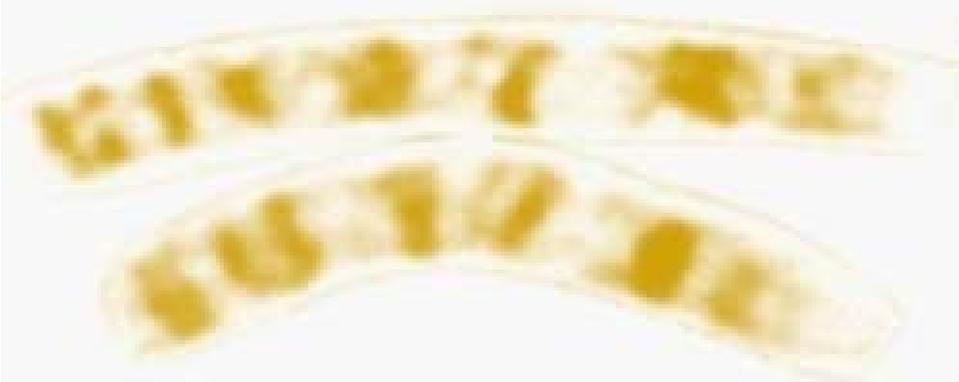




**IMPORTANCIA PREDICTIVA Y
PRONOSTICA DEL ESTUDIO
INMUNOHISTOQUIMICO EN
CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE DE
MAMA**



TESIS DOCTORAL
M. Isabel Gasca Collado





UNIVERSIDAD
de SEVILLA

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA
Hospital Universitario V. de Valme

Memoria de Tesis Doctoral:

*" IMPORTANCIA PREDICTIVA Y
PRONÓSTICA DEL ESTUDIO
INMUNOHISTOQUÍMICO EN CARCINOMA
DUCTAL INFILTRANTE DE MAMA "*

Presentada por:

Maria Isabel Gasca Collado

Sevilla, Noviembre 2005

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la presentación de esta memoria de Tesis Doctoral:

A D. Rogelio Garrido Teruel ,Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático del Departamento de Cirugía de la Universidad de Sevilla , Jefe del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de Valme, y Director de esta Tesis sin cuyo estímulo y apoyo hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A Dña. Ana Fernandez Palacín y Dña. Carmen Victoria Almeida Gonzalez de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Valme, por su inestimable ayuda y paciencia y por las muchas horas que hemos pasado juntas.

A D. Diego Martínez Parra, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz por su colaboración en este trabajo,por su incondicional ayuda y por su afable confianza.

Al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de Valme , compañeros y amigos que sin duda han sufrido conmigo la preparación de esta Tesis, por su excelente enseñanza y su complicidad.

A mis padres, a quienes les debo todo, por inculcar en mí el amor a la ciencia, el estudio y la lectura, incalculable tesoro por el que siempre estaré agradecida.

A Antonio, siempre presente, por sus grandes dosis de paciencia y ánimo , por las tantas horas robadas , y porque sin el nada sería posible

A los que vendrán.....

INDICE

• INTRODUCCION.....	8
I.- BIOLOGIA MOLECULAR DE LA CELULA EUCARIOTICA.....	9
1.-Estructura del DNA, genes y procesos de expresi3n g3nica.....	9
1.1.-Estructura y organizaci3n del DNA.....	9
1.1.1.-Replicaci3n.....	11
1.1.2.-Transcripci3n.....	12
1.1.3.-S3ntesis de prote3nas.....	13
2.-Oncogenes y C3ncer.....	15
3.-La Hip3tesis del Oncogen.....	19
3.1.-El primer proto-oncogen.....	20
4.-Los Oncogenes virales.....	21
4.1.-Virus DNA como agentes transformantes.....	23
4.2.-Virus RNA como agentes transformantes.....	25
4.2.1.-Un retrovirus puede transformar una c3lula	27
5.-Proto-Oncogenes activados en tumores humanos.....	28
5.1.1.-El cambio de un solo amino3cido puede inducir transformaci3n.....	30
6.-Los Oncogenes y sus prote3nas: Clasificaci3n y Caracter3sticas.....	31
6.1.-Factores de Crecimiento (Clase I).....	36
6.2.-Receptores de Factores y Hormonas (Clase II).....	37
6.3.-Transductores intracelulares (Clase III).....	38
6.4.-Factores de Transcripci3n nucleares (Clase IV).....	39
7.-Ciclo celular y Apoptosis. Implicaciones Oncog3nicas.....	42
7.1.-El ciclo celular.....	42
7.1.1.-La transici3n G1/G0:Salida y entrada en el ciclo celular.....	43
7.1.2.-La fase S: S3ntesis del ADN.....	44
7.1.3.-La transici3n G2/M: Producci3n de “c3lulas hija”.....	45
7.1.4.-La regulaci3n del ciclo celular:ciclinas y quinasas.....	46
7.2.-Muerte celular programada: Apoptosis.....	47
7.2.1.- Caspasas.....	48
7.2.2.-Las prote3nas Bax y Bcl-2:inductores e inhibidores de apoptosis... ..	49
7.3.-Apoptosis y Cancer.....	51
8.- El proceso biol3gico de las met3stasis.....	54
8.1.-Invasi3n tumoral.....	56
8.1.1.-Uni3n a la matriz extracelular.....	56
8.1.2.- Prote3lisis local.....	58
8.1.3.-Migraci3n celular.....	59
8.2.-Las met3stasis.....	61
8.2.1.-Angiog3nesis.....	61
8.2.2.-Intravasaci3n y extravasaci3n.....	62
8.2.3.-Parada y extravasaci3n.....	62
8.2.4.-Oncogenes supresores de met3stasis.....	63

II.-BIOLOGIA MOLECULAR DEL CANCER DE MAMA.....	64
1.-Introducción.....	64
2.-Mutaciones constitucionales.....	64
3.-Amplificación y sobreexpresión de protooncogenes en el cáncer de mama.....	65
4.-Inactivación de genes supresores en cáncer de mama:p53.....	66
5.-Expectativas terapéuticas.....	68
III.-FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA.....	69
1.-Categoría I.....	70
1.1.-Tamaño tumoral.....	70
1.2.-Afectación linfática axilar.....	70
1.3.-Micrometástasis.....	71
1.4.-Ganglio centinela.....	72
1.5.-Grado histológico.....	73
1.6.-Tipo histológico.....	73
1.7.-Número de mitosis.....	74
1.8.-Receptores hormonales.....	74
2.-Categoría II.....	75
2.1.-CerbB2-Neu.....	75
2.2.-P53.....	75
2.3.-Invasión vascular peritumoral.....	76
2.4.-Ki-67.....	76
2.5.-Análisis del DNA.....	76
3.-Categoría III.....	77
3.1.-Angiogénesis tumoral.....	77
3.2.-Receptor de Factor de crecimiento epidérmico.....	77
3.3.-Bcl2.....	77
3.4.-pS2.....	77
3.5.-Cathepsina D.....	78
IV.-SOBREEXPRESIÓN DE CERBB2 EN CANCER DE MAMA.....	79
1.-Sobreexpresión de CerbB2 en cáncer de mama.....	82
1.1.-Detección de Her2 en tejidos.....	83
2.-CerbB2 como factor pronóstico.....	94
2.1.-CerbB2 en pacientes con afectación axilar.....	95
2.2.-CerbB2 en pacientes sin afectación axilar.....	100
2.3.-CerbB2 en pacientes con colonización metastásica.....	102
3.-CerbB2 como factor predictivo.....	109
3.1.-CerbB2 y respuesta a quimioterapia.....	109
3.2.-CerbB2 y tratamiento hormonal.....	114

- **HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....123**
- I.-HIPOTESIS.....124
- II.-OBJETIVOS.....125

- **MATERIAL Y METODOS.....126**
- 1.-Ambito de estudio.....127
- 2.-Periodo de estudio.....127
- 3.-Población de estudio.....127
- 3.1.-Criterios de inclusión.....127
- 3.2.-Criterios de exclusión.....128
- 3.3.-Manejo clinico de las pacientes.....128

- 4.-Especímenes.....129
- 4.1.-Procesamiento de los especímenes para estudio histológico.....130
- 4.1.1.-Fijación del espécimen.....131
- 4.1.2.-Muestreo del espécimen.....131
- a).-Biopsia incisional de lesión palpable.....131
- b).-Biopsia excisional de lesión palpable.....131
- c).-Excisión de lesión no palpable detectada por mamografía.....131
- d).-Mastectomía.....132
- 4.1.3.-Inclusión de muestras.....132
- 4.1.4.-Encastramiento de muestras.....133
- 4.1.5.-Realización de cortes histológicos.....133
- 4.1.6.-Realización de tinciones histológicas.....133

- 4.2.-Procesamiento de especímenes para estudios inmunohistoquímicos.....134
- 4.2.1.-Procesos que abarcan desde la fijación del espécimen hasta la preparación de cortes histológicos.....134
- 4.2.2.-Ejecución de la técnica inmunohistoquímica.....135
- a).-Bases de la técnica inmunohistoquímica.....135
- b).-Protocolo de desparafinado.....137
- c).-Desenmascaramiento antigénico.....137
- d).-Bloqueo de enzimas endógenas.....137
- 4.2.3.-Procedimiento de detección de CerbB2 mediante LSAB.....138
- 4.2.4.-Procedimiento de detección de receptoresde estrógenos.....144
- 4.2.5.-Procedimiento de detección de receptores de progesterona.....145
- 4.2.6.-Procedimiento de detección de la proteína supresora de tumores p53.....146
- 4.2.7.-Procedimiento de detección de Ki67.....146

- 4.3.-Interpretación de resultados.....147
- 4.3.1.-Interpretación del estudio histológico convencional.....147
- 4.3.2.-Clasificación TNM.....151
- 4.3.3.-Interpretación del estudio inmunohistoquímico.....158

5.-Valoración de resultados y estudios estadísticos.....	162
5.1.-Determinación del tamaño muestral.....	162
5.2.-Exploración estadística de la información.....	162
5.3.-Análisis descriptivo.....	162
5.4.-Test de independencia en tablas de contingencia.....	163
5.5.-Prueba T de Student y U de Mann-Whitney para muestras independientes.....	163
5.6.-Coeficiente de correlación de Spearman.....	163
5.7.-Análisis de Kaplan-Meier.....	163
5.8.-Análisis de regresión de Cox.....	163
5.9.-Modelo de regresión de Cox con variables dependientes del tiempo.....	164
5.10.-Análisis de conglomerados en dos fases.....	164
• RESULTADOS.....	165
I.-ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	166
1.-Datos generales.....	166
1.1.-Edad de las pacientes.....	166
1.2.-Paridad.....	168
1.3.-Lactancia materna.....	168
1.4.-Menopausia.....	168
1.5.-Antecedentes personales de cáncer.....	169
1.6.-Antecedentes familiares de cáncer.....	170
2.-Hallazgos senográficos.....	171
3.-TNM.....	172
4.-Cirugía.....	173
5.-Anatomía Patológica.....	174
5.1.-Punción-Aspiración con aguja fina (PAAF).....	174
5.2.-Tipo histológico.....	175
5.3.-Componente comedocarcinoma.....	175
5.4.-Grado histológico. Score Bloom-Richardson.....	176
6.-Estudio inmunohistoquímico.....	176
6.1.-Receptores hormonales: Estrógenos / Progesterona.....	176
6.2.-P53.....	177
6.3.-Ki67.....	179
6.4.-CerbB2.....	180
7.-Tratamiento adyuvante.....	182
7.1.-Quimioterapia adyuvante.....	182
7.2.-Hormonoterapia.....	183
7.3.-Radioterapia.....	184
8.-Evolución.....	184
II.-ESTUDIO ANALÍTICO I.- CerbB2 y cáncer de mama.....	185

1.-Sobreexpresión de CerbB2 en relación a otros factores pronósticos en cáncer de mama.....	185
1.1.-CerbB2 y menopausia.....	185
1.2.-CerbB2 en relación a datos histológicos.....	187
1.2.1.-CerbB2 en relación al componente comedocarcinoma	187
1.2.2.-CerbB2 en relación a Score Bloom-Richardson.....	189
1.2.3.-CerbB2 en relación a número de ganglios en el estudio anatomopatológico.....	191
2.-Sobreexpresión de CerbB2 y estudio inmunohistoquímico.....	195
2.1.-CerbB2 y receptores hormonales.....	195
2.1.1.-CerbB2 y receptores estrogénicos.....	195
2.1.2.-CerbB2 en relación a receptores de progesterona.....	197
2.1.3.-Coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona.....	198
2.2.-CerbB2 y P53.....	201
2.3.-CerbB2 y Ki67.....	203
2.4.-Resumen de relación de CerbB2 y variables principales del estudio.....	206
III.-ESTUDIO ANALÍTICO II.-CerbB2,P53,Ki67, receptores de hormonas esteroideas y cáncer de mama.....	207
1.-Sobreexpresión de CerbB2, P53, Ki67, Receptores hormonales en relación al estudio anatomopatológico.....	207
1.1.-Edad.....	207
1.2.-Menopausia.....	208
2.-Sobreexpresión de CerbB2, P53, Ki67, Receptores hormonales y estudio histológico.....	209
2.1.-Tamaño tumoral.....	209
2.2.-Ganglios metastásicos.....	209
2.3.-Grado histológico. Score Bloom-Richardson.....	210
3.-Correlación de Sperman.....	211
IV.-ANÁLISIS CLUSTER O CONGLOMERADOS.....	216
1.-Perfiles de los conglomerados.....	217
1.1.-Edad.....	218
1.2.-Tamaño tumoral.....	219
1.3.-Score Bloom-Richardson.....	219
1.4.-Ganglios metastásicos.....	219
1.5.-CerbB2.....	222
1.6.-P53.....	224
1.7.-Ki67.....	225
1.8.-Receptores de estrógenos.....	227
1.9.-Receptores de progesterona.....	229
1.10.-Coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona.....	232
2.-Distribución de las variables en el análisis cluster. Perfiles de pacientes.....	235
V.-ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIAS.....	236
1.-Análisis de recidivas.....	236
1.1.-Casos de recidiva en función de datos epidemiológicos.....	236

1.1.1.-Recidiva en relación a tamaño tumoral.....	236
1.1.2.-Recidiva en relación a grado histológico.....	237
1.1.3.-Recidiva en relación a existencia de metástasis linfáticas en el momento de la cirugía.....	238
1.2.-Recidiva en función de análisis inmunohistoquímico.....	240
1.2.1.-Recidiva en relación a sobreexpresión de CerbB2.....	240
1.2.2.-Recidiva en relación a sobreexpresión de p53.....	240
1.2.3.-Recidiva en relación a sobreexpresión de Ki67.....	242
1.2.4.-Recidiva en relación a sobreexpresión de receptores de estrógenos.....	242
1.2.5.-Recidiva en relación a receptores de progesterona.....	243
1.3.-Análisis multivariante(análisis de regresión de Cox).....	244
2.-Análisis de supervivencia.....	245
2.1.-Casos de mortalidad en función de datos anatomopatológicos.....	245
2.1.1.-Mortalidad en relación al tamaño tumoral.....	245
2.1.2.-Mortalidad en relación a grado histológico.....	245
2.1.3.-Mortalidad en relación a metástasis linfáticas.....	246
2.2.-Casos de mortalidad en relación a variables inmunohistoquímicas.....	247
2.2.1.-Mortalidad en relación a sobreexpresión de CerbB2.....	247
2.2.2.-Mortalidad en relación a sobreexpresión de p53.....	247
2.2.3.-Mortalidad en relación a sobreexpresión de Ki67.....	248
2.2.4.-Mortalidad en relación a sobreexpresión de receptores de estrógenos.....	248
2.2.5.-Mortalidad en relación a sobreexpresión de receptores de progesterona.....	249
• DISCUSION.....	254
1.-CerbB2 y cáncer de mama.....	257
2.-P53 y Cáncer de mama.....	260
3.-Receptores hormonales y cáncer de mama.....	263
4.-Ki67 y cáncer de mama.....	265
5.-Análisis cluster.....	266
6.-Análisis de supervivencias.....	267
• CONCLUSIONES.....	269
• BIBLIOGRAFIA.....	272

INTRODUCCIÓN

I.-BIOLOGIA MOLECULAR DE LA CÉLULA EUCARIÓTICA.

1.- ESTRUCTURA DEL DNA, GENES Y PROCESOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

La célula eucariótica contiene toda su información en el núcleo, concretamente en una estructura química conocida como ácido ácido (DNA). La composición de esta molécula así como su organización en cromatina (cromosomas durante la mitosis) es fundamental para el funcionamiento de esta doble hebra de DNA. Así, se conoce como replicación a un proceso de gran precisión durante el cual la estructura informativa del DNA se copia para mantenerse invariable entre las distintas generaciones de células. Igualmente, el DNA tiene que expresar su potencial de información para producir aquellas proteínas características de cada tipo de célula y en el momento adecuado del desarrollo que van a generar el fenotipo de la célula. La expresión de genes estructurales (segmentos del DNA con información para proteínas) ,es un proceso complejo en el que se tiene que transcribir el gen para dar lugar a una molécula precursora en el núcleo (un ácido ribonucleico o RNA) ,que tras un proceso madurativo origina en el mismo núcleo RNA mensajero (RNA m),cuya secuencia de nucleótidos dirigirá la traducción o síntesis de proteínas en el citoplasma. Para que la síntesis de proteínas, dirigida por el RNAm tenga lugar, es necesario que participen los ribosomas (integrados por RNA ribosómicos o r RNA y proteínas) y los RNAs de transferencia (t RNAs)que son los que llevan los aminoácidos al lugar donde ocurre la traducción. La información de para la síntesis de estos r RNAs y t RNAs también está en el DNA y los genes que codifican para ellos deben de transcribirse para la formación de los mismos. Finalmente, los ribosomas, los t RNAs activados con aminoácidos y el m RNA, dirigidos por factores proteicos en el citosol, y mediante un diccionario conocido como código genético, dirigirán la traducción de la información de tripletes de nucleótidos del mRNA a cadenas polipeptídicas. La regulación de todos estos procesos es tremendamente compleja y alteraciones en cualquiera de estos puntos puede llevar a una alteración del crecimiento celular y por tanto al CANCER¹.

1.1 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL DNA

El DNA eucariótico se presenta como una estructura llamada Hélice B del DNA, compuesta por dos hebras enrolladas helicoidalmente a derechas e interaccionadas entre sí. Cada una de estas hebras es un polidesoxirribonucleótido con esqueleto de desoxirribosa-fosfato formando enlaces fosfodiéster 3'-5' y enlaces N-glicosídicos entre los azúcares (carbono 1')

y las bases nitrogenadas (nitrógeno 9 de adenina, A de guanina, G y N1 de timina, T o citosina C). Cada hebra tiene polaridad 5'-3' y las dos hebras se asocian en la hélice B de forma antiparalela, dejando los esqueletos azúcar-fosfato hacia el exterior en contacto con el medio acuoso fisiológico y las bases nitrogenadas hacia el interior, perpendiculares al eje de la hélice, en un entorno hidrofóbico. Las bases de cada hebra de la hélice interactúan entre sí mediante puentes de hidrógeno, de acuerdo con los llamados apareamientos de Watson & Crick, es decir A con T mediante 3 puentes de hidrógeno y C con G mediante 2 puentes de hidrógeno.

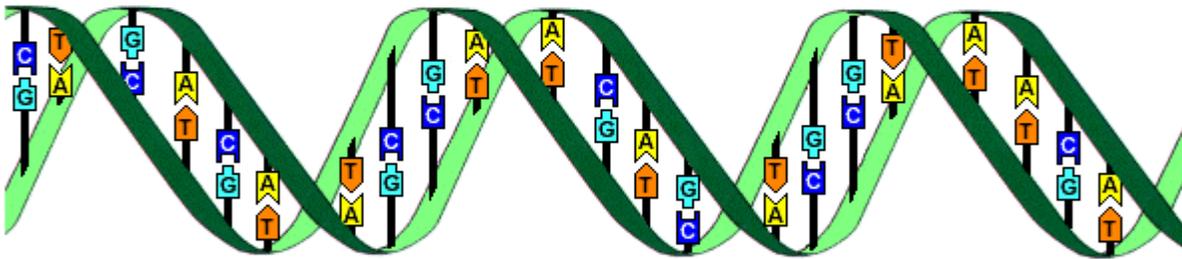


Fig.1.- Estructura y organización del ADN

Debido a que esta organización del DNA no es suficiente para dar cabida a todo el DNA contenido en una célula (ocuparía de esta forma varios cm, lo que es incompatible con el tamaño del núcleo) se impone un nivel de organización superior, que tienda a condensarlo, en lo que se llama superenrollamientos negativos. Esta estructura permite un fácil desenrollamiento del DNA, lo que es muy importante debido a que son numerosas las circunstancias en las que el genoma tiene que relajarse, como durante la replicación y la expresión de genes, volviéndose luego a empaquetar en superhélices. Estos procesos son dirigidos enzimáticamente, mediante las denominadas topoisomerasas. De ellas, la tipo I relaja las superhélices negativas del DNA, mientras que la topoisomerasa II ayuda a la condensación y segregación de cromosomas durante la mitosis y meiosis, y participan en la topología del DNA durante la transcripción. La importancia del conocimiento de estas enzimas es grande, ya que diversas drogas antitumorales actúan sobre ellas, pudiendo ser usadas en tratamientos antineoplásicos.

El DNA se encuentra en el núcleo asociado a proteínas básicas formando una estructura llamada cromatina, que en estado de máxima condensación durante la metafase mitótica da lugar a los cromosomas. Estos alcanzan un grado de empaquetamiento de 10000 veces respecto a la hélice del DNA. Así, cada cromátida de un cromosoma que corresponde a una única molécula de DNA de tamaño cm en doble hélice, está condensada en un tamaño de μm durante la metafase mitótica^{2,3}.

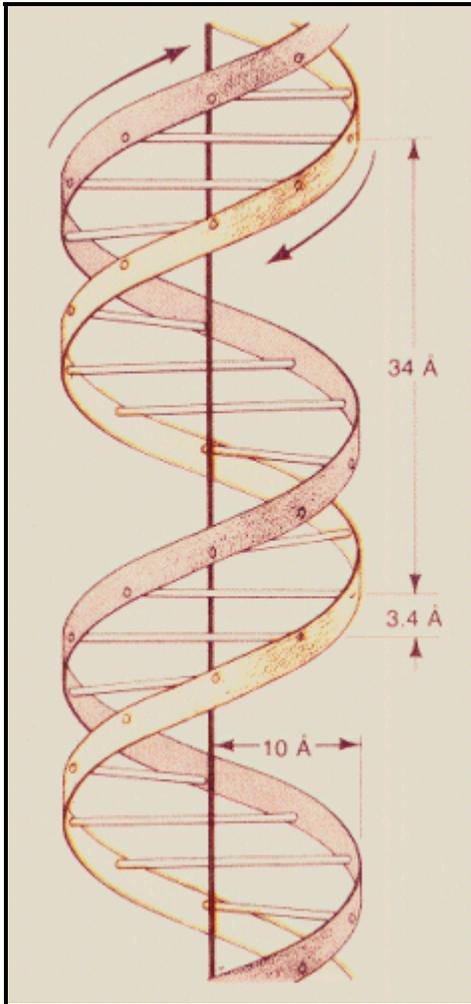


Fig.2.-Estructura en doble hélice del ADN

Conocida la estructura básica del DNA humano, vamos a centrarnos en su organización. Aunque por el tamaño del genoma humano sería esperable un número elevadísimo de genes, sin embargo, y aunque el Proyecto Genoma (que pretende identificar todos los genes humanos) aún no está terminado, el número de genes esperado es mucho mas pequeño (alrededor de 30.000-50.000 genes). Esto es debido a que parte de las secuencias del DNA se encuentra mediana o altamente repetido.

Por el contrario, los genes estructurales, que codifican para proteínas, son generalmente secuencias únicas, de tamaño variable, pero que sólo aparecen normalmente una vez a lo largo de todo el genoma, no siendo además totalmente informativos, ya que gran parte de su contenido son intrones o secuencias sin información, que han de ser eliminados para dar mRNAs maduros y poder dirigir la formación de proteínas específicas. Además, existe gran cantidad de DNA espaciador intergénico organizado. también como secuencias únicas. Todo ello nos hace comprender que sólo una pequeña parte del genoma es informativa.

1.1.1 Replicación

Las células eucarióticas replican su genoma, es decir lo duplican, y ello ocurre durante la fase S del ciclo celular, que dura entre 8-10 horas en un ciclo celular típico. Para ello, el DNA se tiene que desempaquetar simultáneamente en muchos puntos llamados orígenes de replicación, siendo un replicón todo el DNA parental copiado entre dos orígenes de replicación. En cada origen de replicación

se produce un desenrollamiento transitorio de la doble hélice de DNA por una helicasa y ,bidireccionalmente se replica el genoma. La maquinaria enzimática que se ocupa de la replicación es un dímero asimétrico de DNA polimerasa α y DNA polimerasa δ . Las dos polimerasa trabajan sincrónicamente formando enlaces fosfodiéster 3'-5' y avanzando en el sentido 5'-3', siendo ayudadas durante la elongación por un tercer tipo de DNA polimerasa ϵ . Como el DNA eucariótico no está desnudo sino asociado con histonas, según se va formando nuevo DNA se van asociando con nuevas histonas que previamente se han sintetizado ^{1,4}.

1.1.2 Transcripción

Es el proceso por el que los genes, tanto los estructurales (dirigen la síntesis de proteínas) como los que codifican para rRNA o tRNA, se copian a cadenas de polirribonucleótidos (RNAs), siguiendo la pauta dada por los apareamientos de Watson & Crick. Como la naturaleza de estos genes es muy distinta, van a existir enzimas especializadas en transcribir los distintos grupos de genes, denominándose respectivamente RNAs polimerasas II, I y III. Los procesos de transcripción en sí no van a generar directamente RNAs maduros, sino precursores que van a madurar en el propio núcleo, originando RNAs maduros que saldrán al citoplasma para realizar su función de en la síntesis proteica.

El ribosoma eucariótico está formado por dos subunidades que juntas son 80 s (unidad de sedimentación indicativa del tamaño). El ensamblaje de los rRNAs con proteínas para la formación de ribosomas ocurre en el nucleolo. Una vez formados los ribosomas emigrarán al citoplasma, tanto del lado externo del retículo endoplásmico, como libres, para posibilitar la síntesis de proteínas.

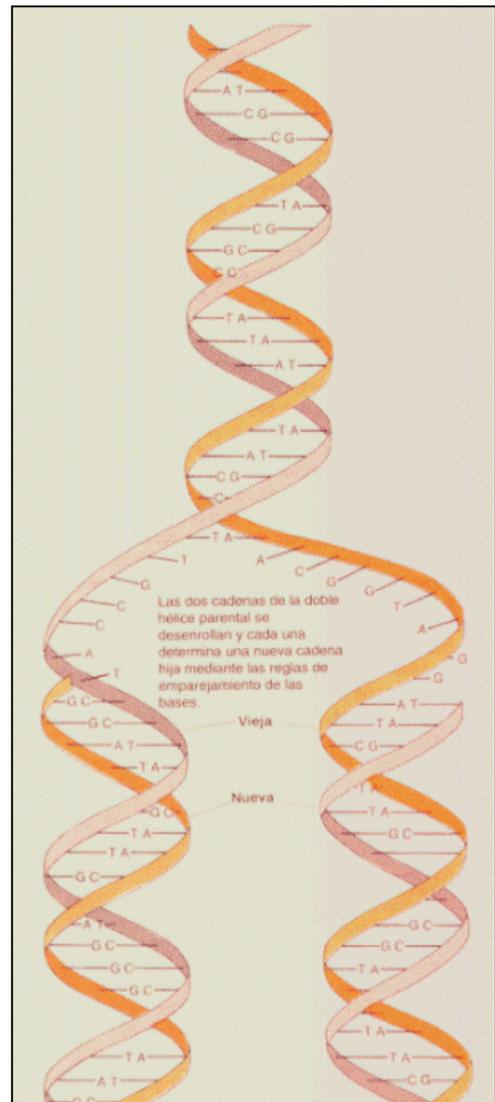


Fig.3.-Modelo de la replicación del ADN propuesto por Watson y Crick.

Vamos a describir con más detalle la transcripción de los llamados genes de clase II, que son aquellos transcritos por la RNA polimerasa II, concretamente los genes estructurales que codifican para proteínas y los genes que controlan la formación de los RNAs pequeños nucleares (snRNAs). Las secuencias inmediatamente anteriores al lugar donde se inicia la transcripción tienen toda la información para

la transcripción de ese gen y se conocen con el nombre de promotores. La secuenciación de muchos promotores de diferentes genes ha demostrado la existencia en la mayoría de los genes eucarióticos de unas secuencias “consenso” entre las que son de destacar la caja “TATA”, situada antes del inicio de la transcripción, la secuencia GC, y la secuencia CAAT un poco más alejada del promotor. Una vez sintetizado el transcrito primario, en un complejo proceso, es necesario eliminar los intrones o secuencias no codificantes para que la formación de mRNAs maduros. Todo este procesamiento tiene lugar en el núcleo y una vez formado el mRNA saldrá por los poros nucleares al citoplasma donde tendrá lugar la síntesis de proteínas^{1,2,4}.

1.1.3 Síntesis de proteínas

La última etapa de la expresión génica es la que conduce a la síntesis de proteínas, que se produce en el citoplasma y en la que intervienen los mRNAs que llevan la información, los tRNAs activados con sus aminoácidos correspondientes, los ribosomas y una serie de factores proteicos que dirigen todas las etapas de la síntesis proteica.

Es importante conocer cómo se produce el flujo de información de nucleótidos a aminoácidos. Los tRNAs poseen tripletes llamados anticodones que son complementarios a los tripletes informativos o codones de los mRNAs. Como el Código Genético esta degenerado, es decir hay más tripletes distintos(64) que aminoácidos(20) , un mismo tRNA puede reconocer varios codones distintos siempre que sólo cambien en la tercera posición del codón(hipótesis del balanceo). Por otro lado, es importante reseñar que el código genético es un código universal para todas las especies, que en él existen codones de iniciación, como AUG que codifica la metionina y codones de terminación de lectura, como UAA, UAG y UGA, y que una vez que se empieza a leer un mensajero, se lee ininterrumpidamente hasta que aparece una señal de terminación.

La etapa más comprometida de la síntesis proteica es la iniciación de la misma. Una vez superados complejos mecanismos, la síntesis proteica se produce, leyéndose el mRNA en el sentido 5'-3' y formándose la cadena polipeptídica desde el extremo NH₂ – hasta el -COOH terminal, hasta que en el lugar aminoacilo aparece un codón de terminación eRF, el cual introduce una molécula de H₂O y separa la cadena polipeptídica del tRNA , liberando el ribosoma y el mRNA^{1,2}.

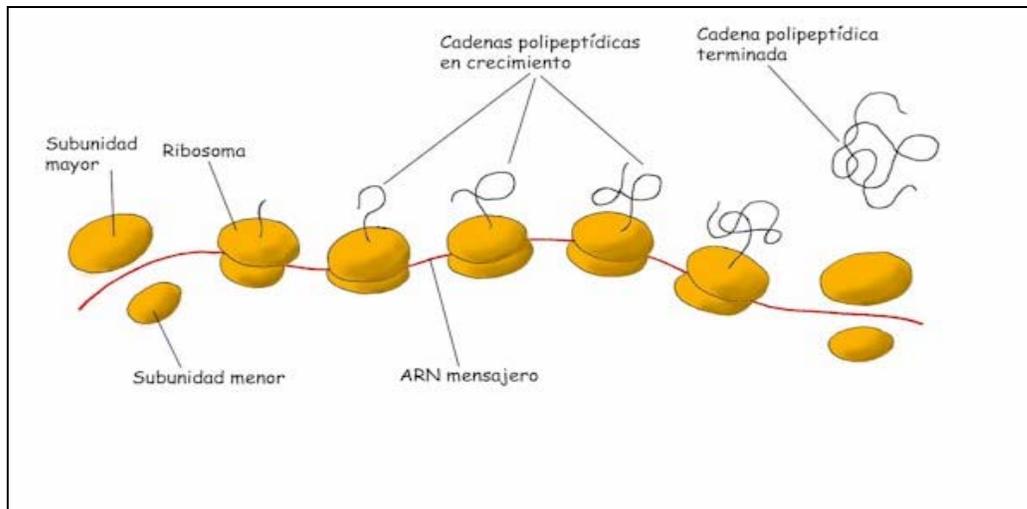


Fig.4.-Síntesis de proteínas

CONSIDERACIONES FUTURAS:

Todas las etapas de expresión de genes son extraordinariamente complejas y están muy reguladas, especialmente aquellas de iniciación de la transcripción, mecanismo de eliminación de intrones, vida media de los mensajeros e iniciación de la síntesis proteica. Se conocen muchos genes eucarióticos que están regulados a uno o varios de esos niveles por factores hormonales, nutricionales, estadio del desarrollo, tipo tisular, ect..

La aparición en línea germinal o somáticamente de alteraciones genéticas tales como mutaciones puntuales, deleciones, amplificaciones, sobreexpresión de genes.....,conducen en muchos casos a un crecimiento descontrolado de las células y a su malignización. El conocimiento molecular de los genes y de sus procesos de expresión será muy importante en el futuro para el diseño de terapias génicas que permitan el tratamiento y el control del Cáncer en las próximas décadas¹.

2.-Oncogenes y Cáncer

El cáncer es el resultado de una serie de accidentes genéticos al azar sujetos a selección natural. En todos los cánceres cabe esperar que participe una alteración de las restricciones normales sobre la proliferación celular. Para cada tipo celular existe un número finito de mecanismos por los que se puede producir esta alteración. De hecho parece que en el cáncer los responsables de la mayor parte de la desregulación de la división celular son algunos cambios en un grupo relativamente pequeño de genes. La identificación y caracterización de muchos de estos genes ha sido uno de los grandes triunfos en biología molecular.

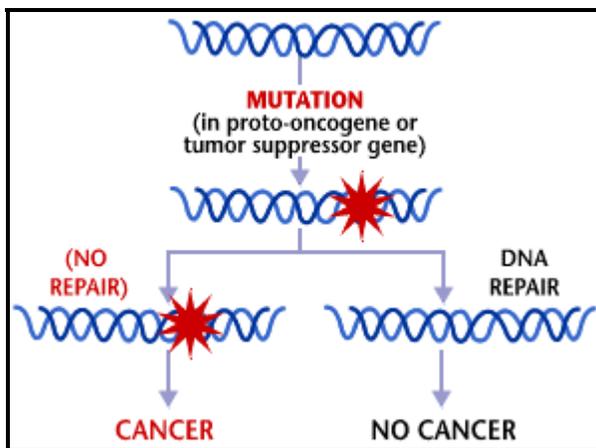


Fig.5.- Carcinogénesis: protooncogenes y genes supresores de tumores

Siguiendo la hipótesis genética del origen del cáncer, los tumores se producen por la expansión de una sola célula que sufre una serie de alteraciones decisivas en su genoma. Estas alteraciones pueden ser producidas por agentes ambientales (virus, radiaciones,...) o pueden haber sido heredadas. El proceso de carcinogénesis se produce de forma escalonada, tanto en el ámbito genotípico como en el fenotípico, fenómeno que se ha denominado progresión tumoral. En el ámbito molecular, la progresión tumoral es el resultado de la progresiva acumulación de lesiones en los genes. Existen cuatro clases principales de genes involucrados en la carcinogénesis: Los **protooncogenes** o genes promotores del crecimiento, los **antioncogenes** o genes supresores de tumores, los **genes reguladores de la apoptosis** o muerte celular programada y los **genes que regulan la reparación del ADN** dañado. Las tres primeras clases son genes reguladores del crecimiento y de la muerte celular. Del último grupo depende la correcta reparación de estos genes reguladores.

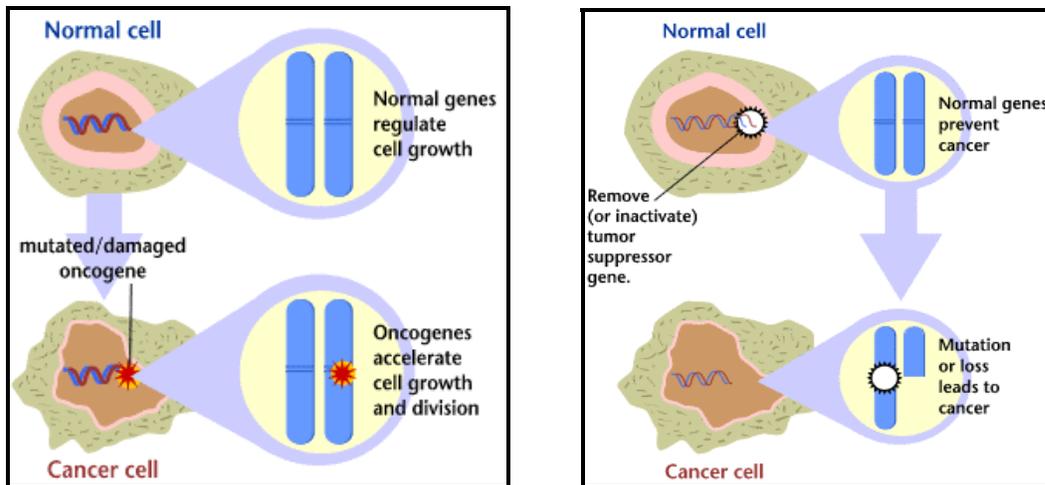


Fig.6.- Esquema del mecanismo de acción de los oncogenes y genes supresores de tumores

Mientras que los protooncogenes y oncogenes codifican proteínas que promueven el crecimiento celular, los antioncogenes o genes supresores tumorales codifican proteínas que limitan el crecimiento celular (el término gen supresor no es estrictamente correcto, ya que estos genes no suprimen el tumor). Los protooncogenes alterados (es decir, los oncogenes) son alelos dominantes, porque basta con la alteración de uno de los dos alelos para que se produzca su efecto transformador celular. En cambio, los dos alelos de los genes supresores tumorales han de estar alterados para que se produzca su efecto transformador celular (por ello han sido denominados también oncogenes recesivos). Los genes que regulan la apoptosis pueden ser dominantes como los protooncogenes o pueden comportarse como los genes supresores tumorales. Ambos alelos de los genes reparadores de DNA deben estar alterados para que estos se inactiven en su función reparadora y, en este sentido, pueden considerarse también genes supresores de tumores.^{5, 6}

Los oncogenes (literalmente genes causantes del cáncer), están asociados con la iniciación, promoción y/o mantenimiento de la neoplasia. Derivan de los protooncogenes –su contrapartida normal- que son genes que actúan en la regulación del crecimiento y diferenciación normales celulares. Los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes por un fenómeno de transducción retroviral o mediante influencias que alteren su comportamiento in situ, por lo que han sido divididos en oncogenes virales(v-oncs) y oncogenes celulares (c-oncs). Los oncogenes virales fueron los primeros en descubrirse como secuencias presentes en retrovirus con capacidad de inducir tumores en animales. Se observó que secuencias prácticamente idénticas a estos v-oncs existían también en el DNA celular. Se considera que en la evolución estas secuencias fueron capturadas o transducidas por los virus mediante su recombinación con el DNA de las células infectadas. Debido a su relación con genes virales, los oncogenes se designan con tres letras que indican el virus donde fueron

aisladas (por ejemplo, v-fes es un oncogen viral aislado en el virus del sarcoma felino-feline sarcoma virus-). Sin embargo. Los v-oncs no están presentes en todos los tumores. En algunos casos las células transformadas por retrovirus presentan dna proviral integrado en el DNA celular en vecindad a determinadas secuencias. Son estas secuencias-protooncogenes celulares- las que parecen alterarse como consecuencia de esta integración proviral cercana, transformándose en oncogenes celulares (c-oncs). En la mayoría de los tumores no parece existir rastro de infección por retrovirus y la inoculación de DNA procedente de estos tumores transmite a determinados cultivos celulares propiedades de las células neoplásicas. Este hecho indica la existencia de oncogenes celulares en el DNA de estas neoplasias. Tal es el caso del oncogen c-erbB-2, que si bien está relacionado con el oncogen viral v-erbB (virus de la eritroblastosis aviar) es un oncogen celular con distinción propia.^{5,6}

Los oncogenes codifican proteínas que promueven el crecimiento tumoral y que son denominadas oncoproteínas. Estas son similares a los productos codificados por los protooncogenes pero carecen de sus importantes elementos reguladores y se producen en la célula alterada de forma independiente a las señales celulares externas. Pueden actuar en los diversos eventos reguladores de la proliferación celular normal (fig.5):

1. Unión de un factor de crecimiento (GR) a su receptor específico localizado en la membrana celular;
2. Activación transitoria del receptor del GR que origina a su vez activación de proteínas transductoras de señal localizadas en la cara interna de la membrana celular;
3. Transmisión de la señal por el citosol hasta el núcleo celular a través de segundos mensajeros;
4. Activación de factores nucleares de regulación que inician la transcripción del DNA;
5. Entrada y progresión de la célula en el ciclo celular, que resultará finalmente en su división.

En el caso de los factores de crecimiento (GR), en situación normal el protooncogen codifica un receptor que, tras unirse a su GR, se activa transitoriamente para realizar la tirosín-fosforilización de numerosos substratos involucrados en la división celular. En cambio en la célula alterada, el correspondiente oncogen codifica un receptor que presenta una activación permanente que no requiere de la unión a su GR. Por ello, esta oncoproteína envía constantemente señales mitogénicas al interior celular^{5,6,7}.

La transformación de protooncogenes en oncogenes puede producirse a través de dos mecanismos:

- Uno de ellos consiste en la alteración de la estructura del gen que da lugar a la síntesis de una proteína anormal (oncoproteína) con una función aberrante .
- El otro consiste en la alteración de la regulación de la expresión del gen que da lugar a la producción aumentada o inapropiada de su proteína promotora de crecimiento estructuralmente normal.

Las lesiones específicas en el genoma que conducen a la activación de los oncogenes son las mutaciones puntuales, el reordenamiento de cromosomas (mediante traslocaciones o inversiones) y la amplificación del gen. En el caso de la amplificación, la activación del oncogen desencadena la reduplicación de su secuencia de DNA dando lugar a la producción de hasta varios centenares de copias del protooncogen. Al estar amplificado el gen puede producirse una mayor transcripción de copias de RNA mensajero y traducirse a una mayor cantidad de la proteína que codifica el gen, esto es, una sobreexpresión de la proteína. Al medir la amplificación se está midiendo, por tanto, un incremento en el número de copias del gen, mientras que al medir la sobreexpresión estamos evidenciando una síntesis excesiva del producto codificado por el gen. Otros mecanismos que pueden influir en que exista una sobreexpresión de la proteína son las alteraciones en el control de la transcripción del RNA o las alteraciones en la eliminación de la propia proteína.

Un hecho fundamental en la sobreexpresión de receptores de factores del crecimiento es que puede acompañarse de una activación constitucional y continuada de dichos receptores. En otras palabras, los receptores sobreexpresados pueden enviar su señal al interior celular de forma continua y sin necesidad de ser activados por su factor de crecimiento. Por tanto, pueden activar diversas vías intracelulares de traducción de señales que pueden ocasionar una desregulación del crecimiento celular y posiblemente una transformación oncogénica^{1,2,6}.

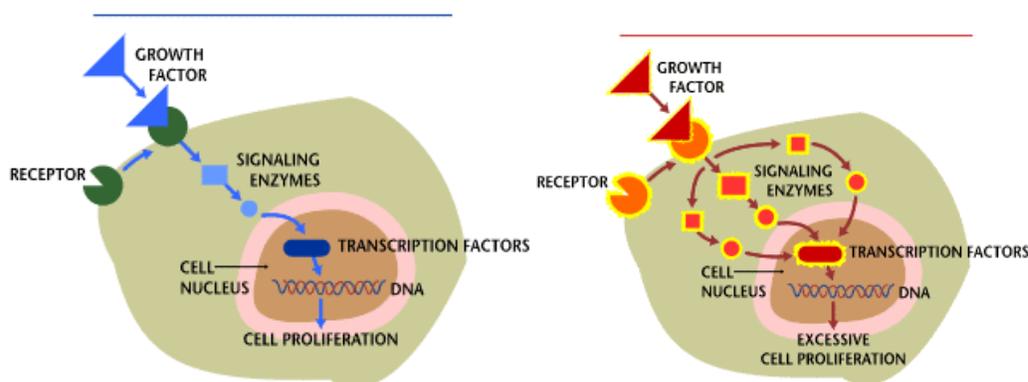


Fig.7.- Esquema de control de crecimiento celular normal y alterado

3.- LA HIPÓTESIS DEL ONCOGÉN

La existencia de oncogenes puede deducirse a partir de varios hechos; La existencia de virus que producen tumores, que fue precisamente el origen del descubrimiento del primer oncogen; la existencia de cánceres hereditarios; la presencia de alteraciones cromosómicas en las células cancerosas; y la relación entre el potencial mutagénico y la capacidad carcinogénica de diversos agentes.

Aunque ya en 1908 los daneses Vilhem Ellerman y Oluf Bang describieron que la inyección de un extracto de un pollo con leucemia transmitía a otro dicha enfermedad, este descubrimiento no tuvo repercusión debido a que entonces la leucemia no era considerado un cáncer. Sin embargo, tan sólo un año después Peyton Rous realizó en Nueva York una serie de experimentos similares ,inoculando extractos de sarcoma de pollo en el pectoral de animales sanos ,observando que rápidamente se desarrollaban tumores que causaban metástasis en diferentes visceras causando la muerte en 4-5 semanas.Así descubrió la existencia del primer virus causante de tumores :el virus del sarcoma aviar ,o como se le ha denominado ,virus del sarcoma de Rous o RSV(Rous Sarcoma Virus).En 1966 Rous recibió el premio Nobel por este descubrimiento. Pasaron decadas antes de que fuese aceptada la existencia de una gran variedad de virus tumorales en practicamente todas las especies de vertebrados.^{8,9,10}

La demostración de que el RSV debía su acción celular a la presencia en su genoma de un gen carcinogénico, tuvo lugar en 1970, cuando G.Steven Martin aisló mutantes del RSV cuya capacidad carcinogénica, pero no su infectividad dependía de la temperatura. Ello demostraba la existencia de un gen responsable de la capacidad de causar transformación celular, pero que no afectaba a la replicación del virus. Este gen fue llamado *v-src* (gen viral causante del sarcoma), y se acuñó el nombre de **oncogén** para referirse al gen causante de cánceres¹⁰(fig.8)

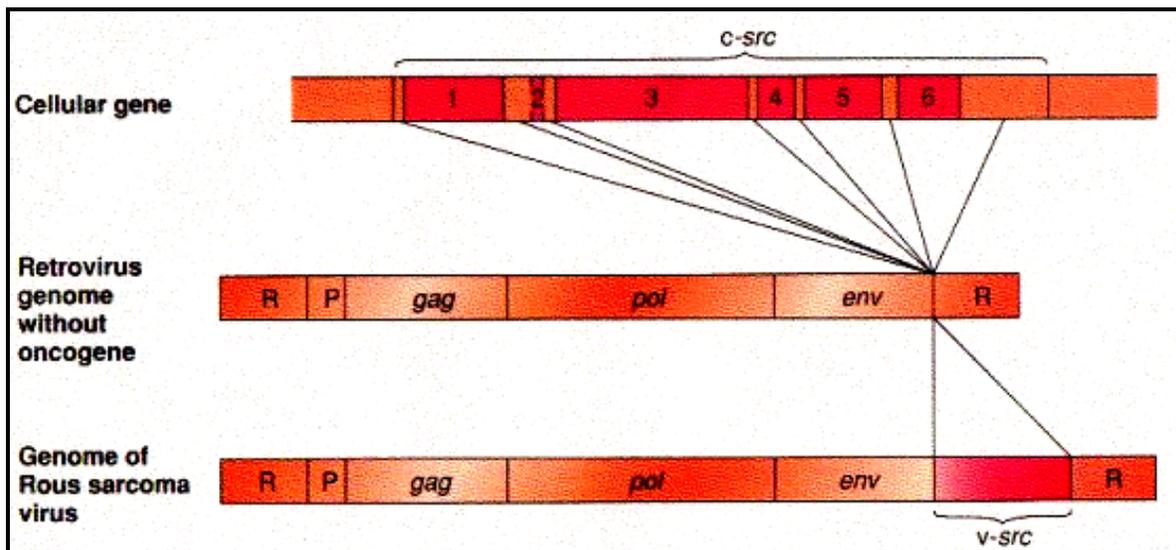


Fig.8.-Virus del sarcoma de Rous

El descubrimiento de que el RSV contenía un gen capaz de transformar células normales en cancerosas abrió la posibilidad de que las propias células de animales contuvieran también genes capaces de causar cánceres. Esta es la *hipótesis del oncogén*, avanzada ya en 1969 por Robert J. Heubner y George J. Todaro, que atribuía el origen de todos los cánceres a la expresión (activación) de oncogenes introducidos en la línea germinal de los vertebrados por la infección ancestral de virus oncogénicos (retrovirus).

3.1.-EL PRIMER PROTO-ONCOGÉN

El experimento crucial que demostró la existencia de un gen homólogo al *v-src* del virus del sarcoma de Rous se realizó en 1976 en el laboratorio de Michael J. Bishop y Harold E. Varmus, siendo indispensable para ello el desarrollo de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, y, sobre todo, el descubrimiento por David Baltimore y Howard Temin de la enzima transcriptasa inversa capaz de sintetizar cadenas de DNA a partir de un molde de RNA, lo que les valió el premio Nobel en 1975¹¹.

Estos experimentos mostraron que los retrovirus transformantes agudos se originan por la incorporación de genes celulares en sus genomas y, por lo tanto, la hipótesis del oncogén era correcta. Bishop y Varmus recibieron el premio Nobel por este descubrimiento en 1989.

Con todo esto se abrió la puerta a ensayos análogos que emplearon sondas para otros oncogenes existentes en otros retrovirus transformantes en animales, que conllevaron al descubrimiento de nuevos oncogenes. Se denominó **proto-oncogén** a la secuencia normal de las células de las que derivan los oncogenes víricos. Los proto-oncogenes tienen importantísimas funciones en el control del crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. No sólo no son perjudiciales, sino que son beneficiosos para las células, y será sólo su expresión excesiva o mutada la que induce a la transformación de las células normales en cancerosas^{10,12,13}.

4.- LOS ONCOGENES VIRALES

Los retrovirus son los únicos virus animales de material genético RNA que son capaces de inducir tumores. Existen virus con material genético DNA (familia herpesvirus y hepadnavirus) , en animales y humanos , que tienen potencial transformante pero en cuyos genomas no se han encontrado oncogenes. Los mecanismos por lo que estos virus producen cáncer pueden ser diversos. Por un lado, la inducción de mutaciones, tales como la delección de genes supresores de tumores o la formación de genes híbridos cuyos productos tengan actividades oncogénicas. Por otro lado, la inestabilidad cromosómica originada tras su integración en el genoma celular, responsable de la inducción de la expresión de genes adyacentes. Otra posibilidad es la estimulación de la proliferación celular para compensar en los tejidos la pérdida de las células que mueren como consecuencia de la infección^{10,14,12}.

Pero, ¿De que forma una infección vírica genera tumores? La solución a este problema, como otros muchos de la biología molecular, depende del desarrollo de un ensayo adecuado por el cual pueda determinarse la capacidad de generar tumores de distintas cepas de virus. El ensayo, ampliamente usado, consiste en la proliferación de fibroblastos sobre una placa de cultivo, al que se le añade un virus tumoral activo , apareciendo a los pocos días pequeñas colonias de células **transformadas** que proliferan anormalmente. Cada una de estas colonias es un clon que deriva de una única célula que ha sido infectada por el virus y ha incorporado de manera estable el material genético del virus. Una vez liberadas de los sistemas de división, las células crecen más que las normales en la placa de cultivo, siendo fáciles de seleccionar. Las células transformadas sufren un complejo grupo de anormalidades que resumimos en la **tabla 1**¹⁰.

Como vemos, estas anormalidades, son por ejemplo, la pérdida de inhibición de la división celular dependiente de la densidad celular y se apilan en capas a medida que proliferan. Además a menudo crecen independientes del anclaje y son capaces de dividirse incluso cuando se mantienen en suspensión; presentan una forma alterada y se adhieren escasamente al substrato e incluso a otras células, manteniendo una apariencia redondeada que recuerda a la de las células normales en mitosis; pueden ser capaces de proliferar incluso en ausencia de factores de crecimiento; son inmortales y en cultivo no alcanzan la etapa de senescencia; por último, cuando son inyectadas de nuevo en un animal huésped adecuado, pueden generar tumores.

CAMBIOS OBSERVADOS EN UN CULTIVO CELULAR TRANSFORMADO POR UN VIRUS TUMORAL

1.-Anormalidades relacionadas con la membrana plasmática

- A.-Activación del transporte de metabolitos
- B.-Abultamiento excesivo de la membrana plasmática
- C.-Aumento de movilidad de las proteínas de la membrana plasmática

2.-Anormalidades de la adherencia

- A.-Disminución de la adhesión a superficies(son capaces de mantener una forma redondeada)
- B.-Incapacidad de los filamentos de actina para organizarse en fibras de estrés
- C.-Disminución de la red externa de fibronectina
- D.-Incremento de la producción de activador de plasminógeno, causando un aumento de la proteólisis extracelular.

3.-Anormalidades de crecimiento y división

- A.-Crecimiento hasta una densidad celular extraordinariamente alta
- B.-Disminución del requerimiento de factores de crecimiento
- C.-Disminución de la dependencia de anclaje(pueden crecer incluso sin unión a una superficie rígida)
- D.-"Inmortalidad" (pueden continuar creciendo indefinidamente)
- E.-Pueden causar tumores cuando son inyectadas a animales susceptibles

Tabla 1

Este comportamiento desregulado de las células transformadas puede deberse a un oncogén transportado por el virus pero que no es necesario para la reproducción o supervivencia del propio virus. Esto fue descubierto por primera vez, gracias al descubrimiento de una mutante del Virus del Sarcoma de Rous que se multiplica de forma pero no transforma a la célula huésped. La pérdida de la capacidad transformadora corresponde a la pérdida o inactivación de un gen, que recibió el nombre de **src** . Se trata de un gen específico del virus del sarcoma de Rous , responsable de la transformación celular "in vitro"y de la generación de tumores "in vivo", pero es una carga innecesaria para el ciclo normal de propagación del propio virus ^{11,15,16} .

Se conocen unos 30 oncogenes presentes en retrovirus que infectan y causan tumores en animales. Puesto que estos retrovirus no infectan al hombre, el interés por ellos es puramente teórico. Sin embargo, son algo más que esto, ya que los oncogenes que se encuentran activados en tumores humanos, coinciden muchas veces con estos mismos oncogenes presentes en retrovirus animales. Aunque no son las mismas versiones mutadas, suelen ser formas alteradas de los mismos proto-oncogenes.

Los retrovirus humanos que han sido aislados hasta el momento no contienen oncogenes. Su acción oncogénica es probablemente la consecuencia de la activación de genes celulares adyacentes a su sitio de integración por la acción de un factor de transcripción¹⁰.

4.1.-VIRUS DNA COMO AGENTES TRANSFORMANTES

Los virus tumorales causan la transformación como consecuencia de su capacidad de integrar su información genética en el DNA de las células huésped. De forma frecuente producen una serie de proteínas que denominamos *proteínas transformantes* responsables de mantener la transformación de las células infectadas. Estas proteínas transformantes están codificadas por oncogenes presentes en el genoma vírico y generalmente son productos intracelulares. En los virus DNA, los oncogenes conocidos son parte integral del genoma vírico.

Si bien todos los tipos de virus DNA pueden ser virus tumorales, nos centraremos en un grupo de virus DNA muy pequeños, los *papovavirus*, de los cuales los más representativos son el SV40 y el poliovirus.

La infección por un papovavirus está dividida en una fase temprana, durante la cual éste forma una serie de proteínas víricas e induce proteínas celulares, y una fase tardía, durante la cual el DNA vírico es replicado, se forman las proteínas de la cápsula y los nuevos viriones maduran (Fig.9)

Las células en las que la fase tardía de la infección vírica sigue a la fase temprana, y la síntesis masiva del virus provoca la muerte celular, se dice que son *permissivas*; en estas células se puede dar una infección *lítica* o productiva.

Por tanto, los virus del poliovirus y el SV40 (Simian Virus 40) causan infecciones en ratones y monos, respectivamente, pero producen tumores en especies distintas a éstas. Aunque no infectan al hombre su importancia radica en la información que nos ha proporcionado el estudio de su actividad transformante sobre células de cultivo. La transformación de estos virus es un fenómeno de laboratorio, y no se conoce ningún virus que induzca el cáncer en poblaciones salvajes de animales.

Es decir, los virus tumorales de DNA, igual que el resto de los agentes causantes de cáncer, causan la transformación mediante la alteración de los tipos de proteínas producidos en la célula¹⁷.

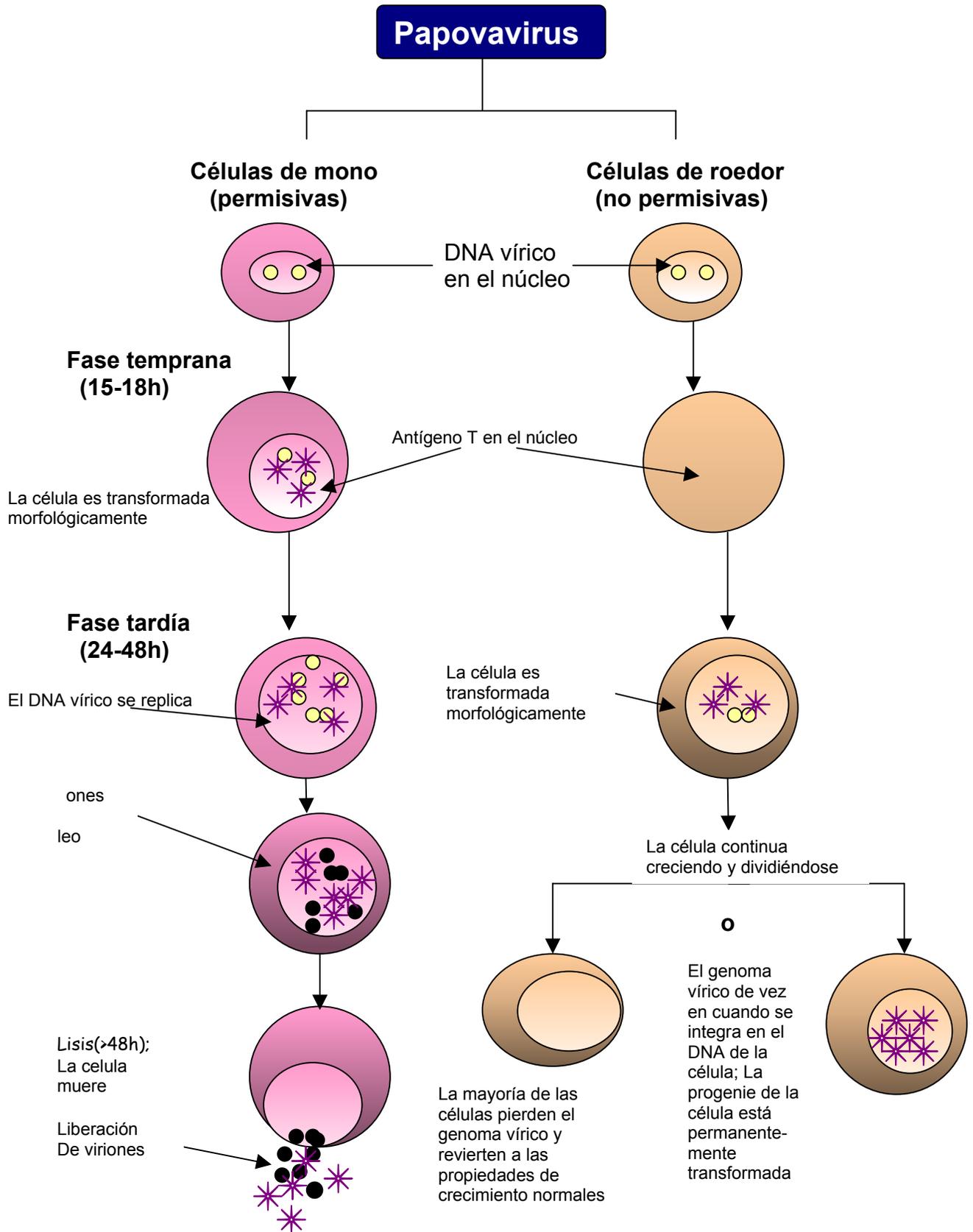


Fig.9.- Respuesta de las células permisivas y no permisivas a la infección por el SV40.En las células permisivas, la infección por el virus lleva a la muerte celular y a la producción de la progenie vírica.En las células no permisivas , la síntesis de proteínas víricas tempranas (antígenos T) hace que las células se conviertan en transformadas. Si el DNA vírico se integra permanentemente en el DNA de la célula, el resultado es la transformación permanente de las células.^{18,19}

4.2.-VIRUS RNA COMO AGENTES TRANSFORMANTES

La transformación mediante retrovirus es más complicada que la transformación mediante virus DNA debido a que el genoma retrovítico básico no codifica proteínas con actividad transformante.

Todos los virus son parásitos intacelulares obligados ya que carecen de la mayor parte de la maquinaria metabólica.Los retrovirus son ,quizás , los parásitos intracelulares más extremos,debido a que pueden ligar su genoma de manera mas o menos estable con el de la célula huésped sin que ésta resulte dañada excesivamente. La información vírica contenida en ellos es replicada como si fuera parte del DNA celular y transmitida a las células hijas las cuales la transcriben en forma de diversas partículas de forma perpetua. Así, el ciclo de los retrovirus difiere del ciclo de los virus DNA en dos aspectos fundamentales:

- La integración tiene un sitio específico en el genoma vírico
- Es parte del ciclo de infección proliferativa

El virus no mata a la célula huésped debido a que el DNA provírico puede digerir continuamente la síntesis de proteínas para la nueva progenie usando solamente una pequeña fracción de la maquinaria metabólica de la célula infectada , de manera que ésta puede continuar el crecimiento a un ritmo normal. De manera ocasional , los retrovirus se integran en la línea germinal de las células animales;de esta manera, son heredadas por todos los descendientes de ese animal, de forma que incluso pueden llegar a formar parte de la herencia de una especie. En el ratón, por ejemplo, se calcula que entre el 0.1-1% de su genoma consiste en DNA viral.Muchos de los retrovirus heredados, son completamente inactivos,a diferencia de lo ,que sucede con los integrados en células somáticas²⁰.

El genoma de muchos retrovirus, esta formado por regiones que codifican proteínas. Éstas son ***gag***, la cual codifica una poliproteína fundamental para dar lugar a cuatro proteínas estructurales del virión ; ***pol*** ,que codifica la transcriptasa inversa y la integrasa;y ***env*** que codifica una glucoproteína que recubre la superficie del virión. Todas estas proteínas retrovíticas se encuentran en viriones, y ninguna cambia las propiedades de crecimiento de los fibroblastos. Así, al contrario de los virus DNA, el retrovirus básico no es un virus transformante; de

hecho, las células infectadas son difíciles de distinguir de las no infectadas por los parámetros de vida celular. Sin embargo, como ya hemos visto, muchos retrovirus pueden causar la transformación celular y el cáncer en animales e incluso en humanos.

Virus de la leucemia murina

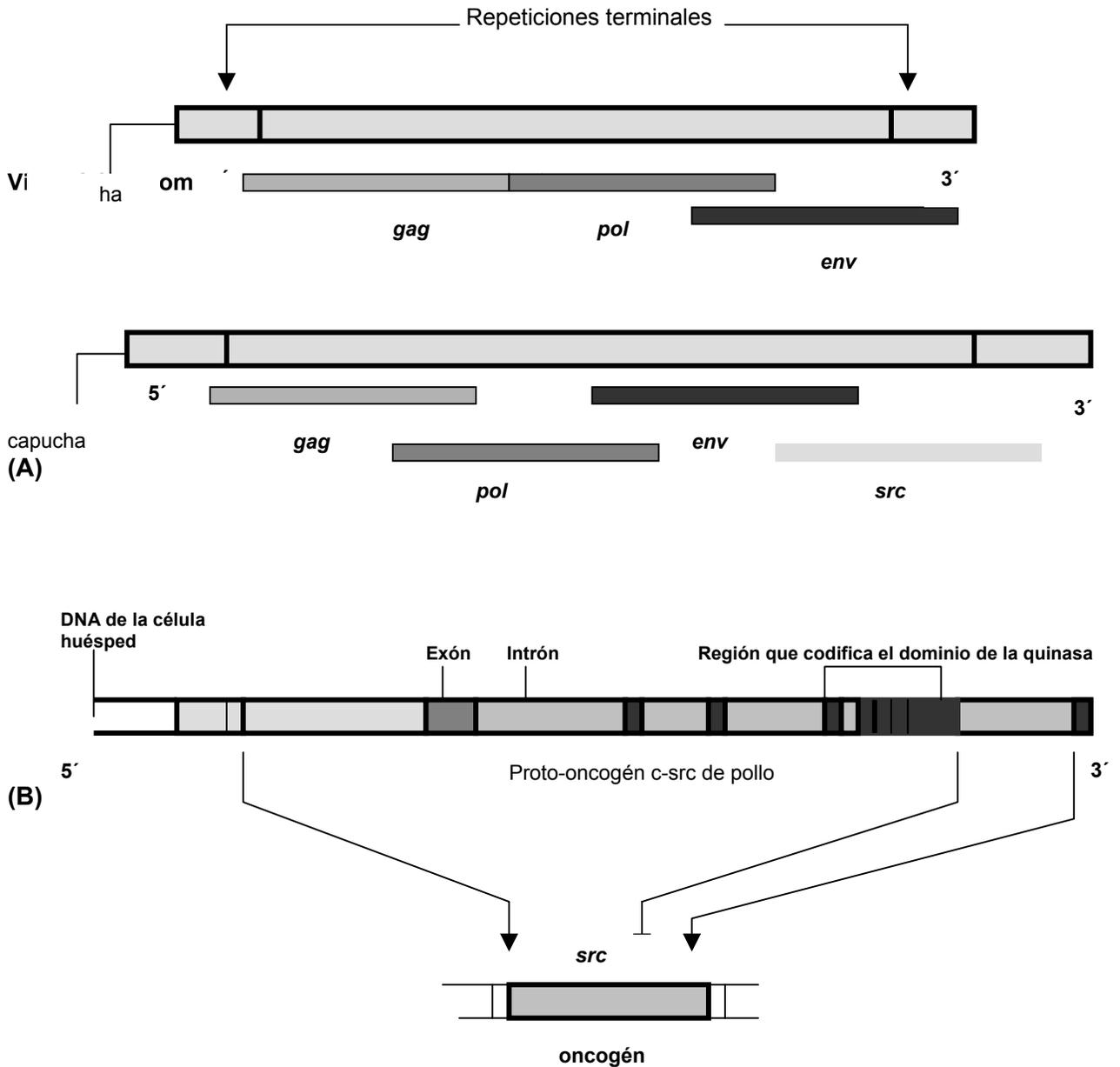


Fig.10.-Estructura del virus del sarcoma de Rous. (A) Organización del genoma vírico comparada con la de un retrovirus mas clásico (virus de la leucemia murina). El virus del sarcoma

de Rous es diferente de la mayoría de los retrovirus que transportan oncogenes en que éste ha retenido los tres genes víricos completos necesarios para el ciclo vital del virus: **gag** (que genera una glucoproteína que se fragmenta para dar lugar a las proteínas de la cápside viral); **pol**, (que produce la transcriptasa inversa y una enzima implicada en integrar el cromosoma vírico en el genoma del huésped, y **env** (que produce la glucoproteína de la cubierta). En otros retrovirus oncogénicos, uno o varios de éstos genes víricos se han perdido total o parcialmente debido al intercambio con el oncogén transformante y, por lo tanto, sólo se pueden generar partículas infecciosas del virus transformante en una célula que sea infectada simultáneamente con un **virus auxiliar**, no defectuoso y no transformante, que suministre las funciones perdidas. (A menudo el oncogén transformante se fusiona con un fragmento residual de **gag**, conduciendo a la producción de una proteína híbrida oncogénica que contiene parte de la secuencia de gag). (B) Interrelación entre el oncogén **v-src** y el proto-oncogén **c-src** del que ha derivado. Los intrones presentes en c-src han sido suprimidos (por maduración por corte y empalme) del v-src. Además v-src contiene mutaciones que alteran la secuencia de los aminoácidos de la proteína v-src, haciéndola hiperactiva y desregulada como proteína tirosina quinasa específica. El virus del Sarcoma de Rous ha sido escogido (por los investigadores de cáncer) por su capacidad de transformar células en células neoplásicas, lo cual realiza con una velocidad y eficiencia poco habituales^{21,22, 23}.

4.2.1.- Un retrovirus puede transformar una célula huésped insertándose DNA en un lugar próximo a un proto-oncogén del huésped

Existen dos caminos por los cuales un proto-oncogén puede pasar a oncogén una vez incorporado en un retrovirus: la secuencia del gen puede ser alterada o truncada de forma que codifique una proteína con una actividad anormal, o el gen puede quedar bajo el control de promotores y activadores potentes del genoma del virus, generándose producto en exceso o en circunstancias inapropiadas. Los retrovirus también pueden ejercer efectos oncogénicos similares por otro camino. Las copias de DNA o RNA del virus pueden ser simplemente insertadas en el genoma de la célula huésped en zonas cercanas a proto-oncogenes o incluso en los mismos proto-oncogenes. La disrupción genética resultante se denomina **mutación por inserción**, y el genoma resultante lo hereda toda la progenie de la célula huésped originaria. Las inserciones más o menos al azar, de las copias en DNA del RNA vírico en el DNA de la célula huésped ocurren como parte del ciclo vital normal del retrovirus y, al menos en un caso bien documentado, la inserción en cualquier lugar de una zona de 10 000 pares de nucleótidos de un proto-oncogén puede causar una activación anormal de este gen.

La mutagénesis por inserción nos proporciona un sistema importante para identificar proto-oncogenes, que pueden ser localizados por su proximidad al DNA del virus insertado. A menudo los oncogenes descubiertos por este camino suelen ser los mismos que los descubiertos por el otro sistema (como homólogos de los oncogenes que los retrovirus transportan de una célula a otra) pero también se han descubierto nuevos proto-oncogenes. Un ejemplo de ellos es el gen **Wnt-1**, activado por mutagénesis por inserción en cánceres de mama de ratones infectados por el virus del tumor mamario. Este gen resulta ser estrechamente homólogo al gen **wingless de Drosophila**, que participa en la comunicación célula-célula que regula los detalles del patrón corporal de la mosca¹⁰.

Sistema de detección	Oncogenes
Mutación por insercción	<i>Wnt-1(int-1), fgf-3(int-2), Notch-1(int-3) , lck</i>
Amplificación	<i>L-myc, N-Myc</i>
Transfección	<i>neu, N-ras, trk, ret</i>
Traslocación	<i>bcl-2, RARa</i>

5.- PROTOONCOGENES ACTIVADOS EN TUMORES HUMANOS

Si los virus son responsables tan sólo de un mínimo porcentaje de los cánceres en el hombre, la hipótesis del oncogén que postulaba que el cáncer es consecuencia de la alteración de genes celulares normales, implica la existencia de otros mecanismos de activación. Por tanto deben existir diversos mecanismos por los que un proto-oncogen humano pueda ser activado, adquiriendo capacidad oncogénica, y por tanto convertirse en un oncogen¹⁰.

Esto puede ocurrir por mutaciones ,que causen tanto cambios en la secuencia de un proto-oncogén ,como ausencia de regulación de su expresión. Los tipos de mutaciones que pueden activar un proto-oncogén son múltiples; pueden ser mutaciones puntuales ,con cambio de tan sólo un aminoácido de la proteína que codifica, suficiente para activar un proto-oncogén .Puede ser por delección de un fragmento de un gen originando una proteína truncada con funcionamiento alterado; por aumento de número de copias del gen (amplificación),con sobreexpresión de la proteína que codifica ;o por traslocación ,con cambio de sitio del proto-oncogén causando síntesis anormal de las proteínas codificadas.

En ocasiones un mismo proto-oncogén ha sido hallado activado de diversas formas en distintos tumores humanos .Por tanto, no existe un único mecanismo de mutación para cada oncogén. El análisis de los reordenamientos cromosómicos, como por ejemplo las traslocaciones que se han encontrado en células de distintos tipos de cánceres, sobre todo en leucemias, ha permitido identificar un gran número de oncogenes humanos. También es interesante señalar que algunos oncogenes aislados mediante la técnica de transfección de células NIH 3T3(Técnica desarrollada en 1971 por Miroslav Hill y Jana Hillova, con la que transformaron cultivos de fibroblastos de embrión de pollo mediante la transferencia directa del DNA del RSV, y perfeccionada en los laboratorios de Robert A. Weinberg, Michael Wigler y Geoffrey M. Cooper donde se comprobó inicialmente que el DNA de células normales contenía secuencias que eran capaces de transformar células de la línea de fibroblastos de ratón NIH 3T3, induciendo crecimiento excesivo. Estos resultados llegaron a la conclusión de que las células normales contenían proto-oncogenes que se activaban durante el proceso de transfección o por agentes químicos , y que podían ser detectados utilizando el ensayo de transfección de monocapas de células NIH 3T3) han sufrido la activación de precisamente durante el proceso de transferencia génica, por formación de proteínas de fusión como consecuencia del recombinaciones génicas con otros fragmentos de DNA, o por una expresión anormalmente elevada^{10,13}.

TIPOS DE MUTACIÓN
Secuencias cortas de DNA
Mutación puntual: Transición Transversión
Insercción de bases
Delección de bases
Secuencias largas de DNA
Delección génica
Amplificación cromosómica
Inversión cromosómica
Translocación cromosómica

Tabla 2-Clasificación de las mutaciones según la secuencia de DNA alterada.

5.1.1.-El cambio de un solo aminoácido puede inducir transformación

Un ejemplo de activación por mutación puntual lo constituye precisamente el H-ras , el primer oncogén humano identificado (año 1982 por los grupos de Mariano Barbacid , Weinberg y Cooper, aislado en un carcinoma de vejiga, como el homólogo del oncogén *v-ras* presente en el genoma del virus Harvey del sarcoma de rata). Estos autores describieron la comparación de las secuencias del protooncogén humano H-ras y de su versión oncogénica aislada a partir del carcinoma de vejiga. La diferencia esencial se identificó como una mutación puntual G a T que ocasiona el cambio de un codón GGC, que codifica el aminoácido glicina , a otro GTC que corresponde a una valina. Es muy sorprendente que el cambio de un único aminoácido pudiera alterar la actividad biológica de una proteína normal, de modo que adquiriera la capacidad de inducir la transformación celular.

La activación por fusión del proto-oncogen *abl* en las leucemias mielógenas crónicas, o por sobreexpresión del *myc* en los linfomas de Burkitt, son ejemplos de translocaciones cromosómicas. A continuación, veremos como ejemplo el primer caso, donde se produce una traslocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 que da lugar al característico cromosoma Filadelfia, responsable de la formación de un gen híbrido entre un gen llamado *bcr* y el proto-oncogen *abl* ^{10,13}.

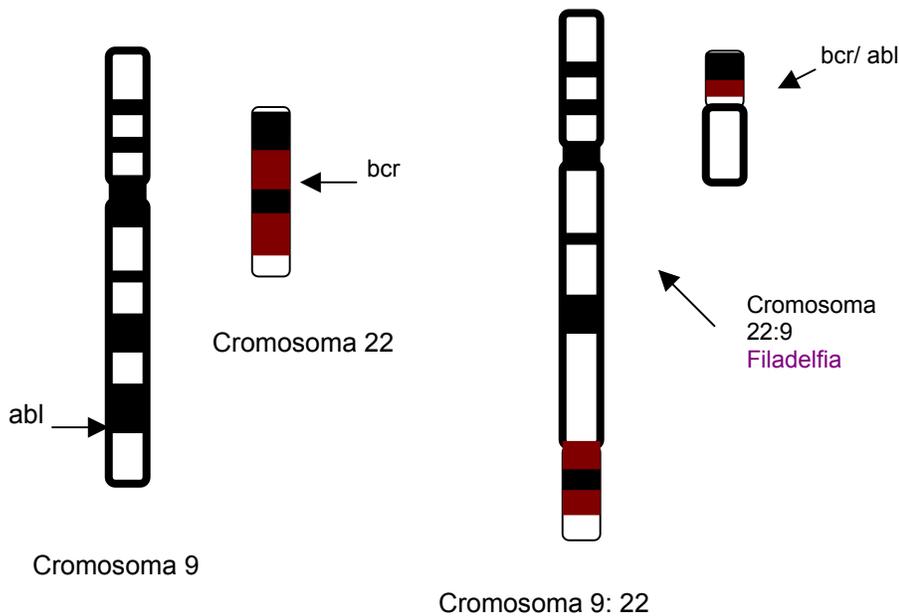


Fig.-11.- Activación oncogénica del gen *abl* por causa de la transformación cromosómica que da lugar al cromosoma Filadelfia.

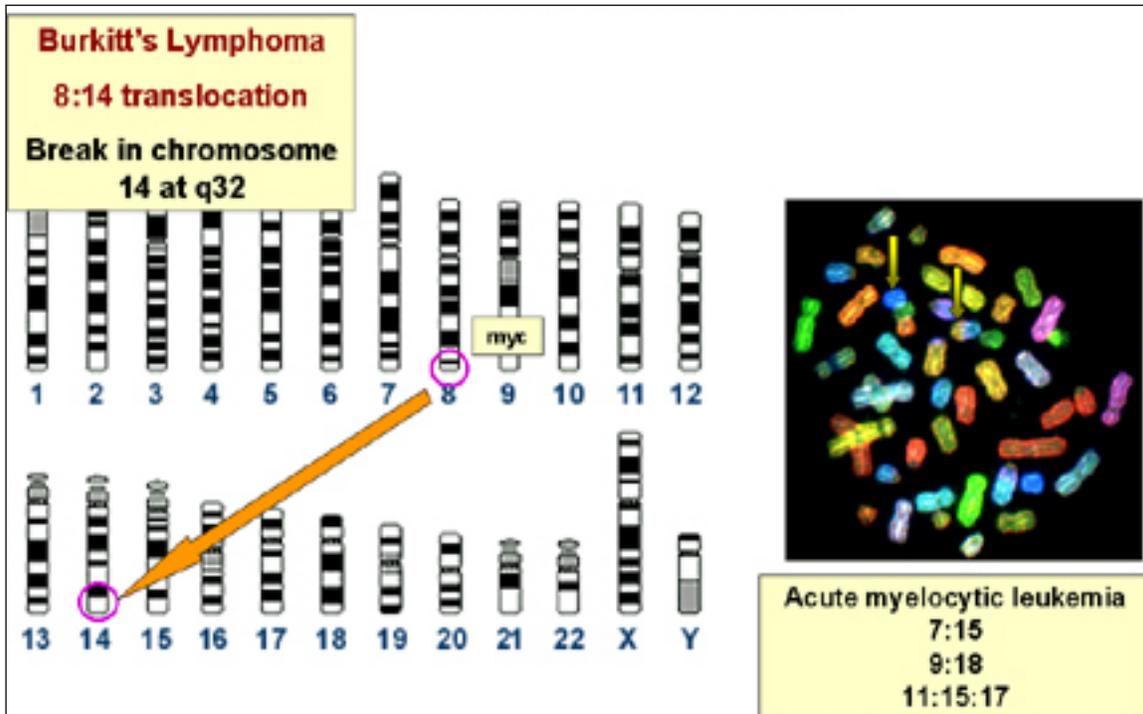


Fig.12.- Traslocación 8:14 en el linfoma de Burkitt

6.- LOS ONCOGENES Y SUS PROTEÍNAS: CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS.

Muchos oncogenes son similares a genes que actúan en vías de control del crecimiento, cosa que sugiere que las proteínas oncogénicas interaccionan con los sistemas de control del crecimiento de las células.

Existen cuatro tipo de proteínas que participan en el control del crecimiento celular: los factores de crecimiento; los receptores de factores de crecimiento; los transductores intracelulares de señales, y los factores de transcripción nuclear. Cada tipo de proteína controladora del crecimiento ha dado lugar a uno o más oncogenes.

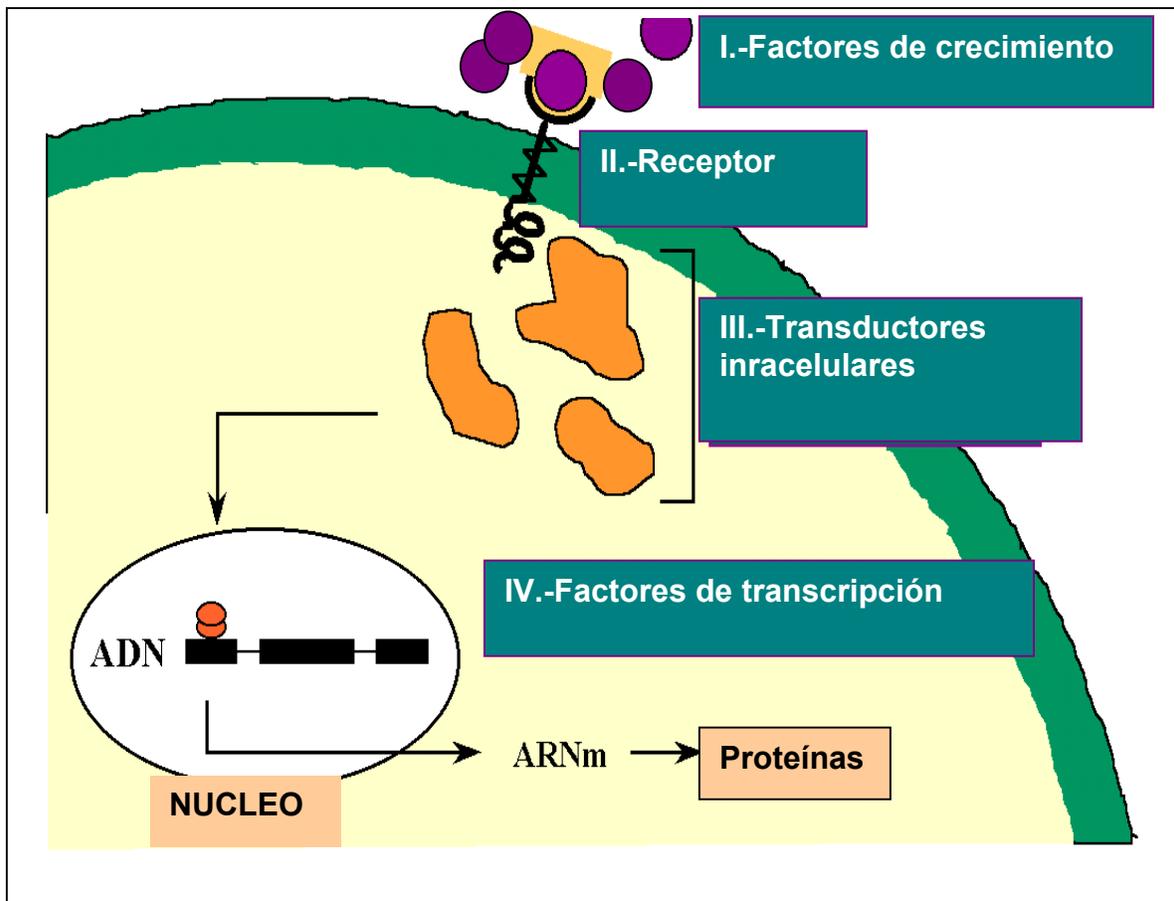


Fig.13.-El control del crecimiento celular comprende cuatro tipos de proteínas las cuales pueden dar lugar a oncogenes. Son los Factores de crecimiento (I), los receptores(II), los transductores (III) y los factores intranucleares (IV).

El inicio del crecimiento celular implica que la célula se comprometa a finalizar el ciclo celular, compromiso que se adquiere en G_1 y que en el ciclo celular de levadura se denomina **START** (Fig.12). La célula detecta si los receptores de los factores de crecimiento están ocupados y, si las condiciones metabólicas son propicias, la célula responde comprometiéndose a finalizar G_1 y a pasar por S, G_1 , y M, para dar lugar a dos células similares a la original^{4,10}.

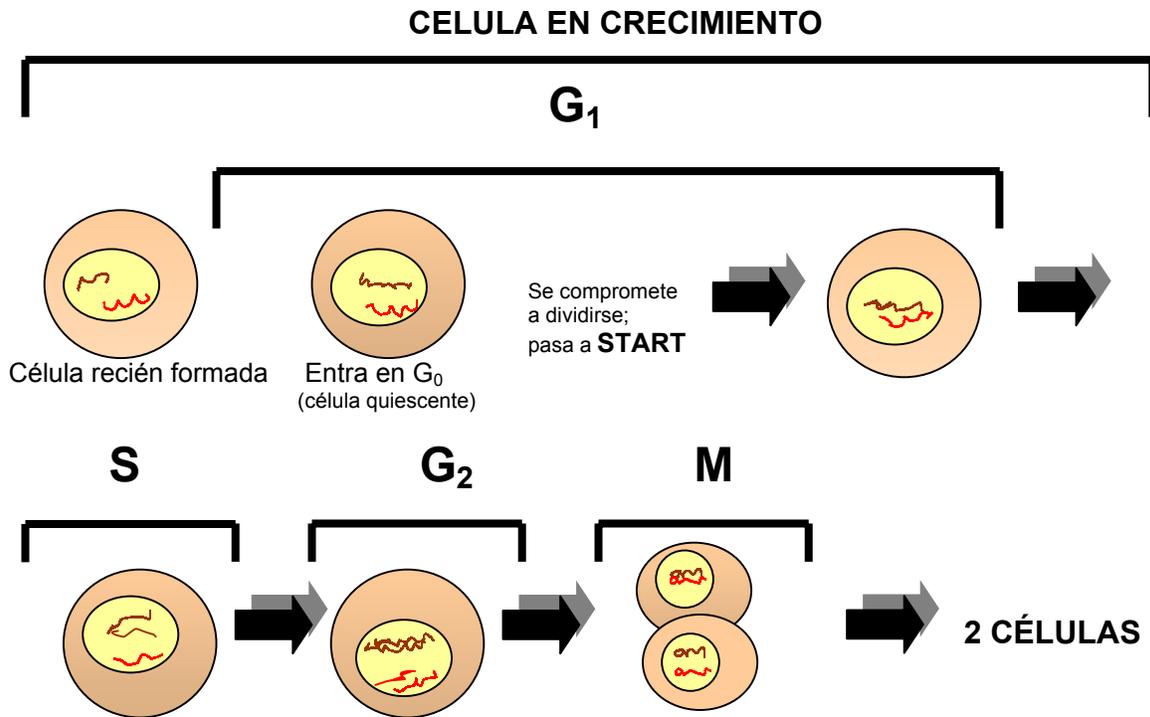


Fig.13-El ciclo celular. Una célula recién nacida puede permanecer quiescente o puede continuar creciendo. El momento decisivo es el inicio de la fase G₁, cuando la célula o bien pasa por **START**, y entonces se compromete al crecimiento, terminando el resto del ciclo celular y dividiéndose (G₁, S, G₂ y M) o bien entra en el estado G₀ y continúa metabolizando pero no crece.

La cadena de acontecimientos que llevan al crecimiento comienza con interacciones ligando-receptor en la superficie celular como en el interior celular (fig.12). Los receptores intracelulares están representados por los receptores de los esteroides, los cuales interactúan con ligandos lipofílicos que pasan de manera pasiva a través de las membranas celulares y alcanzan el receptor en el citoplasma o en el núcleo. La célula interpreta la señal y a menudo envía **transductores intracelulares**, o segundos mensajeros, que pueden alterar la transcripción, ya sea permitiendo que se expresen nuevos genes o modificando los niveles de expresión de genes no activos. Este concepto es fundamental para el desarrollo de nuestros objetivos, ya que muchas proteínas oncogénicas son modificadoras de la transcripción. La respuesta transcripcional altera la composición proteica de la célula, proveyéndola de las proteínas críticas necesarias para el crecimiento de la célula. La transcripción es controlada a través de dos tipos de secuencia de DNA: los promotores, que están localizados cerca del sitio de inicio de la transcripción, y los "enhancers" que están alejados del sitio de iniciación y son capaces de actuar a distancias largas y variables. Ambos actúan a través de proteínas de unión específicas (**factores de transcripción nucleares**) que reconocen pequeñas secuencias dentro de los promotores y los "enhancers".

Las tablas 3 ,4 y 5 muestran un listado de los oncogenes más representativos, clasificados según los cuatro tipo de productos genéticos de control del crecimiento.

ONCOGEN HALLADO EN		Naturaleza de la proteína codificada
Retrovirus Animal	Tumor no vírico	
<u>CLASE I: FACTORES DE CRECIMIENTO</u>		
<i>SIS</i>	sarcoma de simios	Una forma del factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
<u>CLASE II: RECEPTORES</u>		
A.-Receptores de la superficie celular con actividad proteín-tirosín-quinasa		
<i>fms</i>	sarcoma felino de Mc:Donough	Receptor de CSF_1
<i>erb-B</i>	Eritroblastosis aviar	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<i>ros</i>	Sarcoma aviar	Relacionado con el receptor de de insulina
<i>neu(erb B-2)</i>	Neuroblastoma	Relacionado con el factor de crecimiento epidérmico
B.-Receptores intracelulares		
<i>erb-A</i>	Eritroblastosis aviar	Receptor de hormona tiroidea

Tabla 3.- Factores de crecimiento y receptores de factores (Clases I y II)

ONCOGEN HALLADO EN			Naturaleza de la proteína codificada
Retrovirus Animal		Tumor no vírico	
CLASE III: TRANSDUCTORES INTRACELULARES			
A.-Proteín-tirosín-quinasa(PTK)			
<i>src</i>	Sarcoma aviar de Rous		Proteín- quinasa que fosforilan residuos de tirosina
<i>yes</i>	Sarcoma aviar de Yamaguchi		
<i>fps(fes)</i>	Sarcoma aviar de Fujinami		Proteín-quinasa que fosforilan residuos de tirosina
<i>abl</i>	Leucemia murina de Abelson		
<i>met</i>	osteosarcoma murino		
B.-Proteín-serín / treonín-quinasa			
<i>mos</i>	Sarcoma murino de Moloney		Proteín-quinasa e serina o treonina
<i>raf</i>	Sarcoma murino		
C.-Proteínas Ras			
Ha-ras	Sarcoma murino de Harvey	Ca.de vejiga,piel, y mama.	Proteínas de unión a nucleótidos de Guanina con actividad GTP-asa
Ki-ras	Sarcoma murino de Kirsten	Ca.de pulmón,colon	
N-ras		Neuroblastoma y leucemias	
D.-Relacionados con la fosfolipasa c			
<i>crk</i>	virus del sarcoma aviar		Regiones relacionadas con src logas con la asa c.

Tabla 4.- Clase III.- Receptores intracelulares.

	ONCOGEN HALLADO EN		Naturaleza de la proteína codificada
	Retrovirus Animal	Tumor no vírico	
CLASE IV: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEARES			
jun	Virus 17 del sarcoma aviar		Factor de transcripción AP1
fos	Osteosarcoma FBJ		
myc	Mielocitomatosis MC29 aviar		
N-myc		Neuroblastoma	Proteínas posiblemente involucradas en la regulación de la transcripción
myb	Mieloblastosis aviar	Leucemia	
ski	SKV770 aviar		
p53			Antioncogen que se codifica en proteínas oncogénicas nucleares de virus DNA
rel	Reticuloendoteliosis aviar		
RB		Retinoblastoma	

Tabla 5.- Factores de ranscripción nucleares (Clase IV)

6.1.-FACTORES DE CRECIMIENTO (CLASE I)

Sólo se ha descubierto un oncogén (*sis*) que proviene de forma natural de un factor de crecimiento. Se trata del primer proto-oncogén cuyo producto fue identificado como un factor de crecimiento. La forma oncogénica de *sis* fue identificada en el genoma del virus del sarcoma de mono a principios de los años setentay secuenciada por el grupo de Stuart A.Aaronson en 1983.La comparación, en este mismo año entre la secuencia de v-*sis* y la del gen del Factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGF, reveló una elevada homología, lo que permitía predecir que v-*sis* proviene del gen que codifica la cadena B del PDGF. La comprobación de su potencial oncogénico proviene de experimentos en los que la sobreexpresión del gen PDGF-B o c-*sis* inducía transformación celular.Para que esta capacidad oncogénica se exprese, es obvio que deben existir receptores adecuados en la célula diana. Otros resultados sugieren que PDGF-B puede causar transformación por un mecanismo intracrino, sin necesidad de ser secretado al exterior,mediante receptores activados localizados en el interior celular ^{10,24,25}.

La acción oncogénica de *sis*, está apoyada por toda una serie de experimentos tales como la inducción de su expresión por promotores tumorales, así como su expresión y la de sus receptores en células aisladas de distintos tumores tales como sarcomas, gliomas, y algunos carcinomas. Lo más llamativo es que se ha descrito una relación entre la secreción de PDGF-B y el grado tumoral en gliomas humanos. Por su parte el PDGF-A es expresado en melanomas, osteosarcomas y gliomas humanos. Además el PDGF-B induce la aparición de cáncer por un efecto angiogénico, es decir, favorece la vascularización de los tumores mediante la inducción del crecimiento de las células endoteliales que forman las paredes de los vasos sanguíneos.

6.2.-RECEPTORES DE FACTORES Y HORMONAS (CLASE II)

La unión de factores específicos al receptor que lo reconoce, es capaz de enviar una señal de crecimiento a la célula. Algunos receptores de la superficie celular tienen proteínas-tirosín-quinasas integradas en su dominio citoplasmático; estos receptores probablemente envían las señales de crecimiento mediante la fosforilación de los residuos de tirosina en una o varias proteínas diana que inician una cascada de acontecimientos. Los genes de estos receptores se convierten en oncogenes cuando son mutados de modo que el receptor permanece activo incluso sin estar unido a su ligando. Se cree que la señal enviada por una proteína oncogénica es la usual, pero el receptor alterado ha perdido el control del ligando de modo que permanece constitutivamente activo. Una célula que contiene este tipo de oncogén crece independientemente de los factores que habitualmente regulan su crecimiento.

El producto del oncogén *erb-A* deriva del receptor intracelular de la hormona tiroidea. En este caso, el oncogén produce un receptor modificado, el llamado *Erb-A*, que puede actuar compitiendo con el receptor endógeno de la hormona tiroidea, causando un crecimiento sin control. En realidad, *Erb-A* no transforma directamente las células sino que trabaja de forma coordinada con *Erb-B* que deriva del receptor del EGF. Tanto el oncogén *erb-A* como el *erb-B* fueron identificados por primera vez en el virus de la eritroblastosis de ave, en el que actúan de forma sinérgica para dar oncogenicidad completa²⁴.

El proto-oncogén *c-erbB* está amplificado en diversos tumores humanos, como los carcinomas de mama, vejiga, riñón, gástricos, ováricos, glioblastomas y melanomas, sobreexpresándose comúnmente en las fases tardías de éstos últimos. La expresión de un número anormalmente alto de receptores puede provocar la proliferación celular en presencia de concentraciones muy pequeñas de sus ligandos, EGF o TGF- α que, de otro modo no serían capaces de estimular las células, y también pueden potenciar actividades autocrinas y paracrinas. La sobreexpresión del proto-oncogén *c-erb* se ha asociado con rápidas recurrencias en carcinomas de mama. Los genes celulares relacionados, *c-erb 3* y *crb-4*, tienen

una amplia expresión en muchos tejidos del organismo humano, y se encuentran sobreexpresados en un porcentaje de líneas celulares de cáncer de mama.

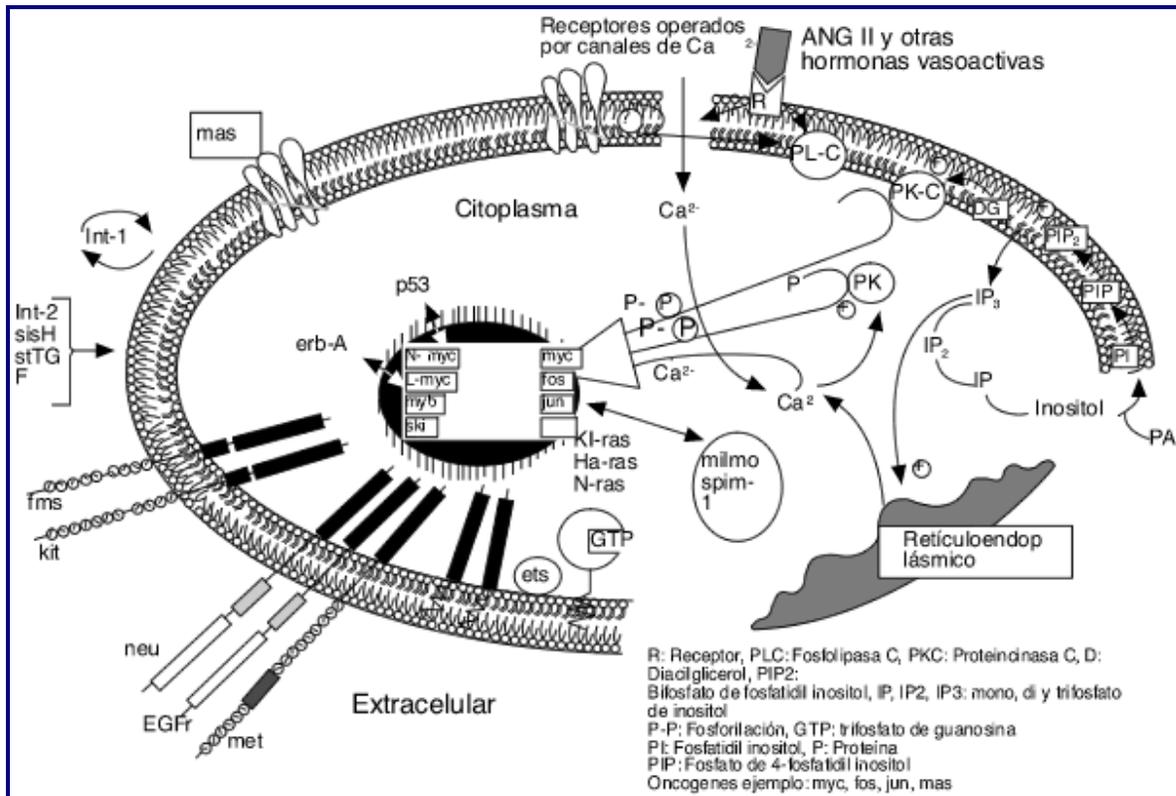


Fig.14.-Mecanismo de acción de receptores de factores de crecimiento

6.3.-TRANSDUCTORES INTRACELULARES (CLASE III)

Se trata de la clase más amplia de oncogenes. Son genes que derivan de proteínas que actúan como transductores intracelulares, proteínas que transmiten señales desde el receptor hasta su diana celular. Los transductores más conocidos son el grupo de las proteínas G, una de las cuales, la G_s , controla la síntesis del AMP_c . Este tipo de oncogenes derivan de una variedad de proteínas transductoras ninguna de las cuales se conoce tan bien como el grupo de las proteínas G. Muchos de ellos codifican proteínas-quinasas que difieren de los receptores de superficie producto de los de clase II en que son proteínas nucleares o intracitoplásmicas que carecen de dominio transmembrana o extracelular.

6.4.-FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEARES (CLASE IV)

De una u otra manera todos los oncogenes pueden causar cambios en el núcleo celular, debido a que las células en crecimiento producen proteínas en proporciones diferentes a las de las células quiescentes. Las proteínas codificadas por los oncogenes de clase IV, parecen ejercer directamente efectos sobre el núcleo celular, codificando proteínas cuya función, en la mayoría de los casos, es la regulación (activación o inhibición) de la expresión génica, actuando como factores de transcripción inducibles. Ello hace particularmente interesantes a estos proto-oncogenes, ya que son responsables directos del control de aquellos genes que convertirán a las células normales en cancerosas. La actividad de los productos de los proto-oncogenes nucleares, así como factores de transcripción está regulada por fosforilación, por las interacciones con otras proteínas, por ligando y por sus niveles de expresión. El análisis de la actividad y regulación de los proto-oncogenes nucleares, así como la caracterización y estudio de los genes que controlan tanto los proto-oncogenes existentes en las células normales como sus versiones alteradas oncogénicas, son clave para el conocimiento del proceso por el que las células normales se convierten en cancerosas. Nos centraremos en algunos de ellos.

La familia de los genes *myc*, compuesta por el proto-oncogén **c-myc**, homólogo al retroviral **v-myc**, y los genes relacionados **N-myc** y **L-myc**, son frecuentemente sobreexpresados en una gran variedad de cánceres humanos. Existen además, otros dos genes similares llamados **S-myc** y **B-myc** que por el contrario, parecen inhibir la transformación maligna. Los tres genes (c-myc, N-myc, y L-myc) son sobreexpresados como consecuencia de amplificaciones en distintos tumores humanos, como neuroblastomas, carcinomas microcíticos de pulmón, carcinomas de mama, estómago, pulmón y colon, neuroblastomas y glioblastomas; o de traslocaciones, como ocurre en el 100% de los linfomas de Burkitt (c-myc). Además se han encontrado mutaciones en el promotor y en la región de transactivación de c-myc en estos linfomas. Sin embargo, se conocen muy pocos genes regulados por c-myc. Se ha descrito la regulación por c-myc de la ornitín descarboxilasa y la protimosina- α , y la represión de algunos otros. Todo ello sugiere que c-myc debe actuar sobre el control de la proliferación celular, en concreto en la transición de la fase G_0/G_1 a la fase S. Por otra parte, c-myc induce apoptosis en fibroblastos y células mieloides tratadas con citostáticos o en ausencia de factores de crecimiento.^{26,27}

Existen otros oncogenes que codifican componentes del ciclo celular. Veremos el gen que codifica la ciclina D1, llamado **PRAD1** o bcl-1, cuya sobreexpresión puede tener valor pronóstico en el cáncer de mama. Se ha descrito la sobreexpresión de **PRAD1** en distintos tumores: adenomas de paratiroides, como consecuencia de inversiones cromosómicas; en linfomas de células B, por translocaciones entre el cromosoma 11, donde se encuentra, y el 14; y, sobre todo, en el 15-25% de los cánceres de mama y quizás en un número superior de carcinomas de cabeza y cuello, de esófago y de pulmón y en algunos tipos de linfomas, debido a la amplificación del brazo largo del cromosoma 11. Es

posible, además, que existan otros mecanismos adicionales aparte de la amplificación génica responsables de que la ciclina D se sobreexpresen en un 30-40% de los carcinomas de mama.

Hay que añadir que la sobreexpresión de la ciclina D1 puede tener un valor pronóstico en el cáncer de mama, puesto que se ha observado que cuando se asocia a la expresión de **c-erbB**(EGF-R) o Rb, los pacientes tienen una peor prognosis. Ello pudiera llevar a identificar aquellos pacientes que requieran terapias más agresivas.

Existe otro grupo de estos oncogenes implicados en la muerte celular. Sabemos, en resumidas cuentas, que al hablar de muerte celular nos referimos a una más de las opciones que una célula tiene, junto con la de continuar dividiéndose y la de diferenciarse terminalmente. Es también una posible respuesta ante un agente externo dañino o ante la ausencia de factores que son necesarios para su correcto funcionamiento. Mientras que la prolongación excesiva del período durante el cual una célula está dividiéndose activamente puede contribuir a la aparición de tumores como consecuencia de mutaciones en sus genes, es evidente que el proceso opuesto de muerte, cuando la célula corre el riesgo de alteraciones genéticas o epigenéticas, disminuye el riesgo de cánceres. El **bcl-2** (**B**-cell leukemia/lymphoma-2) es un oncogén inicialmente detectado en linfomas foliculares de células B. El gen bcl-2 resulta sobreexpresado como resultado de una traslocación entre los cromosomas 14 y 18, causando un aumento de la supervivencia de los linfocitos B. Esta acción es oncogénica porque incrementa la posibilidad de acumulación de mutaciones en estas células, que normalmente tienen una vida media muy corta. De acuerdo con ello, la expresión de bcl-2 en cultivos celulares no causa un aumento de proliferación, sino que impide la muerte por apoptosis de células que de otro modo no resistirían la limitación de factores de crecimiento u otras condiciones adversas. Se ha observado que la introducción de genes bcl-2 exógenos en células tumorales tratadas con quimioterápicos o sometidas a dosis de radiación que ocasionan daño en el DNA, evita la muerte celular.

Así la expresión de bcl-2, está asociado a un mal pronóstico de distintos cánceres humanos, como neuroblastomas, carcinomas de colon, próstata y otros. Por el contrario, los resultados en cuanto a la expresión de bcl-2 y cáncer de mama son, de momento, poco claros. Si bien una elevada proporción de cánceres de mama expresan altos niveles de bcl-2, éstos parecen estar inversamente relacionados con el número de células apoptóticas, y en cultivos de células epiteliales mamarias la sobreexpresión de bcl-2 inhibe la muerte celular pero induce morfogénesis más que tumorigenicidad. En general, se puede afirmar que bcl-2 parece tener un papel más claro en la apoptosis de células hematopoyéticas, tanto normales como cancerosas, que de tumores sólidos.

A pesar de la rápida fama e interés adquirido por el bcl-2, en los últimos años, su acción no está plenamente esclarecida. El gen bcl-2 no es capaz de inhibir todas las formas de apoptosis, como por ejemplo la inducida por la acción de linfocitos T citotóxicos.

Se sabe que este oncogén participa junto con otros en la aparición de carcinogénesis experimental, y no parece aventurado decir que lo haga también en el organismo humano. Y esto, no porque colabore activamente con una acción oncogénica directa, sino probablemente porque permite la generación o mantenimiento de células en las que se acumulan progresivamente oncogenes activados y genes supresores inactivados, o en las que pueden iniciarse procesos de inestabilidad genética que conduzcan a un fenotipo mutador. Se plantea incluso la duda, de si es posible que la expresión de bcl-2 en células aisladas que escapan a la resección quirúrgica del tumor primario, puedan explicar la aparición de metástasis varios años más tarde.²⁸.

7.- CICLO CELULAR Y APOPTOSIS. IMPLICACIONES ONCOLOGICAS

7.1.-EL CICLO CELULAR

La serie de sucesos por los que una célula da lugar a dos células hijas, duplicando su material genético, se denomina *ciclo celular*, y comprende el período entre dos divisiones mitóticas. El ciclo celular se divide en dos fases diferenciadas: una de síntesis (fase S), en la que el material cromosómico se duplica, y otra de mitosis (fase M), durante la cual la célula condensa sus cromosomas y los alinea en un haz microtubular, para posteriormente separarlos hacia polos opuestos de la misma, antes de la división celular. Las fases S y M no se solapan sino que están separadas por dos períodos conocidos como G1 y G2, que dividen el ciclo celular en cuatro fases. La progresión celular a lo largo del ciclo está perfectamente regulada. Dicho control se materializa a través de una serie de procesos interdependientes en las que se hallan implicados kinasas, vías proteolíticas y alteraciones cromatínicas. Para una correcta transmisión del material genético es esencial que el DNA se replique con absoluta fidelidad, teniendo para ello las células unos mecanismos de vigilancia denominados *checkpoints*, que permiten la monitorización de la replicación del DNA, así como la reparación o la muerte celular programada (**APOPTOSIS**) de aquellas células en las que la replicación del material genético se ha visto comprometido en distintas circunstancias (errores de replicación, radiaciones, quimioterapia otros mutágenos).

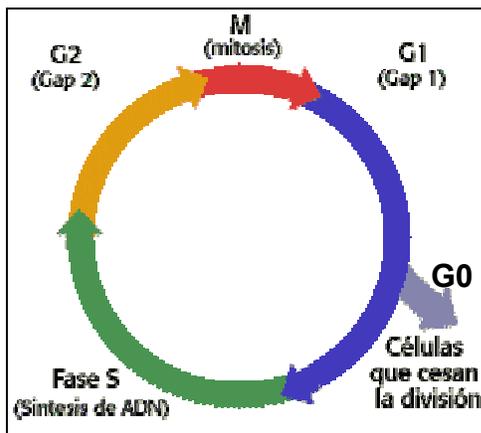


Fig.15.-El ciclo celular:

Periodo G1: Chequeo del código genético
 Periodo S: síntesis del DNA. Comienza la duplicación del ácido desoxirribonucleico
 Periodo G2: Preparación para la división final
 MITOSIS: División celular
 Periodo G0: las células no se están reproduciendo, salen del ciclo celular y entran en un estado quiescente.

A pesar de la heterogeneidad de las enfermedades neoplásicas, todas las células cancerosas tienen en común el haber perdido su capacidad de controlar la proliferación (ciclo celular) y/o la muerte celular programada (apoptosis). Ello tiene importantes consecuencias. En primer lugar la célula tumoral se duplica repetidamente de forma no controlada, lo que conlleva un crecimiento tisular ininterrumpido. En segundo lugar, la pérdida de los *checkpoints* de control conduce a la acumulación de mutaciones y otros errores genéticos en las células

hijas, lo que se conoce como “inestabilidad genómica”. El mejor conocimiento de los factores que regulan el crecimiento y muerte celulares, así como sus alteraciones en los procesos tumorales, permitirá el desarrollo de regímenes terapéuticos dirigidos a modular la progresión del ciclo celular, los *checkpoints* de control y la apoptosis.

7.1.1.-La transición G1/G0 : salida y entrada en ciclo celular

La fase G1 (del inglés **Gap** o intervalo) es el período de 6-12 horas que sigue a una división celular, previo a la síntesis o replicación del DNA. Durante G1 la célula crece, controla su microambiente y su propio tamaño, así como la integridad de su material genético. Posteriormente entrará en la fase S, lo que conlleva la replicación de su material genético. Sin embargo si se ha producido algún tipo de daño del DNA (radiaciones, quimioterápicos, deprivación de nucleótidos o tóxicos ambientales), el ciclo celular se mantiene en G1 mientras se repara el DNA. Esta parada del ciclo, está mediada por proteínas específicas como p21, p53, Rb y kinasas dependientes de ciclina. El papel de estas proteínas lo veremos más adelante.

La gran mayoría de células de mamífero no se hallan habitualmente en ciclo, a pesar de que la proliferación celular es esencial para la supervivencia de los organismos. En el hombre, mientras las neuronas y las células musculares esqueléticas no se dividen nunca, las células epiteliales se dividen diariamente. Cuando no proliferan, las células pueden permanecer en un estado especializado de “no crecimiento” o quiescencia, denominado G0. La depleción de factores de crecimiento permite a la célula entrar en fase de quiescencia. Durante la misma, la célula permanece en activo pero su maquinaria del ciclo se halla inactiva. Bajo una estimulación apropiada con factores de crecimiento, las células pueden reentrar en el ciclo mediante la acción de ciclinas y kinasas dependientes de ciclina.

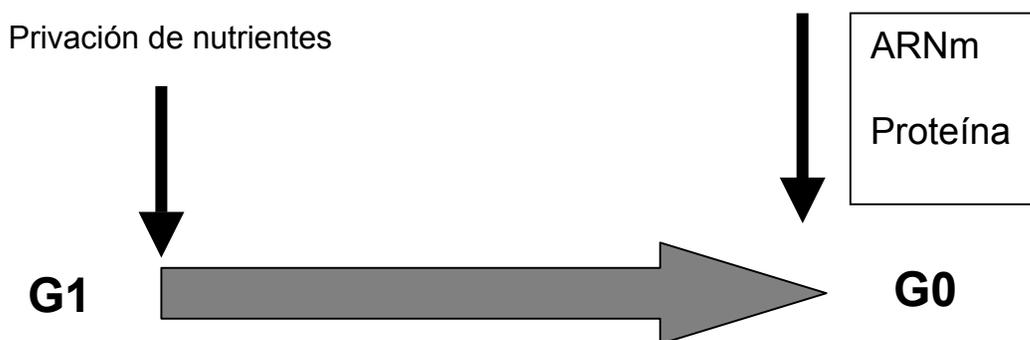


Fig 16.-Cuando se priva a la célula de nutrientes o de factores de crecimiento, ésta entra en una fase quiescente a la que nos referimos como G0

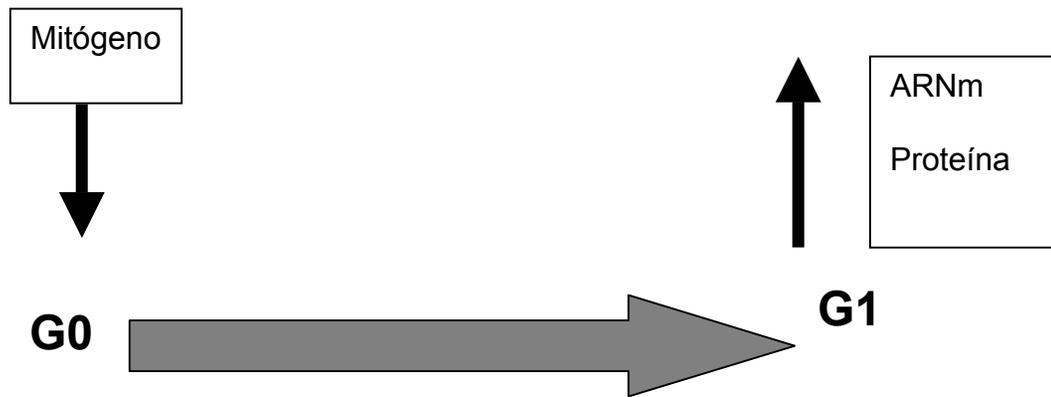


Fig.17.- Cuando las células quiescentes (G0) se estimulan con factores de crecimiento, vuelven a entrar en el ciclo celular.

7.1.2.-La fase S: Síntesis de ADN

La fase S (de Síntesis de DNA) corresponde al tiempo (6-8 horas) durante el cual se replica el DNA. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de DNA de cadena doble, que son copia la una de la otra, que serán transferidas a las células hijas en la mitosis (M). Aparte de la duplicación del DNA, durante la fase S se sintetizan enzimas que participan en la síntesis de DNA y proteínas implicadas en la organización de los cromosomas como las histonas.

Al igual que ocurre en G1, la fase S consta también de un sistema de vigilancia que monitoriza la integridad del material genético. A diferencia de lo que ocurre en G1 en la que los daños genéticos están producidos por agentes externos, en la fase S éstos se generan habitualmente por replicación defectuosa e incorporación incorrecta de nucleótidos. La detección de este tipo de lesiones resulta en una disminución de la velocidad de síntesis de DNA, lo que presumiblemente permitiría la reparación de los daños genéticos. Es interesante observar que algunas de las proteínas que participan en la vigilancia y reparación del DNA dañado durante la fase S son las mismas que se hallan implicadas en el checkpoint de G1, lo que parece decir que la pérdida funcional de dichas proteínas conduciría a un crecimiento celular no controlado y a una acumulación de errores genéticos.

7.1.3.- La transición G2/ M : Producción de células “hija”

El periodo comprendido entre la finalización de la replicación del DNA y el inicio de la división es la fase G2 (3-4 horas). Durante ella , las células se preparan para la escisión en dos células hija. En esta fase existe un tercer punto de **control G2-M** , en la que la célula debe comprobar dos condiciones antes de dividirse :Una, que ha duplicado la masa de modo que puede dar lugar a dos células hija, y otra, que ha completado la replicación del DNA, monitorizando la existencia de posibles roturas acontecidas durante la fase S como resultado de una defectuosa reparación del DNA. La detección de dichas roturas previene o retrasa la progresión a M, permitiendo la reparación de las lesiones genéticas mencionadas. Las deficiencias en este tercer *checkpoint* conlleva la aparición de numerosas anomalías cromosómicas, tales como deleciones, reordenamientos, y amplificaciones en las células hija.

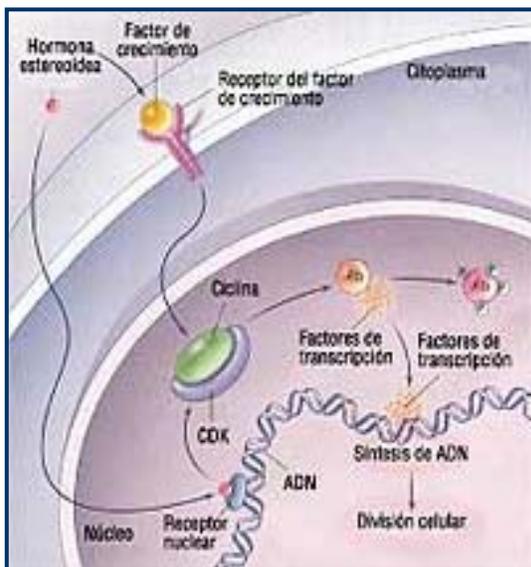
La entrada en mitosis está mediada por la kinasa dependiente de ciclinas cdc2, cuya función se halla regulada al mismo tiempo por los productos génicos cdc25 y wee-1. Microscópicamente la primera manifestación de que la célula entra en mitosis es la compactación de la cromatina en cromosomas, haciéndose visibles como entidades individuales, y los microtúbulos se organizan a partir de dos *cuerpos polares* que se sitúan en ambos extremos de la célula formando el *huso acromático* que va a servir como guía a los cromosomas. Durante la primera fase de la mitosis (**profase**), desaparece la membrana nuclear. A continuación , los cromosomas se unen por medio de *cinetocoros*, unas estructuras asociadas a sus centrómeros, a los microtúbulos en la zona media celular formando la placa ecuatorial (**metafase**). Es en este momento donde existe otro punto de control M, que no permite seguir adelante si todos los cromosomas no están correctamente alineados sobre el huso. Si esto es así, una señal desconocida hace que las cromátidas hermanas se separen , yendo cada una hacia un polo de la célula (**anafase**). Cuando llegan a los extremos (**telofase**) , la célula comienza a escindirse (*citocinesis*) por la zona media dando lugar a dos células hija. El reparto de los demás componentes tiene lugar prácticamente por el flujo de citoplasma, sin que se conozca ningún mecanismo que asegure una distribución igualitaria como ocurre con los cromosomas. La membrana nuclear vuelve a formarse y los cromosomas a descondensarse.

La existencia de puntos de control es clave, ya que permiten que todo el proceso tenga lugar cuando la célula está correctamente preparada mediante varias comprobaciones de que se han dado las condiciones necesarias para que la célula pase a la siguiente fase. Además los puntos de control sirven de freno durante el ciclo, asegurando que una fase no se inicia antes que la anterior haya finalizado , y permiten el control del ciclo por señales externas.

7.1.4 La regulación del ciclo celular: Ciclinas y quinasas dependientes de ciclina

La maquinaria del ciclo celular está constituida por enzimas denominadas quinasas o proteín-quinasas capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato o aminoácidos específicos. El resultado de la fosforilación de una proteína es un cambio en su actividad o en su capacidad para formar parte de una estructura. En la proliferación celular y en otros muchos procesos celulares, la fosforilación tiene un papel esencial como método para poder modular, activar o inactivar la funcionalidad de proteínas. Cada quinasa puede fosforilar un cierto número de proteínas sustrato, y por ello producir un amplio rango de respuestas simultáneas. Las quinasas que coordinan los complejos procesos de control del ciclo celular se denominan **quinasas dependientes de ciclina** o **CDKs** (Cyclin-Dependent Kinases) porque su actividad de fosforilar proteínas está regulada por la asociación reversible de otras proteínas: las **ciclinas**. Las oscilaciones en la concentración de ciclinas son críticas, existiendo un ciclo de síntesis y degradación durante cada ciclo de la división. Además las quinasas pueden ser también reguladas al ser desfosforiladas por otras quinasas.

Durante las distintas fases del ciclo celular se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y CDKs, cuya actividad fosforilando determinadas



proteínas, dirige el avance del ciclo celular. El control se ejerce a distintos niveles, sobre la transcripción de los genes de las ciclinas, sobre su degradación y sobre la modificación de las CDKs por desfosforilación e inhibición de su actividad.

Existen dos clases principales de ciclinas: las **ciclinas G1**, que se unen a CDKs durante la fase G1 y son necesarias para el inicio de la fase S, y las **ciclinas mitóticas**, que se unen a CDKs durante la fase G2 siendo esenciales para la entrada en mitosis²⁹.

Fig.18.-Regulación del ciclo celular: Ciclinas²⁹

De la misma forma que las ciclinas regulan positivamente la actividad enzimática de las CDKs, existen otras proteínas que las inhiben y se han denominado por ello inhibidores de la CDK (**CDKI**). Dado que su participación en la progresión fisiológica del ciclo celular es crítica, parece lógico pensar que tanto ciclinas, CDK como CDKI pueden estar implicados en procesos oncogénicos. Es más: ya que la suspensión de los distintos checkpoints del ciclo, particularmente los de la interfase G1 / S, se hallan frecuentemente asociados a carcinogénesis, la pérdida de controles negativos como CDKI o el incremento en la función de reguladores positivos como ciclinas y CDK puede, con toda seguridad, conducir a

un estado de tumorigenicidad. Estas consideraciones están sustentadas por la observación de que la expresión y la actividad de muchos de estos reguladores del ciclo se encuentran alteradas en un gran número de líneas celulares tumorales y tumores primarios. Así, por ejemplo, los genes p15 y p16 se encuentran deleccionados, reordenados o mutados en una gran mayoría de las líneas celulares tumorales, lo que sugiere que fisiológicamente participan en la supresión tumoral. La expresión de ciclina E está desregulada en carcinomas de mama, colon y próstata. El gen de ciclina D1 está amplificado y sobreexpresado en gran número de tumores humanos como el carcinoma de mama, el esofágico, el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón, cáncer de vejiga y el carcinoma hepatocelular.

7.2.-MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS

El fenómeno de apoptosis, o muerte celular programada, implica la activación de mecanismos específicos que conducen a la muerte de las células. Aunque a primera vista pueda resultar paradójico la existencia de estos mecanismos, el fenómeno de muerte celular programada es mucho más común de lo que inicialmente pudiera pensarse. Se produce apoptosis de modo natural durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en múltiples tejidos. Es un fenómeno esencial en el mantenimiento de la homeostasis durante el desarrollo, la diferenciación y la regeneración de los organismos pluricelulares. Durante la embriogénesis, por ejemplo, más de la mitad de las neuronas necesarias para el establecimiento inicial de conexiones sinápticas están programadas para morir, con la intención de permitir un desarrollo normal del sistema nervioso^{30,31}.

A diferencia del proceso de necrosis o de la muerte celular accidental, la apoptosis es un proceso extremadamente regulado, que se caracteriza por cambios morfológicos distintivos como fragmentación del DNA, deformación de la membrana plasmática y distorsión del volumen celular. La apoptosis, se diferencia asimismo de la necrosis en que se trata de un proceso activo, que implica la transcripción de nuevos genes y la síntesis de nuevas proteínas. La muerte celular apoptótica tiene dos fases:

- Fase de determinación: en ella, las células reaccionan ante un estímulo (o ante su ausencia) decidiendo iniciar el proceso de muerte.
- Fase de ejecución: Las células sufren una serie de alteraciones estructurales que conducen a la muerte. En esta fase, se produce una disminución de la adhesión celular y los contactos intercelulares, cambios en la superficie celular y protusiones que causan un aumento de la movilidad, una reducción del volumen celular y la condensación de la cromatina en zonas discretas, sobre todo, en la periferia del núcleo.

Estas alteraciones se acompañan y son probablemente debidas a la activación de unas enzimas llamadas proteasas que degradan proteínas y de otras

que producen cortes en el DNA llamadas nucleasas y que son quizá activadas por las anteriores.

7.2.1.-Caspasas

La fase de ejecución de la apoptosis comienza con la acción de una familia de proteasas relacionadas con la ICE (Interleukin-1 β Converting Enzyme) , por su capacidad de hidrolizar la molécula de interleucina. Se trata de las *caspasas* ,de la familia de las cisteín-proteasas. Las caspasas poseen un residuo cisteínico en su centro activo y degradan proteínas, por lo que su nombre es una abreviatura de Cysteín-requiring-ASPartate-proteASE. Todas las caspasas se sintetizan en un estado inactivo o de proenzima; en presencia de los estímulos apropiados siguen un proceso autocatalítico que resalta en la inducción de su actividad proteolítica.

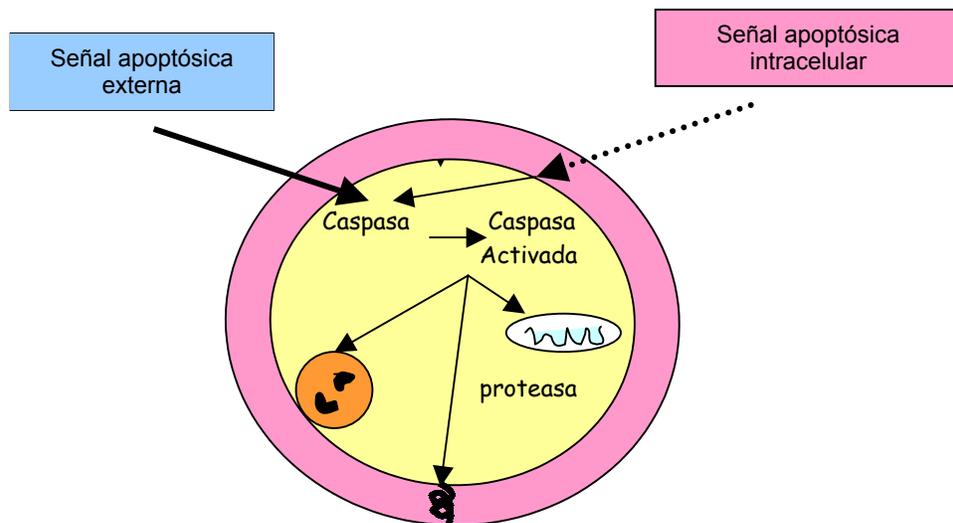


Fig.19.- La activación de las caspasas mediante diversas señales apoptóticas provoca cambios en el núcleo, la mitocondria y la membrana plasmática.

Tras su activación se produce una cascada de fenómenos apoptóticos: **1/** Pérdida de los enzimas requeridos para la reparación del DNA. **2/** destrucción de proteínas estructurales, como lamininas y actinas , críticas para la integridad del citoesqueleto y el núcleo, **3/** Reordenamiento de los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana plasmática y **4/** Fragmentación del DNA.

La homeostasis tisular es un balance entre proliferación y muerte celulares. Por ello, y como ocurre con la proliferación celular , la muerte celular programada debe de estar perfectamente regulada para asegurar un adecuado desarrollo y la supervivencia de los organismos. Recientemente se han identificado una nueva familia de genes que codifican proteínas denominadas IAP, o Inhibitors of Apoptosis Proteins. Dichas proteínas actúan mediante la inhibición de la actividad

caspara, lo que permite detener la cascada apoptótica y el rescate de la célula
30,32

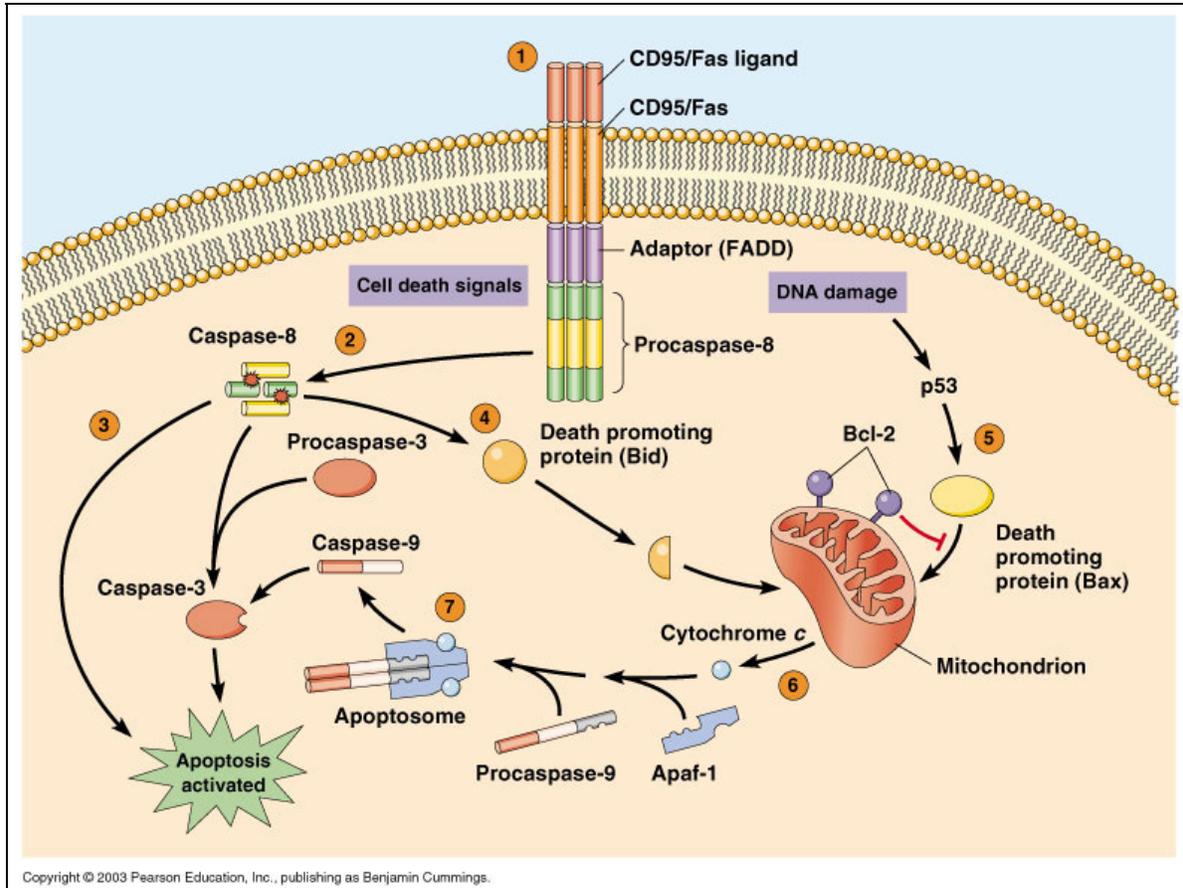


Fig.20.- Mecanismos de activación de la apoptosis celular; Participación de cespasas, p53, Bcl2 y Bax.

7.2.2.- Las proteínas Bax y Bcl-2: inductores e inhibidores de la apoptosis

En los últimos años, se han identificado una gran familia de proteínas con capacidades anti y pro-apoptóticas. La descripción del primer grupo, Bcl-2, se realizó en linfomas de células B, en los que se observó que este gen estaba íntimamente relacionado con el punto de rotura de la t(14;18), que tiene lugar en la mayoría de los linfomas foliculares. Dicha traslocación cromosómica conlleva la sobreexpresión de la proteína de Bcl-2, lo que a su vez conduce a la inhibición de la muerte celular programada, contribuyendo, de esta forma al proceso neoplásico. Bcl-2 se expresa en la mayoría de los tejidos normales, donde actúa como un potente inhibidor de la apoptosis.

El mecanismo de acción de Bcl-2 es desconocido. Sin embargo, se ha observado que Bcl-2 y las distintas proteínas de su familia se heterodimerizan las unas con las otras, lo que sugiere que sea ésta su forma de ejercer su función. La identificación de Bax, otro miembro de la familia con capacidad pro-apoptótica, y la observación de que Bax y Bcl-2 se heterodimerizan, ha permitido hipotetizar que Bcl-2 ejerce su función anti-apoptótica a través de su unión a la proteína Bax, con la consiguiente inhibición de ésta última. A pesar de que no se conocen con exactitud los mecanismos a través de los cuales los homodímeros Bax-Bax inducen apoptosis, parece relativamente claro que los niveles relativos de los distintos miembros de la familia Bcl-2 son críticos para que la célula "decida entre la vida y la muerte".^{6,31,33,34} (Figura 21).

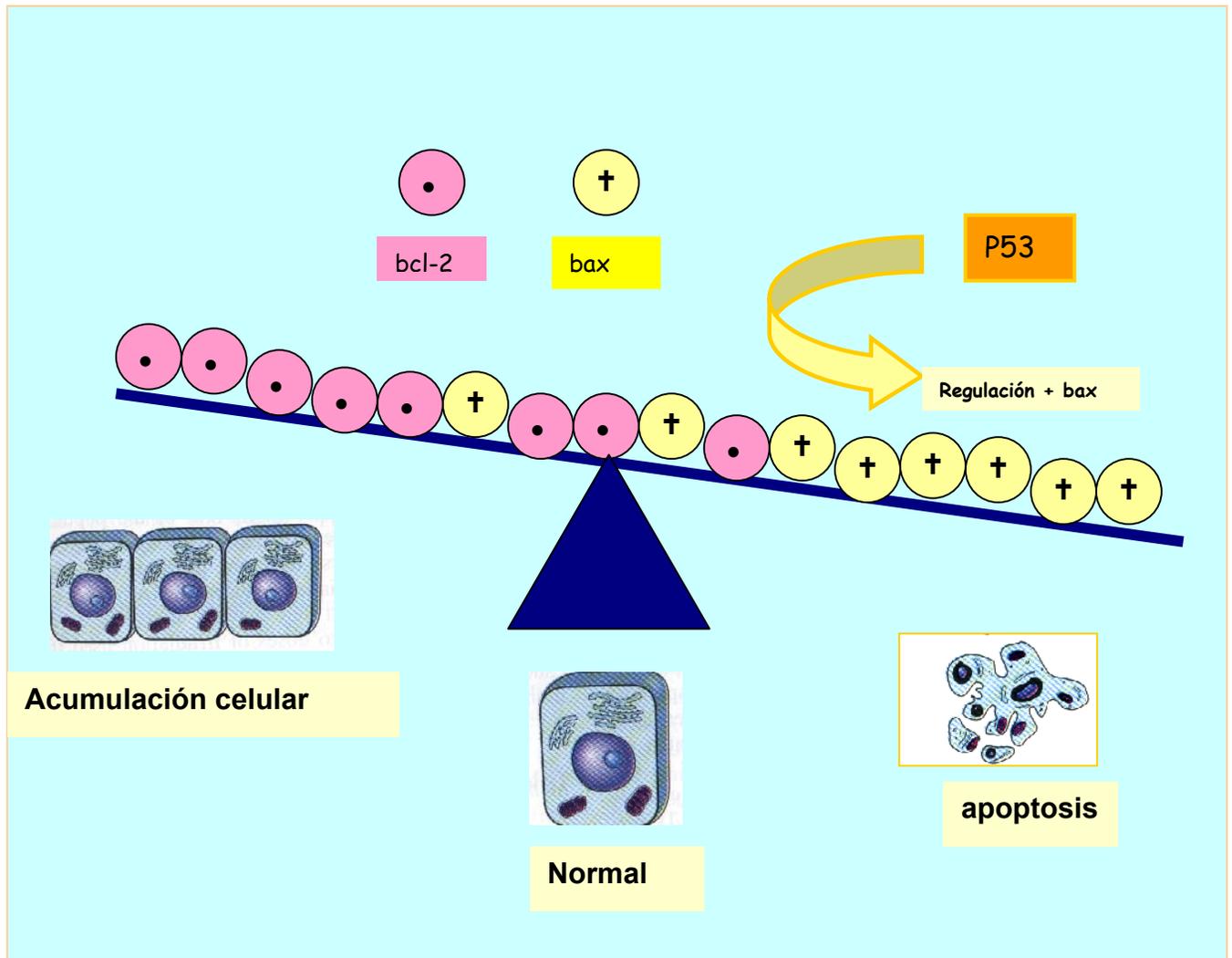


Fig.21.- Equilibrio entre las proteínas bax y bcl-2 y la decisión entre apoptosis o acumulación celular

7.3.-APOPTOSIS Y CÁNCER

En muchos casos , y en numerosos tipos de células este fenómeno de la apoptosis es dependiente del gen p53. Cuando una célula con la proteína p53 normal presenta un daño limitado en el DNA, se induce una parada del ciclo celular en G1. De esta manera, la célula tiene tiempo de reparar la lesión y posteriormente reiniciar la progresión del ciclo convirtiéndose la célula dañada en célula normal. Sin embargo, si el daño en el DNA es excesivo, los altos niveles de p53 inducidos, en lugar de parar el ciclo, activan el mecanismo de apoptosis mediante regulación de proto-oncogenes como bcl-2 y bax, de manera que la célula que está excesivamente dañada, muere.

Cuando este gen supresor de tumores no se expresa como resultado de una delección o de su bloqueo transcripcional, o cuando la actividad de la proteína que codifica está alterada por mutaciones, no se produce la muerte de las células. Entonces tiene lugar la replicación del DNA , con el resultado de la generación de células hijas conteniendo cromosomas mas o menos aberrantes; es decir, la transmisión de mutaciones que puede originar la pérdida de control de la proliferación y la aparición de cánceres.

La importancia de la apoptosis para la aparición de cánceres se manifiesta no sólo porque el p53 es un gen supresor de tumores, sino porque la expresión inadecuada(excesiva) de la proteína codificada por el oncogén bcl-2 provoca la inhibición de la apoptosis: así la proteína bcl-2 es oncogénica porque impide la apoptosis de numerosos tipos celulares. De esta manera, al prolongar la vida de las células, bcl-2 aumenta la posibilidad de generación de las células cancerosas. Aún mas, la expresión de bcl-2 se asocia a la resistencia de algunos agentes quimioterápicos que producen alteraciones del DNA.

Hoy se cree que la acción antitumoral de muchos agentes quimioterápicos citotóxicos empleados en clínica se debe principalmente a su acción inductora de apoptosis, y no, como se aceptaba hasta hace poco tiempo, a su efecto letal directo sobre las células en crecimiento activo como consecuencia de dañar su DNA. Dos son los motivos de este cambio de razonamiento: uno,el hecho de que estas drogas son efectivas destruyendo las células tumorales a dosis bastante menores que las necesarias para causar un daño directo en el DNA; y por otra parte, la inexistencia de correlación entre la capacidad de crecimiento de los tumores y su sensibilidad a drogas que actúan sobre el DNA.^{10,31} .

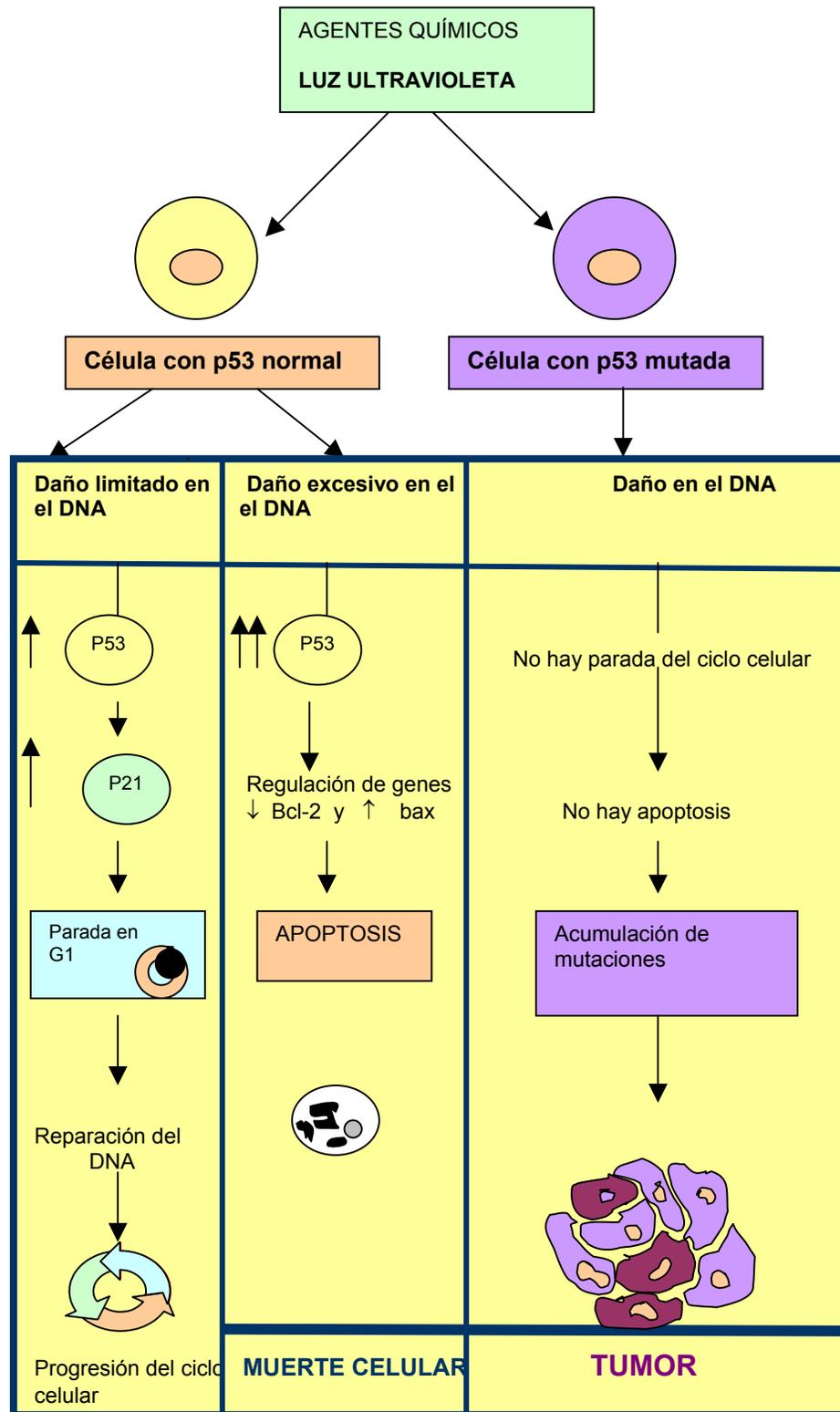


Fig.22.- Acción Protectora de P53 frente a agentes que causan lesiones en el DNA. Efecto de la inactivación funcional de p53.

Si éstas actuaran mediante su incorporación al DNA que se está replicando en células en crecimiento activo, debería ser más eficaces frente a tumores de crecimiento rápido frente a los de crecimiento más lento, hecho que no ocurre. Estos datos indican, por tanto, que su verdadero modo de acción debe ser indirecto, probablemente mediante la inducción de la apoptosis.

8.- EL PROCESO BIOLÓGICO DE LAS METASTASIS

El hecho determinante más importante que caracteriza a las células malignas es su capacidad de invasión y de generación de metástasis, siendo este proceso el responsable de la mayoría de las muertes por cáncer.

Conocemos que en aproximadamente un 30% de los tumores malignos existen metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, mientras que otro 30 % presentan micrometástasis. Por lo tanto, puede considerarse que el fenómeno metastásico es un hecho biológico muy temprano, que además aumenta con el tiempo. Se trata así mismo, de un proceso poco uniforme y muy heterogéneo a pesar de que los tumores malignos son de origen monoclonal.

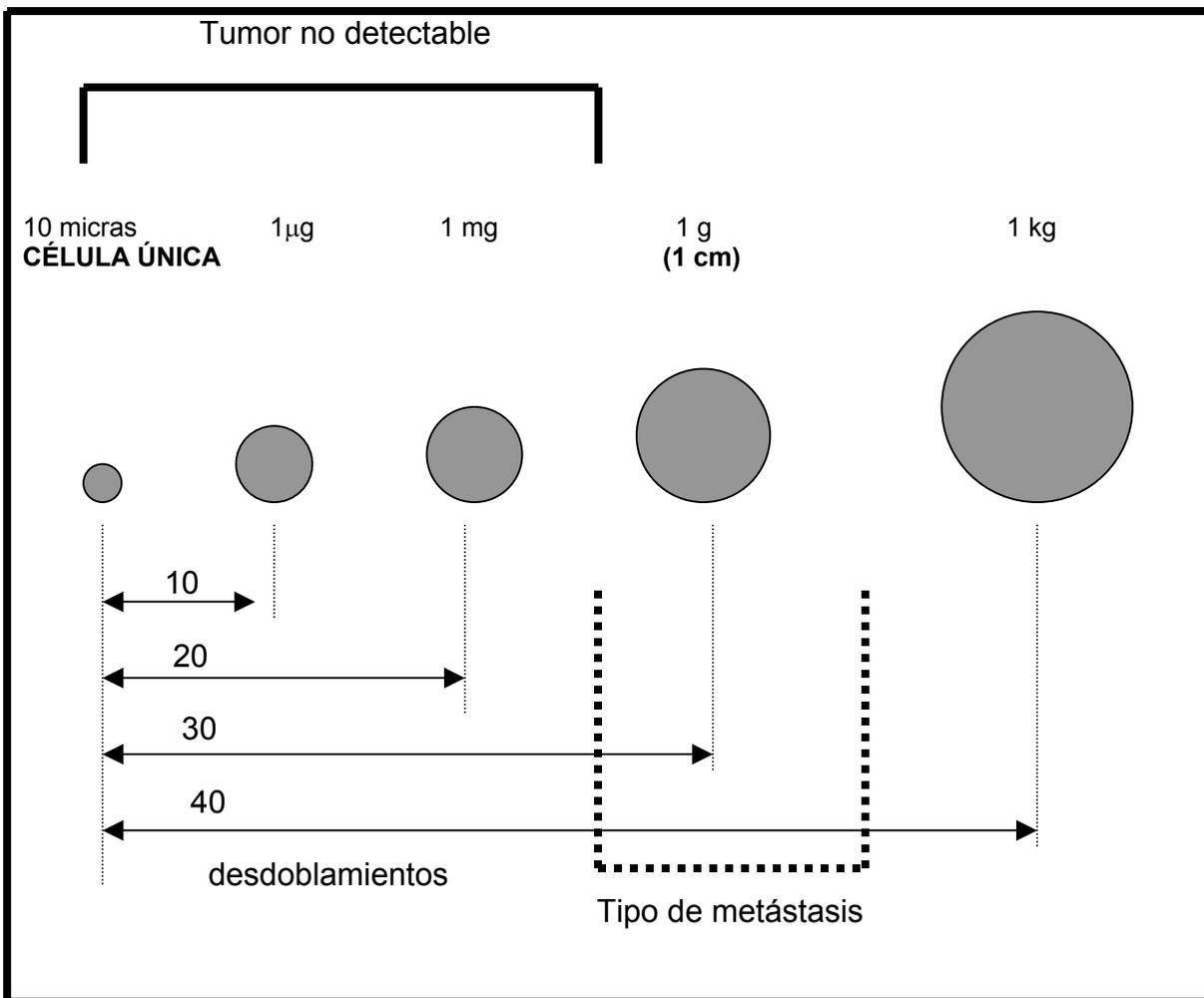


Fig.23.-Crecimiento tumoral y metástasis. Desde el inicio del proceso neoplásico en una célula única y hasta que el tumor tiene 1 gramo (equivalente a 1 cm) se precisan 30 desdoblamientos. Con 40 desdoblamientos un tumor teóricamente tendría 1 kg de masa tumoral. El tiempo durante el cual el tumor puede originar metástasis oscila entre 25 y 35 desdoblamientos³⁵.

Habitualmente, cuando un tumor puede llegar a detectarse clínicamente tiene 1 cm de diámetro. Para llegar a esta situación se necesitan unos 30 desdoblamientos desde la primera célula. El tiempo en el que se desarrollan metástasis oscila entre 25 y 40 desdoblamientos, por lo que cuando un tumor mide 1 cm pueden haberse producido ya metástasis (fig.7). Por lo tanto, aunque muchos tumores no desarrollan metástasis sino cuando ya se encuentran en una etapa clínicamente detectable, otros muchos, por tempano que sean diagnosticados, ya leas han desarrollado. Un ejemplo claro, es el cáncer de mama, tumor considerado como metastásico casi desde el inicio y motivo por el que el tratamiento adyuvante en este tipo de tumores ha adquirido un importantísimo papel.^{35,36}

Las dos vías más importantes por las que un tumor maligno se disemina son la vía linfática y la sanguínea. Se considera típico de los sarcomas, su diseminación vía sanguínea mientras que los carcinomas lo hacen preferentemente por vía linfática, para a partir de ahí hacerlo por vía sanguínea. No es preciso recordar que ambos sistemas, linfático y venoso se encuentran interconectados y que no pueden ser contemplados de manera independiente.

El proceso metastásico es un fenómeno en cascada en el que pueden distinguirse diversas etapas. Hoy se establece que las células han de pasar por una serie de pruebas antes de poder establecerse definitivamente como una segunda colonia, en un proceso que se ha denominado decatlón de la célula tumoral. Se trata de un proceso selectivo que podría resumirse en los siguientes pasos:

- Crecimiento tumoral progresivo
- Adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular que separa los distintos tejidos.
- Proteólisis y disolución de la membrana basal de la matriz extracelular por parte de las células tumorales.
- Migración de las células tumorales a través de la membrana basal hacia el estroma intersticial.
- Creación de una red de vascularización del tumor que asegure su estabilidad (angiogénesis).
- Entrada de las células tumorales en los vasos linfáticos y sanguíneos y posterior circulación de las células tumorales.
- Llegada y parada de las células tumorales en el lecho vascular de las vénulas y arteriolas.

- Migración transendotelial de las células tumorales en las vénulas y arteriolas.
- Establecimiento y crecimiento de la nueva colonia tumoral en el tejido u órgano destino (metástasis).
- Generación de una nueva red de vasos (angiogénesis) en las metástasis.^{10,37}

A todo lo anterior hay que añadir que éstas supercélulas deben superar todos los mecanismos inmunológicos existentes en los diversos niveles por los que vayan pasando. Por lo tanto, no hay que extrañarse de que estas células sean consideradas como supercélulas. Aún más, para su segundo viaje (metástasis de metástasis), estas células han adquirido una superespecialización tal que hace que todo el proceso sea mucho más sencillo y eficaz.

Una característica importantísima de los tumores malignos es su capacidad para generar una rápida diversificación celular con fenotipos celulares malignos heterogéneos. Aunque la heterogeneidad no sea un hecho exclusivo de la célula tumoral, es mucho más pronunciado que en las células benignas correspondientes a tejidos celulares normales. Cuando las células normales son separadas de su microambiente, el fenotipo se hace mucho más diverso, motivado por los cambios de expresión génica que estas células deben hacer para adaptarse a su nueva situación. La diferencia con las células malignas es que éstas los cambios se llevan a cabo incluso sin separarlas de su microambiente.

La población de un tumor maligno, aunque de origen monoclonal, está constituida por diferentes poblaciones celulares lo que determina un comportamiento diferente en relación a distintos parámetros como inmunogenicidad, velocidad de crecimiento, cariotipo, producción de hormonas, receptores y quimiosensibilidad^{10,35}.

8.1.-INVASION TUMORAL: Teoría de los tres pasos.

En la invasión tumoral local pueden resumirse tres etapas:

- Adherencia o unión a la matriz extracelular (MEC)
- Proteólisis local de la membrana basal
- Migración o motilidad celular

8.1.1.- Unión a la matriz extracelular

La matriz extracelular es una unidad de tejido conjuntivo que separa los diferentes tejidos del organismo y se encuentra compuesta por la membrana basal y el estroma intersticial subyacente. Las células basales están unidas a la membrana basal y en circunstancias normales jamás se desplazan y entremezclan con el estroma. La membrana basal está formada por glicoproteínas, laminina, fibronectina y colágeno y el estroma intersticial por células estromales, fibroblastos y miofibroblastos. Dado que los poros existentes en la membrana basal no son suficientes como para dejar pasar células, la invasión tumoral debe ser un fenómeno activo para que una vez en el interior del estroma las células tumorales puedan llegar a los vasos tumorales y a los vasos linfáticos y sanguíneos.^{35,37,38,39}

La unión de las células tumorales a la matriz extracelular se puede realizar por diferentes mecanismos:

1. Las células tumorales se adhieren a las glicoproteínas de la matriz (laminina, fibronectina) utilizando receptores específicos
2. Unión a proteínas extracelulares citoesqueléticas de la matriz gracias a las integrinas
3. Interaccionando con otras células mediante algunas moléculas de adhesión como las integrinas y las cadherinas

La *laminina* está constituida por tres brazos cortos (cadena B1 y B2) y uno largo (cadena A) estando unidas entre sí por puentes disulfuro. Esta molécula es esencial para la adhesión celular, diseminación celular, desplazamiento celular, mitogénesis y morfogénesis entre otras. Muchas células tumorales poseen receptores de alta afinidad para la laminina. El bloqueo de estos receptores puede traducirse experimentalmente en una abolición de la generación de metástasis.

Las *moléculas de adhesión* (CAMs) se clasifican dependiendo de las secuencias de aminoácidos que contienen. Tres de ellas son muy importantes para la morfogénesis : la superfamilia de las integrinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, y la superfamilia de las cadherinas.

Integrinas. Son glicoproteínas de la superficie celular y actúan como receptores celulares que median la adhesión con la matriz extracelular (MEC). Las integrinas se encuentran implicadas en el desarrollo de la embriogénesis, muerte celular programada, crecimiento tumoral, metástasis, activación leucocitaria, reabsorción ósea y respuesta a los mecanismos de estrés. Las integrinas están formadas por subunidades transmembranales de tipo α o β . De las alfa se conocen 16 subtipos y de las beta 8. Las integrinas unen las proteínas de la matriz extracelular a las proteínas citoesqueléticas y a los filamentos actínicos de la fase citoplasmática. Entre las proteínas citoesqueléticas, la actina, una proteína que a su vez se adhieren a las integrinas en su porción citoplasmática. El ensamblaje de

estas dos proteínas tiene dos funciones: 1.-Estabilizar la adhesión celular y regular el tamaño celular, morfología y motilidad y 2.-regulación de la traducción de señales.

Varias tirosín quinazas han sido implicadas en la activación de prácticamente todas las integrinas. De ellas la más importante es la denominada quinasa de adhesión focal (FAK). Se trata de una quinasa fosforilada en tirosina que requiere para su activación el dominio citoplasmático de la subunidad beta de las integrinas ^{10,35,40}.

Cadherinas. Las cadherinas son también glicoproteínas de membrana que regulan la adhesión celular para lo cual precisan de calcio. Esta familia se divide en varias subclases, habiéndose descrito tres tipos en los mamíferos, la E (para las células epiteliales), la N (para las células neuronales) y la P. Actúan como una molécula supresora de la invasión ya que una alta expresión de ésta disminuye el fenotipo tumoral invasor, mientras que un deterioro en su regulación facilita la invasión tumoral ³⁵.

8.1.2.- Proteolisis local

Una de las características de más importantes de las células tumorales es la capacidad de generar un desequilibrio en la proteolisis lo que favorece claramente la invasión. Efectivamente el bloqueo de ciertas proteinasas previene la invasión y las metástasis.

Las células cancerosas generan enzimas proteolíticas que producen la degradación local de la matriz extracelular. Estas proteasa son producidas como consecuencia de la interacción de las células tumorales con las células del estroma, y en ella intervienen decisivamente las integrinas alfa y beta. De entre las proteasas pueden diferenciarse dos familias; La familia de las serínproteasas, dependientes del sistema plasmina activador del plasminógeno, y la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), de las cuales se han identificado 9. El ejemplo más típico de las últimas es la gelatinasa A o 72K, o MMP2, que degrada el colágeno de tipo IV y V, elastina y laminina ^{35,38,41,42}.

Las células del estroma en respuesta a la interacción con las células tumorales generan pro-proteinasas no activadas, como la pro-gelatinasa A y la pro-uroquinasa. Las pro-proteinasas se unen a la célula cancerosa gracias a la existencia en éstas de receptores específicos, MT-MMP para las MMPs y un receptor tipo fosfatidil inositol glicosilado para las pro-uroquinasas. La gelatinasa A produce una cascada proteolítica y en definitiva la degradación de la matriz, pero además la uroquinasa transforma el plasminógeno en plasmina, el cual por vía directa produce también la degradación de la matriz. Además la plasmina indirectamente activa las pro-metaloproteinasas generando MMPs que también degradan la matriz.(fig.24).

Todo lo expuesto indica la importancia en la invasividad tumoral de la actividad proteolítica de las células tumorales o estromales que las rodean. En

gran parte, el fenotipo invasivo parece ser el resultado del balance entre las proteasas y sus inhibidores^{35,38,41}.

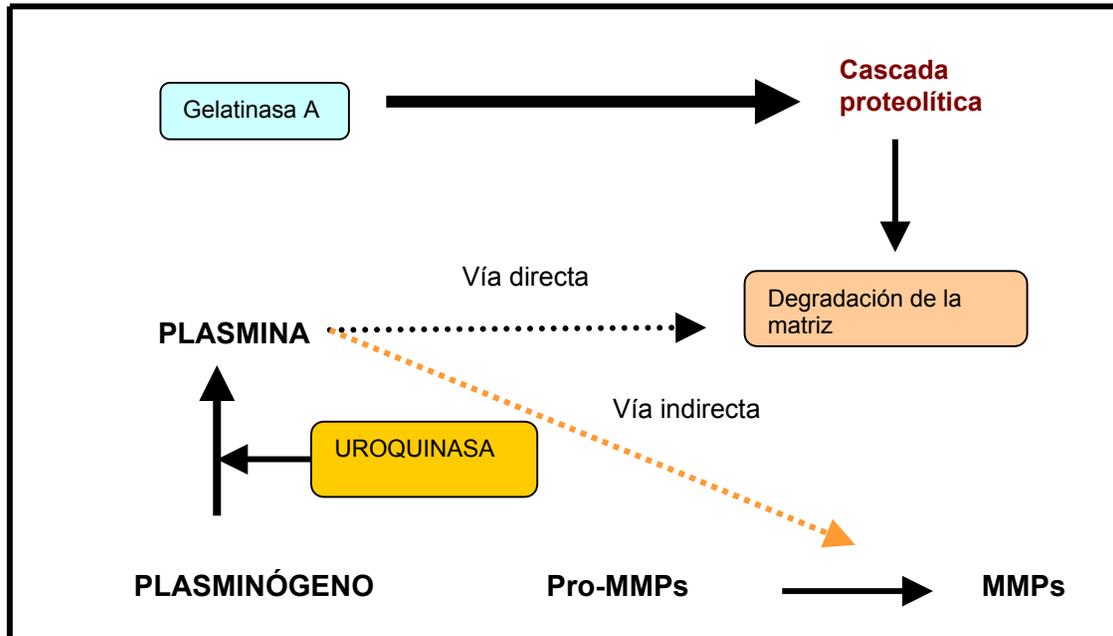


Fig.24.- Mecanismo de activación de la cascada de proteólisis y degradación de la matriz.

8.1.3.- Migración celular

La tercera etapa de la invasividad tumoral es la movilidad celular. Las células tumorales altamente invasivas y metastásicas muestran una mayor movilidad que las normales y las de menor potencial metastásico. Tras despegarse de sus vecinas y degradar la matriz circundante, las células tumorales deben desplazarse para alcanzar los vasos y diseminarse. Las células se pueden mover al azar (quimioinesis), o en respuesta a gradientes de factores solubles (quimiotaxis), también hacia proteínas insolubles de la matriz extracelular (haptotaxis), o bien inducidas por factores secretados por ellas mismas. Diversos factores de crecimiento funcionan también como agentes quimiotácticos atrayendo a las células o estimulando su movilidad con una acción más o menos específica del tipo celular. Se conocen algunos factores potenciadores de la movilidad celular: el HGF (Hepatocyte Growth Factor), el AMF (Autocrine Motility Factor), el FGF ácido y básico, además del PDGF, IGF-1, IGF-2, IL-6, e IL-8. El primer factor caracterizado fue el HGF, que es capaz de disociar las células epiteliales e inducir su movilidad, de ahí su otro nombre SC o Scatter Factor.

Las células tumorales parecen tener un movimiento ameboide similar al de los leucocitos. Hoy se cree que el mecanismo subyacente implica la formación secuencial de protrusiones como filopodios, lamelipodios y pseudópodos, consecuencia de ciclos de ensamblaje y desorganización de redes de filamentos

entrelazados de actina en zonas concretas bajo la membrana celular. En estos procesos parecen tener un importante papel las integrinas que sirven de anclaje al sustrato, además de varias quinasas como la PI3K y las FAK, PKC y PKY, proteínas G de las familias Rho, Rac y Cdc42, y otras que pueden unir actina y/o entrelazantes como vinculina, α -actina y paxalina presentes en las uniones focales. También se ha descrito que factores de crecimiento como el HGF y citoquinas como la IL-8, e incluso componentes de la matriz que inducen la desorganización de las uniones focales, o que son antiadhesivas como la tenascina y la trombospondina-1 (TSP-1), aumentan la movilidad celular.

En principio, parece lógico que las células que forman uniones focales muy fuertes sean poco móviles. Sin embargo, en realidad se cree que para la movilidad es óptimo un nivel intermedio de adhesividad al sustrato. Si la adhesión es demasiado fuerte, las células no pueden liberarse convenientemente del sustrato, pero si es demasiado débil no puede establecerse una tracción suficiente, en la que la concentración tanto de integrinas, como de vinculinas y α -actina es importante.

Durante su movimiento, las células tumorales necesitan adherirse al sustrato para realizar tracciones y para anclarse a las nuevas posiciones. Por ello, se piensa que las células tumorales probablemente expresen menores cantidades de aquellas proteínas de adhesión propias de las células normales que servían anteriormente para mantener su posición en el tejido, en el caso de células epiteliales, para unirse a la membrana basal. Por el contrario, es posible que las células tumorales expresen además otras proteínas distintas más apropiadas para el tipo de contactos dinámicos que necesitan establecer con los componentes del sistema conectivo, ya que este tejido constituye el sustrato sobre el que se desplazan activamente. Es ejemplo de ello, la correlación existente entre la expresión de la integrina $\alpha_4\beta_1$ o VLA-4, normalmente asociada a la migración de linfocitos, con la capacidad metastásica de diversos carcinomas humanos³⁵.

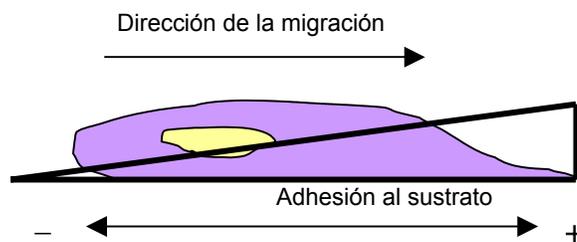


Fig.25.- Interacciones dinámicas de adhesión al sustrato durante el movimiento celular.

8.2.-LAS METASTASIS

La invasividad tumoral no es suficiente, sin embargo, para dar lugar a metástasis. Para formar tumores secundarios en tejidos distantes del tumor original, las células necesitan aún adquirir otras capacidades e inducir otros mecanismos que veremos a continuación.

8.2.1.- Angiogénesis

El crecimiento local y a distancia de un tumor debe estar asegurado con el aporte de flujo sanguíneo adecuado, para lo cual obviamente precisa de la formación de nuevos vasos. El tumor en principio avascular dispone de las células endoteliales de los capilares normales para que convenientemente estimuladas formen nuevos vasos. El estímulo necesario es la producción por parte de las células tumorales de factores de crecimiento angiogénicos. También las células normales pueden contribuir a su producción, bien directamente o a través del estímulo que ciertas citoquinas generan en las células normales.

Se conoce que para que se produzca la angiogénesis no sólo se precisa la actividad de factores angiogénicos positivos, sino que es necesario también una disminución en la producción de inhibidores de la angiogénesis. En esencia, estos factores actúan como estímulos angiogénicos que actúan sobre las células endoteliales de los capilares normales, lo que genera una producción de proteasas que determina la disolución de la membrana basal de los capilares, dejando la puerta abierta para la migración y la mitosis de las células endoteliales. Es así como se van formando redes capilares, dando definitivamente un tumor vascularizado ^{35,43,44}.

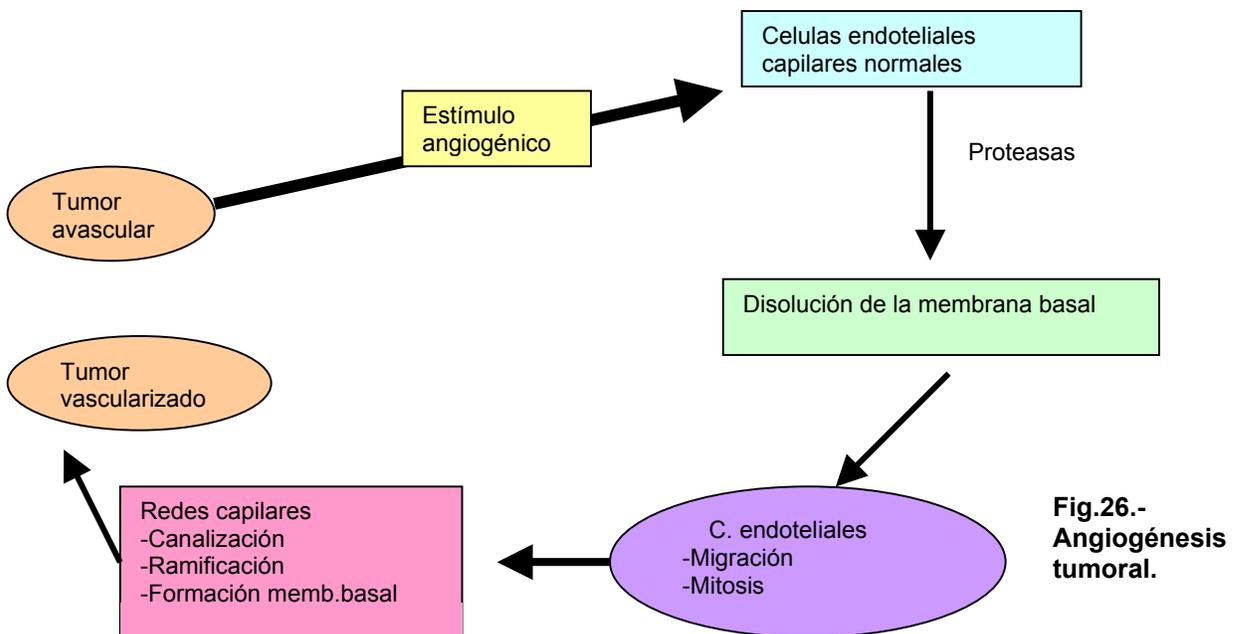


Fig.26.- Angiogénesis tumoral.

8.2.2.- Intravasación y extravasación

Durante la progresión tumoral , las células contactan y degradan la matriz que recubre a los vasos sanguíneos o linfáticos y atraviesan sus paredes penetrando en el torrente circulatorio. Esto es esencial para la diseminación de las células a distancia , invadiendo bien los vasos neoformados, o bien capilares de vasos preexistentes.

Las células tumorales entran en la circulación de manera aislada o por grupos. Se calcula que un tumor de 1 cm. cada día pueden pasar a la circulación sanguínea millones de células , pero menos del 0.01% son capaces de generar una segunda colonia tumoral. También las células tumorales pueden invadir los vasos linfáticos. Las células tumorales entran en el sistema linfático y llegan a los ganglios linfáticos regionales donde son almacenadas en el seno subcapsular. Esta parada suele durar entre 10 y 60 minutos y después alcanzar los linfáticos aferentes y desde allí pasar a la circulación general. La invasión sanguínea y linfática van en paralelo y de ningún modo puede considerarse la estación linfática como un mecanismo de barrera^{35,43}.

8.2.3.- Parada y extravasación

La parada y extravasación de las células tumorales puede hacerse en las vénulas o bien en las arteriolas. En el primer caso las células tumorales alcanzan el endotelio bien de manera aislada o bien agrupadas , en este último caso formando agregados homotípicos con otras células tumorales o heterotípicos con diferentes células (leucocitos,plaquetas) o con fibrina. Establecida la adhesión al endotelio y tras un período de 1-4 horas se produce la retracción de las células endoteliales, paso previo para que tras 8-24 horas se lleve a cabo la disolución de la membrana basal. Finalmente se produce la extravasación de las células tumorales que quedan establecidas como una colonia tumoral si consiguen escapar a los mecanismos de defensa inmune locales. Por último esta colonia tumoral inicia los pasos para conseguir la debida neovascularización, que se realiza de forma idéntica a la seguida en el crecimiento local, ya anteriormente descrita.

No todas las colonias metastásicas son activas, sino que alguna de ellas pueden quedar de forma “dormidas” y no desarrollarse. La explicación de tal fenómeno no es fácil habiendo barajado varias posibilidades: que la colonia quede en equilibrio entre muerte y proliferación celular, posiblemente en relación con un control del sistema inmune; que dicha colonia dependa de factores de crecimiento del huesped, y que existan problemas de vascularización^{35,43}.

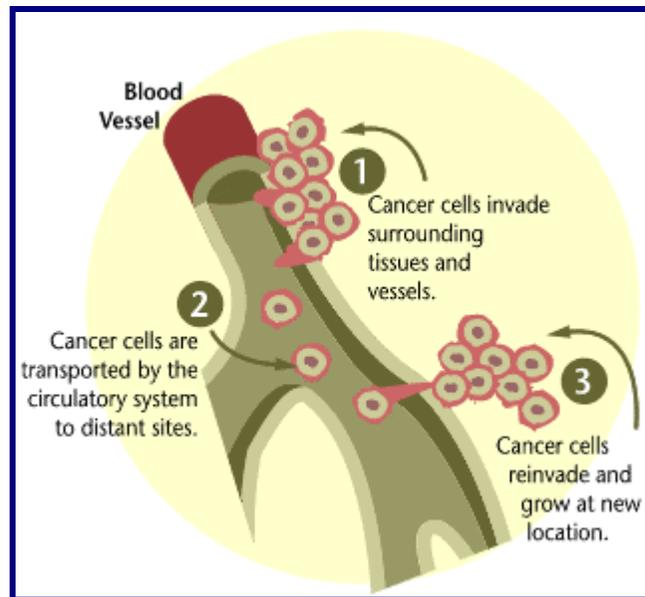


Fig.27.- El proceso de las metástasis⁶

8.2.4.-Oncogenes supresores de metástasis.

El proceso de metástasis esta regulado genéticamente. Algunos de los genes identificados son:

1.- Oncogen supresor nm23. Este gen fue identificado sobre la base de su reducida expresión a nivel del RNA en una serie de siete líneas celulares derivadas del melanoma murino k-1735. La expresión reducida de nm23RNA se ha demostrado en cuatro modelos metastásicos. Este hecho a sido también demostrado en los tumores de mama humano de modo que el cáncer de mama con ganglios positivos expresa bajos niveles de RNAnm23 frente a las mujeres sin afectación axilar.

2.- Inhibidores de las metaloproteinasas (MMPs). Las metaloproteinasas se encuentran en equilibrio con la producción de los niveles tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Estas últimas son producidas por las células tumorales y las células normales, y en esencia provocan una inhibición de la proteiólisis y de la angiogénesis lo que determina una inhibición de las metástasis

35,39,45,46,47

II.-BIOLOGIA MOLECULAR DEL CANCER DE MAMA

1.- INTRODUCCION

El cáncer de mama es el de mayor incidencia en mujeres , suponiendo el 18,4 % y muestra un aumento anual alarmante. En la Comunidad Europea , el cáncer de mama ocupa el primer lugar dentro de las neoplasias malignas⁴⁸ . En 1990 se registraron 157.000 nuevos casos y 68.000 muertes por esta causa, lo cual representa el 24% de todos los casos de cáncer y el 19% de todas las muertes por cáncer ⁴⁹

Con el descubrimiento de los genes implicados en el cáncer y la aplicación de las técnicas de Biología Molecular, se han redefinido y caracterizado los tumores, con resultados muy importantes desde el punto de vista clínico.

La base genética del cáncer de mama ha sido un área de intensa investigación en los últimos años. En este tiempo, se han hallado diversas alteraciones genéticas relacionadas con el cáncer de mama, incluyendo la pérdida de material genético asociada a susceptibilidad, la sobreexpresión , reordenamiento o amplificación de genes normales y proto-oncogenes , y las mutaciones que resultan en la activación de oncogenes o inactivación de genes supresores ⁵⁰ .

En el cáncer de mama, están implicados un grupo complejo de alteraciones genéticas. Los tres tipos de alteraciones genéticas en el cáncer de mama se pueden agrupar en :

- Genes de susceptibilidad hereditaria al cáncer
- Amplificación y sobreexpresión de proto-oncogenes
- Inactivación de genes supresores

2.- MUTACIONES CONSTITUCIONALES: Genes de susceptibilidad al cáncer de mama.

La predisposición genética al cáncer de mama se ha establecido por los descubrimientos de los genes que confieren susceptibilidad a ciertos tipos de cáncer o síndromes asociados con cánceres.

El análisis reciente de los datos del estudio de Cáncer y Hormonas Esteroideas (CASH), que comprendía el análisis de un grupo de 4730 pacientes con cáncer de mama y un grupo control de 4688 mujeres sanas, ha demostrado que el riesgo de desarrollar cáncer de mama depende no sólo de qué familiares han sido diagnosticados previamente de cáncer de mama, sino también de las edades al diagnóstico de la enfermedad ⁵¹. El modelo estadístico del estudio CASH predice que el cáncer de mama se transmite como un rasgo autosómico dominante, y que la mayoría de los cánceres de mama no son portadores del alelo o alelos propuestos.

En la actualidad se cree que aproximadamente un 5% de los cánceres de mama son hereditarios, mientras que un 82% son esporádicos. La proporción de cáncer hereditario es mayor (10%) cuando se consideran los cánceres de aparición precoz (antes de los 40 años).

Los síndromes hereditarios asociados a cáncer de mama son :síndrome de Li-Fraumeni, enfermedad de Codwen, cáncer de mama asociado a cáncer de ovario o colon y cáncer de mama familiar no asociado a otros tipos de cáncer.

Son tres las regiones del genoma humano implicadas en el cáncer de mama hereditario hasta la fecha:

-El gen BRCA 1: localizado en el cromosoma 17q21. se ha demostrado que las mutaciones en esta región confieren un riesgo de cáncer de mama del 85% de las portadoras antes de los 70 años y un riesgo de cáncer de ovario del 63%. Se considera en la actualidad que BRCA 1 es responsable de un 45% de los cánceres familiares de mama y del 80-100% de los casos familiares de cáncer de mama y ovario. Es importante la observación demostrada en varios trabajos de la no asociación de cáncer de mal pronóstico con la mutación en BCRA 1.

-El gen BCRA 2: localizado en la región 13q12-13, de más reciente descubrimiento, que parece ser el responsable de un 40% de los cánceres de mama, pero al contrario que BCRA-1 no parece guardar relación con el cáncer de ovario. Se ha encontrado particularmente relación en casos de cáncer de mama masculinos (aproximadamente un 6% de los casos), lo cual no se ha observado con BCRA 1 ⁵².

-El gen p-53 del que hablaremos más adelante, pero que en las formas hereditarias está implicado en el síndrome de Li- Fraumeni.

3.- AMPLIFICACION Y SOBREEXPRESION DE PROTO-ONCOGENES EN EL CÁNCER DE MAMA.

Se han encontrado amplificadas tre regiones que contienen genes que codifican factores de crecimiento o sus receptores : el proto-oncogen Myc, c-Erb-B2 y la banda cromosomal 11q13, en el 15% de los tumores de mama.

- **PROTO-ONCOGEN MYC:** fue uno de los primeros estudiados. está situado en la región 8q24 codificando una proteína nuclear de 64 kDa y está implicado en el control del crecimiento, diferenciación y apoptosis actuando como un factor transcripcional. La frecuencia de amplificación de este proto-oncogen varía entre autores, habiendo sido publicadas cifras entre un 4 a un 41%.
- **PROTO-ONCOGEN ERBB2:** También llamado HER2 o neu, es un gen localizado en el cromosoma 17q12. se halla amplificado en aproximadamente el 20% de los carcinomas de humanos, entre ellos el cáncer de mama. así es frecuente encontrar la sobreexpresión en cánceres de ovario, de vejiga, y menos frecuentemente en cancer de colon y pulmón. El 20% de los tumores invasivos de mama tienen amplificación y sobreexpresión de ERBB2⁵³, y el 40% de los comedocarcinomas⁵⁴. La amplificación de este oncogén conlleva la sobreexpresión de la oncoproteína ERB-2, que es una proteína caracterizada por una estructura clásica de receptor de factores de crecimiento, presentando un dominio extracelular de unión ligando, un dominio hidrofóbico de transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa.

El número de copias detectadas por FISH es muy superior en líneas celulares que en tumores.

Dedicaremos el capítulo siguiente a este proto-oncogen en el que centramos nuestras investigaciones.

- **AMPLIFICACIÓN EN 11q13:** la banda 11q13 está amplificada en un 15-20% de los tumores de mama. Los dos genes que mapean en esta región y que se han encontrado frecuentemente coamplificado en tumores primarios de mama fueron el FGF3 y el FGF4 (llamado anteriormente INT2 y 6HST respectivamente), ambos codificados por factores de crecimiento fibroblásticos.

4.- INACTIVACION DE GENES SUPRESORES EN CÁNCER DE MAMA: p53.

Ya vimos en el capítulo anterior, como el gen p53 está localizado en el cromosoma 17p13 (brazo corto del cromosoma 17) codifica una proteína de nuclear de 53 kDa, cuyo papel parece ser regular el ciclo celular y contribuir por tanto a mantener la integridad del DNA. p53 se ocupa de controlar el crecimiento celular mediante la regulación del paso de las fases G1 a S del ciclo celular y mediante la determinación de la muerte celular por apoptosis.

Las alteraciones de p53 son las alteraciones genéticas más frecuentemente encontradas en cánceres humanos, observándose en un 40% de los casos. Estas alteraciones son sobre todo mutaciones, aunque también deleciones e inserciones, y suelen asociarse a la pérdida de la función normal de p53.

La proteína p53 posee una vida media muy corta y se halla en cantidades muy pequeñas en las células normales. Las mutaciones de p53 resultan un aumento de la vida media de la proteína, de modo que se detecta en cantidades muy elevadas en las células malignas.

La acumulación de p53 puede detectarse fácilmente por métodos semicuantitativos como la inmunohistoquímica y la inmunotransferencia y por métodos cuantitativos como la inmunoabsorbencia enzimática (ELISA).

En cáncer de mama, se observan mutaciones en el 20-50% de los casos. Debido a la gran heterogeneidad de los cánceres de mama, se considera muy importante estudiar el espectro de mutaciones de p53 en subpoblaciones específicas ya que estas mutaciones tienen especificidades histopatológicas, no encontrándose en tumores mucinosos infiltrantes o carcinomas papilares⁵⁵

Se ha visto también en cáncer de mama una relación entre mutaciones de p53 y estadios avanzados del tumor indicando que las mutaciones de p53 constituyen un evento tardío que contribuyen a la progresión del tumor y a una alta tasa de proliferación celular⁵⁶.

La inactivación de la función normal de p53 puede inducir a una mayor resistencia a la muerte celular y una menor sensibilidad a los quimioterápicos y a la radioterapia, aparentemente medida por un déficit en los mecanismos de apoptosis celular.

Así en el estudio realizado por Koechli y cols, estudiando especímenes de cáncer de mama de 40 pacientes operadas, se estudió la citotoxicidad in vitro a la combinación de CMF y los niveles de p53, con una correlación significativa aunque débil ($p=0,018$), sugiriendo que la acumulación de p53 se asocia a una mayor quimioresistencia. Otros estudios han venido a demostrar datos similares⁵⁷
⁵⁸.

Además los datos de otros investigadores sugieren que la quimioresistencia ocurre también con fármacos de tipo hormonal⁵⁹.

El restablecimiento de la función de genes supresores mediante la transferencia génica ha sido un objetivo de investigación en los últimos años. Las enfermedades metabólicas en las que se estudia la terapia génica (como la Fibrosis Quística) se deben a la alteración de un solo gen. Por el contrario, el cáncer es una enfermedad multigénica, y el restablecimiento de un gen determinado puede no ser suficiente para una curación completa. Estudios iniciales demostraron que células de carcinoma de colon con defectos en el gen p53 podían convertirse en no tumorigénicas al transferirles plásmidos que expresaban un alelo p53 normal.

In vitro, la transferencia de p53 ha avanzado mediante la construcción de moléculas compuestas por el gen p53 normal y un promotor, insertados en un virus desprovisto del material genético necesario para su replicación pero que mantiene su capacidad de infectabilidad. Inicialmente se emplearon retrovirus, para posteriormente usar adenovirus, debido a su tropismo por el epitelio aerodigestivo, así como por su capacidad de infectar células que no están proliferando y al carácter transitorio de su infección. El restablecimiento de p53

mediante estos vectores en células malignas portadoras de mutaciones o deleciones de p53, provoca un enlentecimiento de las líneas celulares in vitro. In vivo, se han empleado tres modelos de terapia génica empleando vectores víricos portadores de p53 normal. El primero de ellos, compuesto por un vector consistente en un adenovirus, el promotor de CMV y p53, que fue inyectado vía subcutánea en la vecindad de tumores en ratones formados por células humanas de cánceres epidermoides de cabeza y cuello. Se demostró un enlentecimiento en el crecimiento tumoral de hasta 60 veces respecto a los controles, y además en un 30% de los casos se obtuvo una desaparición clínica y histológica de los tumores subcutáneos⁶⁰. En la mayoría de los casos, sin embargo, la curación no fue conseguida.

El segundo modelo, sigue el patrón del anterior, pero administrando p53 antes de que los tumores sean palpables (todos los tumores en el modelo anterior tenían al menos 6mm), emulando de alguna manera, el modelo residual microscópico que existe tras la extirpación de tumores. En este modelo, se observó que la administración de p53 prevenía en todos los casos la aparición de tumores respecto a los controles. La eficacia del vector, disminuía si se aumenta el número de células cancerígenas implantadas, o si se dejaba transcurrir más tiempo desde su implantación.

El tercero es un modelo de tratamiento tópico, desarrollado en un sistema de crecimiento endobronquial de células de cáncer de pulmón⁶¹.

Ninguno de estos modelos con de tratamiento mediante transferencia del gen p53 es aplicable al tratamiento del cáncer de mama actualmente, sin embargo abren las expectativas de las consideraciones futuras acerca de la terapia génica en cáncer de mama, como podría ser el tratamiento de la mama restante en cánceres de mama a los que se les aplica cirugía conservadora, o la combinación de quimioterapia junto con la transferencia de p53. En un estudio realizado por Fujiwara⁶², se inyectó una combinación de adenovirus-p53 en tumores implantados en ratones seguida de la administración de cisplatino, lo que indujo a una destrucción masiva por apoptosis de los tumores.

5.-EXPECTATIVAS TERAPEÚTICAS.

Los avances en el entendimiento de las bases moleculares del cáncer de mama conducirán, sin duda, a nuevas estrategias terapéuticas basadas en estos conocimientos.

Ya hemos comentado los avances respecto a terapia génica en relación a la transferencia de p53 en ratones desnudos portadores de células cancerosas humanas, y se han realizado ensayos similares en cáncer de mama demostrando cierta reversibilidad en determinadas alteraciones genéticas. Se están ensayando, además mensajeros antisentido frente a factores de crecimiento (FGF familiar, ligando de ERBB2) y frente a receptores de factores de crecimiento.

La falta de especificidad de la quimioterapia convencional podría ser paliada mediante terapia génica.

Sin embargo, es difícil predecir la utilidad y eficacia de estas técnicas en la práctica clínica, debido a que han de ser evaluadas las consecuencias de tratar de regular a un individuo desregulado genéticamente.

II.-FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA

Basándonos en el trabajo realizado por el Colegio de Patólogos Americanos, que conllevó a la publicación en Julio del 2000 de los factores Pronósticos de Cáncer de mama⁶³, se clasifican los factores pronósticos en cáncer de mama en tres categorías:

- **CATEGORÍA I:** factores de demostrada importancia pronóstica y utilidad clínica.
- **CATEGORÍA II:** factores que han sido estudiados extensamente tanto desde el punto de vista biológico como clínico, pero cuya importancia debe ser validada en estudios estadísticos rigurosos.
- **CATEGORÍA III:** todos los demás factores no estudiados suficientemente para demostrar su valor pronóstico.

CATEGORÍA I	CATEGORÍA II	CATEGORÍA III
Tamaño tumoral	C-erb-B2	Análisis DNA: diploide/aneuploide
Afectación axilar	P53	Angiogénesis tumoral
Micrometástasis	Invasión vascular	EGFR*
Ganglio centinela	Ki-67	TGF*
Grado histológico	Análisis DNA: Fracción en fase S del ciclo celular	Bcl-2
Tipo histológico		PS2
Índice mitosis		Catepsina D
Receptores hormonales	* Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico * Factor Transformante del Crecimiento	

Tabla 6.- Factores pronósticos en cáncer de mama.

1.-CATEGORÍA I

1.1.-TAMAÑO TUMORAL

El tamaño tumoral es uno de los factores pronósticos más importantes en cáncer de mama. La frecuencia de metástasis en tumores mayores de 1 cm es del 10-20% y la supervivencia libre de enfermedad a los 10 años es de alrededor de un 90% en las pacientes con ganglios negativos y tumores < de 1cm.

La exploración manual da una idea aproximada del tamaño tumoral, pero se ve influenciada por la subjetividad y la experiencia del explorador , así como factores locales como fibrosis, hemorragia tras punción o edema. El estudio mamográfico aporta mayor precisión, y en general suele variar poco en sus precisiones del estudio anatomopatológico, pero puede verse también influenciado por reacciones histológicas como edema o fibrosis, así como presencia de microcalcificaciones en áreas no malignas próximas al tumor. La evaluación macroscópica tras la sección de la pieza es la que aporta el tamaño definitivo que se utiliza para el estadiaje.

Para disminuir al mínimo las variaciones interobservador, existen las siguientes recomendaciones:

- El tumor debe ser medido en dos dimensiones, y la medida mayor del tumor infiltrante es la que debe ser usada para determinar el estadiaje.
- El tamaño tumoral medido tras evaluación macroscópica ha de ser verificado con la evaluación microscópica de la pieza. El componente invasivo medido de forma microscópica es el que debe usarse como determinación del tamaño tumoral apto para el estadiaje.
- Para tumores pT1 o para aquellos con extenso componente in situ, la medida del tamaño tumoral ha de hacerse por estudio microscópico detallado.
- Para aquellos tumores que tienen componente in situ y componente invasivo, únicamente servirá como medida la del componente invasivo.
- Cuando en la misma pieza se hallan 2 o más tumores invasivos, deberemos medirlos de manera separada, no pudiendo ser combinados en una sólo medida.

1.2.-AFECTACIÓN LINFÁTICA AXILAR.

La afectación ganglionar axilar constituye el parámetro más importante en la predicción de intervalo libre de enfermedad y supervivencia. Sólo el 20% al 30% de las pacientes con ganglios negativos desarrollan recurrencia a los 10 años en comparación con alrededor de un 70% de pacientes con afectación axilar. Pacientes con 4 o más ganglios positivos tienen peor pronóstico que aquellas con menos de 4 ganglios afectados.

Los factores que pueden afectar a la evaluación correcta de la afectación axilar son :

- La extensión de la disección axilar
- Método empleado para localizar los ganglios en la pieza quirúrgica en el estudio anatomopatológico
- Estudio de cada uno de los ganglios frente al estudio de únicamente ganglios representativos.
- Emisión de informe anatomopatológico con el número concreto de ganglios afectados.
- Detallar no sólo la localización del ganglio de mayor tamaño afectado, sino la localización del resto de ganglios infiltrados.
- Detallar el tamaño del ganglio de mayor tamaño encontrado frente al tamaño de la mayor metástasis linfática encontrada.
- El significado exacto de la extensión tumoral en el área adyacente a ganglios afectados es tema de controversia. La extensión perinodal pareció sugerir en varios estudios un aumento del riesgo de la recurrencia , pero estudios más recientes han mostrado que no existen diferencias en cuanto al pronóstico en pacientes controladas por axila positiva.

Las recomendaciones publicadas para unificar criterios, son:

- El patólogo responsable del estudio del espécimen adecuará el método para la localización de ganglios en la pieza que más se ajuste a su experiencia.
- Los ganglios linfáticos de gran tamaño han de ser seccionados para su correcta fijación y estudio.
- El informe anatomopatológico debe detallar claramente el número de ganglios examinados, el número de ganglios afectados, y la dimensión del foco metastásico mayor hallado.

1.3.-MICROMETÁSTASIS.

Varios estudios retrospectivos han demostrado que el pronóstico en pacientes con presencia de micrometástasis en ganglios axilares, definidas como < de 2mm de tamaño, es el mismo que en pacientes con axila negativa en el estudio anatomopatológico, mientras que otros han venido a demostrar un peor pronóstico asociado.

El porcentaje de focos microscópicos de tumor metastásico es del 9-13% de los cánceres de mama “axila-negativa” cuando se estudia con técnicas de Hematoxilina-Eosina frente al 15-20% cuando se estudian con técnicas de Inmunohistoquímica ⁶⁴el significado pronóstico de estos focos de micrometástasis demostrados por IHQ es controvertido ^{65,66}

Los factores que pueden afectar a la evaluación correcta de la existencia de micrometástasis son :

- El uso de técnicas de hematoxilina-eosina, Inmunohistoquímica (IHQ) o análisis molecular, como técnicas de PCR , difieren en la detección de micrometástasis
- Las micrometástasis tradicionalmente se han definido como la existencia de focos tumorales detectados histológicamente que miden < de 2 mm de tamaño. Algunos autores, consideran también como micrometástasis la existencia de focos tumorales inaparentes desde el punto de vista histológico demostrables únicamente por técnicas de hematoxilina-eosina o Inmunohistoquímica . El significado de estas micrometástasis demostradas por IHQ no está actualmente consensuado.
- Las pacientes con existencia de micrometástasis demostrables únicamente desde el punto de vista de la IHQ deberán ser agrupadas en el mismo estadio que aquellas con micrometástasis según la definición clásica, es decir , como N1a.

A menos que estudios multicéntricos demuestren la importancia real del hallazgo de micrometástasis demostrables únicamente por técnicas de IHQ, la detección y el estadiaje tumoral basado en su hallazgo puede basarse únicamente en el empleo de técnicas de Hematoxilina-Eosina. Si disponemos de técnicas de IHQ , el hallazgo de micrometástasis por éstas técnicas deberá ser especificado aparte en el informe anatomopatológico.

1.4.-GANGLIO CENTINELA.

La biopsia del ganglio centinela es un procedimiento que se ha popularizado rápidamente como una alternativa a la disección axilar para el estadiaje del cáncer de mama y tiene gran especificidad y sensibilidad en la predicción del estadio ganglionar axilar ⁶⁷la disección axilar es considerada como un procedimiento dirigido al estadiaje, aunque ha demostrado tener beneficios terapéuticos en algunas pacientes; sin embargo, el empleo de radioterapia y quimioterapia, las cuales pueden reducir las metástasis axilares, hacen más dudoso el beneficio de la linfadenectomía .

La biopsia del ganglio centinela sin disección axilar completa es atractiva debido a la reducción de morbilidad asociada a la linfadenectomía axilar, pero este procedimiento no ha demostrado tener períodos libres de enfermedad y supervivencia equivalentes a las pacientes con linfadenectomía axilar. La tasa de falsos negativos con este procedimiento es del 0-28 % según los estudios consultados. Existen además controversias en cuanto a la importancia del hallazgo de micrometástasis en el estudio pormenorizado de los ganglios linfáticos en la disección axilar clásica frente a la biopsia del ganglio centinela⁶⁸. Mientras que la presencia de micrometástasis puede tener un significado pronóstico, como hemos visto con anterioridad, no está claro que la identificación de éstas, sobre todo las de tamaño menor de 1mm, tenga un significado clínico tan importante como para considerar la administración de terapia adyuvante.

Debido a el alto valor predictivo demostrado en varios estudios de la biopsia del ganglio centinela, es razonable considerar su utilidad, siempre que su uso se incluya en alguno de los protocolos publicados. Debido a que el cirujano en las pacientes con biopsia del ganglio centinela positiva elegirá completar en la mayoría de los casos la disección axilar completa, el asesoramiento intraoperatorio por parte del anatomopatólogo es fundamental para realizar toda la intervención en el mismo acto quirúrgico.

1.5.-GRADO HISTOLÓGICO.

El grado histológico es un importante determinante del pronóstico de la enfermedad.

Las variaciones a tener en cuenta para su correcta evaluación son:

- Existen diferentes sistemas de gradación
- El grado de tipos especiales de tumores: la mayoría de los tipos especiales de tumores de mama están asociados a un mejor pronóstico, pero esto es realmente cierto sólo cuando éstos muestran además un bajo grado histológico.este no es el caso del carcinoma medular de mama, el cual presenta mejor pronóstico que el que sugiere el grado histológico en su estudio.

1.6.-TIPO HISTOLÓGICO.

Las recomendaciones para la correcta evaluación del tipo histológico:

- El carcinoma lobulillar infiltrante clásico será diagnosticado únicamente cuando el tumor conste de una única línea de patrón de crecimiento, una población de células similares de muy bajo grado nuclear, y una baja densidad celular. Ello es debido a que muchos tumores muestran un tipo

lobular pero sólo los que están asociados a un bajo grado nuclear y baja densidad de células se asocian a un mejor pronóstico que que el carcinoma lobulillar clásico u otros subtipos de carcinoma lobulillar. Los carcinomas lobulillares con estas características descritas, vienen a representar sólo el 4% de los carcinomas invasivos de mama.

- Los tumores con un patrón de invasión difuso que no cumplen los criterios de carcinoma lobulillar deben ser reflejados en el informe primariamente según el grado nuclear añadiendo a continuación “con características lobulillares” o bien “variante lobulillar”.
- El diagnóstico de carcinoma mucinoso puro requiere la presencia de un bajo grado nuclear y la existencia de mucina extracelular en al menos el 90% del tumor. Aquellos con una extensión de mucina menor deben ser reflejados primariamente según el grado nuclear añadiendo “con componente mucinoso”.
- Los patólogos deberán tener normas estrictas para el diagnóstico de carcinoma medular de mama.

1.7.-NÚMERO DE MITOSIS.

Definimos índice mitótico como el número de mitosis en un área determinada del tumor, y se usa como estimación del índice de proliferación tumoral. Un alto índice de mitosis está asociado a un peor pronóstico de la enfermedad ⁶⁹. El índice de mitosis deberá reflejarse como el número de figuras de mitosis contadas en 10 campos consecutivos de 10 o 50 aumentos, según la medida usada (HPF.High-power field) en la zona de mayor actividad mitótica del tumor. Deben reflejarse en el informe de forma específica añadidas al grado tumoral.

Sólo se deberán incluir en el recuento las figuras claramente identificadas como mitosis. No deben ser incluidas los núcleos hipercromáticos o los núcleos apoptóticos.

1.8.-RECEPTORES HORMONALES.

La determinación del estado de los receptores de estrógenos y progesterona forma parte de la rutina habitual en el estudio de la piezas de cáncer de mama, teniendo gran valor predictivo en la respuesta del tumor a la terapia hormonal adyuvante⁷⁰.

El método que ha sido demostrado como más efectivo en determinar el estado de los receptores hormonales es la Inmunohistoquímica.

Las recomendaciones para la correcta evaluación del estado de los receptores hormonales, son:

- Como técnica de laboratorio la más recomendada es la inmunohistoquímica.
- Cuando se dispone para su análisis la pieza tumoral y ganglios metastásicos, el análisis se realizará preferentemente de la pieza del tumor primario.
- Debe especificarse el kit comercial usado, y deben incluirse los controles (con zona tumoral y epitelio benigno adyacente).
- El porcentaje de células que expresan el antígeno debe ser especificado en el informe anatomopatológico, no usando el término “positivo” o “negativo” a menos que nos basemos en estudios clínicos aceptados y consensuados.

2.-CATEGORÍA II

2.1.-C-ERB-B2 (HER2-NEU).

Del que hablaremos ampliamente en el próximo capítulo.

2.2.-P53.

Aproximadamente un tercio de los cánceres de mama presentan mutaciones del gen supresor tumoral p53, lo cual se asocia a una mayor agresividad tumoral y mayor grado histológico^{71,72,73}.

Los datos que disponemos de estudios realizados sobre mutaciones en p53 estan generalmente basados en la secuencia de exones desde el 5 al 9, debido a que es la zona donde por el momento se han conseguido localizar estas mutaciones.. Los estudios basados en la secuencia genética de estas mutaciones estan limitados debido a la complejidad molecular de la secuencia de este gen, aunque se están consiguiendo grandes avances debido al desarrollo de técnicas de alta resolución para el estudio genetico.

Las técnicas de inmunohistoquímica generalmente detectan la sobreexpresion de este gen, cuya consecuencia resulta generalmente en la prolongación de la vida media de la proteína codificada.

Mientras que la mayoría de las mutaciones del p53 ocurren de forma espontánea sobre células somáticas, cuando esta mutación se asocia a alteraciones sobre células germinales (como en el síndrome de Li-Fraumeni), existe además una mayor incidencia de cáncer de mama⁷⁴. Se ha demostrado además una relación entre BRCA1 y p53 en cáncer hereditario de mama, de tal manera que la mutación en p53 actuaría de cofactor en estos pacientes⁷⁵.

P53 es considerado de forma habitual como uno de los marcadores en el cáncer de mama, particularmente en la enfermedad sin afectación linfática, aportando además ayuda para identificar pacientes que van a responder mejor a la quimioterapia y radioterapia ⁷⁶. Dado que en la mayoría de artículos al respecto existe consenso en que los pacientes sin enfermedad linfática consideradas de alto riesgo deben ser tratadas con quimioterapia, el significado de los marcadores en estas pacientes es de particular importancia.

Las recomendaciones respecto a la determinación de p53 son:

- Pese al reconocimiento de que las alteraciones en p53 están asociadas a un peor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama, no existe aún consenso en la determinación rutinaria de p53 en la práctica clínica.
- Su utilidad como marcador predictivo ha sido publicada y estudiada, pero es necesario estudios extensivos de validación para llegar a un consenso sobre su utilidad exacta como marcador.
- El método de laboratorio más usado para la determinación de p53 es la Inmunohistoquímica, más simple que otros métodos, considerándose un sustituto del análisis molecular de p53. La especificidad y sensibilidad de la Inmunohistoquímica se ve afectada por múltiples factores, con lo que la confirmación con técnicas de análisis molecular en algunos casos, está justificada (PCR).

2.3.-INVASIÓN VASCULAR PERITUMORAL.

La invasión vascular peritumoral está relacionada con un peor pronóstico en cuanto a la recurrencia local y al tiempo medio de supervivencia⁷⁷. A este respecto, la mayoría de las líneas de estudio se encaminan a definir el espacio peritumoral distinguiendo la verdadera invasión vascular de los artefactos de retracción en la zona. Han sido usadas distintas sustancias para distinguir este espacio, como colágeno tipo IV, laminina, CD31, CD34, Factor VIII⁷⁸.

2.4.-KI-67.

Ki-67 es una proteína nuclear, no-histona, lábil, que no se puede detectar en G₀, pero es detectable desde G₁ a M en el ciclo celular. Los estudios que han usado esta proteína como marcador de la proliferación celular, han demostrado que la determinación del porcentaje de Ki-67 en las células (detectado por tinciones anti-Ki-67) puede ser usada para estratificar los pacientes en grupos de riesgo, en función de mejor o peor pronóstico para la enfermedad ⁷⁹.

2.5.-ANÁLISIS DEL DNA.

La determinación del número de células en fase de síntesis de DNA (Fase S del ciclo celular), ha sido usado como índice de proliferación celular. Existen estudios publicados en los que se relaciona un alto porcentaje de células en la fracción S del ciclo celular con un peor pronóstico y supervivencias más bajas en pacientes con cáncer de mama, tanto con afectación linfática como sin ella ⁸⁰.

3.-CATEGORÍA III

3.1.-ANGIOGÉNESIS TUMORAL.

El crecimiento y el riesgo de metástasis en el cáncer de mama depende aparentemente del crecimiento de neovasos en la zona adyacente al tumor. Existen muchos artículos que relacionan la densidad del área de crecimiento de neovasos con la existencia de metástasis. Sin embargo, también existen estudios en los que esta relación no existe ^{81, 82}.

3.2.-RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor de membrana que se ha relacionado con un efecto estimulador de crecimiento de algunos cánceres de mama ⁸³. La sobreexpresión de EGFR se ha demostrado en algunos cánceres de mama y se ha relacionado con ausencia de receptores estrogénicos y pobre respuesta al tamoxifeno ⁸⁴. Los estudios relacionados con este factor como marcador de pronóstico en cáncer de mama muestran resultados discordantes.

3.3.-bcl-2.

Bcl-2 ha sido publicado como marcador de buen pronóstico y buena respuesta al tratamiento con tamoxifeno. En el estudio publicado por Elledge y colaboradores, la presencia de bcl-2 se correlacionó con la presencia de receptores de estrógenos y con mayor tiempo libre de enfermedad en relación a tumores bcl-2 negativos ⁸⁵.

3.4.-pS2.

pS2 es una proteína citoplasmática que se expresa únicamente tras la estimulación estrogénica y cuya función es esencialmente un factor de crecimiento. Dado que pS2 es únicamente producido en presencia de receptores

de estrógenos. Teóricamente su determinación podía servir como predictor del comportamiento tumoral y la respuesta a la terapia hormonal. Muchos estudios han relacionado la presencia de pS2 con mejor pronóstico y mayor respuesta al tratamiento con tamoxifeno ⁸⁶.

3.5.-CATHEPSINA D.

Se trata de una proteína lisosomal que está sobreexpresada en algunos cánceres de mama. La sobreexpresión de Cathepsina D está relacionada con factores de mal pronóstico, como alto grado histológico, gran tamaño tumoral, presencia de ganglios positivos, así como aumento del riesgo de recurrencia y tiempo libre de enfermedad reducido. ^{87,88}

IV.-SOBREENPRESIÓN DE CERB-B2 EN CÁNCER DE MAMA

HER-2, HER-2/neu, c-neu o c-erbB-2 son distintos términos que se han empleado para denominar a un mismo oncogén celular localizado en el brazo q del cromosoma 17 humano⁸⁹. El v-erbB fue, en 1984, el primer oncogén identificado como un receptor con actividad tirosín-quinasa de un factor de crecimiento. La búsqueda de secuencias homólogas a la del receptor del EGF (Epidermal Grow Factor) por el grupo de M. Waterfield mediante ordenador en las bases de datos entonces existentes, reveló que esta secuencia era casi idéntica a la del oncogén v-erbB del virus de la eritroblastosis aviar. Ello indicaba que el v-erbB derivaba del gen que codifica para el receptor del EGF, a partir de entonces denominado proto-oncogén c-erbB. El trabajo pionero del laboratorio de S. Cohen entre los años 1978 y 1980 había permitido caracterizar al receptor de EGF como una tirosín-quinasa.

Investigaciones posteriores confirmaron que el producto de v-erbB es una forma truncada del proto-oncogén c-erbB al que le falta el dominio extracelular y el extremo carboxiterminal del dominio citoplásmico. Ello causa una activación permanente de la proteína, que es capaz de fosforilar residuos de tirosina sin necesidad de unirse a moléculas de EGF, su ligando fisiológico. Es lógico pensar que esta actividad anormal independiente de EGF debe enviar continuamente hacia el interior celular la señal mitogénica que, en condiciones normales, depende de la presencia del EGF, y, en consecuencia, debe ocasionar el crecimiento descontrolado que lleva a la transformación celular.

El homólogo humano de neu fue identificado posteriormente y de forma independiente por tres grupos de investigadores^{90,91,92}. Cuando fue clonado y secuenciado se observó que estaba relacionado con el gen humano HER-1 (siglas correspondientes a Human Epidermal growth factor Receptor-1) u oncogen c-erb B. Por ello, el homólogo humano de neu fue denominado HER-2) o c-erb B-2.

HER-2/neu pertenece a una familia de genes y codifica 1255 aminoácidos glicoprotéicos que tienen una similitud extensa con el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR o Epidermal Grow Factor Receptor). La familia EGFR incluye al menos dos miembros más (HER-3 y HER-4), que también han sido observadas sobreexpresadas en algunas líneas celulares de carcinomas de mama^{93,94}. La proteína codificada por HER-2/neu es denominada p185 o simplemente proteína HER-2, c-erbB-2 o neu. Se trata de una glicoproteína transmembrana de 185 kDa que se localiza en la superficie de todas las células. Su dominio externo se encuentra estructuralmente emparentado con EGFR aunque no se ha podido demostrar que tenga capacidad para fijar EGF⁹⁵. Su

dominio intracelular tiene actividad tirosina-quinasa, característica de los enzimas que intervienen en mecanismos de transducción de señales desde el exterior hasta el interior celular.

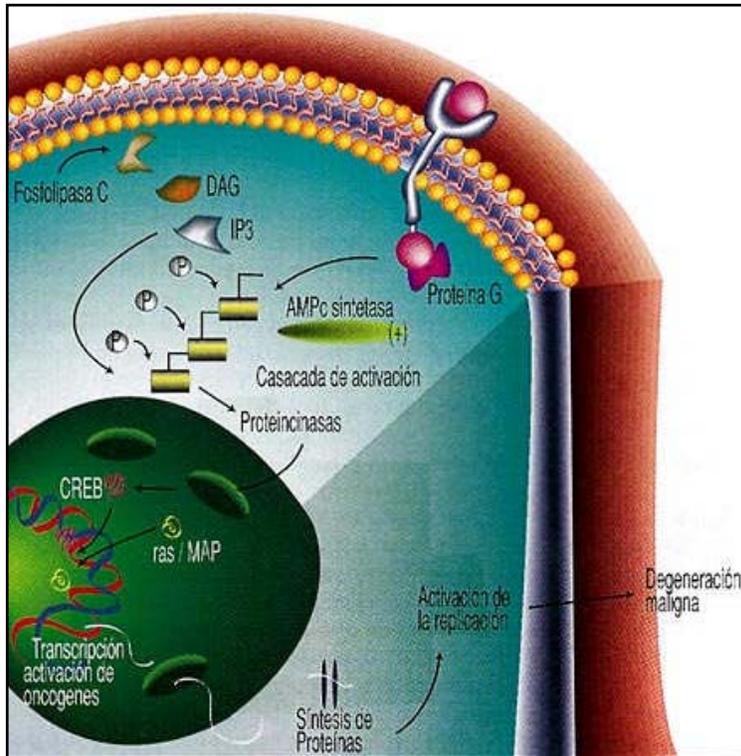


Fig.28.- Activación de Her2Neu

Se postula que c-erbB2 actuaría uniéndose a un ligando específico del exterior que provocaría un cambio en su conformación que implicaría la activación de su dominio tirosina-quinasa. Mediante fosforilización de una o más proteínas por parte de este dominio activado se desencadenaría el proceso de transmisión de señal externa al citosol. Los ligandos que se unen a estos receptores han sido investigados y se hace referencia a ellos denominándolos factor de crecimiento gp30⁹⁶,

hergulinas o factores de diferenciación neu. Estos hipotéticos ligandos actuarían estimulando la mitogénesis y afectando a la diferenciación celular in vitro en líneas celulares de carcinomas de mama ⁹⁷. Parece que el denominado factor activador de neu (NAF) es el ligando específico de ERB-2, aunque su significación parece ser menor que la de la hergulina ⁹⁸.

La mutación más común de todos los oncogenes es, como en el caso de v-erbB, la delección del dominio extracelular. Aunque con menor frecuencia, se han encontrado también mutaciones puntuales activadoras de los respectivos protooncogenes en los dominios extracelulares y transmembrana del receptor.

En el caso del v-erbB, además del dominio extracelular, se deleciona el extremo carboxiterminal, lo que elimina una secuencia reguladora negativa de la actividad quinásica del receptor. Es relativamente frecuente que la sobreexpresión de los receptores normales, que también causa un aumento de la actividad quinasa, induzca transformación celular in vitro. Esta observación se corresponde con las amplificaciones encontradas en ciertos cánceres humanos de estos protooncogenes, como el erbB,y el erbB/neu.

La transfección de múltiples copias del gen HER2 en cultivos celulares que expresaban bajos niveles de proteína c-erb B2 ha dado lugar a la sobreexpresión de la proteína en estos cultivos^{99,100}. La amplificación del gen ha sido observada en el 92% de los cánceres de mama que presentan sobreexpresión de la proteína HER2, lo que indica que la sobreexpresión de esta proteína ocurre sólo rara vez en ausencia de amplificación del gen¹⁰¹. Mientras que una célula normal puede contener de 2 a 4 copias de HER-2/neu, la célula con amplificación de este gen puede llegar a presentar 20 o más copias. La transcripción de los genes HER2 aumenta los niveles de ARN mensajero de HER2 y la concomitante síntesis de la proteína HER2. En las células con sobreexpresión puede producirse un incremento en la cantidad de la proteína de entre 10 y 100 veces más con respecto al epitelio mamario normal adyacente¹⁰². Así, mientras que una célula normal presenta en su membrana unas 50.000 copias de c-erbB-2, una célula que la sobreexpresa puede estar presentando 150.000 copias (x30) de esta proteína. Con la sobreexpresión, la proteína HER2 puede estar activa de forma constitucional, sin requerir de la activación por parte de su ligando externo¹⁰³. En aproximadamente un 10% de los casos no se observa amplificación pero sí existe un aumento de la expresión de la proteína. En estos casos parece que debe existir algún tipo de alteración en la regulación transcripcional o postranscripcional del gen¹⁰⁴.

Se desconoce cuál es el determinante de que se produzca la amplificación y sobreexpresión de este gen. Además de en la mama, se ha observado también amplificación o sobreexpresión de c-erb B-2 en otras localizaciones como en el cáncer de ovario¹⁰⁵, cáncer de endometrio¹⁰⁶, cáncer gástrico¹⁰⁷, cáncer de pulmón¹⁰⁸ o cáncer de glándula salival¹⁰⁹.

La función de la proteína c-erbB-2 es conocida de forma rudimentaria. Su similitud a EGFR y su persistente sobreexpresión en una proporción significativa de carcinomas de mama con pobre pronóstico implica que debe jugar un papel importante en la regulación del crecimiento celular. La transfección de múltiples copias del gen HER2 en cultivos de células tumorales humanas mamarias u ováricas les proporciona un incremento en la síntesis de ADN y un mayor índice de crecimiento en agar, así como una mayor tumorigenicidad y un mayor potencial metastásico cuando se transplantan en ratones^{99,100}. El empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra su dominio extracelular consiguen un efecto antitumoral en cultivos de células obtenidas de carcinomas de mama y en células transformadas mediante neu mutada¹¹⁰. Además, se sabe que la expresión de EGFR en el cáncer de mama está asociada a un peor pronóstico^{111,112}. El empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR inhibe el crecimiento de células carcinomatosas positivas para EGFR in vitro y retarda el crecimiento tumoral en ratones con tumores que expresan EGFR⁷. Por ello, se postula que tanto c-erb B2 como EGFR son componentes de un mecanismo responsable del desarrollo o progresión del cáncer de mama. Se ha demostrado que puede actuar como sustrato para la tirosina-quinasa¹¹³ y que la combinación de la expresión de EGFR y c-erbB2 transforma las células de forma más eficiente que cada uno de ellos por separado¹¹⁴. Por tanto, su función parece deberse a una elevada

activación de la tirosina-quinasa mediante la que se promovería la replicación celular.

Aparte de su efecto estimulador del crecimiento celular, c-erbB2 podría jugar un importante papel en la motilidad de las células tumorales a través de la activación de un factor de motilidad que se sabe que actúa como ligando específico para la proteína neu. Se cree que este factor de motilidad induce la quimiotaxis en los carcinomas mamarios que sobreexpresan neu y por ello podría incrementar el potencial metastatizante de estos tumores. Se ha observado sobreexpresión de c-erbbB2 en el 90% de los casos de Enfermedad de Paget del pezón y se piensa que un factor de motilidad secretado por los queratinocitos podría atraer por quimiotaxis a las células neoplásicas que sobreexpresan esta oncoproteína^{115,116, 117}.

Algunos estudios involucran la sobreexpresión de HER2 con el desarrollo de resistencia al tamoxifeno. Se ha observado que en células de cánceres de mama la activación de HER2 condujo a un descenso en la actividad de los receptores de estrógenos¹¹⁸. Cuando los genes HER2 fueron transferidos a células cancerosas con receptores de estrógenos positivos, éstas dejaron de exhibir un crecimiento ER-dependiente y se volvieron positivas para receptores de progesterona y resistentes a la acción del tamoxifeno. Otros estudios in vitro o in vivo sugieren que la sobreexpresión de HER2 no confiere una sensibilidad o resistencia especial a los cánceres de mama humanos. Los pacientes con sobreexpresión de HER2 pueden responder individualmente a la quimioterapia de forma similar a los pacientes sin sobreexpresión. La mayor recidiva de estos tumores parece deberse a su mayor índice de crecimiento, que podría atribuirse a la función promotora del crecimiento por parte de HER2¹¹⁹. En el momento de la recidiva, la sobreexpresión de HER2 podría conducir a una regulación a la baja de la función de los receptores estrogénicos que produciría la resistencia al tamoxifeno observada en cánceres mamarios que sobreexpresan HER2¹²⁰.

1.-SOBREEXPRESIÓN DE C-ERB-B2 EN EL CÁNCER DE MAMA.

HER 2/neu está amplificado y sobreexpresado en aproximadamente el 25-30% de los cánceres de mama. La proporción de casos con amplificación o sobreexpresión es mayor en los carcinomas intraductales, donde aparece en aproximadamente el 50% de los casos y donde existe una asociación con el tipo comedocarcinoma⁵⁴. Aunque resulta tentador especular con que estos carcinomas in situ con sobreexpresión podrían tener mayor propensión a desarrollar un componente invasivo, no existe hasta el presente ninguna evidencia que apoye esta hipótesis. La sobreexpresión de HER 2 también es mayor en la enfermedad de Paget del pezón, donde aparece hasta en el 90% de los casos¹¹⁷. La

amplificación de HER 2 se correlaciona con cada uno de los tres parámetros- patrón arquitectural, atipia nuclear y número de mitosis- que definen el grado histológico de diferenciación del tumor⁷². Si un tumor primario no sobreexpresa c-erbB-2 sus metástasis subsecuentes pueden sobreexpresar esta proteína; en cambio, si el tumor primario sobreexpresa esta proteína sus metástasis retienen la sobreexpresión en todos los casos.

En general diversos estudios clínicos han asociado la alteración de HER 2 con variables pronósticas negativas así como con mayor frecuencia de recidiva tumoral, períodos libres de enfermedad más cortos y acortamiento de la supervivencia, tendiendo a considerar que la sobreexpresión de HER 2 se correlaciona con peor pronóstico tanto en tumores inicialmente operables como en casos clínicamente avanzados^{72,121,122}. No obstante, no todos los estudios han corroborado estos resultados, especialmente en los pacientes con carcinomas de mama con ganglios axilares no metastásicos¹²².

LA sobreexpresión de la proteína HER2 en la superficie de las células de cáncer de mama sugirió que podría ser un blanco u objetivo para el tratamiento con anticuerpos. Investigadores de Genetech en San Francisco (California) tomaron el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y lo insertaron en el gen de la inmunoglobulina humana. Esta IgG “humanizada” retenía la reactividad del anticuerpo origina murino, que estaba dirigido contra la proteína HER 2. Los ensayos clínicos sugieren que el tratamiento con este anticuerpo, denominado Herceptin, produce un efecto favorable significativo en la supervivencia de los pacientes¹¹⁹. La unión de Herceptin a la porción externa de HER2 no dispara ninguna señal de activación del dominio tirosín-quinasa intracelular, por lo que su modo de acción parece ser debido a que impediría la unión del HER2 a su ligando fisiológico. El tratamiento con Herceptin está indicado sólo en pacientes con amplificación o sobreexpresión de HER2. Además, está contraindicado en pacientes sin amplificación o sobreexpresión de HER2 por sus posibles efectos tóxicos secundarios como la cardiotoxicidad.

1.1.-DETECCIÓN DE HER2 EN TEJIDOS.

Se han desarrollado diversas técnicas para detectar la amplificación o la sobreexpresión de HER2 con fines de investigación y de cara al pronóstico de la paciente. Tales técnicas miden el ADN de HER2, su ARN o la proteína e incluyen métodos de inmunodetección en matriz sólida o filtro sintético, inmunohistoquímica (IHQ), hibridación in situ fluorescente (FISH) e inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA).

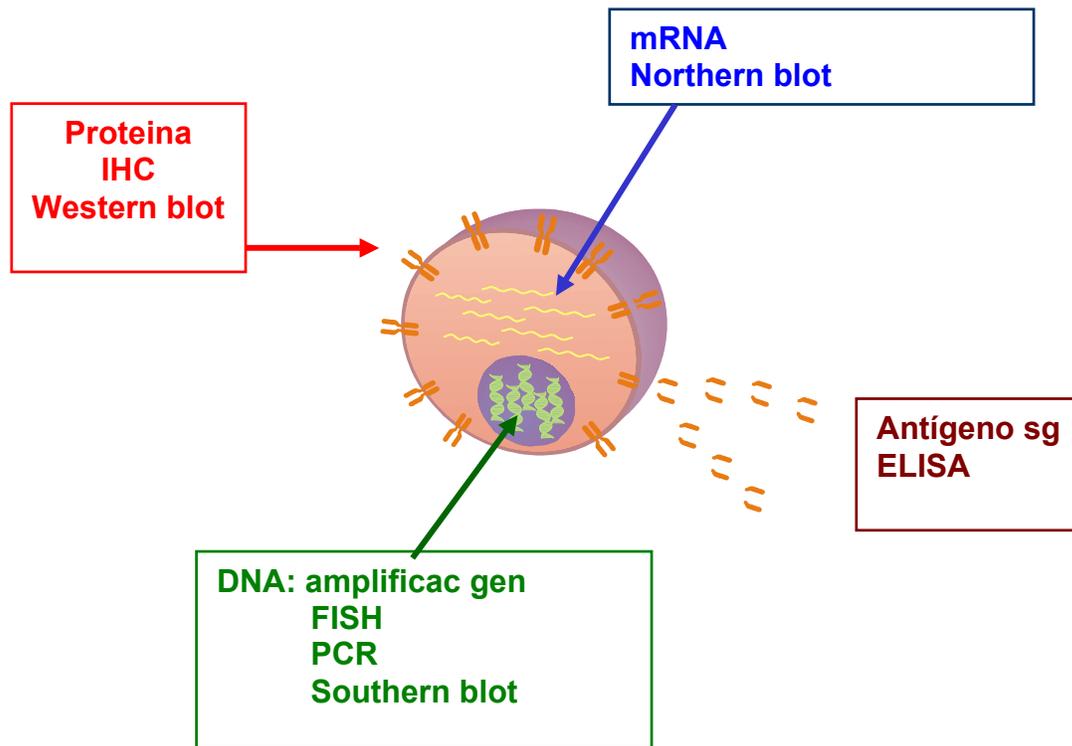


Fig.29.- Detección de HER2-Neu en tejidos.

1. Las técnicas de ELISA se aplican sólo en muestras de suero.
2. Las técnicas de inmunoblot en matriz sólida o filtro sintético incluyen las técnicas de Southern blot o slot blot para la detección del número de copias de ADN; Northern blot y dot blot para la detección de cambios en los niveles de ARNm de HER-2; y Western blot para la detección de la expresión de la proteína. Son muy específicas y presentan sensibilidades elevadas¹²² pero su precisión cuantitativa es más bien pobre y su empleo está limitado a laboratorios de investigación y no se aplican rutinariamente en los hospitales o investigaciones clínicas, ya que requiere un gran número de células purificadas, un equipamiento especial o el uso de radioisótopos.
3. Mediante IHQ se detecta la sobreexpresión de la proteína.
4. FISH detecta la amplificación del gen.

Tanto IHQ como FISH han sido desarrolladas con uso diagnóstico, pueden

ser realizadas sobre muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina, lo que facilita el estudio retrospectivo de los casos, al ser este tipo de muestra la que compone la mayoría de las histotecas hospitalarias.

La detección de la sobreexpresión de c-erbB-2 por IHQ se realiza confrontando el tejido en estudio con un anticuerpo cuyo antígeno es la propia proteína c-erbB-2. La validez de este método se basa en que la sensibilidad de esta técnica es tal que la cantidad de c-erbB-2 existente en las células normales no es perceptible, mientras que la elevada cantidad presente cuando existe sobreexpresión sí es detectable. Al examen de la preparación histológica con el microscopio óptico convencional, la proteína c-erbB-2 sobreexpresada se observa a través de un cromógeno con un patrón de distribución membranoso (en la membrana celular). La intensidad de la tinción que puede expresarse en porcentajes o en grados semicuantitativos (por ejemplo, negativa, leve, moderada e intensa).

Las ventajas de este método incluyen:

- Su coste relativamente bajo.
- Su mayor accesibilidad por la mayor implantación actual de la técnica de IHQ en los laboratorios de anatomía patológica.
- La velocidad de resultados (pueden obtenerse en el mismo día).
- El requerimiento de menos reactivos que FISH, y
- la posibilidad de conservar los portaobjetos permanentemente.
-

Se han empleado anticuerpos policlonales o monoclonales contra distintos epitopos de la proteína c-erbB-2 con resultados variables¹²³ (Gusterson BA, Press MF et al). La variabilidad observada en cuanto a los resultados del valor pronóstico y del valor predictivo de la sobreexpresión de c-erbB-2 probablemente están relacionados en parte con la variedad de anticuerpos anti-HER2 que han sido empleados en los distintos estudios IHQ. No existe un test estándar que se aplique en todos los laboratorios de manera que la interpretación de “positivo” en un laboratorio empleando un anticuerpo determinado puede diferir del resultado obtenido en otro laboratorio empleando otro anticuerpo con distinta afinidad, distinta especificidad de epitopo o distinto grado de reactividad cruzada con proteínas distintas a HER-2¹²¹.

La detección de la amplificación de HER-2 mediante FISH se realiza incubando el tejido en estudio con una sonda marcada complementaria de una secuencia específica del gen HER-2. Mediante un sistema de detección y amplificación se pueden observar al examen con microscopio de fluorescencia las copias existentes del gen en cada núcleo celular. Cada copia aparece en el núcleo celular como una señal punto brillante, considerándose que existe ampliación si se observa una media superior a cuatro copias por núcleo. En la actualidad este método presenta grandes inconvenientes con respecto a la IHQ:

- Su desarrollo requiere más tiempo (incubaciones de 16 horas)

- Es una técnica aún no implantada en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica
- Requiere mayor y especial equipamiento
- El coste de sus reactivos es sensiblemente más elevado que los empleados en la IHQ¹²⁴.

La amplificación del neu aparece principalmente en neoplasias mamarias¹²⁵:

- Tal y Cols mediante southern blot evaluaron la amplificación del neu en 88 adenocarcinomas no mamarios y en 29 tumores malignos de otra histología, hallando amplificación en sólo 4 adenocarcinomas.
- Resultados similares han publicado Cline y Cols, con amplificación sólo 1 de los 26 tumores pulmonares estudiados.
- Slamon y Cols detectaron amplificación del neu en el 25% de 120 pacientes con carcinoma ovárico. Por el contrario, no se detectó amplificación en 139 tumores de origen no mamario u ovárico.
- Mc Cann detectó expresión del neu por inmunohistoquímica (IHQ) en el 4% de 23 adenocarcinomas colorrectales, 2% de 48 carcinomas de vejiga y en el 1% de los carcinomas pulmonares estudiados. Asimismo no detectó presencia de la oncoproteína en ninguno de los carcinomas prostáticos o neoplasias cutáneas estudiadas.
- Voravud y cols, evaluaron la expresión oncogénica durante el desarrollo embrionario hepático y en neoplasias hepáticas. Mediante IHQ detectaron expresión en el 94% de los colangiocarcinomas.

La expresión del neu estaba relacionada con la diferenciación, con positividad en el 79% de los tumores bien diferenciados, y en el 100% de los indiferenciados. Por el contrario, no se detectó expresión en ninguno de los tejidos embrionarios, ni en los tejidos adultos normales. Potter y cols¹²⁵ evaluaron la expresión de la oncoproteína inducida por el neu en lesiones mamarias no neoplásicas, tejido fetal y adulto mamario normal y en diversos tejidos fetales como riñón, intestino y glándulas sebáceas. No detectaron presencia de esta proteína en el tejido normal o en lesiones benignas mamarias. No obstante, se pudo detectar alguna tinción granular a nivel del citoplasma, sin reacción en la membrana citoplasmática, de algunas células mioepiteliales y mamarias no neoplásicas. No existe una evidencia clara de si esta reacción citoplasmática es o no específica.

En conclusión, la mayoría de estudios indican que la existencia de amplificación y/o hiperexpresión del HER-2/neu está rara vez presente en neoplasias no mamarias y ováricas.

La sobreexpresión de ERBB2 en tumores humanos ocurre tanto por amplificación como por desregulación transcripcional y post-transcripcional. A diferencia de los adenocarcinomas de pulmón, pocos tumores de mama muestran sobreexpresión de ERBB2 sin amplificación. La sobreexpresión de ERBB2 puede presentarse temprano en la tumorigénesis mamaria, pero no se ha encontrado

nunca en hiperplasias y displasias¹²⁶, presentándose más tarde en diferentes estadios del tumor (carcinomas in situ, tumores invasivos y metastásicos)¹²⁷. La alta frecuencia de sobreexpresión que tienen los comedocarcinomas sugiere que el carcinoma ductal in situ (DCIS) del tipo comedo, es una entidad biológica separada con su propia progresión tumoral, que implica una gran desregulación temprana de ERBB2. Esto podría explicar la capacidad proliferativa de este tipo de tumores los cuales presentan una clínica más severa y microinvasión.

La amplificación de oncogén neu puede ser detectada en el 15 a 33% de los adenocarcinomas de mama humanos¹²⁸. Esta gran variabilidad de resultados puede ser debida, como sugiere Slamon y cols al estudio de un número escaso de pacientes, o a diferencias en la técnica empleada. El estudio de la amplificación genética no es fácil y necesita tejido fresco, de ahí que los estudios deban ser prospectivos. No obstante, otros métodos pueden ser empleados para el estudio del oncogén neu. Diversos autores han obtenido anticuerpos específicos frente a esta proteína inducida por el neu. La expresión de esta proteína está directamente relacionada con la existencia de amplificación del neu. El empleo de estos anticuerpos en IHQ permite el estudio de grandes series de pacientes, de una manera más económica, fácil y sencilla. Mediante IHQ se ha podido detectar la presencia de la proteína inducida por el oncogén neu entre el 14 y el 33% de las neoplasias mamarias. Estos resultados son muy similares a los descritos estudiando la amplificación genética. No obstante, existen estudios que indican la presencia de esta oncoproteína en un porcentaje muy superior de tumores malignos: 58 y 84%. Esta gran discrepancia de resultados puede estar debida a las características de los anticuerpos empleados en IHQ y a los criterios para considerar o no su positividad. La mayoría de los anticuerpos detectan la proteína p185 en la membrana citoplasmática, coincidiendo con la hipótesis de que esta proteína sería un receptor de un factor de crecimiento.

No obstante algunos autores como Venter¹⁰² o Wright¹²⁰ y cols utilizan anticuerpos con reacción en el citoplasma. Una posible explicación de esta positividad citoplasmática, sería la reacción cruzada del anticuerpo con algunas sustancias presentes en el citoplasma celular.

Muchos de estos estudios refieren correlación entre la detección de la oncoproteína neu en citoplasma y amplificación. Asimismo, la incubación del anticuerpo con el péptido específico, se acompaña de desaparición de la señal. Gusterson y cols sugieren como explicación, que esta proteína neu sería un receptor que tras unirse con el factor de crecimiento específico se internalizaría pudiendo en este período ser detectado a nivel citoplasmático. En los estudios que refieren presencia de esta proteína neu en citoplasma hay que distinguir dos grupos, unas con resultados porcentuales muy similares a los hallados con los anticuerpos con reacción a nivel de la membrana citoplasmática y otros con una sensibilidad muy superior. En estos últimos, no existe una relación entre expresión y amplificación del gen y además es posible observar tinción supuestamente específica en tejidos no neoplásico, así como en células del tejido conectivo y mioepiteliales. Estos resultados hacen pensar, que estos trabajos utilizan anticuerpos con una menor especificidad o emplean condiciones técnicas no adecuadas, con una pérdida notable de especificidad. En las técnicas que

emplean extractos tumorales, como por ejemplo las empleadas para evaluar la amplificación o para determinar el ARN mensajero específico, no existe una visualización directa u otro mecanismo que permita conocer las características del tejido estudiado. No es infrecuente en las neoplasias mamarias hallar un porcentaje importante y variable de estroma, tejido vascular, células inflamatorias y tejido no neoplásico. Todas estas células y proteínas presentes pueden ejercer un efecto de dilución en los resultados obtenidos. Por el contrario, la IHQ permite visualizar las células neoplásicas, observando si existe positividad en la expresión del oncogén y si esta positividad es o no específica.

Slamon et al ¹²⁸ evaluaron comparativamente diferentes técnicas para estudiar el oncogén: el Southern Blot (amplificación), Northern Blot (mRNA), Western Blot (WB) e IHQ (expresión) en tejido fresco. La amplificación del gen fue detectada en 51 de los 187 pacientes. Resultados similares se observaron con los distintos métodos con concordancia al menos por tres métodos en 182 de los 187 pacientes estudiados. Las discrepancias entre amplificación e IHQ fue del 1%, del 2% con relación al Northern Blot y 6% en relación al WB. Estos resultados, permiten concluir que utilizando las mismas muestras, se obtienen resultados similares, en la mayoría de ocasiones.

Otra posible causa de error y por tanto de diferencias en los resultados sería el tipo de material empleado. Las técnicas que evalúan la amplificación u expresión del gen por medio de extractos tumorales, emplean tejido fresco. La IHQ puede ser realizada en tejido fresco o en bloques de parafina. La posibilidad de estudiar el oncogén en bloques de parafina tiene la ventaja de poder estudiar muestras antiguas, del archivo de un hospital y por tanto conocer pronto las posibles aplicaciones clínicas del oncogén. Así mismo facilitaría el estudio del oncogén al permitir un transporte y conservación más fácil. Con el objetivo de evaluar si los resultados obtenidos en tejido precedente de bloques de parafina es comparable al obtenido en tejido fresco, se realizó un estudio en el Health Science Center de San Antonio, comparando la expresión del neu en bloques de parafina mediante IHQ y en tejido fresco a través de Western Blot en 301 pacientes con carcinoma de mama axila positiva ¹²⁸.

- ◆ El 16,6% de las enfermas fueron consideradas como positivas por WB, con concentraciones de esta proteína superiores a 100 U/mg de proteína.
- ◆ El 16,3% de las enfermas presentaron a su vez, reacción específica en la membrana citoplasmática por medio de IHQ.

La concordancia entre ambos métodos fue del 95% (286/301). En ocho casos se halló WB + y IHQ -, mientras que siete pacientes presentaban por el contrario IQ + y WB -. En seis de los ocho casos discordantes con WB +, las concentraciones de esta proteína neu se hallaban cerca del dintel de positividad (100-125 U/ml). Asimismo en tres de los siete casos discordantes con IHQ +, la concentración de proteínas por WB se hallaba muy cerca del punto de corte de la normalidad (80-99 U/mg). Las diferencias en los 6 casos restantes, que

representan sólo un 2% de los resultados, pueden atribuirse a la heterogeneidad tumoral que provocaría que unas zonas fueran positivas y otras negativas dentro del mismo tumor. Estos resultados permiten considerar a las muestras parafinadas tan útiles como las obtenidas en tejido fresco para el estudio del oncogén.

Asimismo, estos resultados indican que las mismas muestras, dan resultados similares, independientemente de la técnica empleada, tal como había indicado anteriormente Slamon y cols.

El oncogén neu está teóricamente relacionado con la duplicación y/o diferenciación celular. Diversos autores han evaluado la posible relación entre expresión y/o amplificación este oncogén y la malignidad o agresividad del tumor. En general la mayoría de autores coinciden en que la amplificación y/o expresión del gen se asocia al grado histológico y nuclear de diferenciación, con predominio en los tumores más indiferenciados.

La sobreexpresión de c-erbB-2 está habitualmente asociada con amplificación, pero ambas pueden ocurrir de forma independiente. Han sido asociadas a parámetros de mal pronóstico en cáncer de mama^{53,122,124} así como a mala respuesta a tratamiento en pacientes con ganglio positivos¹²⁹, aunque la amplificación y sobreexpresión de c-erbB-2 coincidían sólo en parte. En numerosos estudios la relación entre sobreexpresión/amplificación de c-erbB-2 con el peor pronóstico ha sido investigada de forma independiente. No se ha prestado mucha atención a la comparación de las muestras de tumores que sobreexpresan c-erbB-2 en presencia o ausencia de amplificación con respecto a los parámetros pronósticos. Para clarificar este punto, Farabegoli et al¹³⁰ investigaron la amplificación y sobreexpresión en 79 muestras de carcinoma de mama tras la cirugía entre enero de 1993 y septiembre de 1995. La sobreexpresión fue determinada mediante IHQ y la amplificación de c-erbB-2 mediante FISH. Esta técnica, comparada con Southern blot and slot blot, tiene la ventaja de determinar el número de copias del gen en células individuales así como de distinguir un bajo aumento del número de copias de c-erbB-2 debido a una polisomía del cromosoma 17. Con la base de FISH e IHQ, se compararon las características bio-patológicas de las muestras de tumores que sobreexpresaban c-erbB-2 en presencia o no de amplificación con los parámetros pronósticos utilizados normalmente en el estudio del cáncer de mama. Los resultados tienen consistencia con la hipótesis de que sólo la amplificación muestra correlación con los parámetros de mal pronóstico. Los resultados de la comparación entre amplificación-sobreexpresión en las muestras de tejido, se expresan en la siguiente tabla:

FISH	IHQ ² ++	IHQ +	IHQ -	TOTAL
Amplification	18	1	0	19
3-10 ¹	6	9	18	33
2	2	2	11	15
1	1	2	9	12
TOTAL	27	14	38	79

(¹) Número de copias de c-erb-2.

(²) ++: positividad intensa; +: positividad débil.

Tabla 7.- Comparación entre amplificación – sobreexpresión en muestras de tejido

En el citado estudio se evaluó si la sobreexpresión de c-erbB-2, con o sin amplificación estaba asociada a factores pronósticos del cáncer de mama. En base a los resultados de FISH e IHQ, se dividieron las muestras en tres grupos:

1. Grupo I: 19 muestras presentaron sobreexpresión y amplificación.
2. Grupo II: 22 muestras presentaron sobreexpresión pero no amplificación.
3. Grupo III: 38 muestras inmunonegativas.

Se estudiaron en los diferentes grupos, la edad, tamaño tumoral, grado histológico y nuclear, ganglios afectados, receptores de estrógenos y progesterona, grado de ploidia del DNA, ki-67. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad de la paciente y el tamaño tumoral, grado histológico y nuclear y el status ganglionar.

El grupo I mostró mayor porcentaje de aneuploidía y mayor proporción de receptores hormonales negativos que los otros dos grupos, resultando dicha diferencia estadísticamente significativa. No se encontraron diferencias en la fracción de crecimiento detectada mediante ki-67 en los tres grupos.

Los resultados del estudio confirman la hipótesis de que sólo la amplificación muestra características biológicas más agresivas, lo que ha sido previamente demostrado utilizando otras técnicas⁵³. La aneuploidía y los receptores hormonales negativos se asocian con amplificación o sobreexpresión evaluados independientemente en numerosos estudios. En el estudio de la universidad de Bolonia, la sobreexpresión sin amplificación muestra características similares a los tumores inmunonegativos.

La posible relación entre la expresión del oncogén neu y los receptores esteroideos (RE, RP), no están unánimemente aceptados. La amplificación y sobreexpresión de erb-B-2 se ha correlacionado con factores pronósticos adversos como el tamaño tumoral, la afectación ganglionar axilar, el estadio clínico, el grado histológico o la fracción de fase S¹³¹. En una serie del Hospital 12 de Octubre de Madrid ¹³², se encontró que la expresión de ERB-2 ocurre en el 13% de las pacientes con estadios I-III de cáncer de mama. ERB-2 aparece con mayor frecuencia en las pacientes con estadio IV (con metástasis a distancia) en el momento del diagnóstico (36%), lo cual parece indicar un papel de ERB-2 en la metastatización precoz. La porción extracelular de ERB-2 puede detectarse en la circulación periférica. En este mismo estudio se comprobó que el 50% de las pacientes que se encontraban en progresión clínica de su enfermedad tenían niveles elevados de ERB-2, y que estos niveles no se correlacionaban con los niveles del marcador tumoral CA 15.3¹³³.

	<i>n</i>	<i>Erb-B-2 positivo</i>	<i>p53 positivo</i>
Cánceres primarios Estadios I-III	240	13%	29%
Cánceres primarios Estadio IV	42	36%	31%

Tabla 8.-Frecuencia de alteración de los genes erb-b-2 y p53 en cánceres primarios de mama

Otro aspecto interesante es la posible relación entre la expresión del oncogén neu y tipo histológico¹²⁸ :

- ◆ Van de Vjver y cols⁵⁴ indicaron mayor expresión del oncogén neu en los carcinomas in situ (38%) que en los carcinomas invasivos (15%) o en los carcinomas lobulillares (7%).
- ◆ Allred y cols¹³⁴ observaron expresión del oncogén neu en el 11% de los carcinomas ductales invasivos (n=408), 0% de los carcinomas lobulillares infiltrantes (n=21) y en el 27,9% de los carcinomas in situ o de los carcinomas infiltrantes con áreas in situ (n=301). Dentro de los carcinomas in situ, la positividad fue del 6,87% en los comedocarcinomas (n=90), y del 11,2% en otras variedades histológicas (n=206), sin incluir los carcinomas lobulillares in situ donde no se detectó positividad.
- ◆ Resultados similares han descrito Marx y cols con expresión del neu en el 33% de los carcinomas ductales invasivos y en todos los pacientes con comedocarcinomas (9/9). Por el contrario, sólo 1 de 20 carcinomas lobulillares infiltrantes fue positivo.
- ◆ Lammie y cols¹¹⁷ estudiaron el neu en la enfermedad de Paget del pezón, patología asociada al carcinoma de mama. El 91% (41/45) de los pacientes estudiados tenían expresión del gen. Esta elevada positividad puede ser debida a la presencia de áreas de comedocarcinoma en 40 de los 45 pacientes estudiados. La asociación entre expresión del oncogén neu y los comedocarcinomas, es particularmente interesante si consideramos que esta variedad histológica se asocia a una elevada actividad proliferativa.

El componente intraductal extenso es un rasgo histológico que se correlaciona con alto riesgo de recurrencia local en la cirugía conservadora del cáncer de mama^{135,136} . El papel de los marcadores biológicos como c-erbB-2 en la evaluación del comportamiento biológico de estos tipos de tumores no ha sido bien estudiado aún, aunque los pocos estudios existentes indican que son, hasta cierto punto útiles para evaluar el pronóstico de estas pacientes. Además el grado histológico y el tipo de tumor se consideran factores pronósticos esenciales. Jing

et al¹³⁷ han estudiado 187 pacientes con carcinoma invasivo y 4 con carcinoma ductal in situ para observar las diferencias entre los diferentes factores biológicos pronósticos (c-erbB-2, p53, bcl-2 y MIB-1) para el componente intraductal extenso en los carcinomas in situ e invasores. También han analizado la correlación entre el componente intraductal y otros factores pronósticos como tipo y grado histológico, invasión vascular y linfática y afectación ganglionar. Las características histológicas del componente intraductal fueron similares a las de los carcinomas ductales in situ. Sin embargo, la expresión de c-erbB-2, p53 y otros marcadores biológicos en los carcinomas con extenso componente intraductal fue similar a la de los carcinomas invasivos (ver tabla 9). La sobreexpresión de c-erbB-2 fue encontrada más frecuentemente de forma estadísticamente significativa en el grupo con extensión intraductal ($p < 0.01$), que a su vez se observó más veces, de forma estadísticamente significativa, en el grupo de tumores con invasión vascular y linfática ($p < 0.005$). La presencia de márgenes quirúrgicos de resección positivos estuvo estrechamente relacionada con el componente intraductal ($p < 0.0001$).

Componente intraductal	Nº	P53 (%)	c-erbB-2 (%)	Bcl-2 (%)
Positivo	86	33 (38.37)	63 (70.08)	43 (50.00)
Negativo	101	34 (33.66)	55 (51.43)	48 (47.52)
Total	187	67 (35.83)	118 (63.10)	91 (48.22)
Valor de p		0.5035	0.0075	0.7357

Tabla 9.- : Relación entre el componente intraductal y los marcadores biológicos.

El hecho de encontrar sobreexpresión de c-erbB-2 más frecuentemente en carcinomas con extenso componente intraductal, indica que estos tumores poseen un mayor potencial metastásico e invasivo y peor pronóstico con respecto a la cirugía conservadora.

Anteriormente se ha indicado también la asociación entre expresión e indiferenciación. Se ha evaluado la expresión del oncogén neu en relación a la fracción celular en crecimiento utilizando para ello el anticuerpo monoclonal Ki 67. El 50% de las pacientes con elevada capacidad duplicativa (Ki 67 +) tenían expresión del oncogén en contraste con sólo el 29% de los casos con Ki 67 negativo.

La mayor expresión del oncogén neu en carcinomas in situ que en carcinomas infiltrantes sugiere desde un punto de vista morfológico, que la aparición de esta proteína es un evento relativamente precoz en la carcinogénesis, y que define un subconjunto de tumores mamarios con tendencia a la agresividad

de forma muy temprana. Entre un 50-60% de los carcinomas de mama in situ tienen c-erbB-2 positivo. Estos datos sugieren también que el estudio de esta oncoproteína en patología benigna puede permitir identificar un subgrupo de pacientes con un elevado riesgo de carcinoma mamario.

- Gusterson y cols¹²³ estudiaron la expresión del oncogén neu en 149 tejidos mamarios con patología benigna. En 3 pacientes halló una positividad citoplasmática clara mientras en otros 35 detectó una débil señal. Ninguno de los 149 tejidos estudiados presentó positividad a nivel de la membrana citoplasmática.
- Allred y cols¹²⁶ evaluaron la expresión del oncogén neu durante la teórica evolución de un carcinoma mamario. No se detectó positividad de la oncoproteína inducida por el oncogén neu en el tejido mamario normal, muestras de tejido benigno incluyendo enfermedades proliferativas sin atipia e hiperplasia ductal atípica. Por el contrario, en el 55,9% de los carcinomas ductales in situ y en el 76,9% de los comedocarcinomas existía expresión.
- Azadeh Stark, B et al. determinaron si la presencia de amplificación y/o sobreexpresión de erbB-2 en enfermedades mamarias benignas estaba asociada un incremento en el riesgo de cáncer de mama. Para ello realizaron un estudio de casos-control en el que los casos fueron el grupo de mujeres diagnosticados de enfermedad benigna de mama en la clínica Mayo y que posteriormente desarrollaron cáncer de mama. El resto de las mujeres de este grupo constituyó el control (137 casos y 156 controles).

Entre los controles, siete (4.5%) muestras mostraron bajos niveles de amplificación de de HER-2/neu, mientras que 13 muestras de tejidos benignos (9.5%) y 18 muestras de cáncer (18%) de los casos mostraron amplificación. La amplificación de HER-2/neu en las biopsias de patología benigna se asoció con un aumento del riesgo de cáncer de mama con un odds ratio=2,2; 95% de intervalo de confianza, valores que se aproximan a la significación estadística. Los riesgos de cáncer de mama asociados con diagnóstico histopatológico de benignidad tuvieron un odds ratio= 1.1 con 95% de intervalo de confianza para las lesiones que presentaban proliferación sin atipia y un odds ratio=1.5 con 95% de intervalo de confianza para aquellas lesiones que presentaron hiperplasia ductal atípica. Aquellas mujeres que presentaron proliferación con o sin atipia en el diagnóstico y que también presentaron amplificación de erbB-2, el riesgo de cáncer de mama fue mayor de 7 veces: odds ratio=7.2 con un intervalo de confianza de 95%. La sobreexpresión de la proteína de HER-2/neu, definida como la presencia de "manchado" en el 10% o más de las células epiteliales, se encontró en el 30% de los tumores de mama pero no se detectó en ninguna de las muestras de tejido mamario benigno. Los casos que presentaron amplificación del gen HER2/ neu en el tumor maligno de mama, también la presentaron con mayor frecuencia en las muestras de tejido mamario benigno (previas al desarrollo del tumor), sin que esta asociación fuese estadísticamente significativa (p=0.06). Por tanto, podemos concluir tras observar los resultados de este estudio, que mujeres que en biopsias benignas

de mama presentan amplificación del gen HER-2/neu y proliferación en el diagnóstico histopatológico, tienen un riesgo elevado (>7) de desarrollar cáncer de mama.

El porcentaje de expresión del neu desciende progresivamente a lo largo de la evolución teórica de los carcinomas mamarios, con positividad del 11,2% en los carcinomas invasivos puros. Estos resultados sugieren que la expresión del oncogén tendría un papel importante en las primeras etapas del carcinoma mamario pero no posteriormente en su progresión.

En la actualidad, dos de las aplicaciones clínicas de erbB-2 son su valor pronóstico y su valor predictivo. Una tercera aplicación de erbB-2 es su papel como diana terapéutica para los nuevos tratamientos que están dirigidos contra la proteína o el propio gen erbB-2 ¹³⁸.

2.-C-ERB-B2 COMO FACTOR PRONÓSTICO.

Un factor pronóstico es aquel que, independientemente del tratamiento que se utilice, indica una evolución clínica mejor o peor. Un ejemplo tradicional de factor pronóstico en cáncer de mama primario es la afectación ganglionar.

¿Cuándo un marcador biológico puede afectar a las decisiones clínicas? La aplicación más común de la información pronóstica en pacientes con estadios precoces de cáncer de mama es definir qué pacientes poseen bajo riesgo de recidiva en las que la quimioterapia no está justificada. Generalmente todos clínicos recomiendan quimioterapia adyuvante a todas las pacientes con ganglios positivos, independientemente de otros factores pronósticos. Así, para que un marcador tenga utilidad clínica, debe definir en parte el pronóstico de pacientes con ganglios negativos en el diagnóstico inicial. Debe añadir información independiente de otros factores pronósticos de rutina, como el tamaño tumoral, y sus resultados deben ser confirmados por análisis multivariantes.

Como expusimos en el capítulo III, bajo los auspicios del Colegio Americano de Patólogos, un grupo multidisciplinario de clínicos, patólogos y estadísticos clasificaron los diferentes factores pronósticos del cáncer de mama en una serie de categorías que reflejan la fuerza de las evidencias publicadas ¹³⁹. Los factores incluidos en las dos primeras categorías fueron evaluados en función a las variaciones en el método de análisis, la interpretación de los hallazgos en los diferentes estudios, y el análisis estadístico de los datos encontrados. Se hicieron recomendaciones detalladas para mejorar cada factor, basadas en las siguientes premisas:

- A. Evaluación anatómo-patológica completa y uniforme de cada tipo tumoral.
- B. Mejora en la calidad de los datos recopilados acerca de cada factor.
- C. Mejora en el cuidado del paciente.

La relación existente entre expresión del oncogén neu y factores pronósticos del cáncer de mama así como con la duplicación celular, sugiere su posible aplicación como parámetro pronóstico. Diversos estudios se han publicado indicando un menor intervalo libre de enfermedad y supervivencia en los pacientes con amplificación u expresión del oncogén neu. No obstante, no existe unanimidad y hay estudios que niegan el interés pronóstico del neu o por el contrario, existen discrepancias entre su aplicación pronóstica en el intervalo libre de enfermedad o supervivencia. La razón de estas discrepancias puede estar relacionada con el número de pacientes incluidos en cada estudio o con el intervalo medio de seguimiento. Otro factor que puede influir es las características de la población estudiada: el porcentaje de pacientes incluidos en estos estudios con o sin invasión axilar, el porcentaje de casos con RE + etc, que pueden influir en la evaluación de del interés pronóstico del oncogén.

Para obviar la posible interrelación entre los distintos factores pronósticos, se debe realizar un estudio multivariante, valorando simultáneamente los distintos factores pronósticos que intervienen en la supervivencia del carcinoma mamario.

2.1.-CERBB2 EN PACIENTES CON AFETACIÓN AXILAR.

En este sentido existe una gran controversia en el resultado obtenido por diversos autores, debido a dos circunstancias adversas como son los diferentes métodos de inmunodetección empleados y la heterogeneidad en las muestras, correlaciones y estudios estadísticos empleados.

Slamon y cols¹⁰⁵ demostraron que en los pacientes con cáncer de mama axila positiva, la amplificación del neu es, después del número de ganglios invadidos, el factor pronóstico más importante. Halló que, en 189 casos de cáncer de mama primario en los que se determinó la amplificación del gen erbB-2 mediante Southern blot, las pacientes con más de 3 copias del erbB-2 tenían un tiempo a la recaída y una supervivencia global peores que las pacientes sin amplificación¹⁴⁰.

En una revisión reciente se han analizado 47 estudios clínicos en los que se evaluó la expresión de erbB-2 en más de 15.000 pacientes¹³⁸. En 41 de los estudios se observó que erbB-2 se asociaba a un valor pronóstico. El método de estudio y el año de publicación tuvieron importancia en los resultados. Mientras que los estudios de Southern blot, los más antiguos, hallaron valor pronóstico a erbB-2 en el 80% de los casos, los estudios de FISH, más modernos, han hallado una asociación pronóstica en el 100% de los casos (tabla 10).

En una serie de 412 pacientes con cáncer de mama revisada en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid¹⁴¹, en las que erbB-2 se evaluó con ELISA, observamos que la sobreexpresión de erbB-2 tiene valor pronóstico, con un intervalo libre de enfermedad claramente menor en las pacientes con erbB-2 positivo, más evidente a partir de los 22 meses de período de evolución de las pacientes.

Resultados similares fueron publicados en el Health Science Center de San Antonio evaluando la expresión de este oncogén por WB. En este estudio no se observó diferencias en el intervalo libre de enfermedad o supervivencia de las pacientes sin invasión axilar (n=378). Por el contrario, en las pacientes con axila positiva (n=350), se observó un menor intervalo de enfermedad (p=0.014) y supervivencia (p=0,0001) en las enfermas con elevadas concentraciones de la oncoproteína inducida por el oncogén neu¹⁴¹.

En 1992 Singleton y Strickler revisaron los resultados de varios estudios previos concluyendo que la amplificación de neu es un factor pronóstico independiente, de menor supervivencia, sólo en pacientes con metástasis a nódulos axilares.

Champeme et al en 1994 concluyeron que la amplificación del ERB-2 per se puede ser un factor pronóstico independiente.

Método	Años de publicación	Número de estudios/pacientes	Número con valor pronóstico (%)
Southern blot/slot blot	1987-1993	10/2.736	8 (80%)
Inmunohistoquímica	1988-1997	30/11.630	26 (87%)
ELISA/western blot	1990-1997	6/1.075	6 (100%)
FISH	1996-1998	4/730	4 (100%)

Tabla 10. Relación entre el valor pronóstico de erbB-2 y el método de determinación de erbB-2 (elaborado a partir de: The HER -2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. Oncologist 1998.

En el estudio multivariante, el oncogén neu era un factor pronóstico independiente en pacientes con axila positiva, tanto en el intervalo libre de enfermedad como en la supervivencia, pero no en los casos sin invasión axilar.

En resumen, existe una mayoría de estudios que considera al neu un parámetro pronóstico en las enfermas con axila positiva. El interés pronóstico del oncogén neu en las pacientes con carcinoma mamario axila negativa, no está claro. En 3 de 8 estudios publicados en relación a este aspecto, citan menor intervalo libre de enfermedad y supervivencia en los casos con expresión del mismo¹²⁸. Por el contrario, existe un número similar de trabajos que niegan la aplicación de este oncogén como parámetro pronóstico, mientras otros encuentran interés pronóstico principalmente en relación a la supervivencia, pero no en el intervalo libre de enfermedad¹²⁸.

Para intentar resolver estas discrepancias, se realizó un estudio en el Health Science Center de San Antonio, evaluando para ello una población numerosa de pacientes axila negativa: 677 casos. Estas pacientes fueron estratificadas en dos diferentes grupos, según su riesgo: las pacientes con tumores de menos de 3 cm de diámetro, mayor y con RE+. Las pacientes de alto riesgo fueron randomizadas en dos grupos, uno con tratamiento quimioterápico complementario y otro con abstención terapéutica.

En el grupo total de pacientes y en el subgrupo de alto riesgo, no se observaron diferencias en el intervalo libre de enfermedad o en la supervivencia en función de la expresión del oncogén evaluado mediante IHQ. Por el contrario, en las pacientes de bajo riesgo con expresión del neu se observó un menor intervalo libre de enfermedad ($p < 0.0001$) y supervivencia ($p < 0,0001$)¹²⁸.

Tagliabue¹⁴² et al., en una revisión de 1210 pacientes tratadas quirúrgicamente del cáncer de mama entre 1968 y 1971 en el Instituto Nacional del Cáncer de Milán, sin quimioterapia adyuvante y con 20 años de seguimiento, observaron sobreexpresión de p185 en el 23% de los tumores y relación con menor supervivencia en pacientes con ganglios positivos, pero no en aquellas con ganglios negativos. Ulteriores análisis encaminados a analizar esta divergencia en el potencial predictivo del c-erbB-2 en relación con la extensión de la enfermedad indican que la sobreexpresión de c-erbB-2 está directamente relacionada con el tamaño y grado del tumor, asociados a mal pronóstico, y con un incremento en la “densidad de infiltración linfoplasmática” (LPI), que está asociada a un pronóstico favorable. Análisis del valor pronóstico de c-erbB-2 en relación con la presencia de LPI y el estado ganglionar demuestran que en pacientes con ganglios negativos sin LPI la sobreexpresión de p185 muestra el mismo nivel de correlación con mal pronóstico que en pacientes con ganglios positivos, mientras que en pacientes con ganglios negativos y LPI positivo, la sobreexpresión de p185 se correlaciona con buen pronóstico. Estos resultados indican que p185 es inmunogénica y que esta respuesta inmune puede disminuir la progresión del tumor durante estadios precoces de la enfermedad, debido a la presencia de anticuerpos específicos contra la oncoproteína p185.

Otros autores han encontrado un valor pronóstico al c-erbB-2 en pacientes con ganglios negativos en grupos de pacientes seleccionados con otros factores pronósticos asociados, como RE + y bajo grado nuclear. Debido a estas controversias, en las “Pautas para la Práctica Clínica en el uso de Marcadores Tumorales en el Cáncer de Mama”, propuestas recientemente por la Sociedad

Americana de Oncología Clínica, se propugna que los datos existentes son aún insuficientes para recomendar como práctica de rutina el uso de C-erbB-2 como factor pronóstico en pacientes con ganglios axilares negativos.

Paik y cols encontraron resultados similares en un subgrupo de bajo riesgo, clasificado en función del grado nuclear de diferenciación. En las pacientes de alto riesgo de recidiva, sin expresión del oncogén neu, el tratamiento adyuvante mostró un beneficio en relación a las enfermas con abstención. Por el contrario, este efecto beneficioso de la quimioterapia no se observó en las enfermas con expresión de este oncogén¹⁴³.

Jasminka Jakic-Razumovic han publicado recientemente un trabajo en Tumori¹⁴⁴ cuyo objetivo fue evaluar la importancia pronóstica de la sobreexpresión de c-erbB-2 en asociación con otros factores pronósticos. Se incluyeron 149 pacientes que fueron operadas de cáncer de mama entre 1975 y 1982. Únicamente se incluyeron los carcinomas ductales invasivos, lo que supuso la exclusión de 31 pacientes. Otras 25 fueron también excluidas debido a que no se siguieron correctamente. El número final de pacientes con carcinoma ductal invasivo y con seguimiento completo fue de 93, tratadas con cirugía radical y linfadenectomía axilar. Todas las pacientes recibieron quimioterapia adyuvante u hormonoterapia en función de sus receptores hormonales. Fueron seguidas hasta su muerte o hasta 1993.

Los parámetros analizados fueron: edad, menopausia, presencia de metástasis a distancia, tamaño tumoral, grado histológico, afectación ganglionar, RE y RP de forma independiente y de coexpresión de ambos receptores, c-erbB-2 y catepsina D.

El 59.1% de las pacientes fue mayor de 50 años, con un porcentaje similar de premenopaúsicas y postmenopaúsicas (49.5% vs 50.5%). El 59.1% de las pacientes tenía afectación axilar y la distribución de metástasis a distancia fue: pulmón: 12.9%; hueso: 24.7%; hígado: 8.6%; y cerebro: 7.5%. Según el score de Bloom-Richardson, las pacientes se dividieron en tres grupos: grado I: 23.7%, grado II: 54.8% y grado III: 21.5%. El 16.1% de los tumores fueron menores de 2 cm y el 83.9% entre 2-5 cm. Ningún tumor fue mayor de 5 cm. Con respecto al status de los receptores hormonales, distinguimos los siguientes grupos:

1. RE -: 58.1%
2. RP -: 64.5%
3. RE/RP -: 44.1%
4. Positividad en uno de los dos receptores: 34.4%.
5. RE/RP+: 21.5%.

El análisis de DNA reveló que un 43% de los tumores presentaban DNA aneuploide y el 57% diploide, así como que el 83.9% de los tumores tenían más de un 4% de las células en fase S del ciclo celular.

Un 52.7% de la muestra presentó c-erbB-2 positivo y un 77.4% de catepsina D positiva en los macrófagos del estroma.

En las muestras de este estudio, la proporción de tumores que expresaban c-erbB-2 no se correlacionaron ni con el grado histológico ni con el tamaño tumoral. Sin embargo, c-erbB-2 se expresó en un elevado porcentaje de tumores

con RE y RP negativos, de forma estadísticamente significativa. También se encontró correlación estadística tanto con la presencia de afectación ganglionar como con el número de ganglios afectados (>3 ganglios). El análisis univariante de los diferentes factores pronósticos mostró que la afectación axilar, la expresión de RE, RP y su coexpresión presentaban valores estadísticamente significativos en cuanto a período libre de supervivencia. La sobreexpresión de c-erbB-2 mostró una p de 0.059, en los márgenes de la significación estadística. En el análisis multivariante de los datos únicamente la afectación axilar y la presencia de coexpresión de RE/RP fueron encontrados factores pronósticos independientes.

Correlacionando la sobreexpresión de c-erbB-2 con otros factores pronósticos y con la supervivencia se llega a la conclusión de que c-erbB-2 cuando se sobreexpresa, identifica a un grupo de pacientes con un pronóstico desfavorable: por ejemplo, cuando el c-erbB-2 es positivo en el grupo de pacientes con score II, éstas pacientes tienen un período de supervivencia menor. Lo mismo ocurre en pacientes con tumores mayores de 2 cm, aneuploidía y con catepsina D + comparados con las pacientes del mismo grupo que no expresan el c-erbB-2.

En este estudio la incidencia de c-erbB-2 + fue de 52.7%, tasa superior a la encontrada normalmente en la literatura. Esta discrepancia puede ser reflejo de la diferente composición en la cohorte de pacientes examinada. El no encontrar una significación estadística clara al estudiar la sobreexpresión de c-erbB-2 como factor pronóstico independiente, si refleja otros muchos datos encontrados en la literatura.

Hay que considerar c-erbB-2 en el contexto de otros factores pronósticos como un “complemento” al estudio de las pacientes con carcinoma de mama. Así, existe una correlación negativa en la mayoría de los estudios entre el status del receptor hormonal y el c-erbB-2. No está tan clara la correlación con la afectación axilar: los resultados de este estudio muestran que no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la supervivencia entre pacientes con ganglios positivos o negativos en función de la sobreexpresión de c-erbB-2.

La importancia de c-erbB-2 + en la progresión del cáncer de mama ha sido evaluada de forma muy extensa en los últimos años debido a que las técnicas de IHQ con muy sencillas. Aunque existen todavía algunas controversias¹⁴⁴, la mayoría de los estudios sugieren que c-erbB-2 es un indicador de biológico de agresividad tumoral, y que puede ser potencialmente útil en la predicción de la evolución de pacientes con cáncer de mama. De hecho, en este estudio, no se han encontrado datos estadísticamente significativos con respecto a la supervivencia, pero sí se ha observado que la sobreexpresión de c-erbB-2 puede ser utilizada de forma muy efectiva para identificar pacientes de alto riesgo (score II, tumores mayores de 2 cm, DNA aneuploide y con catepsina D +), con pronóstico desfavorable y con tumores muy agresivos.

Takashi Yokota¹⁴⁵ ha estudiado la correlación de p53, la proteína c-erbB-2 y los receptores hormonales con otros rasgos clínico-patológicos del cáncer de mama como la edad, menopausia, estadio, tipo histológico y afectación ganglionar axilar (que es el factor que mejor se correlaciona con el pronóstico en pacientes

sometidas a cirugía potencialmente curativa). Se evaluaron 70 muestras de tumores de mama obtenidas tras tratamiento quirúrgico entre 1995 y 1997. La edad media de las pacientes fue de 53.2 años (28-84); La clasificación por estadios (TNM) fue: I: 21 casos; II: 27; III: 13; y IV: 3 casos. 64 mujeres se sometieron a cirugía radical y el resto (6), cirugía conservadora. En todas se realizó linfadenectomía axilar. En el postoperatorio, aquellas pacientes con ganglios negativos recibieron 100 mg/día de 5-fluoracilo y 20 mg/día de tamoxifeno, durante 2 o 3 años. Las pacientes con ganglios positivos recibieron CMF y tamoxifeno, durante 2 o 3 años.

La mayoría de los tumores eran ductales infiltrantes y la mitad de ellos tenían ganglios + en el momento de la cirugía (35/70). 27 tumores primarios eran menores de 2 cm.

La distribución de los marcadores tumorales fue:

- RE positivos: 38,6%.
- RP positivos: 52.9%.
- P53 positivo: 27.1%.
- C-ERB-2 positivo: 48.6%.

La expresión del RE se correlaciono con la de RP ($p=0.0101$) y de forma inversa con p53 ($p=0.0026$).

Los RE, RP, p53 y c-erbB-2 no se asociaron con la edad, la presencia o no de menopausia, ni con el estadio tumoral. Tampoco hubo correlación entre el tamaño tumoral y la expresión de los 4 marcadores, ni con el subtipo histológico (ductal infiltrante, mucinoso, medular, lobulillar). Únicamente se observó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de RP y los ganglios positivos ($p=0.0166$). Se observó una clara tendencia hacia la asociación entre la sobreexpresión de c-erbB-2 y el grado de afectación ganglionar, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo ($p=0.0826$): 40% de positividad en pacientes con ganglios negativos, 48% en pacientes en estadio N1 y 80% en pacientes con estadio N2. No se observó asociación a la invasión vascular. El único marcador que mostró relación con la invasión linfática fue el RP.

Estudios previos confirman la correlación estadística entre la diferenciación histológica del tumor y la sobreexpresión de c-erbB-2. Se ha sugerido que la sobreexpresión de c-erbB-2 puede llevar a una proporción más alta de crecimiento de las células tumorales y su asociación con la proporción de células en la fase S del ciclo celular ya ha sido demostrada.

En conclusión, la amplificación y/o expresión del oncogén neu, se detecta principalmente en el carcinoma de mama, donde su expresión no siempre se correlaciona con otros factores pronósticos: RE, grado histológico y nuclear de diferenciación, tipo histológico etc. Su estudio permite establecer subgrupos de pacientes con elevado riesgo de recidiva tumoral tanto en las enfermas con axila positiva como en determinados subgrupos de pacientes sin invasión axilar.

2.2.-CERBB2 EN PACIENTES SIN AFETACIÓN AXILAR.

El cáncer de mama con ganglios negativos tiene un pronóstico muy favorable, pero aún mueren un 30% aproximadamente de mujeres a causa de su enfermedad. En este grupo de pacientes, el tamaño del tumor primario, el grado histológico y el tipo histológico constituyen los factores pronósticos más importantes. Los marcadores biológicos como p53 c-erbB-2 RE y RP, a pesar de que han demostrado ser factores pronósticos en pacientes con axila positiva, aún presentan controversias en los estudios de mujeres con cáncer de mama y axila negativa.

Autores como Reed W¹⁴⁶ han publicado un análisis multivariante de los factores pronósticos en 613 pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos seguidas durante 14-30 años. En este estudio, los factores pronósticos mencionados fueron evaluados junto con parámetros clínicos e histológicos en dos series de un total de 613 pacientes con ganglios negativos:

- 228 pacientes fueron escogidas del grupo SACGS. Todas recibieron cirugía radical, quimioterapia postoperatoria. Ninguna tamoxifeno o radioterapia.
- 385 pacientes pertenecientes al grupo HOST, fueron tratadas con cirugía radical y radioterapia ovárica.

No se encontraron diferencias significativas en ambas series en los valores de p53, c-erbB-2 RE y RP, siendo p53 + en el 29% de los tumores, c-erbB-2 en el 10% y RE en el 57%. El valor estadístico de Kappa evaluando la variación interobservador en la graduación histológica fue de 0,69, que se considera un fuerte grado de acuerdo. No hubo diferencias en la supervivencia comparando los casos en los que los cuatro marcadores eran positivos con aquellos tumores que no los expresaban. Sin embargo, tanto el período libre de enfermedad como la supervivencia global fueron tras 10 años de seguimiento mejores en el grupo T1N0M0 que en el T2N0M0 [81% vs 67% ($p < 0.0001$) y 85% vs 70% ($p < 0.0001$)]. La tasa de período libre de enfermedad tras 10 años en aquellas pacientes con grado histológico 1 vs grados 2-3 (de acuerdo con la modificación del método de Bloom-Richardson de Elston and Ellis) fue de 90% y de 70% respectivamente ($p < 0.0001$), y la tasa de supervivencia global en los mismos grupos de 94% y de 81% respectivamente ($p = 0.0002$). Tras 30 años de seguimiento, la tasa de supervivencia global en las pacientes con grado histológico 1 vs grados 2-3 fue de 87% y 68%, y de 78% y 66%, respectivamente, para pacientes con tumores ≤ 20 mm versus aquellos con tumores $>20-50$ mm. Aproximadamente el 35% de las pacientes con tumores >20 mm y con grado histológico 2-3 habían muerto tras 10 años de seguimiento, contrastando con un 6% de pacientes muertas con tumores ≤ 20 mm y grado histológico 1. La radioterapia postoperatoria en la mama y región axilar mejoraron de forma global las tasas de supervivencia y período libre de enfermedad en comparación con el tratamiento quimioterápico postquirúrgico y la radioterapia ovárica.

En un artículo publicado en American Journal ¹⁴⁷ se demostraba que la radioterapia después de la mastectomía y la quimioterapia adyuvante mejoraba de forma significativa la supervivencia en mujeres premenopáusicas de alto riesgo.

En este estudio, la radioterapia mejoró tanto la supervivencia como el período libre de enfermedad en mujeres pre y post-menopáusicas con enfermedad en estadio I. Esto puede explicar las idénticas tasas de recurrencia y supervivencia en los dos grupos de pacientes del estudio incluso cuando el tamaño del tumor era mayor en el grupo HOST. En este estudio la sobreexpresión de la proteína c-erbB-2 fue de un 10%. Otros autores han encontrado hasta un 44%. Al igual que en otros estudios, la expresión de la proteína se correlacionó de forma significativa con factores pronósticos desfavorables como la falta de RE y RP y el alto grado histológico. Contrariamente Rosen et al. no encontraron ninguna asociación entre el grado histológico y el status de los receptores hormonales en relación con c-erbB-2. Una explicación puede ser que su frecuencia de sobreexpresión fue demasiado alta (44%) para mostrar una asociación con subgrupos.

La sobreexpresión de c-erbB-2 se relacionó en este estudio con **tumores de alto riesgo**, aunque no con el pronóstico, lo que coincide con otros estudios^{148,149,122}. Otros autores han encontrado asociación con peor pronóstico^{150,151,152}. En otros grupos, la significación estadística con respecto al pronóstico se limitó a un grupo de pacientes con ganglios negativos: bajo grado nuclear¹⁵³, RE positivos¹³⁴ y carcinoma sin componente in situ¹³⁴.

En conclusión, tanto c-erbB-2 como p53 se correlacionaron con tumores de “alto riesgo”, y la expresión del receptor hormonal se correlacionó con tumores de “bajo riesgo” basándonos en parámetros clinico-patológicos. Ninguno de estos factores tuvo valor pronóstico independiente.

2.3.-CERBB2 y pacientes con colonización metastásica.

Existen datos adicionales de la importancia de la amplificación de ERB-2 en el mantenimiento del fenotipo maligno y la progresión del cáncer de mama:

- En primer lugar, se ha demostrado que la sobreexpresión celular de ERB-2 favorece la eficiencia del trasplante de tumores mamarios malignos a ratones inmunodeprimidos, lo cual indica que ERB-2 proporciona una ventaja en el crecimiento tumoral¹⁵⁴.
- En segundo lugar, en un estudio de biopsias de médula ósea en pacientes con cáncer de mama, se ha observado una elevada incidencia de expresión de ERB-2 (67%) en las células micrometastásicas en la médula ósea, lo cual sugiere que ERB-2 puede ser un factor favorecedor de la colonización metastásica¹⁵⁵.

En los estudios que disponen de seguimiento clínico, se ha correlacionado la expresión de ERB-2 con la aparición de recaídas y con la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama. Esta correlación no se ha observado siempre, y ha ocurrido sobre todo en series grandes, con seguimiento clínico prolongado, siendo más aparente en los casos que no presentan otros factores adversos

(como en tumores bien diferenciados, con receptores hormonales positivos, o con receptores de factor epidérmico de crecimiento negativo)¹³¹. Además, se han descrito importantes variaciones en la detección de ERB-2 en relación con los métodos de fijación y con el anticuerpo empleado para la detección¹⁵⁶, lo cual sin duda puede afectar la significación clínica de la determinación.

A Scorillas¹⁵⁷, ha realizado determinaciones de la amplificación de c-myc en cáncer de mama y evaluado su valor pronóstico junto con c-erbB-2, catepsina D y otras características anatomopatológicas en 152 pacientes con cáncer de mama, que recibieron tratamiento quirúrgico radical (32.9%) o conservador (67.1%). Las pacientes con ganglios positivos recibieron CMF (70 pacientes). 102 pacientes recibieron tamoxifeno mientras que 115 fueron radiadas. El 13.8% (21 mujeres) desarrolló recurrencia locorregional. La media de seguimiento por paciente fue de 5 años (4-8 años). Altas concentraciones de catepsina D, así como la amplificación y sobreexpresión de c-myc, demostraron ser las mejores de las nuevas variables examinadas para predecir la recidiva precoz (antes de los 3 años). Después del análisis multivariante sólo la catepsina D permaneció significativa, lo que sugiere que el poder pronóstico de estas variables fue similar. Utilizando el análisis univariante se demuestra que la amplificación y sobreexpresión de c-myc fue estadísticamente significativa para el período libre de enfermedad y la supervivencia global, aunque en el análisis multivariante la sobreexpresión fue significativa sólo para el período libre de enfermedad y la amplificación sólo para la supervivencia global. Con respecto a c-erbB-2, sólo la sobreexpresión es estadísticamente significativa para el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global, aunque después del análisis multivariante su poder pronóstico fue más débil.

La presencia de ganglios linfáticos axilares positivos en el momento de la cirugía tuvo valor estadísticamente significativo tanto en la evaluación de la recurrencia temprana como en el período libre de enfermedad y la supervivencia global, no teniendo valor pronóstico en el caso de la recurrencia locorregional.

En las tablas siguientes, se resumen los resultados obtenidos:

FACTOR	P univariante	P multivariante	R. Relativo	95% I. Confianza
Amplificación c-myc	0.012	NS	-	-
Sobreexpresión c-myc	0.0088	NS	-	-
Catepsina D	<0.0001	0.0001	3.12	2.32-4.19
Amplificación c-erbB-2	NS	NS	-	-
Sobreexpresión c-erbB-2	NS	NS	-	-
RE	0.018	NS	-	-
RP	NS	NS	-	-
SCORE	0.0084	0.035	-	-
Ganglios +	0.0018	0.0012	2.15	1.32-3.51
Tamaño tumor	0.0027	NS	-	-
Menopausia	NS	NS	-	-
Edad	0.046	NS	-	-

TABLA 11: análisis uni y multivariante para la RECURRENCIA TEMPRANA (<3 años) en 152 tumores primarios de mama. (NS= no significativo).

FACTOR	P univariante	P multivariante	R. Relativo	95% I. Confianza
Amplificación c-myc	0.0016	NS	-	-
Sobreexpresión c-myc	<0.0001	0.0001	2.25	1.55-3.05
Catepsina D	0.0022	NS	-	-
Amplificación c-erbB-2	NS	NS	-	-
Sobreexpresión c-erbB-2	0.031	0.0302	1.88	1.15-3.07
RE	0.019	0.0030	0.25	0.11-0.63
RP	0.028	NS	-	-
SCORE	0.0074	NS	-	-
Ganglios +	0.0055	0.0047	2.54	1.65-3.91
Tamaño tumor	0.0010	NS	-	-
Menopausia	NS	NS	-	-
Edad	NS	NS	-	-

TABLA 12: análisis uni y multivariante para el PERIODO LIBRE DE SUPERVIVENCIA en 152 tumores primarios de mama.

FACTOR	P univariante	P multivariante	R. Relativo	95% I. Confianza
Amplificación c-myc	<0.0001	0.0006	3.10	2.18-4.41
Sobreexpresión c-myc	0.0095	NS	-	-
Catepsina D	NS	NS	-	-
Amplificación c-erbB-2	NS	NS	-	-
Sobreexpresión c-erbB-2	0.0021	0.024	1.62	1.01-2.59
RE	0.0006	0.0053	0.48	0.32-0.71
RP	0.0041	0.025	0.52	0.29-0.94
SCORE	0.042	NS	-	-
Ganglios +	0.0081	0.0043	3.30	2.18-4.98
Tamaño tumor	0.0021	0.015	1.84	1.15-2.94
Menopausia	NS	NS	-	-
Edad	NS	NS	-	-

TABLA 13: análisis uni y multivariante para la SUPERVIVENCIA GLOBAL en 152 tumores primarios de mama.

FACTOR	P univariante	P multivariante	R. Relativo	95% I. Confianza
Amplificación c-myc	0.0024	NS	-	-
Sobreexpresión c-myc	0.0075	NS	-	-
Catepsina D	0.0016	0.0067	4.2	2.52-6.99
Amplificación c-erbB-2	0.0022	0.0091	2.7	1.50-4.86
Sobreexpresión c-erbB-2	NS	NS	-	-
RE	0.0063	0.019	0.32	0.20-0.52
RP	0.012	NS	-	-
SCORE	NS	NS	-	-
Ganglios +	NS	NS	-	-
Tamaño tumor	0.018	NS	-	-
Menopausia	NS	NS	-	-
Edad	NS	NS	-	-

TABLA 14: análisis uni y multivariante para la RECURRENCIA LOCORREGIONAL en 152 tumores primarios de mama.

Este mismo autor¹⁵⁸ con respecto a la recidiva precoz, ha estudiado el valor pronóstico de c-erbB-2 y catepsina D en 138 pacientes con carcinoma de mama que recibieron tratamiento quirúrgico del tumor primario entre 1988-1992:

- 34.7% cirugía radical.
- 62.3% cirugía conservadora.
- 27.5% presentó ganglios positivos y recibió quimioterapia.
- 73.91% recibió tamoxifeno.
- 81.9% fueron radiadas.

La media de seguimiento de las mujeres fue de 60 meses. Un 22.4% de los tumores presentó amplificación de c-erbB-2, mientras que la tasa de sobreexpresión fue del 29.7%. un 46.4% de los tumores tenían altas concentraciones de catepsina D. Los resultados de los diferentes parámetros evaluados (edad, amplificación y sobreexpresión de c-erbB-2, catepsina D, RE, RP, ganglios positivos, tamaño tumoral, score, menopausia), con respecto a la recidiva precoz (antes de los tres años del tratamiento del tumor primario), período libre de enfermedad y supervivencia global, se dividieron en dos grupos en función de los ganglios afectados:

- Altos niveles de catepsina D tenían valor estadísticamente significativo tanto en paciente con ganglios positivos como negativos para predecir recidiva precoz del cáncer ($p < 0.0001$ y $p = 0.002$ respectivamente) y para evaluar el período libre de enfermedad y la supervivencia global en pacientes con ganglios negativos ($p = 0.0012$ y $p = 0.0288$, respectivamente), pero pierde su valor como predictor de la recaída en pacientes con ganglios positivos en períodos mayores de 3 años.
- La sobreexpresión de c-erbB-2 fue predictiva de la supervivencia global para pacientes con ganglios positivos y negativos ($p = 0.0048$ y $p = 0.0285$), pero su valor predictivo fue débil, aunque significativo, para la recidiva

precoz ($p = 0.0456$) y el intervalo libre de enfermedad ($p = 0.0455$) en pacientes con ganglios negativos y desapareció en pacientes con ganglios positivos.

- La amplificación de c-erbB-2 ofrece mínima relevancia en el análisis de estos factores.

La importancia de la amplificación y sobreexpresión de c-erbB-2 como factor pronóstico en el cáncer de mama ha sido muy estudiada desde que, el trabajo inicial de Slamon et al demostró que la amplificación era un valor pronóstico independiente en pacientes con axila positiva. Aunque Scorilas et al^{157,158} demostraron previamente que existe una relación positiva entre la amplificación/sobreexpresión de c-erbB-2, en este estudio han encontrado 22 pacientes (16%) que sobreexpresaban c-erbB-2 sin amplificación. La mayoría de ellas presentaron recidivas precoces o no respondieron a la quimioterapia. También han encontrado diferencias en la relación entre la amplificación/sobreexpresión de c-erbB-2 y las características clínico-patológicas del tumor. Bastante interesante es que la mayoría de las muestras con amplificación de c-erbB-2 sean en tumores con grado histológico II, lo que sugiere que la amplificación es encontrada más frecuentemente en los tumores proliferativos. En contraste, la sobreexpresión no muestra diferencias entre los distintos grados histológicos. Es más: 12 pacientes (8%) con amplificación del c-erbB-2 no presentaban sobreexpresión del gen. 10 de las 12 mujeres tuvieron un largo período libre de supervivencia.

La amplificación en estos casos puede ser debida a inhibición transcripcional. Estos datos sugieren que sólo la sobreexpresión del gen, pero no la amplificación tiene valor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama.

Aunque los estudios disponibles actualmente sugieren que este marcador biológico puede ser útil en la toma de decisiones de tratamiento en mujeres con cáncer de mama, su utilidad clínica es aún controvertida, y existen aún importantes problemas técnicos no resueltos como la preparación de los tejidos, el uso de los reactivos y el más importante: cómo interpretar los resultados.

Molina¹²⁸ ha estudiado los niveles en suero de c-erbB-2, CEA y CA15.3 y su utilidad en el diagnóstico temprano de recurrencias en el cáncer de mama. Una porción de c-erbB-2, denominada p100 puede ser determinada en suero. Varios estudios informan de una baja sensibilidad de c-erbB-2 en cáncer de mama primario (10-12%) y en las metástasis (35-45%). Sin embargo, la presencia de niveles anormales de c-erbB-2 se ha asociado a tumores más agresivos y a peor pronóstico. La utilidad de c-erbB-2 en el diagnóstico temprano de las metástasis ha sido escasamente evaluado.

En este estudio se evalúa la utilidad de determinaciones de c-erbB-2, CEA y CA 15.3 en suero de 250 pacientes seguidas durante 1-4 años (media de 2.5 años) sin evidencia de enfermedad residual tras el tratamiento radical inicial (mastectomía radical o mastectomía simple + radioterapia). 95 pacientes desarrollaron metástasis durante el seguimiento.

Los niveles anormales de c-erbB-2, CEA, y CA 15.3 previos al diagnóstico clínico de metástasis fueron encontrados en un 28.4%, 31.6% y 46.3% de las 95 pacientes con recurrencia, con un intervalo de tiempo de 4.2 ± 2.4 , 5.0 ± 2.5 y 4.6 ± 2.7 meses, respectivamente. Uno de los tres marcadores fue el primer signo de recurrencia en el 69.5% de las pacientes. La especificidad fue de un 100% en pacientes sin metástasis.

La sensibilidad de los marcadores estuvo claramente relacionada con el lugar de la metástasis, siendo muy baja en caso de metástasis loco-regionales y muy alta en pacientes con metástasis en hígado o hueso.

La sensibilidad de c-erbB-2 fue mucho más alta en pacientes que ya lo sobreexpresaban en el tejido primario (10/12, 83.3%) que en las que no (1/34, 2.9%) ($p=0.0001$). Igualmente, se encontraron altos niveles de sensibilidad y de adelanto en el diagnóstico clínico de metástasis para c-erbB-2 y CA15.3 en pacientes con RE + (CA15.3) o RE – (c-erbB-2) ($p<0.015$).

De los tres marcadores, c-erbB-2 fue el que tuvo menor sensibilidad: 28,3%. Sin embargo, estos resultados no son bajos si tenemos en cuenta que el c-erbB-2 no se eleva en suero si previamente no se ha sobreexpresado en el tejido; de hecho, tuvo una sensibilidad de 83.3% en el diagnóstico precoz de recurrencias en pacientes que lo sobreexpresaban en tejido. Es interesante el hecho de que pequeñas elevaciones de sus niveles (la mayor de 25.3 U/mL) con respecto a los considerados normales (≤ 20 U/mL) fueron encontradas en pacientes con metástasis y sin sobreexpresión de c-erbB-2 en tejido. Estos resultados sugieren que la alta sensibilidad encontrada en c-erbB-2 lo hace susceptible de ser introducido en el seguimiento de pacientes con carcinoma de mama que presentaron sobreexpresión del marcador en el tejido.

La relación de c-erbB-2 y CA 15.3 con respecto a los receptores estrogénicos puede tener utilidad en la selección del tratamiento sistémico. Niveles anormalmente elevados de c-erbB-2 se encontraron en pacientes con RE- en los que el tratamiento con quimioterapia será más efectivo que la hormonoterapia.

En resumen, CEA, CA15.3 y c-erbB-2 son útiles en el diagnóstico temprano de recidiva-metástasis, siendo un método sencillo, sensible (76.3%), específico (100%), barato y con baja mortalidad en el seguimiento de las pacientes con cáncer de mama. Añadir al protocolo de seguimiento con CEA y CA15.3 c-erbB-2, principalmente a aquellas pacientes que sobreexpresen c-erbB-2 en muestras de tumor primario, incrementa la sensibilidad del diagnóstico temprano en un 10.5%.

Considerando el c-erbB-2 como parámetro pronóstico del cáncer de mama, podemos concluir que:

1. CON RESPECTO A AXILA POSITIVA:

- ◆ Para obviar la posible interrelación entre los distintos factores pronósticos, se debe realizar un estudio multivariante, valorando simultáneamente los distintos factores pronósticos que intervienen en la supervivencia del carcinoma mamario.
- ◆ La mayoría de los estudios disponibles consideran al neu un parámetro pronóstico en las enfermas con axila positiva.
- ◆ Correlacionando la sobreexpresión de c-erbB-2 con otros factores pronósticos y con la supervivencia se llega a la conclusión de que c-erbB-2 cuando se sobreexpresa, identifica a un grupo de pacientes con un pronóstico desfavorable.
- ◆ La importancia de c-erbB-2 positivo en la progresión del cáncer de mama ha sido evaluada de forma muy extensa en los últimos años debido a que las técnicas de IHQ son muy sencillas. Aunque existen todavía algunas controversias, la mayoría de estudios sugieren que HER2 es un indicador biológico de agresividad tumoral, y que puede ser potencialmente útil en la predicción de la evolución de pacientes con cáncer de mama.

2. CON RESPECTO A PACIENTES SIN AFECTACIÓN AXILAR:

- ◆ Los marcadores biológicos como p53, c-erbB-2 , RE y RP, aún presentan controversias en los estudios realizados en estas pacientes.

3. CON RESPECTO A LA COLONIZACIÓN METASTÁSICA:

- ◆ Aunque experimentalmente se ha demostrado que la sobreexpresión celular de c-erbB-2 favorece la eficiencia del trasplante de tumores mamarios malignos en ratones inmunodeprimidos, y un estudio en biopsias de médula ósea de pacientes con cáncer de mama se ha observado una elevada incidencia de expresión de c-erbB-2 (67%) en las células micrometastásicas de la médula ósea, lo cual sugiere que c-erbB-2 puede ser un factor favorecedor de la colonización metastásica, la utilidad de c-erbB-2 en el diagnóstico temprano de las metástasis ha sido escasamente evaluado.

- ◆ En cualquier caso, los trabajos a ello referidos apuntan que la sensibilidad de c-erbB-2 en el diagnóstico de metástasis fue alta en pacientes que ya lo sobreexpresaban en el tejido primario e incluso aconsejan la posibilidad de añadir al protocolo de seguimiento con CEA y CA 15.3 c-erbB-2, principalmente en aquellas pacientes que ya sobreexpresen este marcador en el tumor primario, lo que incrementaría la sensibilidad del diagnóstico temprano en un 10.5%.

3.-C-ERB-B2 COMO FACTOR PREDICTIVO.

La predicción de la eficacia de los tratamientos actuales contra el cáncer, como la quimioterapia o la hormonoterapia, es otra de las posibles aplicaciones de erbB-2. Varios estudios han investigado la relación entre la expresión de erbB-2 y la respuesta al tratamiento en cáncer de mama. Algunos de estos estudios han evaluado la eficacia del tratamiento en la enfermedad metastásica. Los estudios adyuvantes emplean, como parámetros de estudio, variables dependientes del tiempo (como la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global), mientras que los estudios en enfermedad avanzada pueden además evaluar directamente la respuesta clínica objetiva (lo cual también ocurre con los tratamientos preoperatorios, en los que se valora la respuesta en el cáncer primario de mama). En los estudios adyuvantes se puede realizar solamente una estimación indirecta de la relación entre la eficacia del tratamiento y la expresión de erbB-2, mientras que los estudios en cáncer metastásico permiten estudiar directamente esta asociación y, por tanto, son metodológicamente más apropiados.

3.1.-CERBB2 y respuesta a quimioterapia

Existen numerosos datos que relacionan la expresión de ERB-2 con la sensibilidad a agentes de quimioterapia ¹⁵⁹. Los primeros estudios publicados sobre la relación entre erbB-2 y la resistencia a la quimioterapia se realizaron en muestras de pacientes tratadas de manera adyuvante con quimioterapia tipo CMF^{160,161}. Estos estudios demostraron que el CMF es menos eficaz en las pacientes que tienen sobreexpresión de erbB-2 respecto a las que no lo sobreexpresan. Un trabajo reciente, “Effect of c-erbB-2 and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil” ¹⁶², propuso examinar la interacción entre la sobreexpresión de c-erbB-2 y la quimioterapia adyuvante en 274 pacientes con ganglios positivos y cáncer de mama operable.

Se randomizaron en un estudio prospectivo para recibir, después de la cirugía y vaciamiento axilar, seis ciclos de CMF (n=129) o ningún tratamiento (n=145), con una media de seguimiento de 13.3 años. CMF mejoró el período libre de enfermedad y la supervivencia global en todas las mujeres. El mayor beneficio se observó en aquellas mujeres con RE -. La media de supervivencia en aquellas que recibieron CMF fue de 11.6 años comparadas con sólo 2 años en el grupo control. Para las mujeres con RE+ la media de supervivencia fue de 11.3 años en el grupo que recibió CMF comparado con el grupo control cuya tasa de supervivencia fue de 7.7 años.

Cuando los beneficios de CMF fueron examinados con respecto al c-erbB-2, las mujeres que no expresaban el marcador y recibieron CMF presentaron una supervivencia global de 12.7 años comparada con sólo 7.3 años para el grupo control. La mejora en la supervivencia fue menos marcada en el grupo con c-erbB-2 +, con una media de 6.1 años en el grupo que recibió tratamiento en comparación con 4.4 años en el grupo control. En este grupo de mujeres (tumores operables y ganglios +), el uso de CMF se asoció con una mejora tanto en el intervalo libre de enfermedad como en la supervivencia global en todas ellas. Las pacientes cuyos tumores expresaban c-erbB-2 y que no recibieron quimioterapia tuvieron los peores resultados. Aunque la quimioterapia parece mejorar la media de supervivencia en este grupo, la diferencia no alcanza los niveles de significación estadística. El escaso número de mujeres con c-erbB-2 + en este subgrupo (n=35) limita el poder de este estudio para predecir que las diferencias observadas en la supervivencia no son debidas al azar. La incapacidad de c-erbB-2 para predecir el beneficio de la quimioterapia adyuvante ya ha sido referida en las recomendaciones de la Sociedad Americana de Oncología Clínica en 1997. Cuando el efecto de CMF fue examinado en relación con el status de RE, el mayor beneficio se observó en aquellas pacientes con RE-, aunque también se obtuvo un incremento significativo en la supervivencia global de las pacientes con RE+ que recibieron tratamiento.

Stal O ¹⁶¹ también ha demostrado que los pacientes que presentan períodos de supervivencia mayores tras CMF son aquellos con tumores c-erbB-2 negativos. En un amplio ensayo clínico (NSABP) se constató que aquellas pacientes que sobreexpresaban c-erbB-2 tenían peores resultados si se trataban con CMF en comparación con la pauta ciclofosfamida-adriamicina. Por tanto, parece que el tratamiento con CMF no debe dejar de emplearse en el contexto del tratamiento adyuvante del cáncer de mama.

Tres estudios independientes demostraron que el tratamiento adyuvante del cáncer de mama operado con la combinación CMF era eficaz solamente en aquellas pacientes que no presentaban sobreexpresión de ERB-2 en el tumor primitivo, mientras que era ineficaz en el 20% de las pacientes que eran ERB-2 positivo ¹³².

Un estudio adyuvante del grupo cooperativo americano CALGB sugirió la posible relación entre la expresión de erbB-2 y la sensibilidad a la adriamicina ¹²⁹

(c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. Muss HB). Esta investigación se realizó en 397 pacientes de las 1.572 que participaron en un estudio que comparaba tres dosis de CAF (estándar, dosis bajas y dosis muy bajas). Los resultados de esta evaluación de los casos sugirieron que en las pacientes erbB-2 positivo, el tratamiento con dosis muy bajas de CAF era inferior al tratamiento con dosis estándar. Esta diferencia no se observó en los casos erbB-2 negativo.

El mismo grupo de investigación, sin embargo, no ha validado estos resultados en una muestra independiente de 595 pacientes extraídas del mismo estudio clínico, aunque aparentemente esto se debió a un desajuste de factores pronósticos¹⁶³. La interpretación de los resultados se complica aún más debido a que 1.012 pacientes recibieron tamoxifeno de una manera no reglada. Otro estudio de quimioterapia adyuvante con adriamicina ha sugerido también que puede existir una relación entre la sensibilidad a la adriamicina y la expresión de erbB-2. Sin embargo, no puede afirmarse con estos datos sobre CMF y CAF, que la expresión de erbB-2 pueda ni deba ser un factor de selección de los fármacos de quimioterapia en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama.

Por el contrario, otro estudio demostró que la sobreexpresión de ERB-2 podía ser un indicador útil para identificar a las pacientes que podían beneficiarse de dosis más elevadas de adriamicina, en la combinación de quimioterapia adyuvante CAF¹²⁹.

Las investigaciones realizadas en cáncer de mama primario o metastásico sugieren que erbB-2 puede tener valor predictivo de resistencia a quimioterapia (tabla 15)¹³². En general, las investigaciones muestran que la expresión de erbB-2 se asocia con la resistencia al tratamiento de quimioterapia. Solamente un estudio retrospectivo que se realizó en pacientes tratadas con taxanos sugiere lo contrario.

La asociación de erbB-2 con la resistencia a la quimioterapia es especialmente notable en tres estudios que se han realizado en pacientes con cáncer avanzado de mama, en las que se ha evaluado la expresión de erbB-2 circulante sérico, y que han mostrado que la eficacia de la quimioterapia puede verse reducida a menos de la mitad en los casos erbB-2 positivos¹³².

La relación de ERB-2 con la resistencia o sensibilidad a la quimioterapia podría estar en relación con la llamada resistencia múltiple a fármacos "atípica", la cual es independiente de la glucoproteína-p y parece estar en relación con la topoisomerasa II^{164,165}.

- Por un lado, se han descrito amplificaciones conjuntas de ERB-2 y el gen de la topoisomerasa II y que la heregulina induce la expresión de la topoisomerasa II.

- Por otro lado, cuanto más topoisomerasa II hay en una célula, ésta es más sensible al tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II, como la adriamicina y el etopósido, pero no con otros fármacos como el cisplatino o la ciclofosfamida.

La especificidad de la relación entre erbB-2 y la quimiorresistencia, puede no ser una relación causa-efecto. Se ha descrito que la resistencia a la quimioterapia asociada a la sobreexpresión de erbB-2 es independiente del gen de multirresistencia farmacológica *mdr-1*¹⁶⁶. Además, estudios en animales empleando células transfectadas con erbB-2 han sugerido que la falta de respuesta a la quimioterapia de los tumores erbB-2 positivo está relacionada con la rápida proliferación de las células tumorales que sobreviven a la quimioterapia, y no con una resistencia intrínseca a la quimioterapia.

Una investigación reciente, en la que se midieron los índices apoptóticos en carcinomas de mama primarios antes y 24 horas después de recibir un régimen de quimioterapia con adriamicina, ha demostrado que los tumores erbB-2 positivos tienen una respuesta apoptótica reducida a la quimioterapia. Por tanto, la expresión de erbB-2 puede no indicar una resistencia pleiotrópica a la quimioterapia, sino más bien representar una ventaja para el crecimiento celular, al permitir el recrecimiento de las células tumorales tras el tratamiento¹⁶⁷.

En un estudio publicado por Willsher et al¹⁶⁸, pacientes con carcinoma avanzado de mama recibieron quimioterapia preoperatoria, mastectomía radical modificada posteriormente junto con radioterapia locorregional y hormonoterapia. Se randomizaron 55 pacientes que recibieron "MMM" durante tres meses: mitoxantrona 7 mg/m² y metotrexate 30 mg/m² tres veces a la semana durante 4 ciclos y mitomycina-C 7 mg/m² seis veces a la semana dos ciclos. Los tumores primarios fueron biopsiados pre-quimioterapia, y después de 6 semanas se realizó la mastectomía. No se observaron cambios en la expresión de c-erbB-2 pre y post quimioterapia. Estos resultados están en consonancia con los de otros estudios¹⁴². Mientras que c-erbB-2 puede ser predictivo de quimiorresistencia, la falta de inducción del mismo por el tratamiento sugiere que es improbable que el receptor esté involucrado en los mecanismos de quimiorresistencia.

La eficacia terapéutica del taxol se ve aumentada o disminuida por la sobreexpresión del erb-B-2 según se desprende estudios in vitro y de análisis clínicos retrospectivos.

Autor	N	Muestra	Fármaco	Respuesta clínica		Significación de positividad
				ErbB-2 negativo	ErbB-2 positivo	
Cáncer primario de mama						
Rozan	167	Tumor	FAC	20%	31%	No
Makris	90	Tumor	Mitoxantrona, metotrexate	93%	57%	Peor respuesta
Vargas-Roig	60	Tumor	FAC,FEC	62%	11%	Peor respuesta
Cáncer metastásico de mama						
Seidman	126	Tumor	Taxanos	39%	59%	Mejor respuesta
Wright	66	Tumor	Mitoxantrona	58%	50%	No
Fehm	80	Suero	CNF	59%	29%	Peor respuesta
Colomer	55	Suero	Taxol, adriamicina	78%	64%	Peor respuesta
Colomer	41	Suero	Taxol, gemcitabina	85%	40%	Peor respuesta

Tabla 15.-Eficacia de la quimioterapia en carcinoma primario y metastático de mama¹³²

La gran heterogeneidad de resultados de los estudios previos comparando la expresión de c-erbB-2 y la respuesta a tratamiento con taxanos puede ser debida a varios factores, que incluyen las diferencias en la selección de pacientes, el pequeño tamaño muestral y las diferentes técnicas utilizadas para cuantificar el c-erbB-2. Para enfatizar la importancia de la metodología en dichos estudios, Seidman et al observaron una alta correlación entre la expresión de c-erbB-2 y la mejor respuesta a tratamiento con taxanos utilizando el anticuerpo monoclonal específico anti-cerbB-2 ECD (anticuerpo monoclonal homólogo del Herceptin) pero no con un anticuerpo monoclonal derivado del conejo (Zymed 28-0004). Por tanto, dado que se observan diferencias en la respuesta a taxanos en función del anticuerpo utilizado, el sistema de detección y la técnica de fijación, se requieren futuros estudios randomizados que estudien la eficacia terapéutica de los taxanos.

Baselga et al (1997)¹⁶⁹ demostraron que los pacientes c-erbB-2 + respondían mejor a los taxanos que los c-erbB-2 -, con un odds ratio de 3. Estos datos contrastan con Yu et al (1996), que encontraron que la sobreexpresión de c-

erbB-2 en el cáncer de mama confiere un incremento en la resistencia al paclitaxol.

Lüftner et al,¹⁷⁰ en base al hecho de que los taxanos deben ser considerados el grupo de fármacos más importantes como segunda línea de tratamiento en el cáncer metastásico de mama, y a los resultados controvertidos en estudios anteriores con respecto a los tumores con c-erbB-2 positivo, midieron los valores plasmáticos de c-erbB-2 en pacientes con cáncer metastásico después del tratamiento con intensificación de dosis con el paclitaxol como agente único. Únicamente se evaluaron los niveles de c-erbB en 35 de las 50 pacientes que se sometieron al tratamiento. Diez de ellas (28.5%) tuvieron c-erbB-2 positivo en suero (>15 U/mL). Mientras que la tasa de respuesta en el total de la muestra fue de un 36%, en el subgrupo de pacientes c-erbB-2 positivo fue de un 62%. En todas las pacientes respondedoras los niveles sanguíneos de c-erbB-2 disminuyeron por debajo de los límites de detección antes del diagnóstico clínico de respuesta o del final del siguiente ciclo de quimioterapia. Sin embargo, la normalización de los niveles de c-erbB-2 no fue específica de las mujeres que respondieron a quimioterapia. Pacientes con niveles elevados de c-erbB-2 que fueron resistentes al fármaco y en quienes progresó la enfermedad, presentaron niveles normales del marcador o decrementos mayores del 50%, sugiriendo que la fracción c-erbB-2 positiva del tumor desapareció mientras que la parte c-erbB-2 negativa del tumor progresó. Este hecho también se observó en pacientes que necesitaron volver a tratarse tras un largo tiempo de respuesta, debido a progresión de la enfermedad. Debe asumirse que en este caso que inicialmente respondieron las fracciones negativas y positivas para c-erbB-2 del tumor, pero que evolucionó la fracción negativa.

Existen trabajos muy recientes sobre los beneficios del Herceptin, un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de c-erbB-2, combinado con la quimioterapia en pacientes con cáncer metastásico de mama¹⁰⁵. Se observan beneficios en la tasa de respuesta y en la progresión en estas pacientes cuando se combina el taxol con el Herceptin en comparación con el uso de taxol exclusivamente.

3.2.-CERBB2 y tratamiento hormonal.

Existen suficientes evidencias para indicar que la sobreexpresión de ERB-2 puede indicar también resistencia a fármacos de hormonoterapia.

Numerosos estudios retrospectivos han demostrado claramente una fuerte asociación entre amplificación y sobreexpresión de c-erbB-2 y negatividad del receptor hormonal. Un estudio de Tagliabue¹⁴² de 712 casos de carcinoma de mama revela una alta significación estadística ($p < 10^{-6}$) entre la frecuencia de RE+ en el grupo de c-erbB-2 positivo versus el grupo negativo:

c-erbB-2	Nº de casos	RE+ (%)	P
Positivo	158	51 (32%)	P<10 ⁻⁶
Negativo	554	387 (70%)	

Tabla 16 :asociación entre c-erbB-2 y receptor hormonal¹⁴²

La razón de esta asociación es aún desconocida. Se ha descrito que, en cáncer de mama, existe una regulación cruzada entre los sistemas de crecimiento relacionados con el receptor de estrógeno y erbB-2¹⁴⁰. Se ha observado que el gen c-erbB-2 es sensible a la hormona. De hecho, las células MCF7 cultivadas en presencia de estrógeno no expresan niveles detectables de p185 pero sí tras la retirada de la hormona del medio de cultivo, indicando una regulación negativa de la transcripción genética por parte de las hormonas. Así en tumores RE+ la expresión del gen c-erbB-2 puede ser parcial o completamente suprimida por los estrógenos. La Heregulina, el factor de crecimiento relacionado con erbB-2, induce una disminución de los niveles de receptor estrogénico, y modula su actividad en células de cáncer de mama¹⁴⁰. La transfección del oncogén erbB-2 en células de cáncer de mama dependientes de estradiol hace que adquieran la independencia hormonal in vitro e in vivo. Por otra parte, el estradiol reduce la expresión de erbB-2 in vitro, mientras que el tamoxifeno la induce¹⁴⁰.

Liu et al⁶⁰ demostraron que la transfección de c-erbB-2 a líneas celulares de carcinoma de mama dependientes de estrógeno reducía la dependencia hormonal de las mismas. Ha sido observado que la transferencia de c-erbB-2 a células en cultivo en presencia de hormonas tenía una fuerte inhibición del crecimiento de las mismas, que se bloqueaba en la fase G1 del ciclo celular y las células sobreexpresaban p21, una molécula asociada con inducción de la diferenciación y bloqueo de la proliferación. Si estas observaciones las aplicamos a tumores in vivo, entonces p185 puede acutar induciendo proliferación únicamente en casos con RE- o en pacientes postmenopáusicas porque disminuye la producción hormonal. En pacientes premenopáusicas tumores que sobreexpresan la oncoproteína y son RE + son tan agresivos como los tumores RE-, lo que probablemente refleja el hecho de que c-erbB-2 puede obviar la proliferación mediada por RE y llevar a un fenotipo más agresivo.

Varios grupos de trabajo han intentado demostrar que los tumores que sobreexpresan c-erbB-2 no responden a terapia hormonal. Dos extensos estudios randomizados (SWOG y CALGB) han fallado al intentar demostrar la asociación entre c-erbB-2/RE+ y hormonorresistencia. Dichos estudios han ofrecido dificultad en la interpretación de datos debido a que no tenían un grupo control de pacientes no tratadas. Un estudio reciente de Carlomagno et al¹⁷¹, que incluye un grupo control, ha demostrado que los casos c-erbB-2 + no sólo no responden a

hormonoterapia, sino que además el tratamiento fue perjudicial en las pacientes tratadas ya que presentaron una supervivencia significativamente menor que las pacientes no tratadas c-erbB-2 +. En estas series, la sobreexpresión de c-erbB-2 fue mejor predictora de la respuesta a la terapia endocrina que el propio receptor hormonal.

El mecanismo por el que el tamoxifeno produce este efecto en los tumores c-erbB-2 + es desconocido. Una posibilidad es que estimularía el sistema de erbB-2. De hecho, los estrógenos pueden unirse al dominio extracelular de c-erbB-2 y el tamoxifeno puede inhibir esta unión, lo que sugiere que el tamoxifeno puede también unirse al c-erbB-2.

Otra posibilidad es que los tratamientos contra erbB-2 (como el anticuerpo monoclonal Herceptín) estimulen el sistema de crecimiento relacionado con el receptor de estrógeno, aunque estos experimentos no se han realizado. Algunos estudios han mostrado que la eficacia del tamoxifeno adyuvante en el cáncer de mama operado se ve comprometida en las pacientes con expresión erbB-2. Otros estudios no han observado esta asociación, aunque en un contexto metodológico muy cuestionable.

Dos estudios clínicos parecen demostrar la relación entre ERB-2 y resistencia a la hormonoterapia:

- ◆ El primero de ellos observó que, en 30 pacientes con receptores estrogénicos positivos, la respuesta a tamoxifeno disminuía del 48% cuando ERB-2 era negativo, al 20% cuando ERB-2 era positivo¹²⁰.
- ◆ El segundo estudio, ha demostrado de manera más convincente la implicación de ERB-2 en la resistencia a antiestrógenos en humanos. En el curso de un ensayo clínico randomizado entre los fármacos tamoxifeno y droloxifeno en 300 pacientes con cáncer de mama avanzado, se recogieron muestras de suero, y se determinaron los niveles circulantes de la oncoproteína ERB-2. Se halló una diferencia significativa en los niveles de respuesta a cualquiera de los dos antiestrógenos y los niveles circulantes de ERB-2, de manera que las pacientes con niveles bajos de ERB-2 tuvieron un 41% de respuestas, mientras que solamente un 21% de las pacientes con niveles elevados de ERB-2 presentaron respuesta ($p=0,004$)¹⁷².

En las pacientes tratadas con tamoxifeno para enfermedad avanzada se ha encontrado en algunos estudios que la relación predictiva de la sobreexpresión del erbB-2 no está presente: a mayor sobreexpresión no hay peor respuesta a tamoxifeno^{169,171}. En cambio, Wright y col¹⁷², en una serie pequeña si encontraron correlación negativa¹⁶⁶.

Se han publicado siete estudios en cáncer avanzado de mama que correlacionan la eficacia del tratamiento hormonal con la expresión de erbB-2. Cinco de estos estudios han evaluado erbB-2 mediante inmunohistoquímica en

muestras tumorales, y 2 estudios han estudiado los niveles de erbB-2 en el suero mediante ELISA (tabla 17).

Aunque algunas de estas investigaciones se han realizado en el marco de estudios prospectivos de tratamiento, ninguno de los estudios ha realizado las determinaciones de erbB-2 de manera prospectiva, y por lo tanto la interpretación está sujeta al influjo de posibles sesgos. Sin embargo, es destacable que todos los estudios clínicos, salvo uno, han mostrado que existe una asociación entre la expresión de erbB-2 y la eficacia de los tratamientos hormonales. La diferencia entre la respuesta clínica al tamoxifeno u otros tratamientos endocrinos es, en general, dramática, y en varios de los estudio clínicos la eficacia de la hormonoterapia en las pacientes con sobreexpresión de erbB-2 es de la mitad o menos de la mitad que en las pacientes sin sobreexpresión de erbB-2.

Autor	N	Muestra	Fármaco	Respuesta clínica		Significación de positividad
				ErbB-2 negativo	ErbB-2 positivo	
Wright	72	Tumor	Tamoxifeno	37%	7%	Peor respuesta
Newby	34	Tumor	Tamoxifeno	40%	0%	Peor respuesta
Houston	241	Tumor	Tamoxifeno y otros	56%	38%	Peor respuesta
Klijn	292	Tumor	Tamoxifeno	43%	12%	Peor respuesta
Elledge	205	Tumor	Tamoxifeno	57%	54%	No
Leitzel	300	Suero	Megestrol/fadrozol	41%	21%	Peor respuesta
Yamauchi	122	Suero	Droloxifeno	56%	10%	Peor respuesta

Tabla 17.- Eficacia del tratamiento hormonal en cáncer avanzado de mama en relación con la expresión de erbB-2.

Los datos disponibles sugieren que c-erbB-2 probablemente puede ser un parámetro de selección de aquellas pacientes que se beneficiarían de hormonoterapia. Los ensayos clínicos en los que esta modalidad terapéutica es utilizada en función de la sobreexpresión de c-erbB-2 están en marcha y podrán ayudar a definir la utilidad de éste parámetro en la planificación del tratamiento.

En pacientes tratadas con acetato de megestrol o con fadrozol, como segunda línea de hormonoterapia, que tenían niveles elevados de la proteína erbB-2 al diagnóstico de la enfermedad (determinada en tejido y en suero), se ha observado un peor pronóstico, estimado como menor tiempo a la progresión (11.6 meses vs. 15.5 meses) y peor supervivencia global ¹⁶⁹.

Considerando c-erbB-2 factor predictivo de la terapia contra el cáncer de mama, podemos concluir que:

1. C-ERBB-2 Y QUIMIOTERAPIA.

- ◆ Los estudios en cáncer metastásico son metodológicamente más apropiados que los estudios adyuvantes en los que se puede realizar solamente una estimación indirecta de la relación entre la eficacia del tratamiento y la expresión de c-erbB-2, mientras que en los primeros se puede estudiar directamente la asociación entre la expresión del neu y la sensibilidad al tratamiento.
- ◆ En general, las investigaciones muestran que la expresión de c-erbB-2 se asocia con la resistencia al tratamiento de quimioterapia. Sin embargo, no puede afirmarse con los datos disponibles sobre CMF y CAF que la expresión de c-erbB-2 pueda ni deba ser un factor de selección de los fármacos de quimioterapia en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama, aunque por lo publicado hasta ahora las pacientes con c-erbB-2 positivo parecen responder mejor a taxanos y altas dosis de antraciclinas que al tratamiento convencional con CMF.

2. C-ERBB-2 Y TRATAMIENTO HORMONAL.

- ◆ Existen suficientes evidencias para indicar que la sobreexpresión de ERB-2 puede indicar también resistencia a la hormonoterapia.
- ◆ Los datos disponibles sugieren que c-erbB-2 probablemente puede ser un parámetro de selección de aquellas pacientes que se beneficiarían de hormonoterapia. Los ensayos clínicos en los que esta modalidad terapéutica es utilizada en función de la sobreexpresión de c-erbB-2 están en marcha y podrán ayudar a definir la utilidad de éste parámetro en la planificación del tratamiento.

Después de analizar de forma detallada algunos de los numerosos estudios realizados sobre el marcador biológico c-erbB-2, podemos realizar las siguientes consideraciones^{173,174}.

- I. Los factores pronósticos que están bien establecidos en el cáncer de mama, son afectación ganglionar, tamaño del tumor, grado histológico y nuclear y tipo histológico. Los únicos marcadores biológicos validados desde el punto de vista estadístico que predicen la respuesta al tratamiento hormonal son los receptores de estrógenos y progesterona.
- II. El uso de un marcador biológico debe tener implicaciones clínicas basadas en la evidencia, es decir su uso debe estar basado en estudios que evalúen su utilidad clínica por su poder de predecir el pronóstico de la paciente o su respuesta a determinados tratamientos. Estos estudios deben llevarse a cabo en poblaciones de pacientes bien definidas (idealmente pacientes sin tratamiento cuando evaluamos la utilidad pronóstica o estudios randomizados entre dos diferentes tratamientos cuando evaluamos la utilidad predictiva del marcador). Está ampliamente reconocido que muchos estudios sobre marcadores biológicos no cumplen estos criterios.
- III. Los estudios deben realizarse en pacientes que no han recibido quimioterapia adyuvante debido a que algunos marcadores como HER2 están implicados en la respuesta al tratamiento.
- IV. Los estudios que incluyen dos brazos de pacientes, tratadas y no tratadas, pueden llevar a confusión ya que, al influir HER2 tanto en el pronóstico como en la predicción de respuesta a tratamiento, es difícil evaluar los efectos pronósticos únicamente. Finalmente, el marcador debe conferir suficiente efecto en términos de riesgo relativo para tener trascendencia en el manejo clínico. Por ejemplo, en una paciente con un riesgo relativo de recurrencia de un 10% (estimado en base al tamaño tumoral y al número de ganglios positivos), el conocimiento de un marcador adicional con un riesgo relativo de 2 y que se encuentre en un 50% de pacientes permitiría discriminar un subconjunto de pacientes con un 6.7% y 13.3% de riesgo de recurrencia. Esta diferencia en el pronóstico puede influir en las decisiones clínicas, mientras que un riesgo relativo de 1.3 (que dividiría a los pacientes en dos grupos de 8.7% y 11.3% de riesgo), puede que no. Aproximadamente un 25% de pacientes con cáncer metastásico de mama tienen amplificación/sobreexpresión de HER 2.

Así, para una población con un riesgo de resultado negativo de un 10%, si la amplificación/sobreexpresión de HER2 confiriera un alto riesgo relativo de 2 para un resultado negativo, el análisis de HER2 permitiría la identificación de subconjuntos de pacientes con 8% y 16% de riesgo. Marcadores como c-erbB-2, que se encuentran sobreexpresados en sólo algunas pacientes, pueden tener más utilidad en seleccionar pacientes con mal pronóstico que pacientes con un pronóstico mejor que la media.

- V. Significado pronóstico de HER : El primer estudio publicado por Slamon et al en 1987 reveló que HER 2 era un factor independiente para predecir la supervivencia global y el período libre de supervivencia en análisis multivariante en pacientes con ganglios positivos. Desde entonces muchos estudios han demostrado esta primera conclusión de Slamon. Recientemente se ha informado de que la baja expresión de mRNA puede predecir mal pronóstico en el cáncer de mama¹⁷³. La proteína de HER2 puede ser detectada mediante radioinmunoquímica. Utilizando esta técnica, el 85% de los cánceres de mama muestran niveles de la proteína antes que las células normales de la mama, con una distribución bimodal. Un 25% de los cánceres expresan verdaderos niveles elevados de la proteína y todos ellos tienen también amplificación. La proteína es indetectable en un 15% de los tumores y el 60% restante presenta sobreexpresión de la proteína pero con niveles significativamente menores que los tumores que tienen amplificación. Las pacientes con amplificación en ausencia de sobreexpresión de la proteína tienen peor pronóstico que el resto.

La detección de pequeños tumores con ganglios negativos es cada vez más frecuente debido a la aparición de programas de screening. Aunque estas pacientes tienen buen pronóstico, aproximadamente un tercio desarrolla metástasis a distancia. En esta dirección van encaminados todos los esfuerzos actuales: se intenta encontrar los marcadores que detecten qué pacientes con ganglios negativos tienen más riesgo de desarrollar recidiva y/o metástasis y por tanto pueden beneficiarse de quimioterapia postoperatoria. Los estudios realizados con HER2 en estas pacientes han mostrado resultados muy contradictorios, probablemente debido al bajo número de pacientes evaluadas y a la gran diversidad tanto de métodos de estudio de HER2 como de definiciones de positividad o negatividad del mismo.

Actualmente, la medida de este marcador exclusivamente para dilucidar el pronóstico en pacientes con axila negativa no está justificado de rutina, y se requieren evaluaciones más rigurosas y homogéneas entre los diferentes grupos de investigación.

Es muy probable que HER2 pueda ser utilizado para determinar el potencial invasivo del carcinoma ductal in situ (CDIS), ya que se ha observado que su sobreexpresión es más frecuente en tumores de alto grado y tipo comedo. La mortalidad del CDIS es muy baja si se trata con mastectomía y parece ser que el HER2 puede convertirse en un arma importante que nos permita detectar qué pacientes se beneficiarían de un tratamiento más agresivo y por tanto disminuir el riesgo de recidiva local y progresión a cáncer invasivo.

VI. Predicción de respuesta al tratamiento:

A.-Tratamiento hormonal: los estudios realizados in vitro sugieren que existe una asociación entre HER2 positivo y resistencia a tratamiento hormonal.

Aunque en la mayoría de estudios realizados existe alguna evidencia de que el status de HER2 es un posible indicador de hormono-resistencia, los datos son contradictorios. La respuesta sólo puede obtenerse mediante un estudio

prospectivo a gran escala y prolongado en el tiempo comparando a pacientes que reciban o no tamoxifeno en función del HER2. Sin embargo, si existe una correlación inversa entre los receptores estrogénicos y HER2, debemos estudiar la respuesta al tratamiento teniendo en cuenta ambos marcadores biológicos. Se estima que aproximadamente un 15% de las pacientes con receptores de estrógenos positivos poseen también HER2 positivo. En una población total de 1000 pacientes con RE+, si dividimos en dos brazos en función de que reciban o no tratamiento las pacientes con ambos marcadores positivos (para evitar el sesgo que supondría RE+), tendríamos aproximadamente 75 pacientes por grupo, siendo un tamaño muestral muy pequeño para estimar el factor predictivo.

B.- Tratamiento quimioterápico:

-CMF: todos los datos disponibles indican que HER2 puede ser utilizado para seleccionar aquellos pacientes que no se van a beneficiar del tratamiento con estos fármacos, aunque hay que tener presente que todos los estudios se basan en análisis retrospectivos no validados con análisis prospectivos que contengan un suficiente número de pacientes que hagan los resultados estadísticamente significativos.

-ANTRACICLINAS: existen amplios y rigurosos estudios que indican que existe una relación entre la respuesta a regímenes terapéuticos basados en antraciclinas y HER2, como CALGB, NSABP o SWOG. Parece que aquellos tumores que sobreexpresan HER2 son más sensibles a dosis altas de antraciclinas que los que son negativos para este marcador. Otros estudios no han mostrado esta asociación, pero hay que apuntar que son estudios más pequeños, menos rigurosos y con menos poder estadístico.

-HERCEPTIN: desde que ha sido aprobado por la FDA el anticuerpo monoclonal anti c-erbB-2 para pacientes con HER2 positivo y cáncer de mama metastásico, se abre un nuevo debate sobre la conveniencia de realizar la medición de este marcador de rutina en el diagnóstico inicial del cáncer, ya que se ha demostrado que la quimioterapia no altera su expresión y así dispondríamos de sus niveles cuando progresara la enfermedad. Se está dando especial atención al hecho de que la combinación de este tratamiento y el taxol en el cáncer metastásico parece tener mejores resultados que el taxol en terapia única.

VII. ¿ Cuándo se debe determinar C-ErbB2?

Si el objetivo de determinar HER2 es que pueda ser utilizado como guía pronóstica y terapéutica, ésta debe realizarse lo más precozmente una vez realizado el diagnóstico de cáncer, aunque la ausencia de su determinación en el diagnóstico no debe ser óbice para su determinación en tejidos archivados una vez que progrese el cáncer, ya que ha demostrado ser muy útil para la toma de decisiones en el cáncer metastásico.

VIII. ¿Cómo debemos medir C-erbB2?

A. Para el estudio de la amplificación del gen **FISH** es el método más conveniente. Es una técnica muy sensible y específica, estandarizada, y es capaz de detectar c-erbB-2 en muestras de tejidos muy pequeñas, aunque aún no se ha establecido el punto de corte de positividad o negatividad de forma generalizada. Además es una técnica que no está al alcance de todos los laboratorios. Esta técnica ha sido aprobada en Estados Unidos para evaluar el riesgo de recurrencia en pacientes con ganglios negativos.

B. Las técnicas de **PCR** están aún en desarrollo.

C. La **IHQ** es la más ampliamente utilizada actualmente para evaluar el C-erbB2. Es específica, rápida, requiere menos pasos que FISH y puede estar presente en un mayor número de laboratorios más modestos. El mayor inconveniente de esta técnica es el confuso estado de la literatura debido a que cada grupo ha utilizado diferentes anticuerpos y diferentes sistemas de medida para interpretar los resultados. Un nuevo kit, el HERCEP TEST ha sido aprobado por la FDA para la evaluación del pronóstico y la elección entre las diferentes opciones terapéuticas en las pacientes con HER 2 positivo.

La adopción de un método estándar por todos los laboratorios permitirá poder comparar los resultados entre diferentes centros y así conseguir muestras de pacientes lo suficientemente numerosas para poder establecer datos definitivos estadísticamente significativos.

Por tanto, podemos concluir que c-erbB-2 parece ser un buen indicador de mal pronóstico, de tumores más agresivos, con menor supervivencia e intervalo libre de enfermedad, así como tener capacidad de resistencia a ciertas terapias convencionales y mayor sensibilidad a otros como las antraciclinas. Así puede ser de gran utilidad en la valoración integral del cáncer de mama evaluado junto con otros marcadores biológicos, como RE y RP. El desarrollo de una técnica de laboratorio simple y estandarizada se hace imprescindible para introducir este parámetro en el estudio rutinario de todas las mujeres con cáncer de mama, así como para poder evaluar de forma rigurosa las implicaciones pronósticas y predictivas del mismo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I.-HIPÓTESIS

- **E**xisten evidencias de que es la asociación de factores pronósticos y predictivos, configurando el denominado fenotipo tumoral, y no de factores independientes la que confiere el perfil pronóstico en el carcinoma ductal infiltrante de mama.
- **E**n pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama la amplificación de HER-2/neu produce una sobreexpresión de la oncoproteína que podría asociarse a un peor pronóstico de la enfermedad, así como la resistencia a tratamientos hormonales y quimioterápicos.
- **E**n pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama el estado de los receptores hormonales, la pérdida de diferenciación, así como la inactivación de genes supresores de tumores, medidos por técnicas inmunohistoquímicas, afectan al pronóstico de la enfermedad.

II.-OBJETIVOS

- **D**escribir las características epidemiológicas, clínicas e histológicas de las pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama en nuestra población
- **C**orrelacionar los factores pronósticos (categorías I y II) con la sobreexpresión de C-erb-B2.
- **C**orrelacionar los factores pronósticos (categorías I y II) con el estatus de los receptores hormonales, P53 y Ki67.
- **E**valuar la supervivencia global, el intervalo libre de enfermedad y el intervalo de recidiva loco-regional en pacientes con cáncer de mama tratadas en relación a la expresión de receptores de hormonas esteroideas, p53, Ki 67 y cerbB2 estudiados por técnicas inmunohistoquímicas.
- **E**stablecer mediante análisis multivariante perfiles de pacientes en función de factores de orden predictivo y pronóstico, analizando la supervivencia global y el tiempo libre de enfermedad en cada uno de los perfiles.

MATERIAL Y METODOS

III.-MATERIAL Y METODOS

1.- AMBITO DE ESTUDIO

Estudio epidemiológico observacional descriptivo de una muestra de 121 mujeres del Área Sur de Sevilla (Area Hospitalaria de Valme) con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante de mama durante el período de inclusión establecido atendidas en la Unidad de Patología Mamaria de nuestro hospital.

2.- PERIODO DE ESTUDIO

El período de inclusión de pacientes fue desde Enero de 1999 a Octubre de 2002

El tiempo de seguimiento ha sido hasta agosto de 2004 , con un Tiempo máximo de seguimiento de 65 meses (5,4 años) y un Tiempo medio de seguimiento de 50 meses (4,16 años).

3.- POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.1.-CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mujeres de cualquier edad, con tumor primario de mama susceptible de tratamiento quirúrgico y sin evidencia de enfermedad diseminada
- Pruebas complementarias realizadas en nuestro Hospital, en la Unidad de Patología mamaria.
- Diagnóstico de cáncer de mama confirmado postquirúrgico.
- Tejido tumoral válido para el análisis anatomopatológico concluyente y aplicación válida de los tests para el análisis de c-erb-B2.
- Seguimiento postquirúrgico en consultas externas de nuestro hospital (Unidad de Patología Mamaria)

3.2.-CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres en las que esté contraindicada la cirugía como tratamiento inicial, bien por criterios puramente médicos, o bien por tratarse de un cáncer de mama localmente avanzado.
- Pacientes sometidas a tratamiento quimioterápico previo a cirugía
- Pacientes en las que el análisis de algunos de los parámetros considerados fundamentales para este estudio (p53, ki-67, c-erb-B2, número de ganglios, Score de Bloom-Richardson) hayan sido no concluyentes.

3.3.-MANEJO CLÍNICO DE LAS PACIENTES

Se ha elaborado una base de datos elaborada mediante programa informático con Microsoft Access 2000, con las siguientes categorías:

- **Datos generales:**
 - Fecha de nacimiento
 - Menopausia
 - Años de seguimiento ginecológico
 - Paridad
 - Edad del primer hijo
 - Lactancia
 - Antecedentes personales de cáncer. Tipo
 - Antecedentes familiares de cáncer. Tipo. Línea familiar
- **Anatomía Patológica:**
 - PAAF
 - Tipo histológico
 - Componente de comedocarcinoma
 - Score de Bloom-Richardson
 - Receptores estrogénicos
 - Receptores progestagénicos
 - Ki-67
 - P-53
 - C-erb-B2
 - Gglios infiltrados
- **TNM**
 - T:tamaño tumoral

- N:ganglios linfáticos afectados clínicamente
- M:metástasis a distancia

- **Senografía**
 - Imagen senográfica
 - Existencia de adenopatías visibles en senografía
 - Ecografía mamaria complementaria
 - Años de seguimiento senográfico pre-diagnóstico

- **Cirugía**
 - Cirugía radical (Madden)
 - Cirugía conservadora
 - Linfadenectomía
 - Ganglios aislados en cirugía

- **Tratamiento**
 - Quimioterapia adyuvante :CMF,CAF,antraciclina y taxol,epirrubina y genoxal
 - Hormonoterapia: tamoxifeno, análogos de GnRh, ambos,inhibidores de la aromatasa
 - Radioterapia
 - Radioterapia ovárica

- **Evolución**
 - Fecha de diagnóstico clínico
 - Fecha de diagnóstico definitivo
 - Fecha de cirugía
 - Fecha de inicio y finalización de quimioterapia
 - Fecha de inicio y finalización de radioterapia
 - Período libre de enfermedad
 - Meses de remisión parcial
 - Meses de remisión completa
 - Fecha de recidiva
 - Fecha de última revisión
 - Supervivencia global
 - Fecha de muerte

4.- ESPECIMENES

4.1.-Procesamiento de los especímenes para estudio histológico.

El procesamiento histológico es el conjunto de procedimientos que se realizan con objeto de obtener de los especímenes las preparaciones histológicas

adecuadas para su estudio microscópico. La secuencia de procedimientos realizados en este proceso es la siguiente:

- Secuencia en el procesamiento de los especímenes para su estudio histológico
 - Fijación
 - Muestreo
 - Inclusión de muestras
 - Encastramiento de muestras
 - Realización de cortes histológicos
 - Ejecución de la tinción histológica

4.1.1.-Fijación del espécimen

Tiene por objetivo fundamental bloquear los fenómenos de autólisis y degradación tisular , así como de forma secundaria evitar artefactos en las muestras, mantenerlas en condiciones óptimas de conservación y evitar contaminaciones del personal que las manipula.

Elegimos como líquido fijador una solución tamponada de formalina al 10 %. Se trata de una solución simple, cuyo agente fijador es el formaldehído. En estado puro, el formaldehído es un gas de fácil disolución en agua. La formalina pura o formol es la solución en la que el formaldehído está disuelto en agua en torno a una concentración del 40% y estabilizado con metanol.

El formaldehído actúa mediante la reticulación de las proteínas, es decir, induciendo la rotura de los puentes de hidrógeno determinantes de la estructura helicoidal de las proteínas y facilitando la posterior formación de una malla reticular de polipéptidos por asociación química entre grupos activos desmascarados por el fijador. Posee una rápida capacidad de penetración en los tejidos , provoca escasa retracción tisular sin endurecer excesivamente los tejidos y permite la realización de la mayor parte de las tinciones convencionales e inmunohistoquímicas que se emplean en Anatomía Patológica , especialmente tras la incorporación de los métodos de desmascaramiento antigénico. La utilidad de usar formol tamponado es prevenir los cambios osmóticos derivados de la disolución de formalina en agua destilada y evitar la aparición de depósitos de pigmento formólico que ocurre a pH menor de 6.

Como fijador, el formaldehído se emplea al 4% , obtenido de diluir 1 parte de formalina en 9 de agua o de la solución salina o tamponada que se elija. la fórmula de preparación de la solución tamponada de formalina al 10% empleando el tampón fosfato calibrado a pH 7.0-7.2 es la siguiente (preparación de 1 litro) : 1) formalina pura 100 ml. 2) fosfato sódico monohidrato 4 gr. 3) fosfato sódico dibásico (anhidro) 6,5 gr. 4) agua destilada= 900 ml.

Para evitar autólisis, los especímenes han de ser introducidos en el líquido fijador lo antes posible tras su extracción. Los de tamaño mayor de 1 cm, con el objeto de la correcta penetración de la solución fijadora en los tejidos, han de ser seccionados previamente en lonchas de 0,5 cm de espesor máximo. El espécimen se introduce durante 18-24 horas a temperatura ambiente en un frasco

herméticamente cerrado conteniendo la solución tamponada de formalina al 10% en una relación 1:20, es decir, 1 unidad de tejido por cada 20 unidades de líquido fijador. Para biopsias pequeñas es recomendable un período de fijación menor, entre 4-8 horas. Habrá que tener en cuenta que períodos excesivamente largos de fijación pueden producir daños irreversibles para técnicas de inmunohistoquímica.

4.1.2.-Muestreo del espécimen

Tras completar el examen macroscópico una vez fijado el espécimen, se procede a la toma de muestras representativas para su estudio histológico mediante microscopía óptica. Estas muestras representativas del espécimen son las que van a seguir los siguientes procedimientos técnicos hasta convertirse en preparaciones histológicas.

Si el espécimen es pequeño se procede a su inclusión total como una sola muestra. En especímenes mayores, se obtienen con bisturí de hoja de metal un número estandarizado de muestras. Cada una de ellas debe de tener un espesor aproximado de 3 mm y habitualmente una morfología rectangular con unas dimensiones de hasta 2,5 cm x 2 cm de ejes máximos. El protocolo de muestreo de éstos se expone a continuación:

El protocolo de muestreo para el estudio histológico de los especímenes mamarios con carcinoma infiltrante primario de mama, lo exponemos a continuación:

a).-Biopsia incisional de lesión palpable

- Especímenes pequeños (que ocupan hasta 5 bloques): Inclusión total.
- Especímenes mayores: Inclusión de al menos dos tercios del tejido mamario (excluido el tejido adiposo). Al menos 3 bloques del tumor. Representación de al menos un bloque por cm de cualquier otra lesión macroscópicamente visible.

b).-Biopsia excisional de lesión palpable

- Especímenes pequeños (que ocupan hasta 5 bloques): Inclusión total(con los márgenes del espécimen teñidos con tinta India).
- Especímenes mayores: Inclusión de al menos dos tercios del tejido mamario (excluido el tejido adiposo). Al menos 3 bloques del tumor .Representación de al menos 1 bloque por cm de cualquier otra lesión macroscópicamente visible. Inclusión total de los márgenes quirúrgicos (con los márgenes del espécimen teñidos con tinta India). En caso de presencia de piel en el espécimen, representación de cualquier lesión macroscópicamente visible y un bloque de piel macroscópicamente normal. Las lumpectomías y cuadrantectomías pueden ir acompañadas de linfadenectomía axilar (véase apartado de mastectomía)

c).-Excisión de lesión no palpable detectada por mamografía

- Inclusión total (con márgenes del espécimen teñidos con tinta India).

d).-Mastectomía

- Tumor: al menos 3 bloques
- Cuadrantes mamarios: 1 bloque por cada cuadrante (CSE,CSI,CIE,CII).
- Muestreo adicional de cualquier lesión identificada macroscópicamente (orientativamente 1 bloque por cm de cada lesión).
- Tumorectomía intraoperatoria: 2 bloques de tejido pericavitario.
- Pezón: 1 bloque. Muestreo adicional de cualquier lesión identificada macroscópicamente (orientativamente 1 bloque por cm de cada lesión).
- Ganglios linfáticos axilares: 1 corte de cada uno de los ganglios identificados (con representación del tejido adiposo periganglionar).
- Ganglios interpectorales (de Rotter): 1 corte por cada uno de los ganglios identificados (con representación del tejido adiposo periganglionar).

4.1.3.-Inclusión de muestras

Consiste en la sustitución del agua tisular por otro medio líquido capaz de solidificar en las condiciones adecuadas de temperatura, con objeto de proporcionar a la muestra la consistencia adecuada para poder obtener los cortes histológicos.

El medio elegido es la parafina. La inclusión en parafina requiere tres pasos:

- 1.- Deshidratación del tejido : eliminación completa del agua del espécimen. Para ello se emplean una serie de alcoholes de gradación ascendente. El alcohol elegido es el metanol.
- 2.-Aclaramiento o desalcoholización: debido a que el alcohol no es miscible en parafina , se debe eliminar el alcohol sustituyéndolo por otro medio miscible en parafina. El medio elegido es el xileno (dimetil benceno).

3.-Infiltración del tejido en parafina. Se empleó una parafina dura con un punto de fusión a 56-58 °C.

4.1.4.-Encastramiento de las muestras

Consiste en la confección de bloques sólidos de tejidos adecuados para la posterior obtención de los cortes histológicos. Los bloques están constituidos por el tejido y su medio de inclusión (parafina).

Sobre la placa caliente se coloca cada muestra de tejido en un molde metálico, se orienta en el molde y se rellena el molde dispensando parafina (que es líquida a esta temperatura). Tras la confección de los bloques de parafina, éstos se enfrían lentamente a 10-15 °C sobre una placa fría para conseguir la solidificación óptima del bloque.

4.1.5.-Realización de cortes histológicos

Se empleó un microtomo de rotación modelo Leica RM 2035. los cortes se realizaron con un espesor de aproximadamente 5 micras. Los cortes obtenidos de cada bloque fueron seleccionados en un baño de agua caliente a 45 °C y una vez aplicados a los portaobjetos se secaron en estufa a 60 °C durante 15 minutos.

4.1.6.-Realización de las tinciones histológicas

La tinción empleada para el estudio histológico convencional fue la Hematoxilina-Eosina (H-E). La hematoxilina es un colorante nuclear que se extrae del árbol *hematoxylon campechianum*. El agente colorante es la hemateína, que se produce tras la oxidación de la hematoxilina. La hemetoxilina de Harris es un método regresivo en el que el primero todas las estructuras tisulares (nucleares y citoplásmicas) son teñidas con la hematoxilina y posteriormente se procede a una decoloración o “azuleamiento de la hematoxilina” en la que se obtiene la coloración nuclear deseada. Habitualmente, la hematoxilina se emplea conjuntamente con un colorante citoplásmico en los estudios histológicos convencionales. La eosina es el colorante citoplásmico más extendido en su uso.

El método empleado es el de hematoxilina de Harris y eosina. Los núcleos contienen una coloración azul y los citoplasmas y restantes estructuras una coloración del rosado al rojo.

La ejecución de la tinción H-E es la siguiente:

- . Solución de hematoxilina de Harris
- . Solución de eosina

- . Etanol ácido al 1%
- . Agua corriente (como solución de azuleamiento).

4.2.-Procesamiento de los especímenes para estudios Inmunohistoquímicos

El estudio IHQ para la demostración de la sobreexpresión de la oncoproteína HER-2 fue realizado sobre muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina. La secuencia de los procedimientos técnicos empleados puede dividirse en dos partes. La primera parte está constituida por los procedimientos que abarcan desde la fijación del tejido hasta la confección de los cortes histológicos. Estos pasos se realizaron igual a la empleada con las muestras destinadas al estudio histológico convencional. La segunda parte la forman los procedimientos específicos de las técnicas de IHQ.

4.2.1.-Procesos que abarcan desde la fijación del espécimen hasta la preparación de los cortes histológicos:

Las muestras destinadas al estudio IHQ fueron tomadas habitualmente en el propio acto de estudio intraoperatorio de la pieza quirúrgica, para comenzar de inmediato su proceso de fijación. Se obtuvo una muestra de cada espécimen destinada al estudio IHQ. En caso de tumores muy heterogéneos se obtuvo más de una muestra por espécimen. La muestra destinada a estudio IHQ es rectangular y de 3 mm de espesor, pero de menor tamaño que las destinadas al estudio histológico convencional, midiendo 1 cm² de superficie. Con ello se facilita la técnica de IHQ al permitirse una mejor difusión de los reactivos inmunológicos en la preparación histológica. Es recomendable que la muestra incluya zona periférica del tumor, con objeto de valorar parénquima mamario no tumoral como control interno de la tinción.

Como ya se ha indicado, previamente a la ejecución de la tinción IHQ, las muestras para el estudio IHQ se procesaron de forma similar a como se procesaron las muestras tomadas para el estudio histológico convencional. Las muestras se preservaron en formalina neutra tamponada durante un tiempo de 18-24 horas en una relación volumétrica de 20 unidades de volumen de líquido fijador por cada unidad de volumen de la muestra seleccionada. Tras la fijación en formalina, las muestras se deshidrataron en una serie de alcoholes y xileno y se infiltraron en parafina fundida mantenida a 60 °C, para seguidamente formar los bloques mediante encastramiento en parafina. Los cortes histológicos fueron obtenidos mediante microtomo de rotación a aproximadamente 3 micras de espesor.

Los bloques seleccionados para estudio IHQ de HER-2 así fijados y embebidos pueden mantenerse indefinidamente si se mantienen entre 15-25 °C. Para la preservación de la antigenicidad, los portas con las secciones de tejido deben ser teñidos dentro de las 4-6 semanas desde que se cortaron, con una

temperatura de conservación de entre 20-25 °C. Los portas empleados para las técnicas de IHQ deben ser sialinizados.

Muestras citológicas: las muestras citológicas destinadas a estudio IHQ fueron fijadas en acetona al 100% y a 4 °C de temperatura. La acetona es un fijador que actúa por deshidratación tisular. El protocolo de fijación es el siguiente: antes de fijar los extendidos citológicos en acetona deben dejarse secar completamente. Se sumergen en acetona durante 10 minutos y finalmente se procede a su congelación a 4 °C.

4.2.2.- Ejecución de la técnica inmunohistoquímica

Para la detección de la sobreexpresión de la proteína HER-2 se seleccionó inicialmente el anticuerpo anti oncoproteína c-erb-B2 marca DAKO código N°N1629 y el kit universal de visualización LSABÓÓ marca DAKO N°. K0680. posteriormente se sustituyó este sistema por el ensayo inmunohistoquímico marca DAKO denominado DAKO HercepTest™ (código N°. K5204).

a).-Bases de la técnica de inmunohistoquímica

Se basa en la localización de un antígeno tisular mediante el empleo de un anticuerpo contra ese antígeno y la posterior identificación del lugar de la reacción antígeno-anticuerpo mediante el empleo de un enzima trazador. El enzima trazador al actuar sobre el sustrato produce un efecto sobre una sustancia denominada cromógeno que precipita sobre el lugar de la reacción antígeno-anticuerpo de forma coloreada permitiendo visualizar dicho tejido.

- ***Técnicas de inmunoperoxidasa*** : el trazador enzimático más empleado es la enzima peroxidasa obtenida del rábano, que ha dado lugar a las denominadas técnicas de inmunoperoxidasa. La peroxidasa forma un complejo con el sustrato peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y este complejo reacciona con un donante de electrones para conseguir el producto final de la reacción: una molécula coloreada y agua(H₂O). Al no desaparecer el enzima en esta reacción , una sólo molécula de enzima puede catalizar muchas moléculas de sustrato , dando lugar a muchas moléculas de producto coloreado y por tanto a una amplificación en la señalización del lugar donde se encuentra la unión del antígeno-anticuerpo. Existen varios cromógenos, de los cuales el 3,3 tetracloruro de diaminobencidina (DAB) es uno de los más empleados. DAB produce un color marrón y es insoluble en alcohol. Su empleo permite que las laminillas puedan ser deshidratadas y cubiertas con métodos convencionales de montaje.

- **Introducción a los tipos de métodos IHQ:** se denominan técnicas con anticuerpos marcados a aquellas en las que el enzima trazador va unido de forma covalente al anticuerpo.
 - Método directo: se denomina método directo cuando el enzima trazador está unido de forma covalente al anticuerpo dirigido contra el antígeno tisular que se pretende detectar. En este método, se realiza un único paso que consiste en la aplicación del anticuerpo marcado sobre el tejido.
 - Método indirecto: en este caso el enzima trazador está unido a un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario o puente) cuyo antígeno es el anticuerpo (denominado anticuerpo primario) dirigido contra el antígeno tisular. En éste método, se aplica primero el anticuerpo primario sobre el tejido y después el anticuerpo secundario marcado contra el anticuerpo primario.
 - Técnicas con anticuerpos no marcados: se denominan a aquellas técnicas en las que el trazador está constituido por inmunocomplejos formados por la enzima y anticuerpos dirigidos contra ella.

En el caso de la peroxidasa se denominan complejos peroxidasa-antiperoxidasa (complejo PAP) y cada uno de ellos está constituido por tres moléculas peroxidasa y dos de anticuerpo anti-peroxidasa. Para éste último procedimiento son necesarios tres anticuerpos y tres pasos. Primero se aplica el anticuerpo primario contra el antígeno del tejido, después se aplica el anticuerpo secundario (denominado anticuerpo puente porque está dirigido contra el anticuerpo primario y contra el complejo PAP) y, finalmente, se aplica el complejo PAP.

El anticuerpo primario y el anticuerpo del complejo PAP proceden de la misma especie, mientras que el anticuerpo secundario procede de una especie animal distinta .

Los métodos de avidina-biotina emplean anticuerpos marcados y se basan en la gran afinidad que poseen entre sí las moléculas de avidina y biotina. La avidina es una molécula de alto peso molecular que está presente en la clara del huevo y en la bacteria "streptomices avidinii" siendo denominada estreptavidina cuando procede de la bacteria. Está formada por cuatro subunidades y presenta cuatro regiones de unión a la biotina. La biotina es una proteína de bajo peso molecular perteneciente al complejo B (vitamina H) y que se encuentra en la yema del huevo. Puede conjugarse con facilidad con anticuerpos y con enzimas trazadoras mediante enlaces covalentes. además pueden unirse hasta 150 moléculas de biotina a un solo anticuerpo. Por ello el método del complejo avidina-biotina (ABC) facilita una considerable amplificación en la señalización de la unión antígeno-anticuerpo. Este método incluye también tres pasos. En un primer paso se añade el antígeno primario (que se une al antígeno tisular), en el segundo paso se añade un anticuerpo secundario marcado con biotina (se unirá al

anticuerpo primario), y en un tercer paso se añade avidina con peroxidasa (se forma el complejo avidina-biotina).

b).-Protocolo de desparafinado

Antes de comenzar la técnica de IHQ los cortes obtenidos de bloques de parafina han de ser desparafinados e hidratados. El protocolo es como sigue:

- 1.- Colocar los portas con los cortes histológicos en una estufa a 58 °C (mínimo 2 H; Preferible entre 16-24 H)
- 2.- Sacar los portas de la estufa y colocarlos en Xilol durante 15 min
- 3.- Escurrir. Pasar a etanol al 100% 5 min.
- 4.- Escurrir. Pasar a etanol al 70% 5 min.
- 5.- Escurrir. Colocar en agua.
- 6.- Escurrir y colocar el tiosulfato sódico al 5% unos segundos.
- 7.-Escurrir y colocar en agua.

c).- Desenmascaramiento antigénico

Durante el proceso de fijación tisular y sobre todo con el empleo de fijadores cuyo mecanismo es el entrecruzamiento de las proteínas puede suceder que algunos antígenos queden ocultos, fenómeno que se denomina enmascaramiento antigénico. En el caso de la formalina se emplean puentes metilo entre aminoácidos y polipéptidos dando lugar a una red formada por diferentes proteínas y que bloquea el acceso a de los anticuerpos a sus epitopos de los antígenos. El desenmascaramiento antigénico consiste en eliminar estos enlaces producidos durante el proceso de fijación para hacer de nuevo accesibles los epitopos al anticuerpo.

El desenmascaramiento antigénico puede ser realizado mediante enzimas (desenmascaramiento enzimático) o bien mediante calor (desenmascaramiento térmico), realizado mediante olla a presión, autoclave, esterilizadores, vaporizadores o microondas.

d).-Bloqueo de enzimas endógenas

El uso de enzimas para la detección de la unión del antígeno al anticuerpo obliga a inhibir las que existan previamente en el tejido para evitar una reactividad falsa. Éste hecho ocurre con el empleo de peroxidasa, enzima presente en los tejidos. El bloqueo de la peroxidasa endógena debe llevarse a cabo antes de la incubación con el anticuerpo que lleve esta enzima detectora. Para bloquear <la actividad de la peroxidasa endógena se recurre al propio sustrato de esta enzima, ya que, mediante el principio de inhibición del sustrato, al añadir un exceso de

peróxido de hidrógeno la enzima peroxidasa endógena quedará inhibida. De esta forma, mientras que en la solución sustrato empleada para formar el cromógeno se usa una concentración de H₂O₂ al 3% en 10 ml de solución de tampón (0,03%), para eliminar la actividad peroxidasa endógena se emplea una concentración de H₂O₂ al 3%, lo que representa un exceso de sustrato 100 veces superior a la cantidad requerida para la reacción. Este exceso es suficiente para inhibir irreversiblemente a la enzima.

4.2.3.- Procedimiento de detección de CerbB2 mediante LSAB

Anti-c-erb-B-2 No. N1629 (DAKO), es un anticuerpo de conejo anti c-erbB-2 oncoproteína humana que reconoce un epitopo en la parte citoplasmática de la oncoproteína de membrana c-erb-B2. Los sistemas de visualización recomendados son DAKO LSAB®2 y DAKO En Vision™.

El sistema LSAB es una variante de la técnica avidina-biotina en la que un anticuerpo secundario biotinilado reacciona con varias moléculas de estreptavidina conjugadas con peroxidasa.

Se recomienda un tiempo de incubación del anticuerpo primario de unos 30 minutos a temperatura ambiente. Para DAKO LSAB ® 2 (cod.K0680) el tiempo de incubación recomendado para el anticuerpo secundario y la enzima estreptavidina son 30 minutos en cada uno de los pasos. Si se emplea 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) como cromógeno el tiempo de incubación para el anticuerpo primario y los siguientes pasos puede ser reducido a 10 minutos. El tiempo recomendado de incubación para DAB es de 5 minutos.

La secuencia de procedimientos que incluye la técnica empleada con LSAB aparece reflejada a continuación:

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">▪ 1.-Desparafinado y desenmascaramiento antigénico▪ 2.-Bloqueo de Peroxidasa endógena▪ 3.-Incubación del anticuerpo primario (anti c-erb-B2)▪ 4.-Incubación del anticuerpo secundario (anticuerpo puente biotinilado)▪ 5.-Aplicación del sistema de visualización▪ 6.-Aplicación de la solución cromógeno sustrato (diamonobenzidina)▪ 7.-Contratinción (hematoxilina de Harris) |
|--|

Tabla 18.- Técnica de LSAB.

Esquemáticamente, representamos a continuación el método LSAB de visualización:

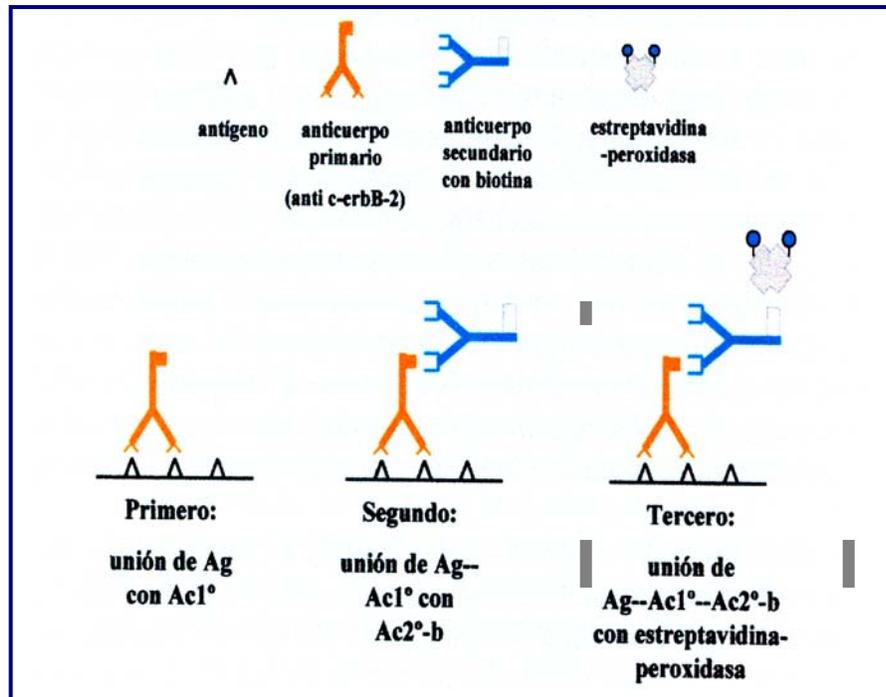


Fig.30.- Método LSAB de visualización.

El primer paso antes de la realización del procedimiento para la detección de c-erb-B2 mediante LSAB consiste en la presentación del anticuerpo. La presentación incluye el anticuerpo primario y un control negativo que se sirven de un modo prediluido:

a.- Presentación del anticuerpo primario:

- 7ml del anticuerpo en 0,05 M de tampón Tris-HCL a pH 7,6
- Proteína transportadora
- 15 mm de azida sódica

b.- Presentación del reactivo de control negativo:

- 5 ml de fracción purificada de inmunoglobulina de suero no inmunizado en 0,05 mM de tampón Tris-HCL a pH 7,6
- proteína transportadora
- 15 mM de azida sódica

La ejecución de esta tinción requiere además del siguiente material, el cual no se suministra en el Kit comercial:

- Xileno
- Etanol al 100%
- Etanol al 95%
- Agua destilada

- Solución de lavado sin azida sódica
- Limpiadores absorbentes
- Jarras de tinción
- Hematoxilina de Harris (contratinción)
- Hidróxido de aminio (37mM)

Se precisan además los siguientes reactivos, los cuales es conveniente prepararlos previamente a la realización de la tinción:

-Soluciones de lavado: PBS, tampón 0,05 Tris-HCL o tampón Tris salino, a pH 7,2-7,6, sin azida sódica.

Para lavar el peróxido de hidrógeno, la solución sustrato-cromógeno y la contratinción puede usarse agua destilada.

Pueden almacenarse entre 2-8°C.

-Reactivo estreptavidina: Preparación de 4ml (para 10-16 portas):

1.-Verter 4 gotas de 5^a (tampón concentrado) en el tubo para estreptavidina

2.-Añadir agua destilada hasta 4 ml

3.-Añadir 1 gota de 5b (concentrado de estreptavidina)

4.-Mezclar y aplicar al espécimen con la pipeta proporcionada en el Kit

5.-Almacenar el sobrante a 2-8°C (máximo 14 días).

-Solución sustrato-cromógeno: es estable tan sólo dos horas por lo que debemos prepararla inmediatamente antes de su uso.

Preparación de 2ml (para 5-8 secciones histológicas ó 2-4 extendidos celulares):

1.-Traspasar alícuotas de 2ml (cuantas sean necesarias) desde 7 (sustrato calibrado) al tubo calibrado de preparación de cromógeno .

2.- Por cada 2 ml de tampón añadir 1 gota de 6 (cromógeno de AEC), y mezclar inmediatamente.

3.-Por cada 2ml de tampón añadir 1 gota de 8 (sustrato peróxido de hidrógeno), mezclar y añadir al espécimen con la pipeta pasteurizada proporcionada.

-Contratinción: se puede usar tanto una hematoxilina acuosa como alcohólica ya que DAB es insoluble en agua y alcohol. La de Mayer

es óptima para contrateñir la preparación. tras la contratinción se lavan las muestras con agua destilada, después se pueden sumergir en agua amoniaca al 37mM.

-Medio de montaje: se recomienda uno no acuoso permanente.

La ejecución de la técnica es manual. El protocolo de la tinción (a temperatura ambiente, 20-25°C) aparece reflejado en la siguiente tabla. Previo a los pasos que se exponen, ha de realizarse desparafinación y rehidratación de las preparaciones histológicas. Las preparaciones citológicas no deben ser sometidas a desenmascaramiento antigénico.

- 1.- Recuperación antigénica:
 - Precalentar la jarra de Coplin con 10 mM de tampón citrato a pH 6.0 metiéndola en el baño con agua a 95-99°C
 - Cuando la temperatura sea estable introducir los portas en la jarra con el tampón precalentado. Calentar 40 minutos.
 - Dejar enfriar la jarra con el tampón y las muestras a 20°C
 - Lavar bien con tampón PBS
- 2.-Peróxido de hidrógeno:
 - Eliminar el exceso de buffer. Secar cuidadosamente.
 - Añadir el reactivo Bloqueante de la Peroxidasa.
 - Incubar 5 minutos.
 - Escurrir y lavar con agua destilada o desionizada. No añadirlo directamente sobre las muestras y colocar las preparaciones en una solución fresca de buffer.
- 3.-Reactivo bloqueante:
 - Eliminar el exceso de buffer y escurrir. Secar cuidadosamente alrededor de la preparación.
 - Añadir suficientes gotas azules del reactivo bloqueante para cubrir el espécimen reactivo
 - Incubar 5 minutos.
 - No lavar.
4. Anticuerpo primario reactivo control negativo:
 - Eliminar el exceso de buffer y escurrir.
 - Cubrir las muestras con anticuerpo primario o reactivo control negativo.
 - Incubar durante 10 minutos.
 - Escurrir y colocar las muestras en solución buffer.
- 5.-Anticuerpo puente:
 - Eliminar el exceso de buffer. Escurrir .
 - Cubrir los portas con suficientes gotas amarillas del Ac.Puente
 - Incubar 10 minutos.
 - Escurrir y lavar con buffer, colocar las muestras en solución buffer.
- 6.-Reactivo de visualización:
 - Escurrir el buffer de las preparaciones.
 - Añadir suficientes gotas rojas del preparado de estreptavidina para cubrir los portas
 - Incubar 10 minutos.
 - Preparar la solución sustrato-cromógeno.
 - Escurrir y lavar con buffer, colocar las muestras en solución de buffer.
- 7.-Solución de sustrato-cromógeno DAB:
 - Escurrir las preparaciones.
 - Cubrir las muestras con solución sustrato-cromógeno DAB.
 - Incubar 10 minutos.
 - Lavar con agua destilada.
- 8.-Contratinción con hematoxilina:
 - Añadir hematoxilina
 - Incubar entre 2-5 min(depene del tipo de hematoxilina)
 - Lavar con agua destilada
 - Sumergir 10 veces en agua amoniacal.
 - Lavar con agua destilada durante 2 minutos.
- 9.-Montaje

Tabla 19.- Protocolo de tinción técnica LSAB

Este ensayo está indicado como una ayuda en el seguimiento de pacientes para los que se ha considerado el tratamiento con HERCEPTÍN.

Es necesario recordar que todos los pacientes seleccionados para el ensayo clínico con HERCEPTÍN fueron seleccionados usando un ensayo clínico inmunohistoquímico de investigación denominado CTA. Ninguno de ellos fue seleccionado utilizando DAKO HercepTest™. No obstante, DAKO HercepTest™ fue comparado con el CTA sobre un set independiente de muestras y se encontraron resultados concordantes. La realización de HercepTest para la determinación de la sobreexpresión de HER-2 fue evaluada en un estudio independiente comparando los resultados del HercepTest con la CTA en 548 muestras de tumores de mama, ninguno de los cuales fueron obtenidos de los pacientes en los ensayos clínicos de HERCEPTÍN. Los resultados indicaron un 79% de concordancia entre los resultados de los dos ensayos sobre estas muestras.

Siguiendo la incubación con el anticuerpo primario policlonal de conejo frente a la proteína HER”, este kit emplea reactivos de visualización listos para ser usados basados en la tecnología de dextrano. Estos reactivos consisten en ambas moléculas de anticuerpo de cabra anti-conejo y peroxidasa de Rábano unidas a una estructura común de polímero de dextrano, eliminando así la necesidad de utilizar los pasos secuenciales de anticuerpo puente y el anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa. La conversión enzimática y la posterior adición de cromógeno dará lugar a una reacción visible en el sitio del antígeno. La muestra es contratada posteriormente. La secuencia de etapas de la técnica de esta tinción aparece reflejada a continuación:

- Secuencia del ensayo DAKO HercepTest™ para la demostración de la sobreexpresión de c-erb-B2
 - Desparafinación y desenmascaramiento antigénico
 - Bloqueo de peroxidasa endógena
 - Incubación del anticuerpo primario(anti c-erb-B2)
 - Aplicación del sistema de visualización
 - Aplicación de la solución cromógeno-sustrato
 - Contratinción (hematoxilina de Harris) y montaje.

4.2.4.- Procedimiento de detección de Receptores de estrógenos

El receptor de estrógenos es una proteína de 67 kDa , perteneciente a una larga familia de receptores nucleares hormonales que funcionan como factores de transcripción activados por ligando. El gen del receptor de estrógeno consiste en más de 140 kb de DNA dividido en 8 exones.este es transformado en una proteína con 6 dominios funcionales denominados de A a F. Una segunda forma de receptor de estrógeno ha sido recientemente descrita, el denominado receptor de estrógeno β (RE β).

Para la detección de receptores de estrógenos usamos un anticuerpo monoclonal prediluido (Ready to use) del receptor de estrógeno (clon ER007) de Biocare Medical®. Este clon ha sido establecido para trabajar en tejidos fijados en formalina o incluidos en parafina. Los patrones de tinción observados incluyen : RE + y RP +, RE+ y RP -, RE- y RP+ y RE- y RP-.

Reactividad en especies	En humanos; no testado en otras especies.
Clones	ER007
Isotipo	IgG1/k
Aplicaciones conocidas	Inmunohistoquímica
Control positivo	Receptor de estrógeno positivo de cáncer de mama
Localización celular	Nuclear
Presentado como	Buffer con proteína transportadora y conservante
Conservación y almacenaje	Conservación a 4°C. Estable por 18 meses.

Tabla 20.- Detección de receptores de estrógenos con kit comercial BiocareMedical®

El protocolo de uso:

Bloqueo de peroxidasa endógena	5 min
Pretratamiento	Hervir a 100°C 10min. Enfriar 10-20 min.
Bloqueo de proteínas	5 min
Anticuerpo primario	Incubación de 30-60 min
Anticuerpo secundario biotinilado	Incubación 10-20 min
Cromógeno	Incubación durante 5-10 min

Tabla21.- Protocolo de uso kit comercial BiocareMedical®

4.2.5.- Procedimiento de detección de Receptores de progesterona

Usamos un anticuerpo monoclonal super-sensible “Ready to use” de Biogenex®. Se usa en tejidos incluidos en parafina. Las características generales:

Reactividad en especies	En humanos; no testado en otras especies.
Clones	PR 88
Isotipo	Mouse IgG1, kappa
Aplicaciones conocidas	Inmunohistoquímica
Control positivo	Receptor de progesterona positivo de cáncer de mama
Localización celular	Nuclear
Presentado como	Buffer con proteína transportadora y conservante

Tabla 22.- Kit de Biogenex® para detección de receptores de progesterona

4.2.6.- Procedimiento de detección de la proteína supresora de tumores p53

Se trata de una fosfoproteína de 53kDa identificada como el producto del gen supresor de tumores p53. reacciona tanto como con las formas mutantes como las normales de p53..

Usamos un anticuerpo monoclonal prediluido “ready to use”, clon DO-7, de Biocare Medical®.

Reactividad en especies	En humanos, vacas y monos
Clones	DO-7
Isotipo	IgG _{2b} /k
Aplicaciones conocidas	Inmunohistoquímica
Control positivo	Cáncer de colon o de mama
Localización celular	Nuclear
Presentado como	Buffer con proteína transportadora y conservante
Conservación y almacenaje	Conservación a 4°C. Estable por 18 meses.

Tabla 23.-Kit de Biocare Medical® para detección de p53.

4.2.7.- Procedimiento de detección de Ki-67

Ki-67 está relacionado con la proliferación celular pudiéndose reconocer en todo el ciclo celular excepto en G0. Se detecta mediante un anticuerpo monoclonal de ratón . Usamos el kit de DBS®, cuyas características representamos a continuación (Tabla 24):

Inmunógeno	Ki-67 recombinante humana conteniendo extremo C-terminal de 340 aminoácidos.
Clones	MB67
Isotipo	IgG ₁ /kappa
Especificidad	Anticuerpo específico frente a antígeno Ki-67 nuclear de 340 kD. Reconoce Ki-67 nativo y recombinante.
Aplicaciones conocidas	Inmunohistoquímica
Control positivo	Amígdala
Localización celular	Nuclear
Presentado como	Buffer con proteína transportadora y conservante
Conservación y almacenaje	Conservación entre 4-8°C.

Tabla 24.- Kit de DBS® para la detección de Ki67.

4.3.-Interpretación de los resultados

4.3.1.- Interpretación del estudio histológico convencional.

El estudio histopatológico convencional es realizado por un patólogo. Consiste en el examen macroscópico del espécimen y el examen microscópico de las muestras histológicas tomadas del mismo.

El protocolo empleado para producir el informe histopatológico aparece reflejado a continuación. Constituye una adaptación basada en las recomendaciones emitidas por la Asociación de Directores de Patología Quirúrgica y Anatómica (ADASP)¹⁷⁵, el Departamento de Patología del Hospital Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de New York (EEUU)¹⁷⁶, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su segunda edición de tumores de la glándula mamaria¹⁷⁷, la Union Internacional Contra el Cancer (UICC) en su quinta edición de la clasificación TNM de tumores malignos¹⁷⁸ y la modificación de los grados de Bloom-Richardson realizada por Elston y Ellis¹⁷⁹.

INFORME HISTOPATOLÓGICO DE LOS ESPECÍMENES MAMARIOS CON CARCINOMA PRIMARIO INFILTRANTE

Tipo de espécimen:

- Biopsia incisional.
- Biopsia escisional de lesión palpable.
- Exéresis de lesión no palpable detectada en mamografía
- Mastectomía
- Re-excisión (especificar tipo).
- Con o sin linfadenectomía axilar.

Localización del espécimen:

- Mama izquierda, cuadrantes /mama derecha, cuadrantes

Tamaño del espécimen

Tipo histológico del tumor

- Carcinoma ductal infiltrante sin otro tipo de especificación.
- Carcinoma ductal infiltrante con predominio del componente intraductal.

Grado de Bloom-Richardson modificado (Modificación Nottingham)

- Grado I (bajo grado de malignidad, bien diferenciado): 3,4, ó 5 puntos
- Grado II (grado intermedio de malignidad, moderadamente diferenciado): 6 ó 7 puntos
- Grado III (alto grado de malignidad, pobremente diferenciado): 8 ó 9 puntos

Grado histológico:formación tubular

- Grado histológico I/III (1 punto): formación tubular en > 75% del tumor
- Grado histológico II/III (2 puntos):formación tubular entre el 10-75% del tumor.
- Grado histológico III/III(3 puntos):formación tubular en < 10% del tumor.

Grado nuclear:

- Grado nuclear I/III (1 punto): leve o ninguna variación en forma y tamaño.
- Grado nuclear II/III (2 puntos):moderada variación en forma y tamaño.
- Grado nuclear III/III (3 puntos): intensa variación en forma y tamaño.

Índice mitótico (considerar sólo las mitosis en la periferia del tumor):

- Índice mitótico I/III (1 punto):0-9 mitosis /10 campos de objetivo x 40.

- Índice mitótico II/III (2 puntos): entre 10-20 mitosis
- Índice mitótico III/III (3 puntos): más de 20 mitosis

Porcentaje del componente ductal in situ

- El componente ductal in situ ocupa <25% de la masa tumoral
- El componente ductal in situ ocupa > 25 % de la masa tumoral.

Tamaño tumoral (del componente infiltrante).

- El diámetro mayor tumoral medido macroscópicamente es de -----
- El diámetro mayor tumoral medido microscópicamente es de ----- (para tumores < 1 cm)
- El diámetro mayor tumoral no puede especificarse debido a -----

Necrosis tumoral en el componente infiltrante

- No se observa necrosis tumoral
- La necrosis tumoral es mínima
- La necrosis tumoral es extensa
- La necrosis tumoral no puede evaluarse (especificar)

Calcificación tumoral

- No se identifica calcificación tumoral.
- La calcificación tumoral en el componente in situ es mínima.
- La calcificación tumoral en el componente in situ es extensa.
- La calcificación tumoral en el componente infiltrante es mínima.
- La calcificación tumoral en el componente infiltrante es extensa.

Invasión vascular

- No se identifica invasión vascular
- Se observa invasión vascular
- La invasión vascular no puede determinarse (especificar)

Invasión perineural

- No se identifica invasión perineural
- Se observa invasión perineural
- La invasión perineural no puede determinarse (especificar)

Localización tumoral (para mastectomías):

- El tumor está localizado en los siguientes sitios (marcar):

- Pezón/ Porción central/ cuadrante superoexterno/ Cuadrante inferoexterno/ Cuadrante inferoexterno/cuadrante inferointerno/ cola axilar

Multicentricidad tumoral (para mastectomías):

- No se identifica multicentricidad tumoral
- Se observan focos de carcinoma in situ en (especificar)
- Se observan focos de carcinoma ductal infiltrante en (especificar).
- Número y tipos de focos.

Pezón

- No se identifica afectación del pezón
- Los conductos galactóforos están afectados por carcinoma in situ.
- El pezón está afectado por carcinoma in situ (Enfermedad de Paget)
- El pezón está afectado por carcinoma infiltrante
- Otros hallazgos en el pezón.

Piel

- No se identifica afectación de la piel
- La piel está afectada por el tumor por invasión directa.
- Se identifican émbolos neoplásicos en los vasos linfáticos dérmicos.
- Otros hallazgos en la piel

Márgenes quirúrgicos

- No se observa afectación de márgenes quirúrgicos.
- El carcinoma infiltrante está cercano (dentro de una campo x40) a los siguientes márgenes quirúrgicos-----
- El carcinoma infiltrante afecta a los siguientes márgenes quirúrgicos----
- El carcinoma in situ está cercano a los siguientes márgenes quirúrgicos---
- El carcinoma in situ afecta a los siguientes márgenes quirúrgicos----
- No se puede determinar la afectación de bordes quirúrgicos por la neoplasia debido a ----

Ganglios linfáticos regionales

- Número total de ganglios axilares aislados
- Número total de ganglios con metástasis
- Presencia o ausencia de rotura capsular

Músculo pectoral

- El músculo pectoral no está afectado por la neoplasia
- El músculo pectoral está afectado por la neoplasia (especificar)
- No puede determinarse la afectación del músculo pectoral por la neoplasia debido a----

4.3.2.- Clasificación TNM

La clasificación TNM empleada para determinar la extensión anatómica de las neoplasias basada en aplicaciones clínicas (cTNM) o patológicas (pTNM) ideada por Pierre Denoix, en el Instituto Gustav Roussy, hace más de 50 años, se utiliza en el cáncer mamario desde hace 25 años. Los continuos cambios en el diagnóstico y tratamiento hacen que se introduzcan reiteradas modificaciones en esa clasificación^{180,181}

Exponemos a continuación la clasificación TNM en su 5ª edición y 6ª edición^{175,176}

- **Tumor primario (pT)**

pT1: Tumor de 2cm o menos en su mayor diámetro

T1a: Tumor de hasta 0,5cm

T1b: Tumor de entre 0,5 –1cm

T1c: Tumor de entre 1 y 2 cm

pT2: Tumor de entre 2-5 cm en su diámetro mayor.

pT3: Tumor mayor de 5 cm en su diámetro mayor.

pT4: Tumor de cualquier tamaño con invasión directa de la piel o pared costal (costillas, músculos intercostales o músculo serrato anterior. Queda excluido el músculo pectoral).

pT4a: Con invasión de la pared torácica.

pT4b: Con edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama o con nódulos satélites en la piel, confinado en la mama afecta.

pT4c: con los signos T4a y T4b

pT4d: Carcinoma inflamatorio.

- **Ganglios linfáticos regionales (pN)**

pNX: Ganglios linfáticos regionales que no pueden ser valorados (incluyéndose tanto los extraídos como los no extraídos para estudio anatomopatológico)

pN0: Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

pN1: Metástasis en ganglio(s) linfático(s) ipsilateral(es) no adheridos.

pN1a: Solo micrometástasis (no superiores a 0,2 cm de diámetro)

pN1b: Metástasis de ganglio(s) linfático(s)(siendo alguna superior a 0,2 cm de diámetro).

pN1b1: Metástasis en 1,2 ó 3 ganglios siendo por lo menos uno de ellos mayor de 0,2 cm y ninguno superior a los 2 cm en su extensión mayor.

pN1b2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos, siendo por lo menos uno de ellos mayor de 0,2 cm y ninguno superior a los 2 cm.

pN1b3: Extensión del tumor más allá de la cápsula de un ganglio linfático metastatizado con un tamaño inferior a los 2 cm .

pN1b4: Metástasis en un ganglio linfático de 2 o más cm en su diámetro mayor.

pN2:Metástasis de los ganglios linfáticos axilares ipsilaterales adheridos entre sí o a otras estructuras.

pN3:Metástasis de ganglio(s) linfático(s) interno(s) ipsilateral(es) (cadena mamaria interna).

- **Metástasis a distancia**

pMx: Presencia de metástasis a distancia que no pueden ser valoradas.

pM0: Sin metástasis a distancia.

pM1: Metástasis a distancia

Recientemente se ha propuesto por la *American Joint Comité on Cancer (AJCC)* su revisión para incorporarla en la sexta edición del *Cancer Staging Manual* recomendándose a los registros de tumores su utilización a partir de Enero de 2003. la nueva versión cuenta con la ventaja de que se corresponde exactamente con la edición actual del sistema de gradación de la Internacional Union Against Cancer (UICC) lo que facilita el intercambio de información entre centros.

Las modificaciones incorporadas a la edición anterior a 1997¹⁸², atienden a :

1.- Los cambios surgidos por el uso generalizado de la mamografía de cribado; muchos de los cánceres se descubren cuando tienen pequeño tamaño, pero aún así el comportamiento de esos tumores pequeños es heterogéneo.

2.-La incorporación de la técnica del ganglio centinela en el tratamiento del cáncer de mama temprano, con el uso de técnicas inmunohistoquímicas y moleculares para la detección de metástasis; éstas, a veces, son lesiones tan pequeñas que hace años no se hubieran detectado.

3.- La experiencia acumulada, que cuestiona la importancia clínica de algunas localizaciones metastásicas como en ganglios del III nivel axilar (infraclaviculares) o fuera de la axila (ganglios supraclaviculares y de la cadena mamaria interna).

Micrometástasis y células tumorales aisladas

El empleo de técnicas inmunohistoquímicas y moleculares permite detectar grupos de células o incluso células aisladas en los ganglios linfáticos. Según la 5ª edición del AJCC Cancer Staging Manual, éstas metástasis deben considerarse micrometástasis si no superan los 2,0 mm de tamaño y clasificarse como pN1. Sin embargo, su significación biológica es mal conocida, así que la 6ª edición del AJCC Cancer Staging Manual asigna un tamaño inferior límite a las micrometástasis definiéndolas como metástasis mayores de 2,0 mm que se clasifican como pN1mi. Los depósitos de células menores se consideran células tumorales aisladas (CTA) y, por el momento, se clasifican como N0¹⁸³.

Número de ganglios con metástasis

El número absoluto de ganglios positivos es uno de los factores pronósticos más importantes; así, en pacientes con uno a tres ganglios axilares positivos (con al menos un cúmulo neoplásico mayor de 2mm y todos mayores de 0,2 mm) se clasifica como pN2a y pacientes con diez o más ganglios axilares positivos como pN3a. La decisión de dividir a los pacientes en estos tres grupos se basa en resultados de estudios previos.¹⁸⁴

Metástasis en ganglios infraclaviculares

El estado de los ganglios infraclaviculares o del nivel III o internos al borde medial del músculo pectoral menor, en ediciones anteriores se agrupaban con el resto de ganglios axilares. Debido a que su afectación implica un pronóstico muy desfavorable¹⁸⁵ se ha recomendado que se especifique en la clasificación como N3a.

Metástasis en ganglios no axilares

En ediciones anteriores, la afectación de ganglios de la cadena mamaria interna (MI) se clasificaba como N3.

Debido a que el impacto en la supervivencia, según se demuestra en estudios recientes¹⁸⁶ depende del estado de los ganglios axilares y también está asociado al tamaño de esos ganglios MI positivos detectados mediante la técnica del ganglio centinela, pero no clínicamente ni por estudios de imagen, se clasifican como pN1b en ausencia de ganglios axilares positivos, pN1c si se asocian a uno a tres ganglios axilares positivos y pN3b con cuatro o más ganglios axilares positivos. La existencia de ganglios MI positivos detectados por examen clínico o estudios de imagen se clasifica como N2b/pN2b en ausencia de ganglios axiales positivos y como N3b/pN3b si hay ganglios axilares positivos.¹⁷⁸

La existencia de metástasis en ganglios supraclaviculares tradicionalmente se han considerado como muy mal pronóstico, considerándose como metástasis a distancia (M1), lo que puede implicar disminuir el esfuerzo terapéutico, no justificado a la visa de recientes estudios. Por ello se reclasifican las metástasis en ganglios supraclaviculres como N3c/pN3c, con un nuevo Estadío IIIc que incluye cualquier T y N3 (pN3a, pN3b, pN3c).¹⁷⁸

Ganglio centinela

Si la clasificación está basada solamente en el ganglio centinela, sin posterior disección axilar se dsigna adicionalmente como (sn).

Grado histológico

En la revisión se valora muy favorablemente la utilización, como un importante dato pronóstico del grado histológico combinado de Nottinghamm, propuesto por Ellston- Ellis¹⁷⁹. No obstante se considera prematura su incorporación al TNM.

- 1.- Separación demicrometástasis y células tumorales aisladas basándose en el tamaño y evidencia histológica de actividad maligna.
- 2.-Se identifica el uso de la disección del ganglio centinela y de técnicas inmunohistoquímicas y moleculares.
- 3.-La clasificación del estado ganglionar se realiza según el número de ganglios con metástasis. Éstas se identifican con HE (preferentemente) o con inmunohistoquímica.
- 4.-las metástasis en ganglios infraclaviculares se clasifican N3
- 5.- Se reclasifican las metástasis en los ganglios de la mamaria interna basándose en el método de su detección y en la presencia o ausencia de afectación de los ganglios axilares.la metástasis microscópica del ganglio centinela empleando linfoescintigrafía y no por estudios de imagen o examen clínico se clasifica como N1. si hay afectación macroscópica de los ganglios detectada por estudios de imagen (excluyendo linfoescintigrafía) o por examen clínico, se clasifica como N2 si no hay también afectación de ganglios axilares y como N3 si hay afectación de ganglios d ambas cadenas.
- 6.-la metástasis de ganglios supraclaviculares se clasifica como N3.

Tabla 24.- Resumen de los principales cambios introducidos en el TNM del cáncer de mama¹⁷⁸

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

*T1 incluye T1mic (microinvasión 0,1 cm)

Tabla 25.- Estadíos del cáncer de mama

5ª Edición	6ª Edición
Tis.- Carcinoma in situ	Tis.- Carcinoma in situ Tis (CDIS).- Carcinoma ductal in situ Tis (CLIS).- Carcinoma Lobulillar in situ Tis (Paget).- E. de Paget del pezón sin tumor
pN0.-No ganglios regionales con metástasis	pN0.- No metástasis histológicamente para ganglios regionales sin análisis para CTA. pN0(i-). -No metástasis, histológicamente en ganglios regionales, IHQ negativa. pN0(i+). -No metástasis, histológicamente, en ganglios regionales, IHQ positiva con CTA pN0(mol-). -No metástasis histológicamente en ganglios regionales;estudio molecular neg. pN0(mol+). -No metástasis histológicamente, en ganglios regionales;studio molecular +.
pN1.-Metást. móviles en ganglio(s) axilares ipsi.	pN1.- Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y/o en ganglios mamarios internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente*
pN1(mi).-Excluida	pN1(mi). -Micrometástasis (>0,2 mm / <0,2 cm)
pN1a.-sólo micrometástasis (<0,2cm)	pN1a.- Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares.
pN1b.-Metástasis > de 2mm (alguna de ellas)	pN1b.- Metástasis en ganglios mamarios internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente*
pN1bl.-Metást.1-3 ganglios,>0,2 cm/ < 2cm	pN1bl.- Excluida
pN1bll.-Metást.4 ó más gang>0,2 / < 2cm	pN1bll.- Excluida
pN1blll.-Metást.< 2cm y extensión extracapsular	pN1blll.- Excluida.
pN1bIV.-Metástasis (2 cm)	pN1bIV.- Excluida
pN1c.-Excluida.	pN1c.- Metástasis en 1 a 3 ganglios y en ganglios mamarios internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente* (la afectación mamaria interna asociada con más de 3 ganglios axilares afectados s eclasifica pN3b)
pN2.- Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales con fijación entre ellos o a otras estructuras.	pN2.- Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares, o en ganglios mamarios internos clínicamente aparentes * en ausencia de ganglios axilares afectados.
pN2a.-Excluida	pN2a.- Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral >0,2 cm
pN2b.-Excluida.	pN2b.- metástasis en ganglios mamarios internos clínicamente detectables* en ausencia de ganglios axilares detectados

pN3 .-Metástasis en ganglios mamaros internos	pN3 .-metástasis en 10 ó más ganglios axilares o en ganglios infraclaviculares o en ganglios mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables* en presencia de 1 o más ganglios axilares afectados; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópica en ganglios mamaros internos, clínicamente negativos, o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.
pN3a .-Excluida	pN3a .-Metástasis de 10 ó más ganglios axilares (con al menos un depósito tumoral > 0,2 cm) ó metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.
pN3b .-Excluida	pN3b .-Metástasis en ganglios mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables* en presencia de 1 ó más ganglios axilares afectados; o en más de 3 ganglios axilares y en ganglios de la mamaria interna con afectación microscópica detectada mediante disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente.
pN3c .-Excluida	pN3c .-Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
M1 .-Metástasis a distancia (incluida en ganglios supraclaviculares)	M1 .-Metástasis a distancia

* *clínicamente aparente, detectable: detectado por estudios de imagen (excluyendo linfoescintigrafía) o por examen clínico.*

Tabla 26.-Principales diferencias en el TNM entre la 5ª y 6ª edición¹⁷⁸

4.3.3.- Interpretación de resultados del estudio inmunohistoquímico.

Realizados por microscopio óptico. Se interpretan de manera similar los dos tipos de estudios IHQ realizados.

En la interpretación de la sobreexpresión de la proteína de HER 2 para estudio inmunohistoquímico, solamente debe ser evaluada la intensidad de la tinción de la membrana , siguiendo una gradación semicuantitativa en 0,1+,2+,3+. La tinción del citoplasma debe ser considerada como inespecífica, y por tanto no debe ser interpretada como positiva.

Interpretación de la tinción en el estudio IHQ de la sobreexpresión de C-erb-B2		
Patrón de Tinción	Valoración	Sobreexpresión de la proteína HER2
Ausencia de Tinción ,o tinción de membrana en menos del 10% de las células tumorales	0	Negativo
Una finísima tinción de membrana en más del 10% de las células tumorales. Las células están teñidas en sólo una pequeña parte de su membrana	1+	Negativo
Débil a moderada tinción de membrana en más del 10% de las células tumorales	2+	Débilmente positivo
Fuerte y completa tinción de membrana en más del 10% de las células tumorales	3+	Positivo Fuerte

Tabla 27.- Interpretación de la tinción inmunohistoquímica de la sobreexpresión de C-erbB2

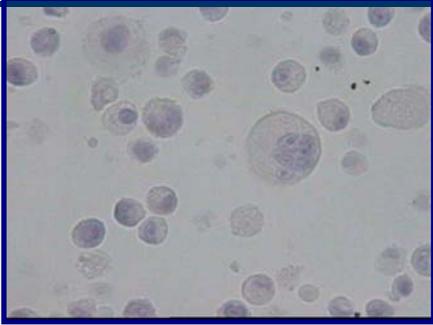
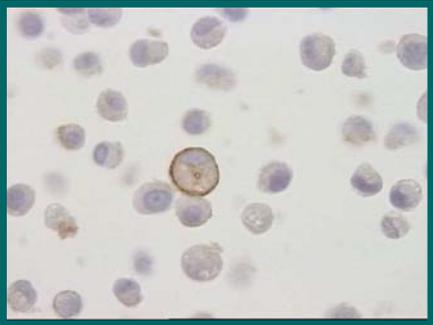
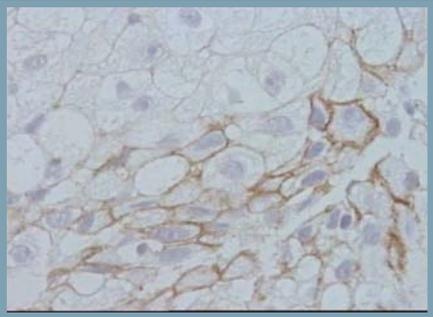
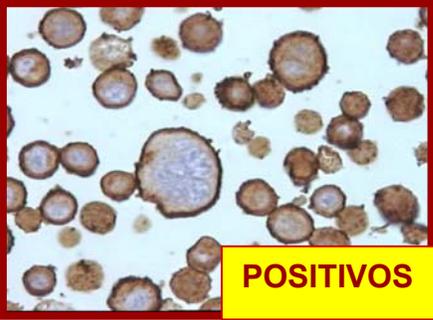
	<p>+ Tinción apenas perceptible ó >10% de células tumorales</p>
	<p>Ninguna tinción o <10% de las células tumorales</p>
	<p>++ De débil a moderada tinción En toda la membrana en >10% de las células tumorales</p>
	<p>+++ Tinción intensa en toda la membrana en >10% de las células tumorales</p>

Fig.31.- Interpretación del resultado inmunohistoquímico para CerbB2.

Cuando las técnicas inmunohistoquímicas están rigurosamente procesadas, se ha demostrado que existe una excelente correlación entre el status de amplificación génica y la sobreexpresión de la oncoproteína.

Como comentaré en la discusión, desde que la FDA aprobó el uso de Trastuzumab en cáncer metastásico de mama, la detección de CerbB2 se ha convertido en esencial; el primer test clínico aprobado por la FDA para la detección de la sobreexpresión de CerbB2 es el Dako Hercep Test. Sólo los resultados 3+ en este test se correlacionan con los resultados con trastuzumab en los ensayos clínicos; Scores 2+ no se correlacionarían del todo bien y se han demostrado insuficientes para este tipo de tratamientos, a menos que este resultado se confirme mediante técnicas de FISH. Es por este motivo, y con el fin de evitar sesgos, que en este trabajo nosotros consideramos como positivos únicamente los especímenes con 3+ en el estudio inmunohistoquímico, considerando negativo el resto de los resultados.

Para el resto de las variables estudiadas por inmunohistoquímica (P53, Ki67 y receptores de hormonas esteroideas) la interpretación de resultados es similar:

Variable	Lectura	Codificación
0 (Negativo)	No expresión	NEGATIVO
+ (Débil positivo)	<25% de expresión de las células tumorales	
++ (Moderado positivo)	25-75% de expresión	POSITIVO
+++ (Intenso positivo)	>75% de expresión	

Tabla 28.- Interpretación de resultados en estudio IHQ.

5.- VALORACIÓN DE RESULTADOS Y ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico de datos utilizamos el paquete estadístico **SPSS 11.5** para Windows.

5.1.-Determinación del tamaño muestral

Para la determinación inicial del tamaño muestral mínimo del estudio inicial univariante de CerbB2 consideramos como variables fundamentales :

- Valor de Ki-67
- Valor de p-53
- Número de ganglios afectados en estudio anatomopatológico.

La elección de estas variables así como su precisión absoluta se realizó basándonos en criterios clínicos.

Fijamos un error α del 5 % y un error β del 20 % (potencia estadística 80%), obteniéndose un tamaño muestral global de 50 mujeres, 25 para el grupo de mujeres con c-erb-B2 positivo y 25 para el grupo con c-erb-B2 negativo.

Para la realización de los modelos de regresión de riesgo proporcional de Cox, se debe utilizar un tamaño de muestra de 10 sujetos por cada variable predictora. En nuestro estudio el número de variables utilizadas para predecir las probabilidades de muerte o recidiva es 8 (tamaño tumoral, afectación linfática, componente comedo, CerbB2, Ki-67, P53, receptores de estrógenos, receptores de progesterona), por tanto, y haciendo uso de la regla $10(k+1)$, se estimó necesaria una muestra mínima de 90 pacientes.

5.2.-Exploración estadística de la información *(detección de observaciones outliers y extremas)*

Aunque se realizó una verificación de la información previa a la entrada de datos y durante la entrada de los mismos, se completó dicha verificación realizando una exploración estadística de la información, con métodos gráficos y analíticos que detectaron las observaciones erróneas.

5.3.-Análisis descriptivo *[determinación de tablas de frecuencias, medidas que resumen la muestra y representaciones gráficas]*

Se determinaron medias y desviaciones típicas o medianas y rangos intercuartílicos para las variables cuantitativas. Para las variables cualitativas se realizaron tablas de frecuencias y porcentajes. Cuando se consideró necesario, ya

que contribuía a clarificar los resultados, se construyeron representaciones gráficas según el tipo de información, cuantitativa o cualitativa.

5.4.-Test de independencia en tablas de contingencia

Para todas aquellas variables de tipo cualitativo se realizaron tests de Chi cuadrado o test exacto de Fisher, para el estudio de dependencia entre dos variables. Completamos el análisis con el cálculo, en caso de existir diferencias estadísticamente significativas, de medidas de asociación en tablas de contingencia.

5.5.-Prueba de T de Student y prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes *[Comparación de medias de variables cuantitativas en dos muestras independientes definidas por la variable CerbB2 (positivo y negativo) bajo los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas]*

Para el estudio de las variables cuantitativas en dos grupos independientes, se realizaron tests de comparación de medias T de Student o, en su defecto, la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, según se verificara o no el supuesto de normalidad. Así mismo, se determinaron intervalos de confianza para diferencias de medias del 95%.

5.6.-Coeficiente de correlación de Spearman

Versión no paramétrica del coeficiente de correlación de Pearson que se utilizó para analizar relaciones entre datos ordinales.

5.7.-Análisis de Kaplan-Meyer

Se obtuvieron las probabilidades de supervivencia, la media y mediana de supervivencia y los cuartiles. Se generaron estadísticos separados para cada grupo de variables y se representaron las funciones de supervivencia para cada uno de estos grupos.

El test Long-rang se utilizó para comparar la igualdad de distribuciones del tiempo de supervivencia global, el tiempo libre de enfermedad, y el tiempo libre de enfermedad a distancia.

5.8.-Análisis de regresión de Cox *(“obtención de una función lineal de un conjunto de variables independientes (factores pronósticos) que permitan estimar, en función del tiempo, la supervivencia, recaída local o a distancia”).*

La regresión de Cox se utilizó para crear modelos para datos de tiempos de espera hasta un evento (supervivencia, tiempo libre de enfermedad, y tiempo libre de enfermedad a distancia) cuando existen casos censurados. Se incluyeron en estos

modelos variables predictoras (covariables) tanto categóricas como continuas tales como edad, estado hormonal, tamaño tumoral clínico e histológico, adenopatías clínicas e histológicas, índice de mitosis, grado histológico (Bloom-Richardson), receptores estrogénicos, receptores de progesterona, Ki-67, P53. Para aquellas variables seleccionadas en el modelo se calcularon Odds ratio e intervalos de confianza del 95% para las mismas.

5.9.-Modelo de regresión de Cox con variables dependientes del tiempo (*“Obtención de una función lineal de un conjunto de variables independientes (factores pronósticos) algunas de las cuales tiempo-dependientes, que permitan estimar, en función del tiempo, la supervivencia, recaída local o a distancia”*).

En aquellas situaciones en las que el modelo de regresión de Cox no cumplió el supuesto de tasas de riesgos proporcionales se utilizó un modelo de regresión de Cox tiempo-dependiente con el que se determinaron estadísticos y gráficos similares a los del modelo de Cox.

5.10.-Análisis de conglomerados en dos fases

En algunas aplicaciones, se puede seleccionar como método el procedimiento Análisis de conglomerados en dos fases. Ofrece una serie de funciones únicas que se detallan a continuación: selección automática del número más apropiado de conglomerados y medidas para la selección de los distintos modelos de conglomerado. Posibilidad de crear modelos de conglomerado basados al mismo tiempo en variables categóricas y continuas. Posibilidad de guardar los modelos de conglomerado en un archivo XML externo y, a continuación, leer el archivo y actualizar el modelo de conglomerados con datos más recientes. Así mismo, el procedimiento Análisis de conglomerados en dos fases puede analizar archivos de datos de gran tamaño.

RESULTADOS

I.-ESTUDIO DESCRIPTIVO

1.- DATOS GENERALES

En un primer tiempo realizamos un estudio descriptivo para conocer la distribución general de nuestra muestra en función de variables de orden epidemiológico general, así como poner de manifiesto posibles sesgos derivados del proceso de selección de la misma.

El total de pacientes admitidas en nuestro estudio fue de 121, todas con diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante de mama entre Enero de 1999 y Enero del año 2001 sobre las cuales haremos la descripción muestral.

El tiempo de seguimiento, hasta Agosto del año 2004, es de 65 meses (5 años y 4 meses).

A continuación analizaremos cada una de las variables anteriormente descritas

1.1.-Edad de las pacientes.

Distribución de edades en la muestra. Medidas estadísticas

Media	62,72
Mediana	62,70
Varianza	199,344
Desviación estándar	14,11892
Minimo	32
Maximo	98
Rango	66

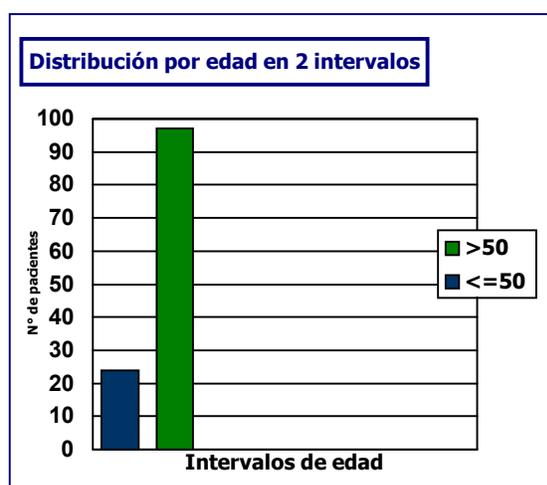
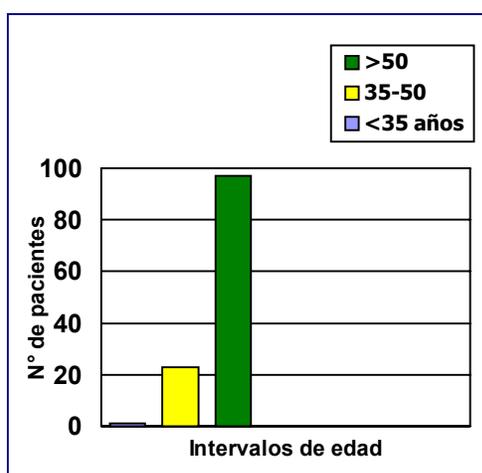
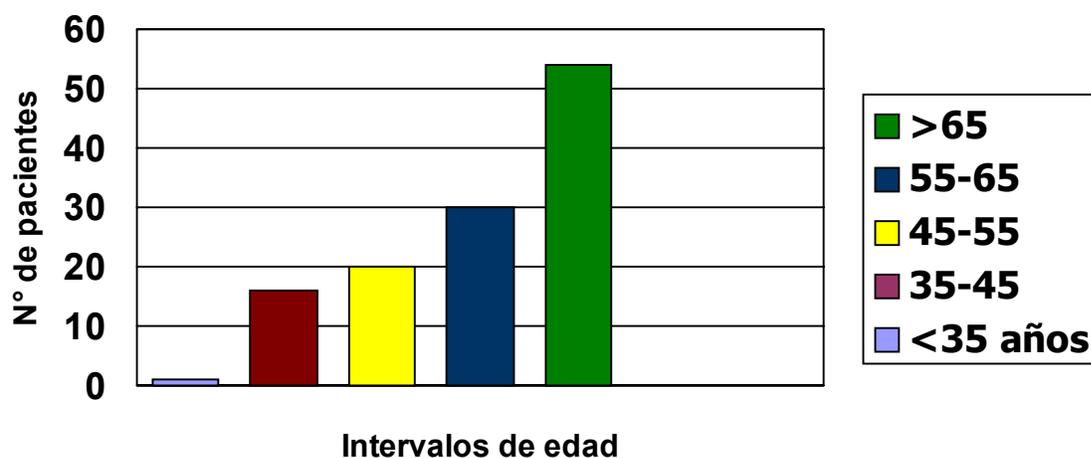
Tabla 29.-Distribución de edades en la muestra. Medidas estadísticas

La distribución por edades de nuestra muestra :

Grupo de edad	Frecuencia	Porcentaje
≤35 años	1	0,8 %
35-45 años	16	13,2 %
45-55 años	20	16,5%
55-65 años	30	24,8 %
> 65 años	54	43,8 %
TOTAL	120	100

Tabla 30.-Distribución de edades en la muestra. Frecuencias.

Distribución por edad



Graf.1,2,3.- Representación gráfica de la distribución de edades en la muestra.

Grupo de edad	Frecuencia	Porcentaje
≤35 años	1	0,8 %
35-50 años	23	19%
>50 años	97	80,16%

Grupo de edad	Frecuencia	Porcentaje
≤50 años	24	19,8 %
>50 años	97	80,16%

Tabla 30.-Distribución de edades en 3 intervalos Tabla 31.-Distribución de edades en 2 intervalos.

1.2-Paridad.

En cuanto al número de hijos de nuestras pacientes, las medidas estadísticas descriptivas son como siguen:

Variable	Mediana*	(P25,P75)
Paridad	2	(1,4)
Edad del primer hijo	25	(22,28)

*Las variables se han resumido por mediana y rango interpercentílico (P25,75) debido a su marcada asimetría

Tabla 33.-Mediana y rango interpercentílico según paridad y edad al primer hijo

1.3.-Lactancia materna.

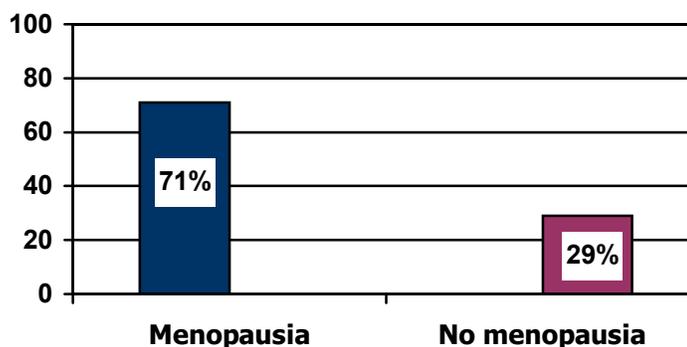
Recogimos el antecedente de lactancia materna, con el siguiente resultado:

- Si lactancia materna en el primer hijo: 63 pacientes: 69,2%
- No lactancia materna: 28 pacientes: 23,1%
- Perdidos: en 30 casos no recogido este antecedente :24,8%

1.4.-Menopausia.

Analizamos el número de pacientes en estado de menopausia frente a las no menopaúsicas con la siguiente distribución:

- Menopausia: 86 pacientes (71,1 %%)
- No menopausia: 35 pacientes (28,9 %)



Graf. 4.- Distribución de la muestra en función de menopausia

Vemos que en nuestra muestra el grupo de mujeres menopáusicas ocupa un altísimo porcentaje frente al total de la muestra poblacional en estudio.

1.5.-Antecedentes personales de cáncer.

Recogimos este dato para conocer si existía en algún caso la posibilidad de asociación tumoral en el contexto de síndromes multineoplásicos de origen genético. Obtuvimos los siguientes resultados:

- Sí: 4 pacientes (3,3%)
- No: 117 pacientes (96,7%)

De las cuatro pacientes con antecedente personal de cáncer, los tipos encontrados fueron:

- Ca. de mama: 2 pacientes
- CIN III: 1 paciente
- Ca. Epidermoide : 1 paciente

En los estudios preliminares desestimamos esta variable, puesto que ninguno de los casos anteriores se puede englobar dentro del cuadro descrito. En todos los casos descritos, se trataba de pacientes con antecedente no sincrónico de neoplasia, no relacionada con aumento de riesgo de padecimiento de cáncer de mama.

1.6.-Antecedentes familiares de cáncer.

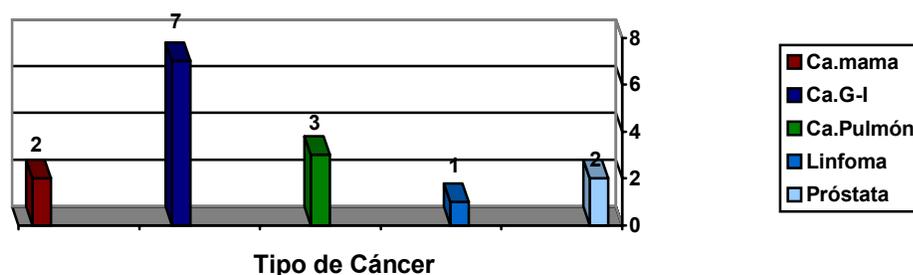
Tratamos de poner de manifiesto la existencia o no de “genotipo familiar cancerígeno” con el fin de poner de manifiesto la posibilidad de asociación familiar tumoral de origen genético. Encontramos los siguientes resultados:

- Sí: 38 pacientes (31,7%)
- No: 82 pacientes (67,8%)
- Perdidos : 1 caso

Desestimamos este dato porque al igual que en el caso anterior, analizando cada uno de los casos descritos, no encontramos ningún caso de asociación tumoral familiar que orientara hacia la posibilidad de un posible defecto genético.

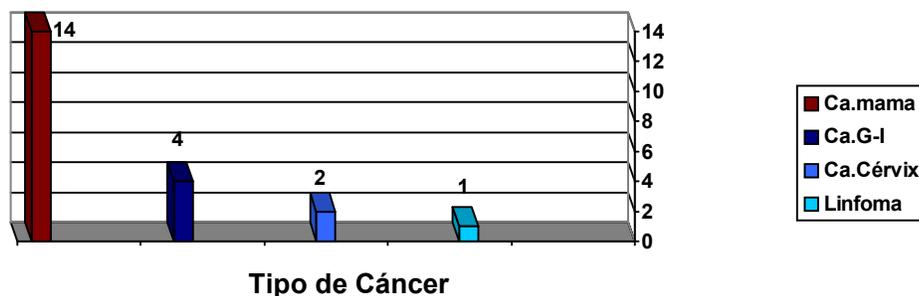
a).- Línea paterna:

Con antecedente de cáncer paterno (padre y abuelos paternos), encontramos 15 pacientes (12,4%), con los siguientes tipos de cáncer:



b).- Línea materna:

Con antecedente de cáncer en línea materna (madre y abuelos maternos) encontramos a 21 pacientes (17,5%), con la siguiente distribución por tipo de cáncer:



c) .- Hermanos:

Encontramos 10 pacientes con antecedente de cáncer en las hermanas (8,3%), todas ellas con cáncer de mama, y en 2 casos con ca. Bilateral de mama, y sólo 1 caso con antecedente de cáncer en un hermano (Ca. Pulmón).

2.- HALLAZGOS SENOGRÁFICOS

Analizamos las imágenes senográficas halladas en la senografía prequirúrgica realizada a las pacientes. El hallazgo más frecuente fue de nódulo con características radiológicas malignas.

Las imágenes senográficas halladas fueron:

Imagen senográfica	Frecuencia	Porcentaje
ADA*	16 casos	13,2%
Nódulos	70 casos	58,7%
Microcalcificaciones	9 casos	7,5%
Nódulo + microcalcificaciones	16 casos	13,2%
Quiste complejo	1 caso	0,8%
LEC**	7 casos	5,8%

- *ADA: Area de densidad asimétrica o Asimetría
- **LEC: Lesiones esclerosantes complejas ó cicatrices radiales

Tabla 34.-Hallazgos senográficos

Las lesiones fueron palpables en un 46 % de los casos, practicándose en estos casos Biopsia Intraoperatoria. En el resto de los casos, las lesiones no fueron

palpables, precisando por lo tanto Localización prequirúrgica mediante arpon radiológico (LPQ) (en el caso de lesiones BIRADS IV, lo que supuso el 96% de los casos) o Biopsia con Aguja gruesa en las escasas imágenes clasificadas como BIRADS III, que fueron sobre todo microcalcificaciones.

Se observaron nódulos adenopáticos en la senografía en únicamente 8 pacientes, lo que supone el 6,6% de los casos.

3.- TNM

En nuestra muestra la distribución según la clasificación clínica TNM(Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) en su quinta edición de la clasificación TNM de tumores malignos, "TNM Classification of malignant tumours.5th Ed. LH Sabin and Ch Wittekind (editors). Wiley- Liss, Inc. (New York), 1997) es como sigue a continuación:

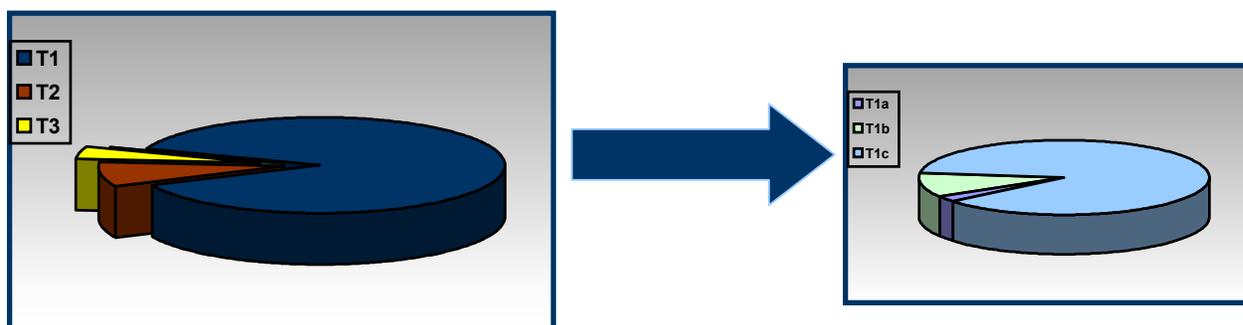
T1		T2		T3	
Nº casos	%	Nº casos	%	Nº casos	%
106 casos	87,60%	10 casos	8,26%	5 casos	4,13%

Tabla 35.-Distribución según tamaño tumoral.

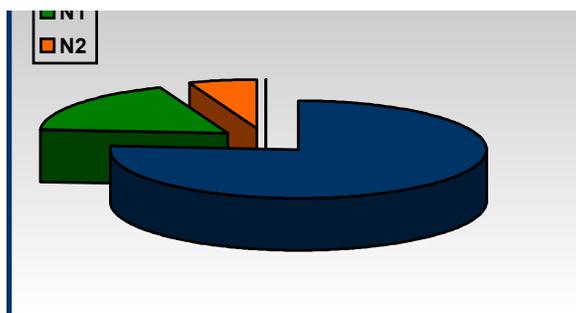
Dentro de los tumores T1:

pT1a	pT1b	pT1c
3 casos	12 casos	101 casos

Tabla 36.-Distribución de tumores T1



Respecto al hallazgo clínico de adenopatías, según la clasificación TNM:



Graf.7.-Distribución según hallazgo clínico de adenopatías

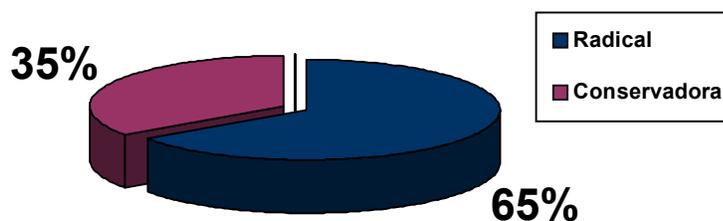
N0		N1		N2	
Nº casos	%	Nº casos	%	Nº casos	%
92 casos	76 %	22 casos	18,2%	7 casos	5,8%

Tabla 37.-Hallazgo clínico de adenopatías

M: M0=121 (100%)

4.- CIRUGÍA

En cuanto al tratamiento quirúrgico de las pacientes, se realizó cirugía radical (Mastectomía total radical modificada tipo Madden) en 79 casos (65,3%), optándose por cirugía conservadora en 42 casos (34,7%).



Se realizó linfadenectomía en todos los casos.

En cuanto al número de ganglios obtenidos en cirugía en la linfadenectomía axilar, la mediana fué 14 siendo el rango interpercentílico P_{25} , P_{75} de (10.5 , 17).

Distribución según el tipo de cirugía realizada		
Ganglios aislados	14	(10.5, 17)

*La variable ganglios aislados se han resumido por mediana y rango interpercentílico (P_{25}, P_{75}) debido a su marcada asimetría

Tabla 38.-Mediana y rango interpercentílico respecto a ganglios aislados

5.- ANATOMIA PATOLOGICA

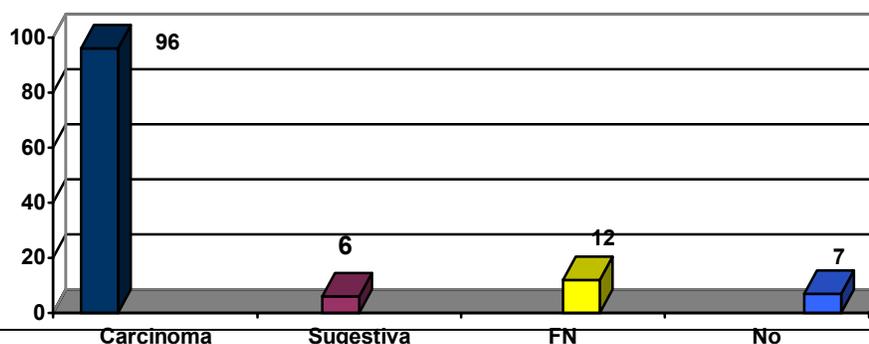
A continuación, analizaremos aquellas variables recogidas relacionadas con el estudio anatomopatológico de la muestra.

5.1.-Punción-aspiración con aguja fina (PAAF).

Excepto en 6 casos en los que se consideró de entrada la realización de biopsia quirúrgica, en todos los casos restantes la PAAF fue un arma diagnóstica fundamental, con la que se obtuvieron los siguientes diagnósticos tras estudio histológico de la muestra obtenida:

- Carcinoma: 96 casos (80%)
- Sugestiva de malignidad: 6 casos (5%).
- Falsos negativos: 12 (10%)
- No realizada (arpón, biopsia diferida): 7 (5,7%).

La representación grafica de estos datos sería:



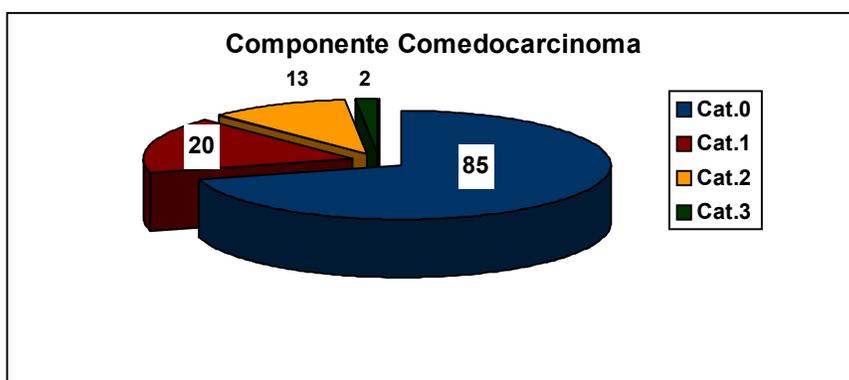
5.2.-Tipo histológico.

En el 100% de los casos, y con el fin de evitar sesgos de selección , se trata de carcinomas ductales infiltrantes de mama.

5.3.-Componente comedocarcinoma.

Sabiendo la relación que parece existir entre el porcentaje de componente de comedocarcinoma respecto al total de la masa tumoral, en cuanto a la agresividad tumoral se refiere, recogimos este dato, con los siguientes resultados:

- Categoría 0: sin componente comedo: 85 casos(70,8%)
- Categoría 1: <25%: 20 casos (16,7%)
- Categoría 2: 25-50%: 13 casos (10,8%)
- Categoría 3:>50%: 2 casos (1,7%).



Graf.10.- Componente comedocarcinoma

5.4.-Grado histológico. Score Bloom-Richardson.

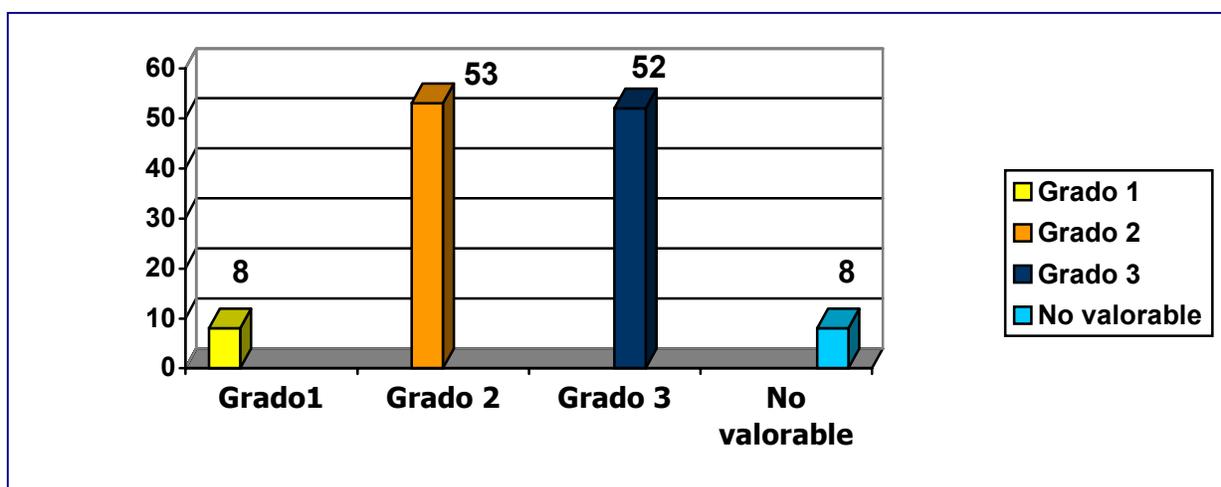
Siguiendo en la línea de estudio anatomopatológico de la pieza tumoral, describimos a continuación la muestra en función de la puntuación obtenida en el Score de Bloom- Richardson (3-9).

La mediana de esta variable es 7 con un rango interpercentílico P_{25} , P_{75} de (5,8).

Reclasificamos esta variable en función del Grado histológico basado en la clasificación de Elston- Ellis¹⁷⁹ según la cual:

	Bajo Grado	Grado intermedio	Alto grado
Score Bloom-Richardson	1-3	3-6	6-9
Grado histológico de Elston-Ellis	Grado 1	Grado 2	Grado 3

Tabla 39 .-Reclasificación del Score Bloom-Richardson en grados histológicos



Graf 11.-Distribución en función del grado histológico

Como veremos posteriormente en el apartado que corresponde al estudio epidemiológico analítico, debido a la gran dispersión de datos obtenida, será necesario redefinir esta variable con el fin de agrupar la muestra para poder obtener datos comparables con nuestra variable principal.

6.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

6.1.-Receptores hormonales:Estrógenos / Progesterona.

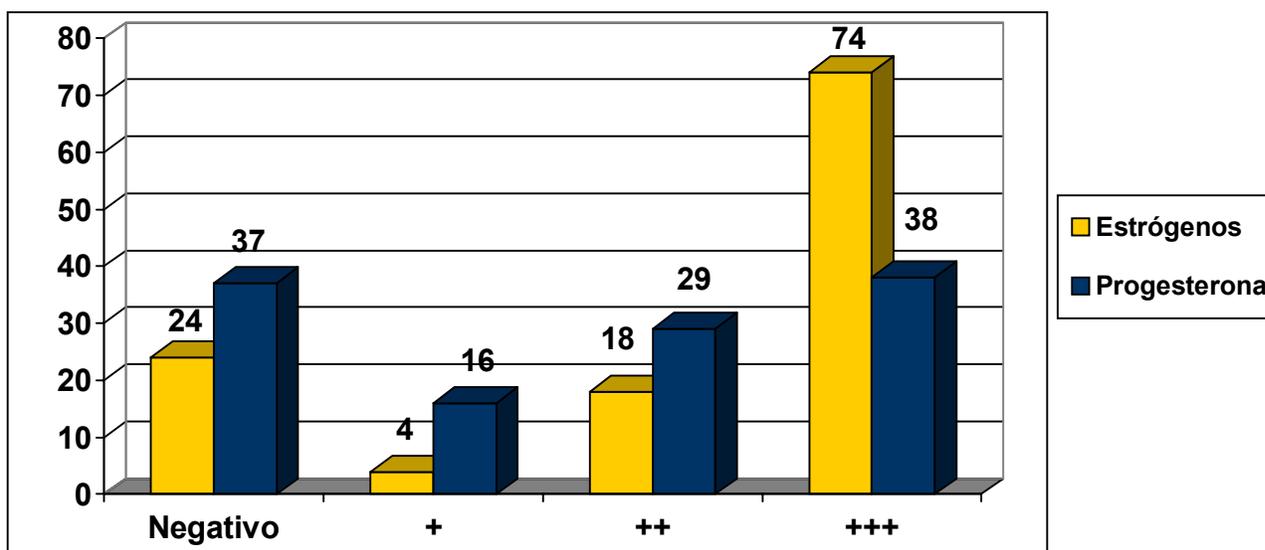
En cuanto al estudio hormonal de la pieza quirúrgica, y ante la posibilidad de relación entre agresividad tumoral y positividad o negatividad de los mismos, describimos la muestra en función de la cuantificación positiva o negativa de los receptores hormonales habituales en el estudio del cancer de mama.

	Negativo		Positivo débil (+)		Positivo moderado (++)		Positivo intenso (+++)	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Receptores Estrógenos	24	20%	4	3,3%	18	15%	74	61,7%
Receptores Progesterona	37	30,8%	16	13,3%	29	24,2%	38	31,7%

* 1 caso no valorable para ambas variables

Tabla 40.-Distribución según el estudio de receptores esteroideos.

La representación conjunta de ambas variables según su distribución muestral, sería la siguiente:



Graf 12.- Representación de expresión de receptores de hormonas esteroideas

6.2.-p53.

El resultado del análisis estadístico de esta variable desde un punto de vista descriptivo fue:

Variable	Mediana*	(P25,P75)
p53	11	(6.5,36.25)

*La variable p53 se han resumido por mediana y rango interpercentílico (P25,75) debido a su marcada asimetría

Tabla 41.-Mediana y rango interpercentílico de p53

Recordando que la medida por métodos inmunohistoquímicos de p53 la interpretamos según el porcentaje de expresión en las células tumorales de la siguiente manera, recodificamos la variable para conseguir mayor agrupación para la aplicación de métodos estadísticos analíticos:

p53	Lectura	Codificación
0 (Negativo)	No expresión	NEGATIVO
	<25% de expresión de las células tumorales	
++ (Moderado positivo)	25-75% de expresión	POSITIVO
+++ (Intenso positivo)	>75% de expresión	

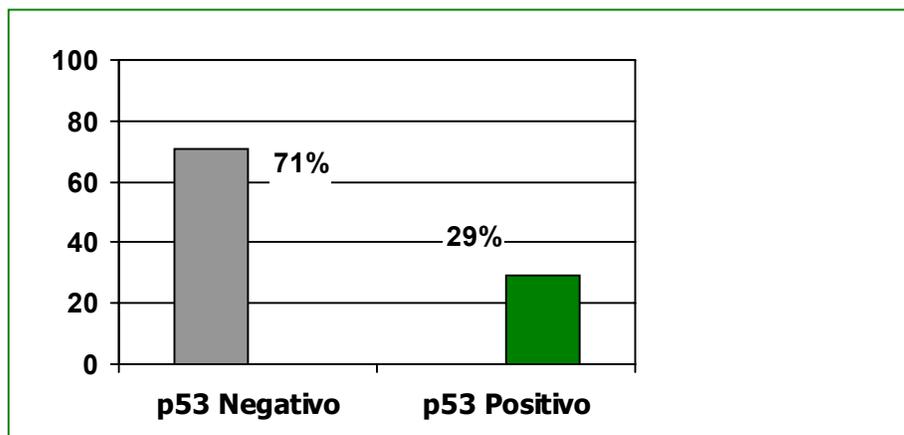
Tabla 42.-Recodificación de p53 en la muestra

De esta manera, agrupamos la variable p53 en estos dos intervalos (positivo y negativo):

p53	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
NEGATIVO	78	64,5%	70,9%
POSITIVO	32	26,4%	29,1%
No valorable	11	9,1%	

Tabla 43.-Distribución según remodelación dep53

La representación gráfica:



Graf 13.-Representación de P53 en función de positividad o negatividad en remodelación.

6.3.-Ki-67.

El resultado del análisis descriptivo de esta variable:

Variable	Mediana*	(P25,P75)
Ki-67	15	(5.5,30)

*La variable p53 se han resumido por mediana y rango interpercentílico (P25,75) debido a su marcada asimetría

Tabla 44.- Mediana y rango interpercentílico de Ki 67

Al igual que la variable anterior recodificamos esta variable:

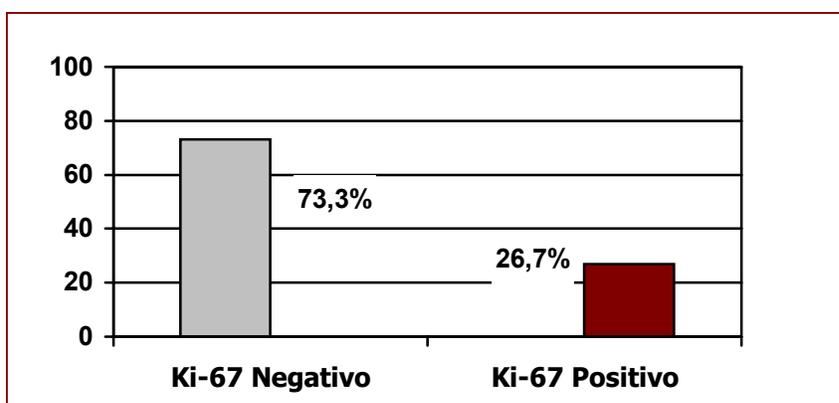
Ki-67	Lectura	Codificación
0 (Negativo)	No expresión	NEGATIVO
+ (Débil positivo)	<25% de expresión de las células tumorales	
++ (Moderado positivo)	25-75% de expresión	POSITIVO
+++ (Intenso positivo)	>75% de expresión	

Tabla 45.-Recodificación de Ki 67 en la muestra

En nuestra muestra, la distribución de la variable Ki-67:

Ki-67	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
NEGATIVO	85	70,2%	73,3%
POSITIVO	31	25,6%	26,7%
No valorable	5	4,1%	

Tabla 46.-Distribución según remodelación de Ki67



Graf 14.-Representación de Ki67 en función de positividad o negatividad en recodificación

6.4.-C-erbB2.

Según los grupos establecidos por el resultado inmunohistoquímico en cuanto a el grado de positividad o negatividad de las células del tejido tumoral para el c-erb-B2, clasificamos en categorías en un primer tiempo esta variable tal y como sigue a continuación:

--	--	--	--

C-erb-B2	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Válido
- (negativo)	55	45,5%	46,6%
+ Débil positivo	13	10,74%	11%
++ Moderado positivo	10	8,26%	8,47%
+++ Intenso positivo	40	33,1%	33,9%
No valorables	3	2,5%	

Tabla 47.-Distribución según grado de positividad de CerbB2

Al no aplicar técnicas de FISH en los moderados positivos, consideramos como positivos únicamente los casos que expresan C-erb-B2 en más del 75% de las células tumorales.

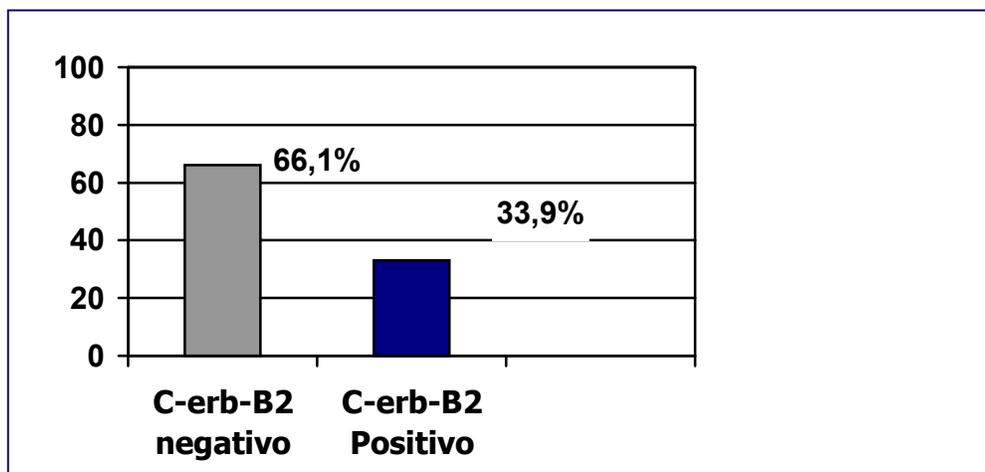
C-erb-B2	Lectura	Codificación
0 (Negativo)	No expresión	NEGATIVO
+ (Débil positivo)	<25% de expresión de las células tumorales	
++ (Moderado positivo)	25-75% de expresión	
+++ (Intenso positivo)	>75% de expresión	POSITIVO

El resultado de esta recodificación:

C-erb-B2	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Negativo	78	64,5%	66,1%
Positivo	40	33,1%	33,9%
No valorable	3	2,5%	

Tabla 49.-Distribución según remodificación de CerbB2

Representado en una gráfica:



Graf 15.-Representación deCerbB2 en función d positividad o negatividad en recodificación

7.- TRATAMIENTO ADYUVANTE

7.1.-Quimioterapia Adyuvante.

Se aplicaron los siguientes esquemas de quimioterapia adyuvante:

Quimioterapia	Frecuencia	Porcentaje
CMF	42	34,7%
CAF	6	5%
Antraciclinas+taxol	17	14%
Epirubicina+Genoxal	11	9,1%
NO	45	37,2%

Graf 16.-Quimioterapia adyuvante

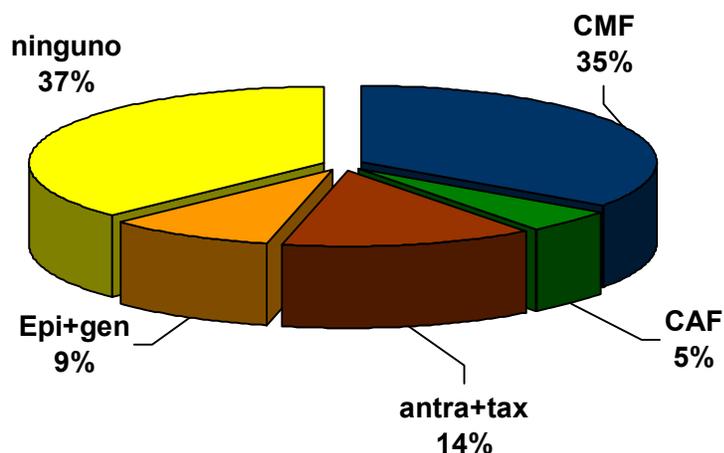
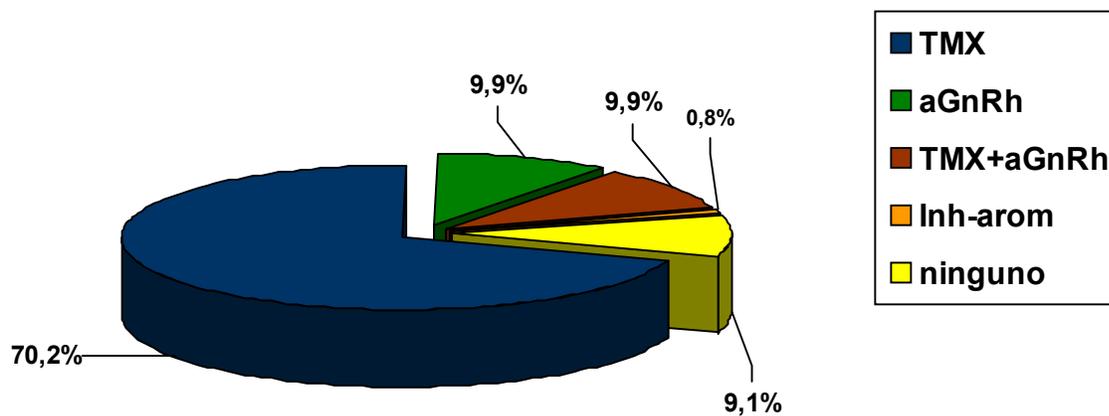


Tabla 50.-Quimioterapia adyuvante

7.2.-Hormonoterapia.

Hormonoterapia	Frecuencia	Porcentaje
Tamoxifeno	85	70,2%
Análogos GnRh	12	9,9%
Tamox+ GnRh	12	9,9%
Inhibidores aromatasa	1	0,8%
Ninguno	11	9,1%

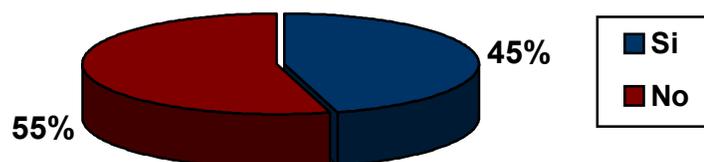
Tabla 51.- Hormonoterapia



Graf.17.- Hormonoterapia

7.3.-Radioterapia.

Recibieron radioterapia 55 pacientes (45,6%).



Graf.18.-Radioterapia

8.-Evolución

- 65 meses (5 años y 4 meses);
- Seguimiento medio de las pacientes: 42,38 meses (3 años y 5 meses);
- Fecha última revisión de las pacientes: Agosto-2004.
- Rango de seguimiento: 65-42 meses

II.-ESTUDIO ANALÍTICO I. CerbB2 en cáncer de mama

1.- SOBREEXPRESIÓN DE CERBB2 EN RELACIÓN A OTROS FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA.

1.1.-Cerb-B2 y menopausia

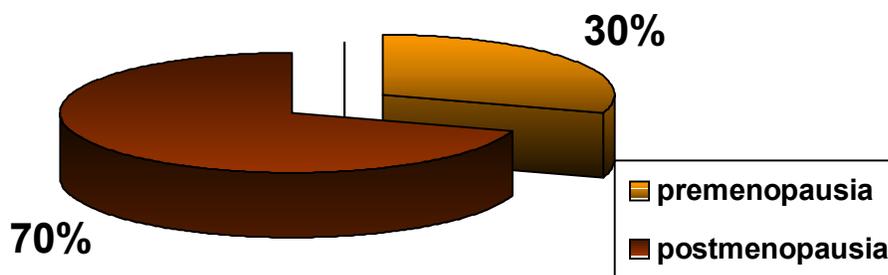
Usamos tablas de contingencia para analizar si existen diferencias significativas en cuanto al valor de c-erb-B2 y el estado menopáusico o no de las pacientes.

			MENOPAUSIA		TOTAL
			NO	SI	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	10		40
		%c-erbB-2 definido como +/-		75.0%	100.0%
		% menop	28,6%	36,1%	33,9%
		% del total	8,5%	25,4%	33,9%
	NEGATIVO	Recuento	25	53	78
		% c-erbB-2 definido como +/-	32,1.0%	67,9%	100%
		% menop	71,4%	63,9%	66,1%
		% del total	21,2%	44,9%	66,1%
TOTAL	Recuento	35	83	118	
	% c-erbb-2 definido como +/-	29,7%	70,3%	100%	
	% menop	100%	100%	100%	
	% del total	29,7%	70,3%		

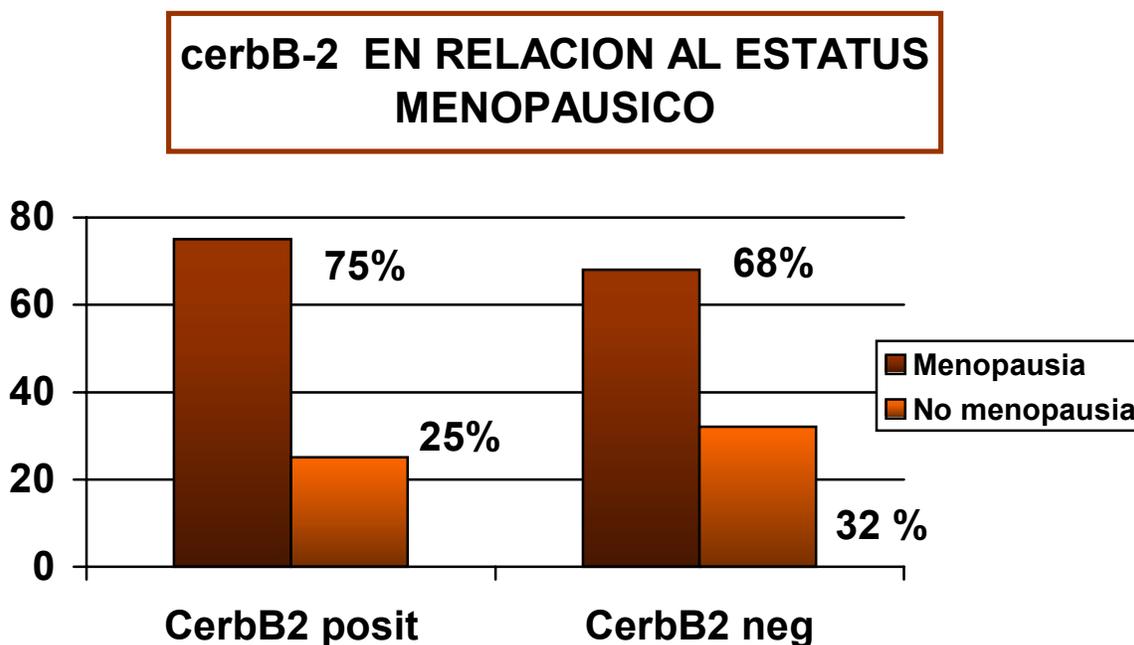
Tabla 52.-CerbB2 y Status menopáusico.

Observamos que en nuestra muestra el 70,3% de las pacientes son postmenopáusicas, contando en este grupo con porcentajes superiores de pacientes con tumores con C-erb-B2 positivo (un 36,1% de los casos en comparación con el 28,6%).

La representación gráfica de estos hallazgos:



Graf.19.- Distribución en función del status menopáusicos



Graf.20.-CerbB2 en relación a estatus menopáusicos

Pruebas de chi-cuadrado

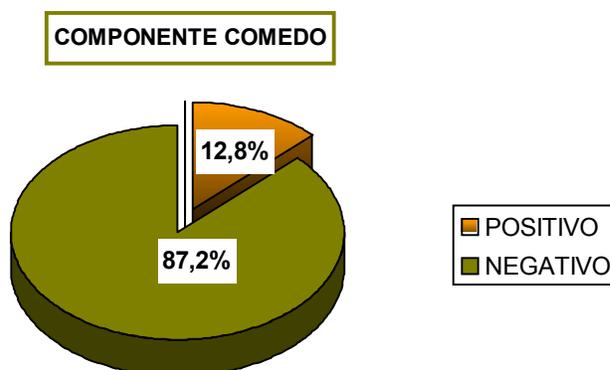
En este caso aplicamos corrección por continuidad con significancia de **0,561** (no diferencias estadísticamente significativas).

1.2.-Cerb-B2 en relación a datos histológicos1.2.1.- CerbB2 2n relación al componente comedocarcinoma del tumor.

Redefinimos la variable "componente comedo", considerando como negativos, aquellos tumores con componente de comedocarcinoma en estudio anatomopatológico igual o menor al 25% de la masa tumoral, y positivos el resto.

Redefinición de la variable "componente comedo"	
Ausencia de componente comedo	NEGATIVO
Componente comedo <25%	NEGATIVO
Componente comedo 25-50%	POSITIVO
Componente comedo >50%	POSITIVO

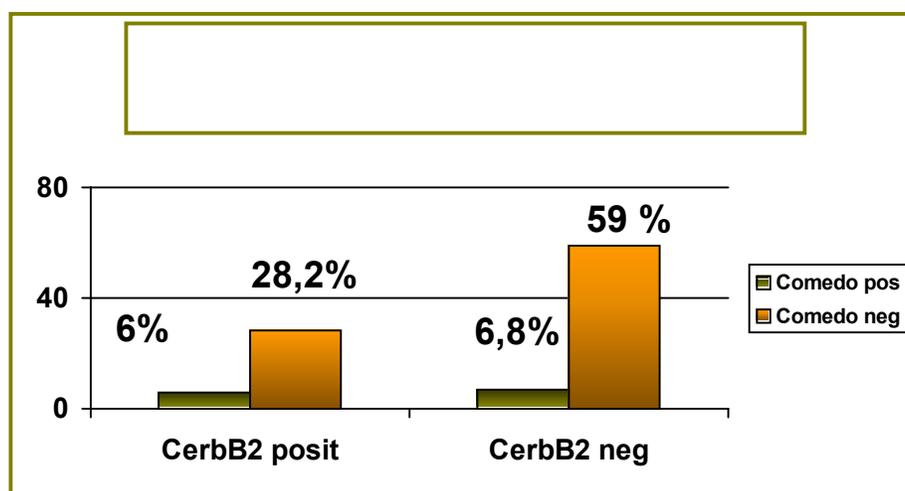
Tabla 53.- Remodificación de variable componente comedocarcinoma



Graf.21.- Componente comedocarcinoma.

			COMPONENTE COMEDO		TOTAL
			POSITIVO	NEGATIVO	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	7	33	40
		%c-erbB-2 definido como +/-			100.0%
		%componente comedo	46.7%		34.2%
		% del total	6.0%	28.2%	
	NEGATIVO	Recuento	8		77
		% c-erbB-2 definido como +/-	10.4%		100%
		%componente comedo	53.3%	67.6%	65.8%
		% del total	6.8%	59.0%	65.8%
TOTAL	Recuento	15		117	
	% c-erbB-2 definido como +/-	12.8%	87.2%	100%	
	%componente comedo	100%	100%	100%	
	% del total	12.8%	87.2%	100%	

Tabla 54.- Relación entre expresión de CerbB2 y componente comedocarcinoma



Graf.22.- Relación entre CerbB2 y componente comedocarcinoma

Prueba de chi-cuadrado

Realizamos:

- **Chi-cuadrado de Pearson 1,191**
- **Corrección de continuidad (p=0,424)**
- Razón de verosimilitud
- Test exacto de Fisher
- Asociación lineal por lineal

Sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambas variables.

1.2.2.- C-erbB2 en relación a Score Bloom-Richardson

Enfrentamos ambas variables para comprobar si en nuestra muestra la agresividad tumoral medida en grados del Score Bloom-Richardson se correlaciona con mayor porcentaje de tumores C-erb-B2 positivos.

El Score Bloom-Richardson lo enfrentamos a C-erb-B2 reclasificado según el grado histológico de Elston-Ellis, según explicamos anteriormente.

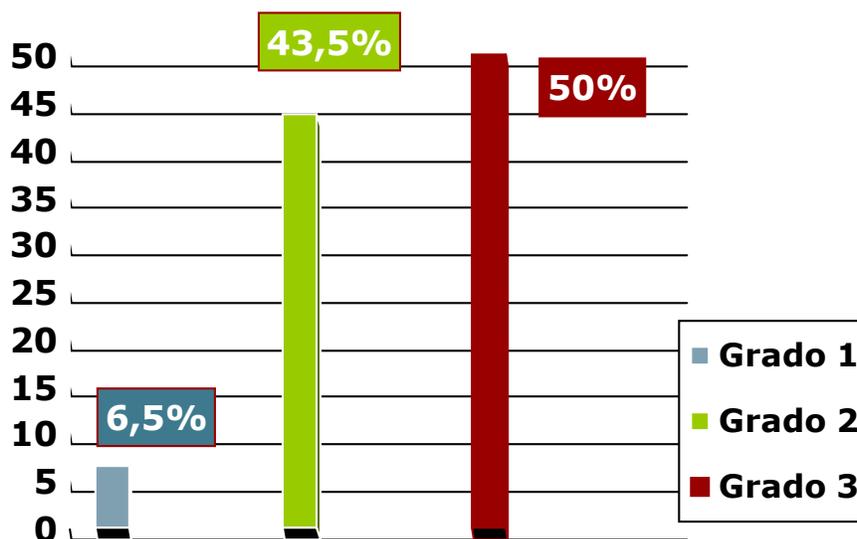
Redefinición de la variable "Bloom-Richardson"	
B-R Bajo grado (0-3)	Grado 1
B-R Grado intermedio (4-6)	Grado 2
B-R Alto grado (7-9)	Grado 3

Tabla 55.- Recodificación de grados histológicos.

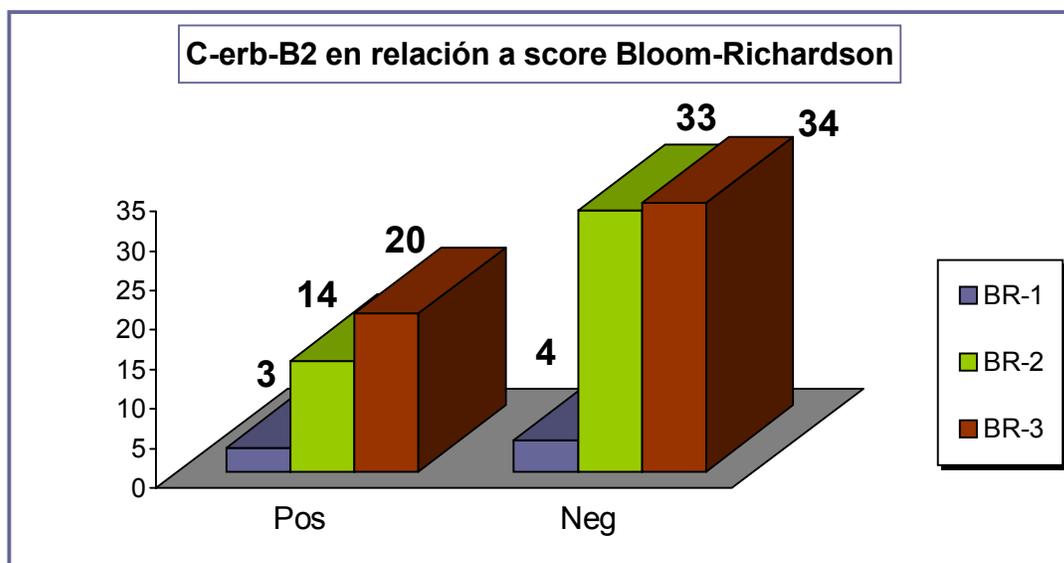
Expresamos la relación entre positividad y negatividad para el c-erb-B2 y el grado (1-2-3) recodificado para el Score Bloom-Richardson.

			Variable Score BR recodificada			TOTAL
			1	2	3	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	3	14	20	
		%c-erbB-2 definido como +/-	8.1%%	37.8%	54.1%	100.0%
		% Score BR	42.9%	29.8%	37.0%	34.3%
		% del total	2.8%		18.5%	
	NEGATIVO	Recuento	4	33	34	71
		% c-erbB-2 definido como +/-	5.6%	46.5%	47.9%	100%
		% Score BR	57.1%	70.2%	63.0%	65.7%
		% del total	3.7%	30.6%	31.5%	
TOTAL	Recuento	7	47	54	108	
	% c-erbB-2 definido como +/-	6.5%	43.5%	50.0%	100.0%	
	% Score BR	100%	100%	100%	100.0%	
	% del total	6.5%	43.5%	50.0%		

Tabla 56.- Relación entre sobreexpresión de CerbB2 y Grado histológico



Graf.23.- Distribución de la muestra en función del grado histológico



Graf.24.-CerbB2 en relación al grado histológico

Aplicando los test estadísticos correspondientes, no encontramos diferencias estadísticamente significativas que correlacionen grado histológico y expresión de CerbB2 en nuestra muestra de pacientes:

	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	0,832	0,660

Tabla 57.- Aplicación de test estadísticos entre CerbB2 y variable Grado histológico.

1.2.3.- CerbB2 en relación a número de ganglios afectados en el estudio anatomopatológico.

En un primer tiempo, realizamos estadística descriptiva mediante estadísticos descriptivos que nos definan la variable ganglios afectos en anatomía patológica, obteniendo una media de 1.21 ganglios metastáticos en el momento de la cirugía con marcada asimetría:

	N			
metastáticos	50	0	1.21	2,80

Tabla 58.- Descripción de ganglios afectados en estudio histológico

En un segundo tiempo, redefinimos la variable “ganglios afectados en estudio anatómico-patológico” como sigue,

- Sin afectación metastásica: Categoría 1
- Con afectación metastásica: Categoría 2

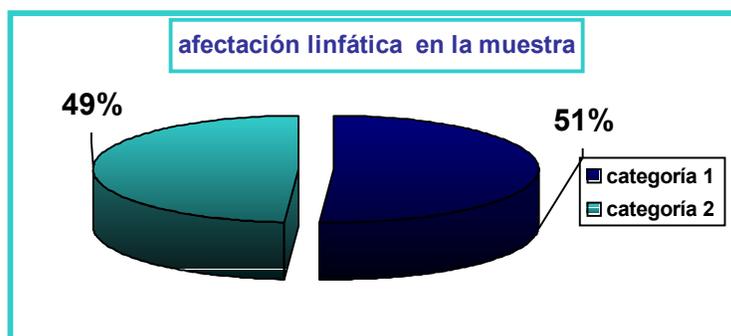
Veremos como en un segundo tiempo redefiniremos la variable afectación metastásica en nuevas categorías.

Relacionamos dicha variable y la expresión de cerb-B2 para poner de manifiesto diferencias estadísticamente significativas, expresándolo en tablas de contingencia:

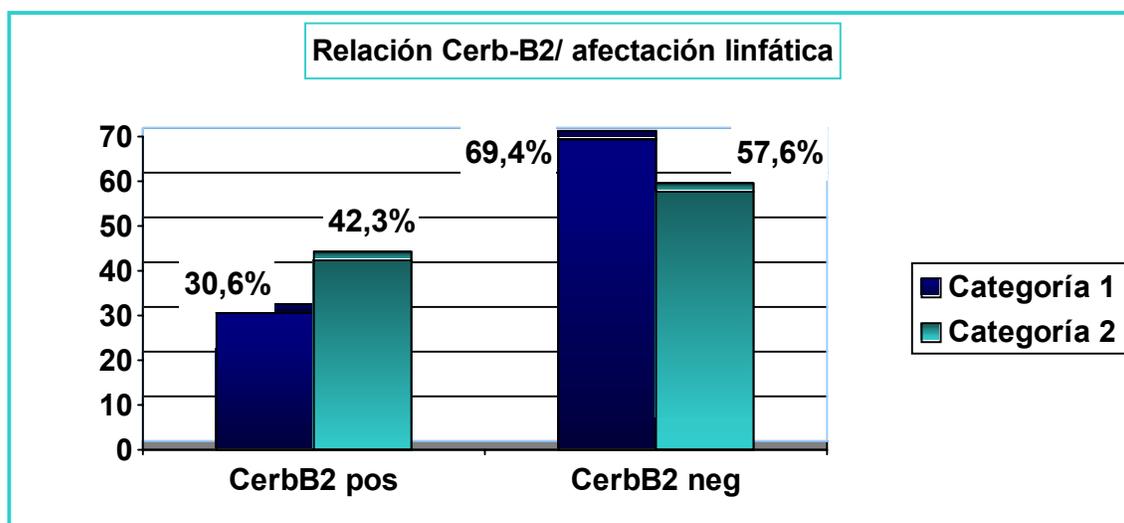
			dicotomizado		TOTAL	
			POSITIVO	NEGATIVO		
E X P R E S A D O	CATEGORIA 1	Recuento		43	62	
		% ganglios metastasicos	30,6%	69,4%	100.0%	
	CATEGORIA 2	Recuento	25	34	59	
		% ganglios metastasicos		57,6%	100%	
	TOTAL		Recuento		77	121
			% ganglios Metastasicos			100%

Tabla 59.- Relación entre ganglios metastásicos y expresión de CerbB2

Observamos una tendencia consistente en mayor número de pacientes axila positiva que a su vez son CerbB2 positivos y mayor número de pacientes axila negativa en pacientes CerbB2 negativos; sin embargo, al aplicar los correspondientes test estadísticos, la diferencia no es estadísticamente significativa.



Graf.25.- Afectación linfática de la muestra.



Graf.26.-Relación entre afectación linfática y expresión de CerbB2

Aplicando los correspondientes Tests estadísticos:

	Valor	Sig.asint. (bilateral)	Sig. Exacta (bilateral)	Sig.exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,730	0,391		
Razón de verosimilitud	0,439	0,508		
Corrección de continuidad(a)	0,735	0,391		
Test de Fisher			0,438	0,254
Asociación lineal por lineal	0,729	0,284		

Tabla 60.- Aplicación de test estadísticos relacion CerbB2 y número de ganglios

No obtenemos diferencias estadísticamente significativas.

2.- SOBREEXPRESIÓN DE CERBB2 Y ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

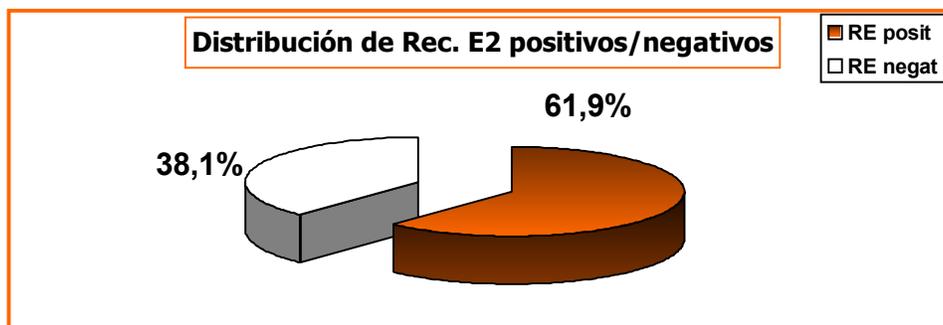
2.1-Cerb-B2 y receptores hormonales

2.1.1. C-erb-B2 y receptores estrogénicos

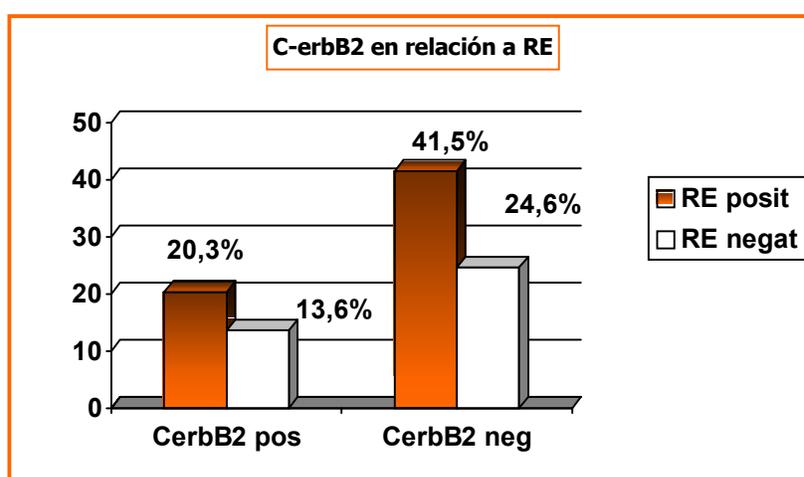
Expresamos en tablas de contingencia la relación entre c-erbB-2 definido como positivo o negativo y los receptores estrogénicos en el tejido tumoral definidos así mismo como positivos o negativos según expusimos en el estudio descriptivo:

			RECEPTORES ESTROGÉNICOS		TOTAL
			POSITIVO	NEGATIVO	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	24	16	40
		%c-erbB-2 definido como +/-	60%	40%	100.0%
		% receptores estrogénicos	32.9%	35.6%	33.9%
		% del total	20.3%	13.6%	33.9%
	NEGATIVO	Recuento	49	29	78
		% c-erbB-2 definido como +/-	62.8%	37.2%	100%
		% receptores estrogénicos	67.1%	64.4%	66.1%
		% del total	41.5%	24.6%	66.1%
	TOTAL	Recuento	73	45	118
		Frec esperada			
% c-erbb-2 definido como +/-		61.9%		100%	
% receptores estrogénicos			100%	100%	
% del total		61.9%		100%	

Tabla 61.- Relación entre CerbB2 y receptores de estrógenos.



Graf.27.- Distribución de la muestra en función de receptores de estrógenos



Graf.28.- Relación entre CerbB2 y expresión de receptores de estrógenos.

Observamos una mayor agrupación de tumores con receptores estrogénicos positivos en el grupo de C-erb-B2 negativos. Al aplicar las pruebas estadísticas:

Variable Rc.Estrógenos	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	0,089	0,765
Corrección por continuidad	0,010	0,922

Tabla 62.- Resultados χ^2

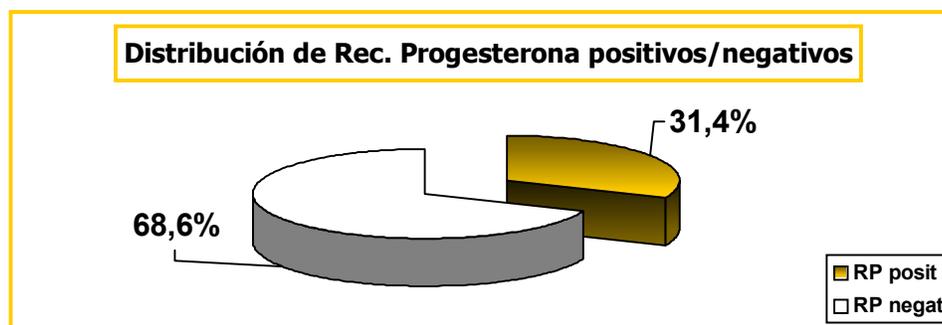
Sin encontrar asociación estadísticamente significativa entre ambas variables.

2.1.2.- c-erb-B2 en relación a receptores de progesterona

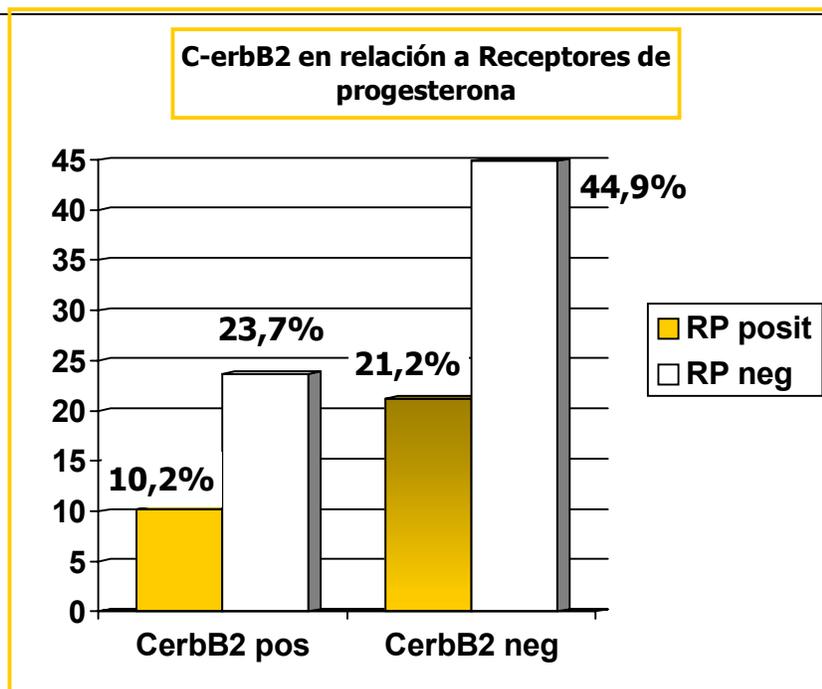
Redefinimos la variable “receptores de progestágenos” (RP) en positivos y negativos como expusimos en el estudio descriptivo, y estudiamos la distribución de esta variable en nuestra muestra en relación a C-erb-B2:

			RECEPTORES DE PROGESTERONA		TOTAL
			POSITIVO	NEGATIVO	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	12	28	40
		%c-erbB-2 definido como +/-	30.0%	70.0%	100.0%
		% receptores progesterona	32.4%	34.6%	33.9%
		% del total	10.2%	23.7%	33.9%
	NEGATIVO	Recuento	25	53	78
		% c-erbB-2 definido como +/-	32.1%	67.9%	100%
		% receptores progesterona	67.6%	65.4%	66.1%
		% del total	21.2%	44.9%	66.1%
TOTAL	Recuento	37	81	118	
	% c-erbb-2 definido como +/-	31.4%	68.6%	100%	
	% receptores progesterona		100%	100%	
	% del total	31.4%	68.6%	100%	

Tabla 63.- Relación entre receptores de progesterona y CerbB2.



Graf.29.-Distribución en la muestra según positividad de receptores de progesterona



Graf.30.-Relación entre C-erbB2 y Receptores de progesterona

Aplicando los estadísticos de contraste:

Variable Rc.Progesterona	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	0,052	0,820
Corrección por continuidad	0,000	0,986

Tabla 64.- Resultado de test estadísticos

Sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

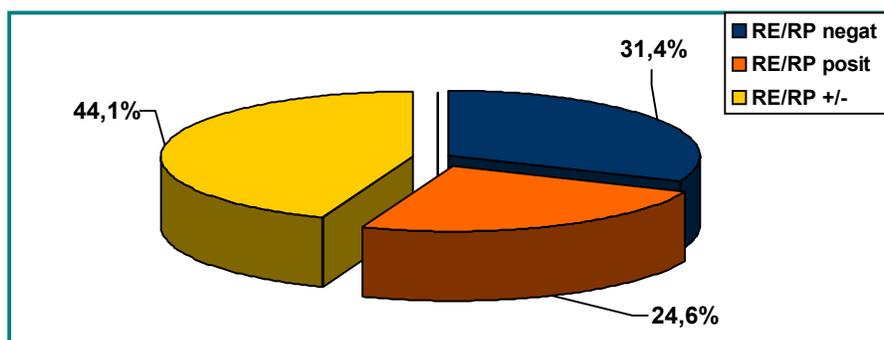
2.1.3.-Coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona

Relacionamos la coexpresión de receptores hormonales de la siguiente manera:

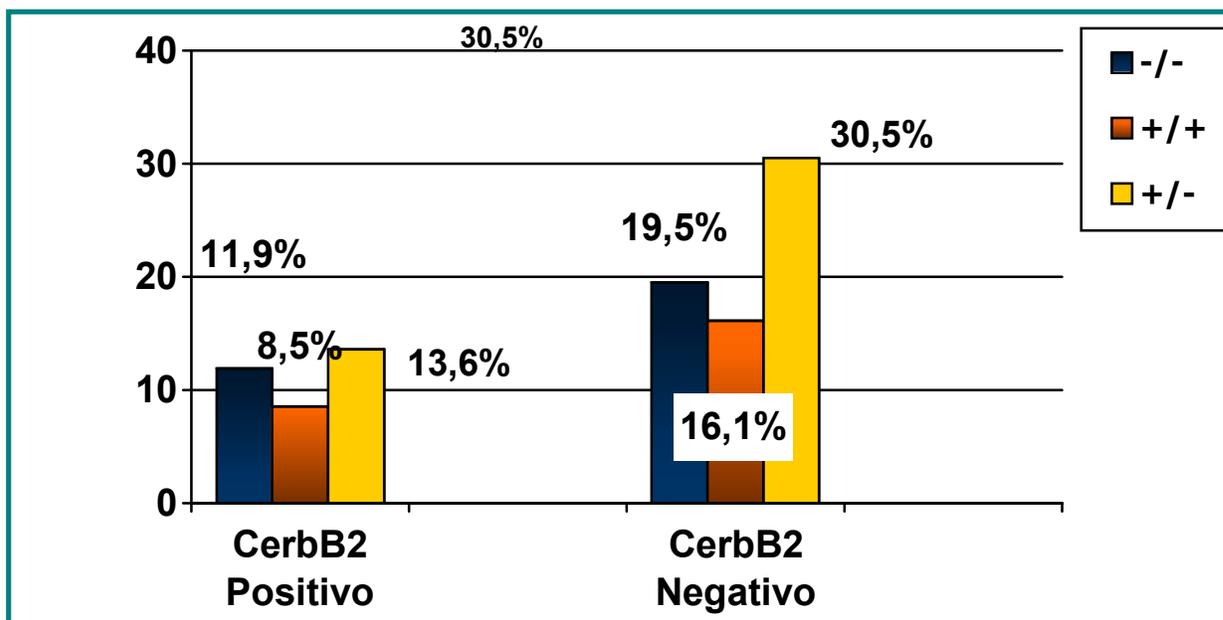
- Ambos tipos de receptores hormonales negativos: RE/RP -/-
- Ambos tipos de receptores hormonales positivos: RE/RP +/+
- Receptores hormonales distintos en cuanto a positividad o negatividad: RE/RP +/-

			receptores de estrógenos y progesterona			TOTAL
			-/-	+/+	+/-	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	14	10	16	
		%c-erbB-2 definido como +/-	35.0%	25.0%	40.0%	100.0%
		% Coexpresión E/P	37.8%	34.5%	30.8%	33.9%
		% del total	11.9%		13.6%	33.9%
	NEGATIVO	Recuento	23	19		78
		% c-erbB-2 definido como +/-		24.4%	46.2%	100%
		% Coexpresión E/P	62.2%		69.2%	66.1%
		% del total	19.5%	16.1%	30.5%	66.1%
TOTAL	Recuento	37			118	
	% c-erbB-2 definido como +/-	31.4%			100.0%	
	% Coexpresión E/P	100%	100%	100%	100.0%	
	% del total	31.4%			100.0%	

Tabla 65.-Coexpresión de sobreexpresión de receptores de estrógenos y progesterona en relación a CerbB2



Graf.31.- Coexpresión de receptores de estrógenos y progstágenos.



Graf.32.- Coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona en relación a sobreexpresión de CerbB2

Aplicando los test estadísticos:

Variable coexpresión E/P	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	0,488	0,784

Tabla 66.- Aplicación de test estadísticos

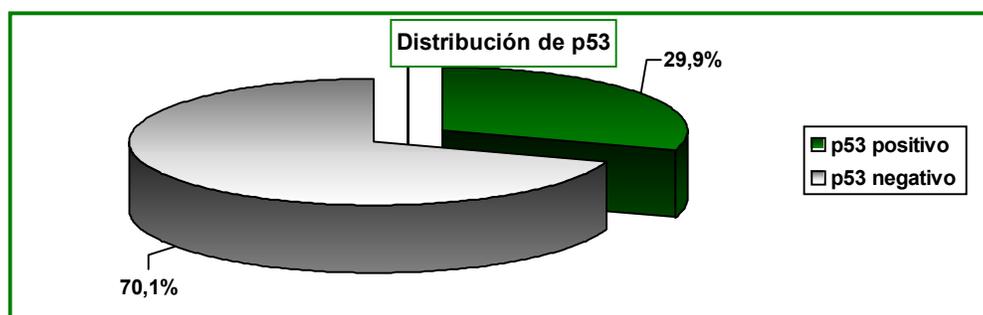
Sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

2.2-Cerb-B2 y P53.

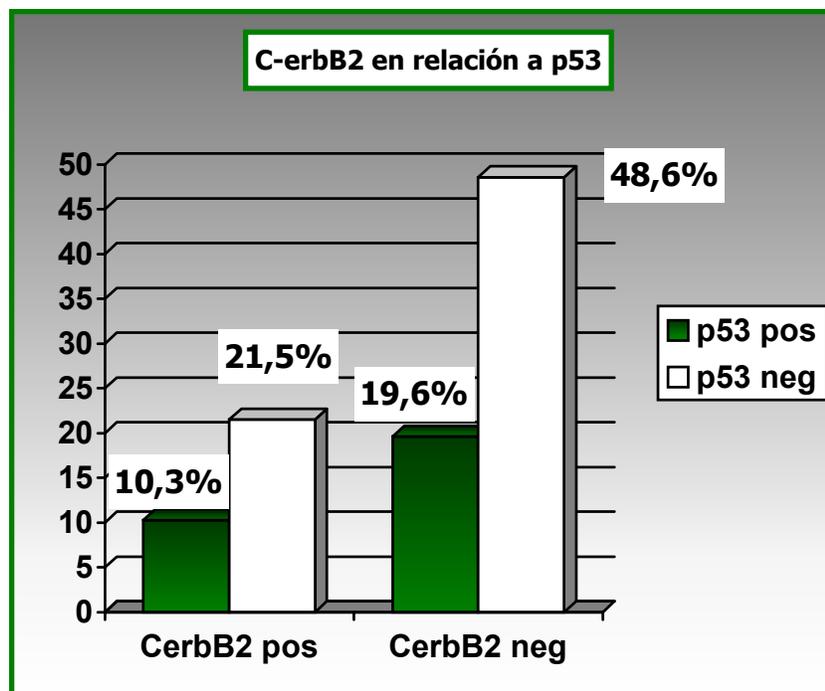
Relacionamos el marcador p-53 definido como positivo o negativo con la expresión de C-erbB-2 en la muestra tumoral:

			P 53		TOTAL
			POSITIVO	NEGATIVO	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	11	23	34
		%c-erbB-2 definido como +/-	32.4%	67.6%	100.0%
		% de p53	34.4%	30.7%	31.8%
		% del total	10.3%	21.5%	31.8%
	NEGATIVO	Recuento	21		73
		% c-erbB-2 definido como +/-	28.8%	71.2%	100%
		% de p53	65.6%		68.2%
		% del total	19.6%	48.6%	
TOTAL	Recuento	32		107	
	% c-erbB-2 definido como +/-		70.1%	100%	
	% de p53	100%	100%	100%	
	% del total	29.9%	70.1%	100%	

Tabla 67.- Relación entre expresión de p53 y Cerbb2



Graf.33.- Distribución de expresión de p53 en la muestra



Graf.34.- Relación entre expresión de p53 y C-erbB2

Variable P53	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	0,142	0,880

Tabla 68.- Chi cuadrado de Pearson

Aplicamos en un segundo tiempo estadísticos de contraste para dilucidar si existe relación entre las variables p-53 y c-erb-B2, es decir si a medida que el valor de p-53 es más alto el marcador c-erb-B2 es más positivo, siendo por tanto el tumor mas agresivo.

Estadísticos de contraste para p-53:

	p-53
U de Mann-Whitney	1204.500
W de Wilcoxon	3905.500
Z	-.246
Significación estadística	0.805

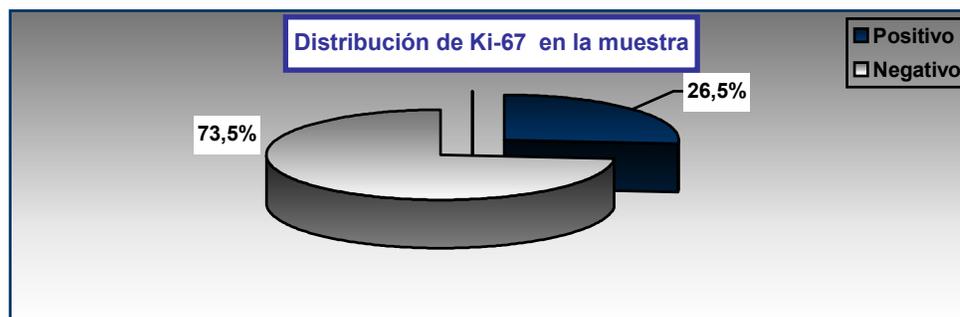
Tabla 69.- Estadísticos de contraste para P53

No existiendo por tanto diferencias estadísticamente significativas.

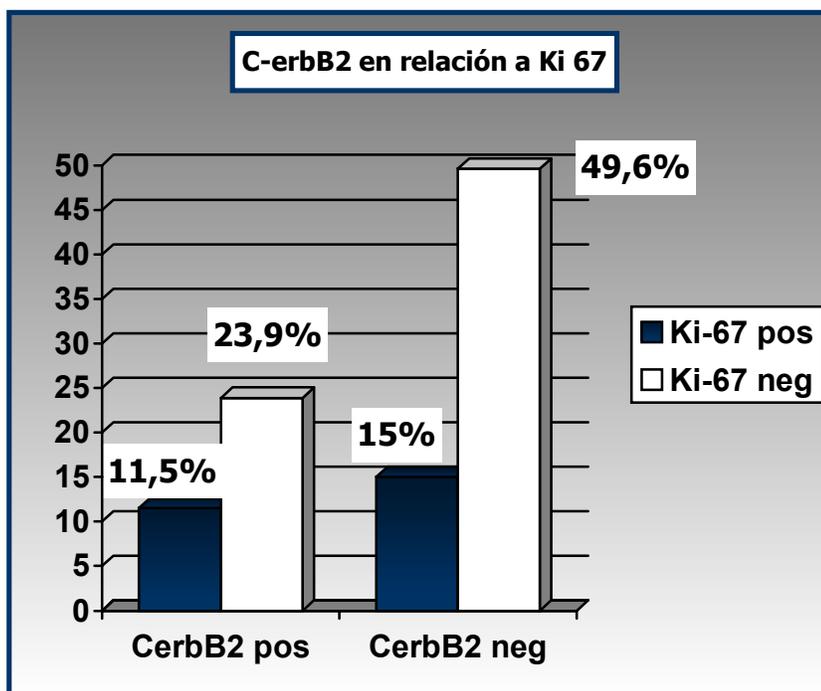
2.3-Cerb-B2 y Ki-67.

Relacionamos las variables c-erb-B2 , definida en dos intervalos, y la variable Ki- 67 en dos intervalos, como positivo o negativo.

La distribución general en la muestra según el porcentaje de Ki-67 redefinido en estas tres categorías , fue como sigue:



Graf.35.-Distribución de Ki 67 en la muestra



Graf.36.- Relación entre Ki67 y CerbB2

			Ki-67		TOTAL
			POSITIVO	NEGATIVO	
C-ERBB-2 DEFINIDO COMO POSITIVO O NEGATIVO	POSITIVO	Recuento	13	27	40
		%c-erbB-2 definido como +/-	32.5%	67.5%	100.0%
		% de Ki 67	43.3%	32.5%	35.4%
		% del total	11.5%	23.9%	35.4%
	NEGATIVO	Recuento	17	56	73
		% c-erbB-2 definido como +/-	23.3%	76.7%	100%
		% de Ki67	56.7%	67.5%	64.6%
		% del total	15%	49.6%	64.6%
TOTAL	Recuento	30	83	113	
	% c-erbb-2 definido como +/-	26.5%	73.5%	100%	
	% de Ki-67	100%	100%	100%	
	% del total	26.5%	73.5%	100%	

Tabla 70.- Relación entre CerbB2 y Ki67

Siendo el valor de Chi-cuadrado de Pearson 1.125, con una significación estadística de 0.402.

Aplicamos también pruebas no paramétricas, con los siguientes resultados:

	Ki-67
U de Mann-Whitney	1168.500
W de Wilcoxon	3869.500
Z	-1.178
Significación estadística	0.77

Tabla 71.- Estadísticos de contraste para Ki67

Es decir, no encontramos relación estadísticamente significativa entre estas variables.

2.4.-Resumen de relación c-erb-b2 y variables principales del estudio.

Variable		Expresión de C-erb-b2		χ^2	p
		+	-		
Edad	<50	6	18	0,677	0,410
	>50	34	59		
Menopausia	Si	30	53	0,337	0,561
	No	10	25		
Grado histológico	I	3	4	0,832	0,666
	II	14	33		
	III	20	34		
Componente comedo	Negat	33	69	0,640	0,424
	Posit	7	8		
Tamaño tumoral	<2 cm	38	67	1,40	0,236
	>2 cm	2	11		
Metástasis linfáticas	Si	25	34	0,439	0,508
	No	19	43		
Receptores estrógenos	+	24	49	0,089	0,922
	-	16	29		
Receptores progesterona	+	12	25	0,052	0,986
	-	28	53		
Coexpresión E/P	+/+	10	19	0,488	0,784
	+/-	16	36		
	-/-	14	23		
P-53	+	11	21	0,142	0,880
	-	23	52		
Ki-67	+	13	17	1.125	0,402
	-	27	56		

Tabla 72.-Resumen de relación expresión de CerbB2 con el resto de variables de nuestro estudio.

III.-ESTUDIO ANALÍTICO II. CerbB2 ,P53, Ki67, Receptores de hormonas esteroideas y cáncer de mama.

1.- SOBREENPRESIÓN DE CERBB2, P53, KI-67, RC HORMONALES EN RELACIÓN A ESTUDIO CLINICOPATOLÓGICO

En este apartado del estudio analizamos la sobreexpresión inmunohistoquímica de C-erb-B2, p-53, Ki-67 y receptores de hormonas esteroideas en la pieza tumoral para establecer la relación entre dicha sobreexpresión y variables clinicopatológicas como son la edad de las pacientes, el estado menopáusico, el tamaño tumoral, el componente comedocarcinoma, el score Bloom-Richardson y las metástasis ganglionares.

Para ello, todas las variables inmunohistoquímicas se comparan de forma dicotomizada considerando la sobreexpresión inmunohistoquímica en el caso de los receptores hormonales, p-53 y Ki-67 cuando más del 25% de las células tumorales son positivas para esta sobreexpresión y en el caso de C-erb-B2, como expresamos en el apartado de material y métodos cuando este porcentaje de positividad se eleva al menos al 75% de las células tumorales.

Comparamos las variables de tipo inmunohistoquímico y las variables de tipo clinicopatológico mediante test de chi-cuadrado y los expresamos mediante tablas, indicando el número de casos para la variable clinicopatológica a estudiar y el número de casos con sobreexpresión para cada variable inmunohistoquímica estudiada, precisando el porcentaje que representa respecto a la variable clinicopatológica, y a continuación el valor de la significación estadística.

Consideramos que existen diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

1.1.-Edad.

Relacionamos la edad de las pacientes, con los datos obtenidos en el estudio inmunohistoquímico de la pieza tumoral con la finalidad de evidenciar diferencias entre los distintos grupos de edad.

Edad	Nº casos*	Rc.Est (%) p	Rc.Pg(%) p	C-erb-B2(%) p	p-53(%) p	Ki-67(%) p
≤50	24	20(83.3) 0.027	10(41.7)0.351		7(30.4) 1.0	9(40.9) 0,170
>50	96	54(56.3)	28(29.2)	34(36.6)	25(29.1)	22(23.7)

Tabla 73.-relacion entre edad de las pacientes y el resto de variables clinicopatologicas

*El N° de casos representa el número de datos válidos para los dos grupos de edad. Al cruzar la edad con las diferentes variables puede disminuir el número de casos en los grupos de edad debido a la existencia en alguna de estas variables de valores perdidos.

Observamos que el porcentaje de sobreexpresión de receptores de hormonas esteroideas es mayor para las pacientes de menos de 50 años, que representan únicamente el 19,8% de la muestra. existe significación estadística (**p=0.027**) en el caso de receptores de estrógenos, no encontrando estas diferencias para los receptores de progesterona (p=0.351). Para el resto de marcadores inmunohistoquímicos, observamos una mayor sobreexpresión en pacientes menores de 50 años para p-53 y Ki-67 sin diferencias estadísticamente significativas, siendo la mayor sobreexpresión de C-erb-B2 en el grupo de más de 50 años con valor de p=0.410.

1.2.-Menopausia.

Analizamos en este apartado el estado menopáusico con el resto de las variables del estudio inmunohistoquímico, con los siguientes resultados:

Menopausia	Nº casos*	Rc.Est (%) p	Rc.Pg(%) p	C-erb-B2(%) p	p-53(%) p	Ki-67(%) p
No	35	26(74.3)0.09	12(34.3)0.82	10(28.6)0.561	10(30.3)1.0	14(42.4)0.029
Si	85	48(55.8)	26(30.2)	30(36.1)	22(28.6)	17(20.5)

Tabla 74.-.relacion entre menopausia y resto de variables

*El N° de casos representa el número de datos válidos para los dos grupos de pacientes. Al cruzar la variable menopausia con las diferentes variables puede disminuir el número de casos en los dos grupos debido a la existencia en alguna de estas variables de valores perdidos.

Encontramos de nuevo, un mayor porcentaje de sobreexpresión para los receptores de hormonas esteroideas en pacientes premenopáusicas, pero no evidenciamos diferencias estadísticamente significativas. Para el resto de marcadores inmunohistoquímicos observamos un comportamiento similar que cuando estudiamos la edad de las pacientes, con sobreexpresión de p-53 y Ki-67 más manifiesta en el grupo de pacientes premenopáusicas, existiendo para Ki-67 diferencias estadísticamente significativas (**p=0.029**).

2.- SOBREEXPRESIÓN DE CERBB2, P53, KI-67, RC HORMONALES Y ESTUDIO HISTOLÓGICO

2.1.-Tamaño tumoral.

Relacionamos el tamaño tumoral con los marcadores inmunohistoquímicos, dicotomizando el tamaño tumoral en tumores menores e iguales de 2 cm y tumores mayores de 2 cm. Obtenemos los siguientes resultados:

T	Nº casos*	Rc.Est (%) p	Rc.Pg(%) p	C-erb-B2(%) p	p-53(%) p	Ki-67(%) p
≤2	106	67(63.2)0.34	35(33.0)0.47	38(32.2)0.2	28(28.9)1.0	27(26.5)1.0
>2	15	7(46.7)	3(20.0)	2(15.4)	4(30.8)	4(28.6)

Tabla 75.- Relacion entre tamaño tumoral y resto de variables

*El Nº de casos representa el número de datos válidos para los dos grupos de pacientes. Al cruzar la variable tamaño con las diferentes variables puede disminuir el número de casos en los dos grupos debido a la existencia en alguna de estas variables de valores perdidos.

Como ya mostramos en el estudio descriptivo, la mayoría de tumores en nuestro estudio son inferiores a 2 cm de tamaño. Únicamente cabe destacar la sobreexpresión mayor de p-53 y Ki-67 en tumores mayores de 2 cm aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

2.2.-Ganglios metastásicos.

Considerando únicamente los casos con afectación y sin afectación linfática metastásica en el estudio anatomopatológico, sin considerar el número de ganglios afectados como hicimos en la primera parte del estudio analítico, y con el fin de no introducir sesgos, encontramos:

Gang	Nº casos*	Rc.Est (%) p	Rc.Pg(%) p	C-erb-B2(%) p	p-53(%) p	Ki-67(%) p
No	63	38(60.3)1.0	21(33.3)0.829	19(30.6)0.5	11(19)0.034	16(26.7)1.0
Si	57	35(61.4)	17(29.8)	21(38.2)	20(39.2)	14(25.5)

Tabla 76.-Relación entre hallazgo de ganglios metastásicos y resto de variables.

*El Nº de casos representa el número de datos válidos para los dos grupos de pacientes. Al cruzar la variable ganglios afectados con las diferentes variables puede disminuir el número de casos en los dos grupos debido a la existencia en alguna de estas variables de valores perdidos.

Encontramos una distribución muy similar para las variables de tipo inmunohistoquímico en los dos grupos de pacientes , con mayor sobreexpresión

de C-erb-B2 para el grupo de pacientes con hallazgo de metástasis linfáticas, aunque con valor p no significativo ($p=0.5$), llamando la atención la diferencia encontrada, estadísticamente significativa ($p=0.034$), entre la sobreexpresión de p-53 y la existencia de metástasis linfáticas, observando que dicha sobreexpresión es mucho menor en casos de no afectación linfática en el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica.

2.3.-Grado histológico. Score Bloom- Richardson.

Con el fin de facilitar el estudio estadístico de los datos, dicotomizamos la variable Score bloom-Richardson en bajo e intermedio grado (Score 0-6) y alto grado (Score 7-9); a continuación lo relacionamos con el estudio inmunohistoquímico para conocer si existe relación entre el Score de Bloom-Richardson y la sobreexpresión de las variables inmunohistoquímicas en el tumor:

B-R	Nº casos*	Rc.Est (%) p	Rc.Pg(%) p	C-erb-B2(%) p	p-53(%) p	Ki-67(%) p
0-6	55	36(65.5)0.279		37(68.5)0.6	13(26)0.64	6(11.5)0.001
7-9	56	30(53.6)	11(19.6)	34(63)	17(32.1)	23(41.8)

Tabla 77.-Relacion entre grado histológico y resto de variables.

*El N° de casos representa el número de datos válidos para los dos grupos de pacientes. Al cruzar la variable Score Bloom-Richardson con las diferentes variables puede disminuir el número de casos en los dos grupos debido a la existencia en alguna de estas variables de valores perdidos.

Observamos un mayor porcentaje de sobreexpresión de receptores de hormonas esteroideas en tumores con grado histológico más bajo, siendo el valor $p=0.279$ para los receptores de estrógenos, y para el caso de los receptores de progesterona $p=0.012$, es decir con diferencias estadísticamente significativas.

Paradójicamente, para C-erb-B2 encontramos un mayor porcentaje de sobreexpresión para aquellos tumores de menor grado histológico, aunque sin diferencias estadísticamente significativas($p=0.6$).

En el caso de p-53 y Ki-67 encontramos que existe una menor sobreexpresión en caso de tumores con grado histológico más bajo, siendo muy significativo estadísticamente para Ki-67 con un valor de $p=0.001$.

3.- CORRELACION DE SPERMAN

Por último, establecemos una relación multivariante de Spearman , para poner de manifiesto las relaciones significativas entre variables, y obtenemos los siguientes datos:

Parametro	Tamaño	Comp comedo	Score B-R	Met. ganglios	CerbB2	P53	Ki67	RcE	RcP
R. progest.	-0,06	-0,160	-0,354	0,04	-0,082	-0,052	-0,11	0,525	
R. estrog	-0,080	-0,060	-0,234	0,047	-0,038	-0,151			
Ki67	-0,006	0,056	0,323	0,011	0,202				
P53	0,117	0,040	0,150	0,239	0,083				
C-erbB2	0,036	0,107	0,065	0,089					
Met.Gang	0,100	0,056	0,125						
Score B-R	-0,051	0,175							
C.Comedo	0,033								
Tamaño									

Tabla 78.- Correlacion de Sperman.

- Las celdas sombreadas son en las que se obtienen valores significativos:
 - Los datos en negrita tienen correlación significativa a nivel **0,05**
 - Los datos en rojo tienen correlación a nivel **0,01**

Existe relación estadísticamente significativa, con $p < 0,05$ entre el Score Bloom-Richardson y los receptores de estrógenos, la existencia de metástasis ganglionares en el estudio anatomopatológico y los niveles de p53, y entre C-erbB2 y Ki-67.

Existe relación estadísticamente significativa , con $p < 0,01$ entre el Score Bloom-Richardson y los receptores de progesterona, entre el Score Bloom-Richardson y Ki-67, entre p53 y Ki-67, entre los receptores de estrógenos y progesterona, y entre Ki-67 y los receptores de estrógenos.

Encontramos, por tanto, las mismas relaciones que en el estudio previo, a excepción de la puesta de manifiesto de relación estadísticamente significativa entre C-erbB2 y Ki67, que en el estudio analítico no encontrábamos en las pruebas Chi-cuadrado, y la puesta de manifiesto de relación entre el Score Blom-Richardson y los receptores de estrógenos.

Cuando observamos la distribución en tablas de contingencia de el Score Bloom-Richardson (con la modificación de Elston-Ellis) en relación a los receptores de progesterona:

			Grado histológico (Elston-Ellis)			TOTAL
			1	2	3	
Receptores progesterona	POSITIVO	Recuento		27	45	76
		% RP definido como +/-		35,5%	59,2%	100,0%
		% Grado histológico		57,4%		68,5%
		% del total	3,6%	24,3%	40,5%	68,5%
	NEGATIVO	Recuento	4	20	11	35
		% RP definido como +/-		57,1%		100%
		%Grado Histológico	50%	42,6%	19,6%	31,5%
		% del total	3,6%	18%	9,9%	31,5%
TOTAL	Recuento		47	56	111	
	% Rp definido como +/-	7,2%		50,5%	100,0%	
	% Grado histológico		100%		100,0%	
	% del total	7,2%		44,1%	100,0%	

Tabla 79.- Relación entre grado histológico y receptores de progesterona.

	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	7,575	0,023

Tabla 80.- Chi-cuadrado

Observamos que se ponen de manifiesto diferencias estadísticamente significativas.

Si expresamos en tablas de contingencia la relación estadísticamente significativa encontrada entre receptores de estrógenos y expresión de Ki-67:

			Ki-67		TOTAL
			NEGATIVO	POSITIVO	
RECEPTORES DE ESTROGENOS	NEGATIVO	Recuento	16	12	28
		%Rc estrogénos +/-	57,1%	42,9%	100.0%
		% de Ki-67	18,8%	38,7%	24,1%
		% del total	13,8%	10,3%	24,1%
	POSITIVO	Recuento		19	88
		%Rc estrogénos +/-	78,4%	21,6%	100%
		% de Ki-67	81,2%	61,3%	75,9%
		% del total	59,5%		75,9%
TOTAL	Recuento	85		116	
	Frec esperada				
	%Rc estrogénos +/-	73,3%	26,7%	100%	
	% de Ki-67	100%	100%	100%	
	% del total	73,3%	26,7%	100%	

Tabla 81.- Relación entre receptores de estrógenos y Ki67.

Observamos como en el grupo de pacientes con receptores de estrógenos positivos existe una clara tendencia a valores de Ki-67 más bajos, es decir, a mayor diferenciación tumoral con la aparición de receptores de estrógenos, existe en nuestra muestra índices de proliferación tumoral más bajos. Obtenemos que la relación es estadísticamente significativa con $p=0,049$

	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	4,906	0,027
Corrección por continuidad	3,880	0,049

Tabla 82.- Chi-cuadrado

Observamos además una fuerte asociación entre Ki-67 y el grado histológico, que exponemos a continuación en tablas de contingencia.

Expresamos el grado histológico en 2 categorías ; categoría 1 Elston-Ellis 1 y 2; Categoría 2 Elston-Ellis 3.

			Ki-67		
			NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
GRADO HISTOLOGICO	BAJO GRADO	Recuento		6	52
		% grado histologico	88,5%	11,5%	100.0%
		% de Ki-67	59%	20,7%	48,6%
		% del total	43,0%	5,6%	48,6%
	ALTO GRADO	Recuento	32	23	55
		% grado histologico	58,2%	41,8%	100%
		% de Ki-67	41,0%	79,3%	51,4%
		% del total	29,9%	21,5%	51,4%
TOTAL	Recuento	78	29	107	
	Frec esperada				
	% grado histologico		27,1%	100%	
	% de Ki-67	100%	100%	100%	
	% del total	72,9%	27,1%	100%	

Tabla 83.- Relación entre Ki67 y grado histológico

	Valor	p
Chi-cuadrado Pearson	12,404	0,000
Corrección por continuidad	10,919	0,001

Tabla 84.-Chi-cuadrado

Por último, ponemos de manifiesto que encontramos asociación estadísticamente significativa entre la coexpresión de estrógenos y progesterona y los niveles de p53. expresado en tables de contingencia:

			P53		TOTAL
			NEGATIVO	POSITIVO	
COEXPRESION Estrógenos/ progesterona	-/-	Recuento	51,14	11	25
		%coexpresion	56%		100%
		%p53	18,2%		22,9%
		%del total	12,8%	10,1%	22,9%
	+ / +	Recuento	40	18	58
		%coexpresion	69%		100%
		%p53	51,9%	56,3%	53,2%
		%del total	36,7%	16,5%	53,2%
	+/-	Recuento	23	3	26
		%coexpresion	88,5%	11,5%	100%
		%p53	29,9%		23,9%
		%del total	21,1%	2,8%	23,9%
TOTAL	Recuento	78	29	107	
	%coexpresion		27,1%	100%	
	%de p53	100%		100%	
	% del total	72,9%		100%	

Tabla 85.-Relacion entre p53 y coexpresion de estrógenos/progesterona.

Observamos un porcentaje mayor de pacientes con valores más bajos de p53 en los casos en los que existe coexpresion de receptores de estrógenos y progesterona, es decir, en casos de tumores más diferenciados, estadísticamente significativo.

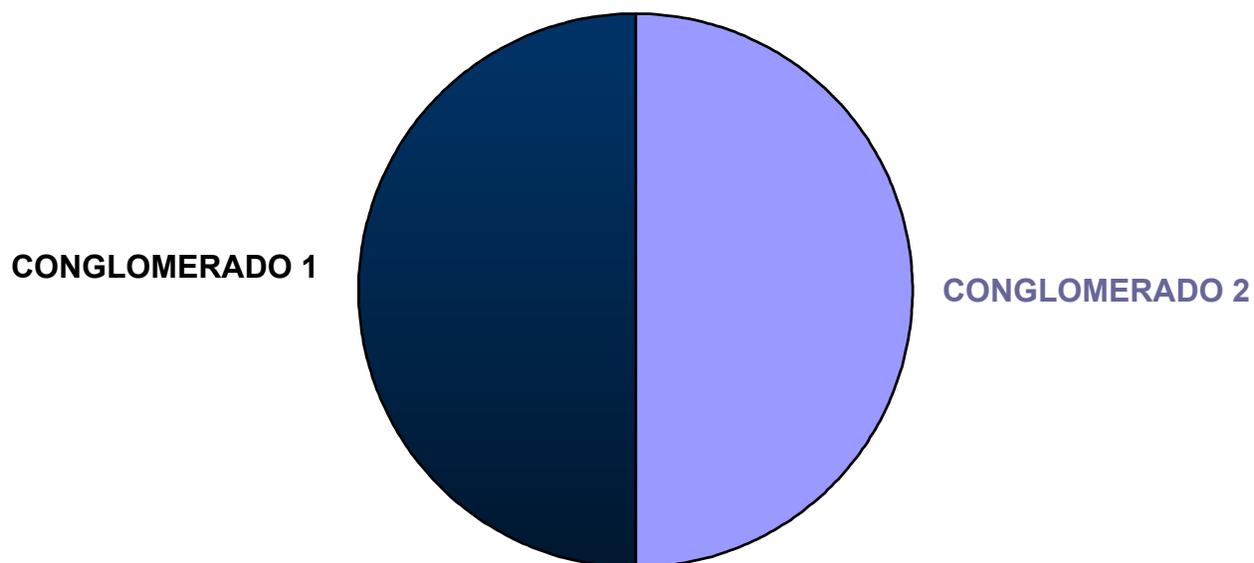
	Valor	<i>p</i>
Chi-cuadrado Pearson	6,644	0,036

Tabla 86.- Chi cuadrado.

IV.-ANÁLISIS CLUSTER O CONGLOMERADOS

Por último decidimos explorar nuestros datos mediante análisis de conglomerados o clúster con el fin de poder evidenciar relaciones entre las variables en nuestro estudio que por no tener peso estadístico suficiente podrían pasar desapercibidas en los análisis estadísticos anteriores.

Así, observamos que se establecen 2 grupos de pacientes en función de las diferencias entre las variables estudiadas, con un 50% de la muestra válida para este tipo de estudio en cada uno de los conglomerados:



Los perfiles de los conglomerados quedan con la siguiente distribución:

		N	% de combinados	% del total
Conglomerado	1	49	50%	40.5%
	2	49	50%	40.5%
	combinados	98	100%	81%

Casos excluidos		23		19%
Total		121		100%

De la muestra total se excluyen 23 casos para este tipo de análisis estadístico, por no poder ser catalogados dentro de los perfiles de los conglomerados o bien por tratarse de pacientes con algún valor perdido en variables fundamentales.

1.- PERFILES DE LOS CONGLOMERADOS

Las variables que hemos estudiado para establecer los perfiles de los conglomerados son :

- Datos epidemiológicos generales:
 - Edad de las pacientes
- Estudio anatomopatológico:
 - Tamaño tumoral
 - Score Bloom-Richardson
 - Ganglios linfáticos metastásicos
- Estudio inmunohistoquímico:
 - P-53
 - Ki-67
 - Receptores de estrógenos
 - Receptores de progesterona
 - Coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona
 -

A continuación analizaremos cada uno de estas variables y su distribución dentro de los conglomerados.

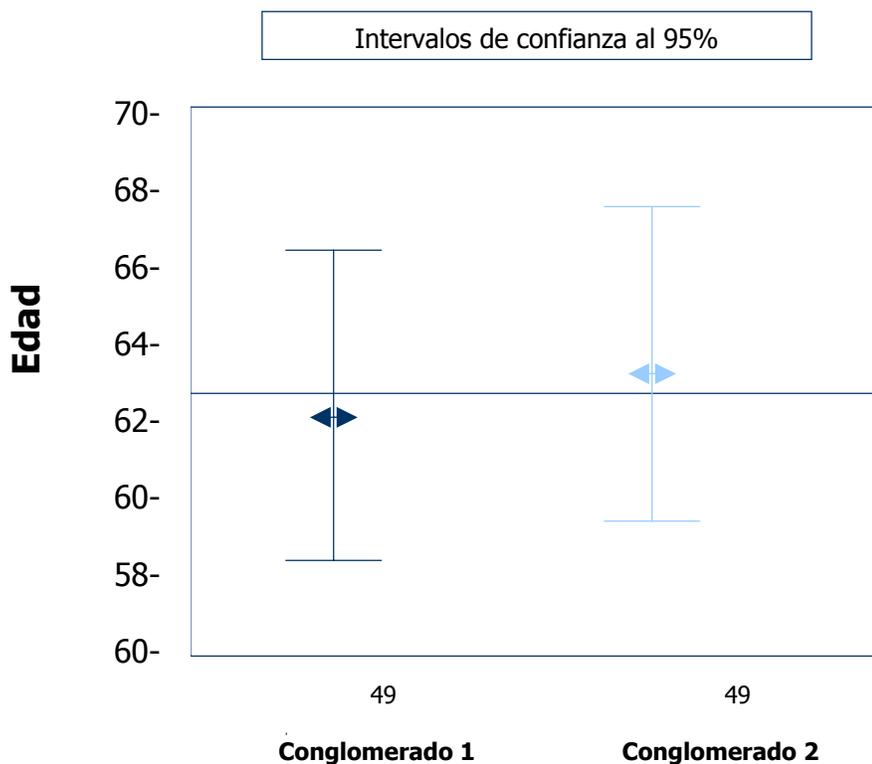
1.1.-Edad.

		EDAD	
Conglomerado		Media	Intervalo de confianza *
			Limite sup Limite inf
1		62.59	66.99 58.20
2		63.61	67.43 59.79
	Combinados	63.10	

* Intervalo de confianza para la media al 95%

Tabla 87.- Distribución de edades en los conglomerados.

Como podemos observar en ambos conglomerados de pacientes la media de edad es similar, siendo para el conglomerado 1 de 62.5 años y para el conglomerado 2 de 63.61 años.



La línea de referencia es la media global=63.10.

Graf.37.-Distribución de edades en los conglomerados

1.2.-Tamaño tumoral.

Manteniendo la división establecida para estudios preliminares en tumores menores o iguales a 2 cm y tumores mayores de 2 cm, obtenemos la siguiente distribución estadística intraconglomerado:

			TAMAÑO TUMORAL		TOTAL
			≤ 2	>2	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	40		49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	81.6%	18.4%	100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	46	3	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	93.9%	6.1%	100%
TOTAL		Recuento		12	98
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	87.8%	12.2%	100.0%

Tabla 88.-Distribución del tamaño tumoral en conglomerados.

Observamos que en ambos conglomerados la distribución de las pacientes en función del tamaño tumoral es prácticamente similar, con 86 pacientes con tumores inferiores o iguales a 2cm , distribuidos entre ambos conglomerados (un 46.5% en el conglomerado 1 y un 53.5% en el conglomerado 2), y 12 pacientes con tumores con tamaño superior a los 2 cm, en el 75% asignados estadísticamente al conglomerado 1.

1.3.-Score Bloom-Richardson.

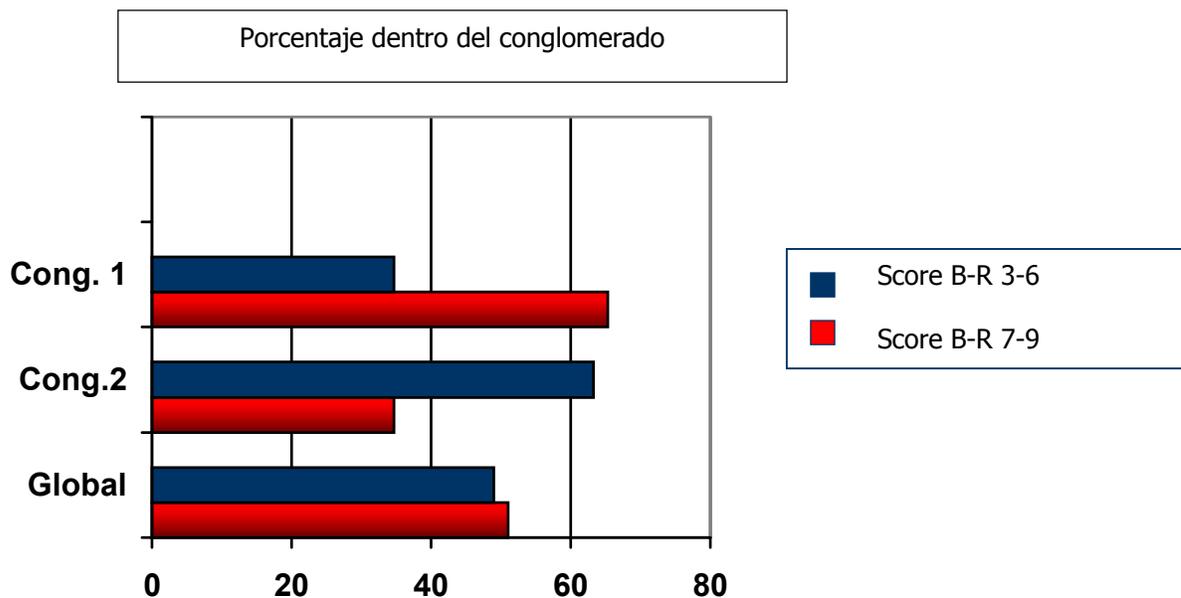
Usamos la variable Bloom-Richardson dicotomizada en tumores de bajo grado (Score Bloom-Richardson 3-6) y tumores de alto grado histológico (Bloom-Richardson de 7-9). Obtenemos la siguiente distribución en los conglomerados:

			SCORE BLOOM-RICHARDSON		TOTAL
			0-6	7-9	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	17	32	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	34.7%	65.3%	100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	31		49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	63.3%		100%
TOTAL		Recuento		50	98
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	49.0%	51.0%	100.0%

Tabla 89.-Distribución del grado histológico en cada conglomerado.

En este caso encontramos que mientras en el conglomerado 1 el 64% de las pacientes presentan Score de Bloom-Richardson de alto grado, en el conglomerado 2 las pacientes entran dentro de las categorías más bajas mayoritariamente (64.6% de los casos).

Expresado en forma de gráfico:



Graf.38.-Distribución del grado histológico en los conglomerados.

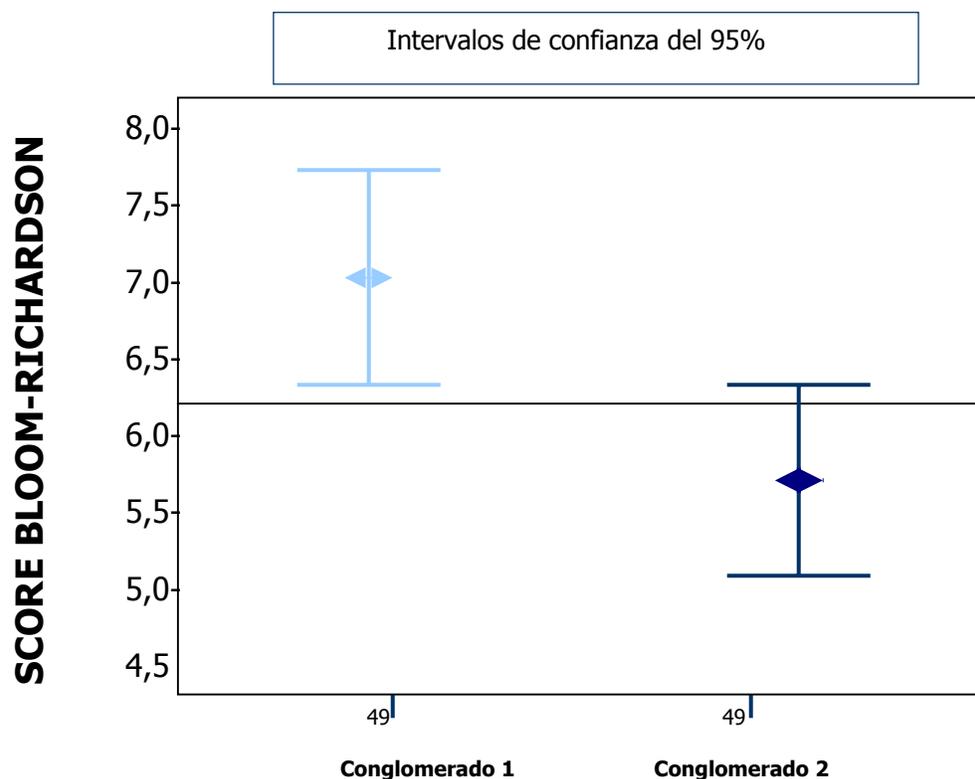
Si usamos la variable Bloom-Richardson como continua, es decir, sin incluir sus valores dentro de categorías:

		Grado histológico	
Conglomerado		Media	Intervalo de confianza *
			Limite sup Limite inf
1	1	6.96	7.51 6.41
	2	5.69	6.29 5.10
Combinados		63.10	

* Intervalo de confianza para la media al 95%

Tabla 90.-Distribución en los conglomerados según el grado histológico

Podemos observar que en el conglomerado 1 la media del valor Bloom-Richardson es más alta (6.96) que en el conglomerado 2 (5.69). La representación gráfica es:



La línea de referencia es la media global= 6.33.

Graf.39.-Medias del grado histológico en cada conglomerado.

1.4.-Ganglios metastásicos.

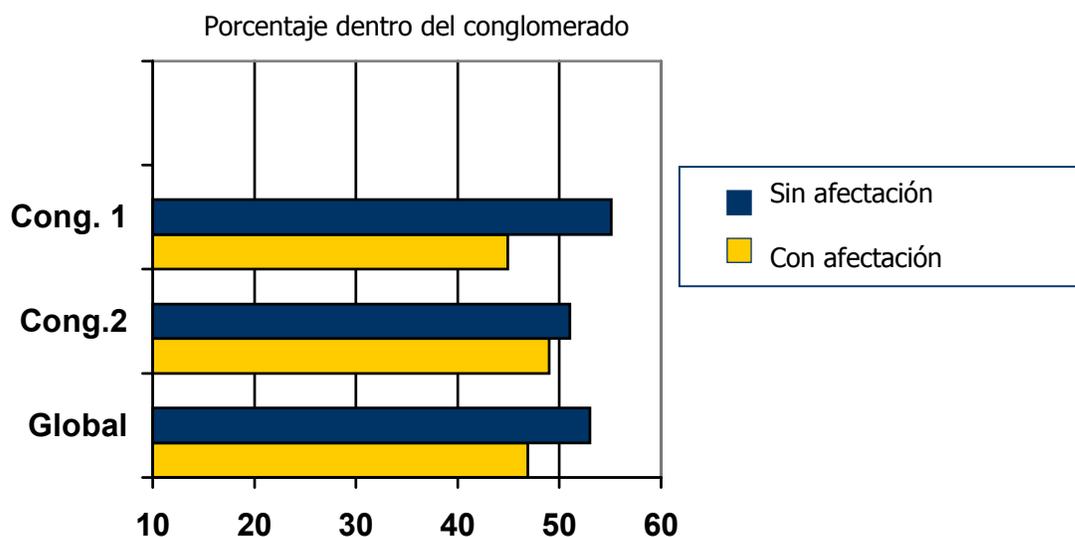
Dicotomizamos la variable ganglios metastásicos, según se encuentren en el estudio anatomopatológico metastásis en 1 ó más ganglios frente a los casos en los que no se ha encontrado metastatización linfática.

			Ganglios metastásicos		TOTAL
			NO	SI	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	27	22	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	55.1%	44.9%	100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	25		49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont		36.7%	100%
TOTAL	Recuento	52	46	98	
	%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	53.1%	46.9%	100.0%	

Tabla 91.-Distribución en los conglomerados según la afectación metastásica.

En la distribución intraconglomerado, observamos que en el conglomerado 1 , 27 pacientes (55,10%) no presentan afectación linfática, frente a 22 pacientes (44,89%) en las que si aparece .En el conglomerado 2, 25 pacientes (63.3%) no presentan afectación linfática frente a 24 (36,7%) que si lo presentan.

La representación gráfica:



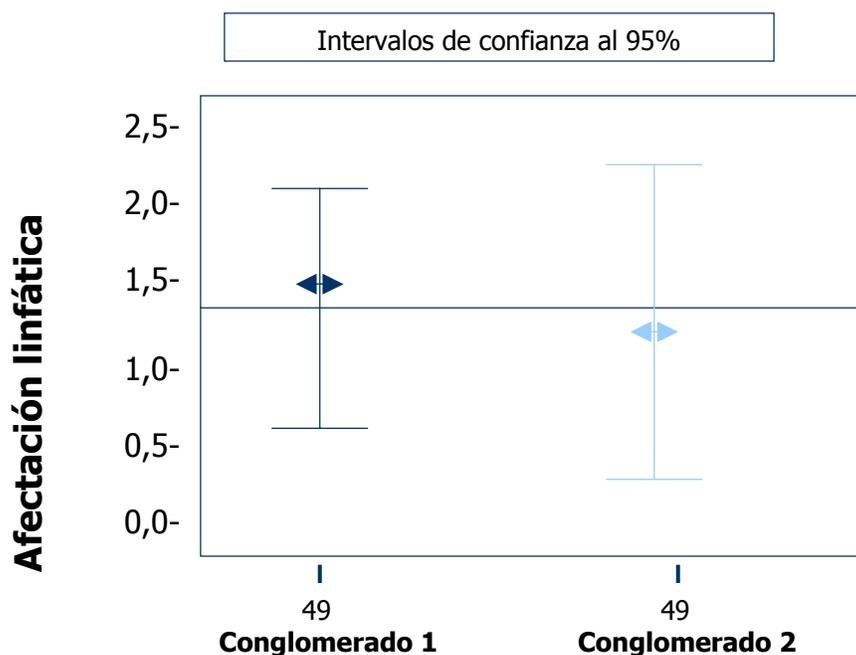
Graf.40.- Representación gráfica de la distribución en cada conglomerado según afectación metastásica.

Si analizamos la variable afectación metastásica linfática de forma continua, sin dicotomizarla como hemos realizado previamente, observamos que:

		Afectación linfática	
Conglomerado		Media	Intervalo de confianza
			Limite sup Limite inf
	1	1.43	2,04 0,82
	2	1.31	2,13 0,48
	Combinados	1.37	

Tabla 92.-Distribución en conglomerados según número de ganglios afectados.

La media de ganglios afectados para el conglomerado 1 es 1.43 y para el conglomerado 2 es de 1.31, es decir la afectación linfática es muy similar entre ambos conglomerados.



La línea de referencia es la media global=1.37

Graf.41.-Distribución dentro de los conglomerados según la media de ganglios afectados.

1.5.-C-erbB2.

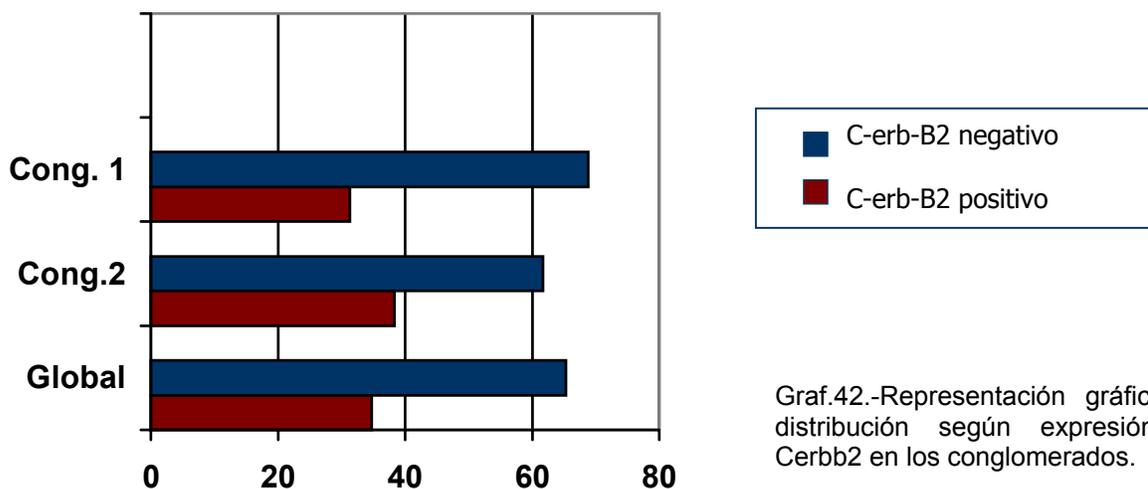
Considerando C-erb-B2 como positivo o negativo, según hicimos en el estudio estadístico previo:

			C-erb-B2		TOTAL
			Positivo	Negativo	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	15	33	48
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	31.3%	68.6%	100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	18	29	47
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	38.3%	61.7%	100%
TOTAL		Recuento	33	62	95
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	34.7%	65.3%	100.0%

Tabla 93.-Distribución según la expresión de CerbB2 en los conglomerados

Observamos valores de C-erb-B2 muy similares entre ambos conglomerados, existiendo valores ligeramente superiores en cuanto a positividad y menores en cuanto a negatividad en el conglomerado 2.

La representación gráfica:



Graf.42.-Representación gráfica de distribución según expresión de Cerbb2 en los conglomerados.

1.6.-P53.

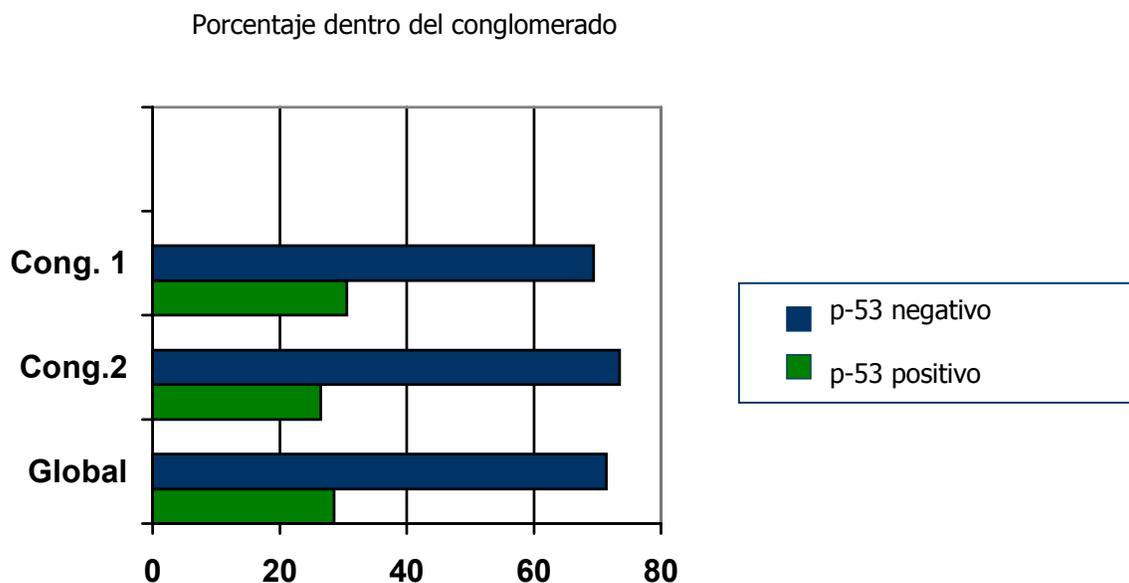
Analizamos la variable P-53 , de forma dicotomizada en 2 categorías, según hemos realizado en el estudio estadístico previo, para observar su distribución estadística entre los conglomerados:

			P-53		TOTAL
			Negativo	Positivo	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	34	15	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	69.4%		100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	36	13	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	73.5%	26.5%	100%
TOTAL		Recuento		28	98
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	71.4%		100.0%

Tabla 94.-Distribución en conglomerados según expresión de p53.

El 73.5% de las pacientes del conglomerado 2, tienen valores de p-53 negativos, algo superior a las pacientes con p-53 negativo en el conglomerado 1 (69.4%).

La representación gráfica:



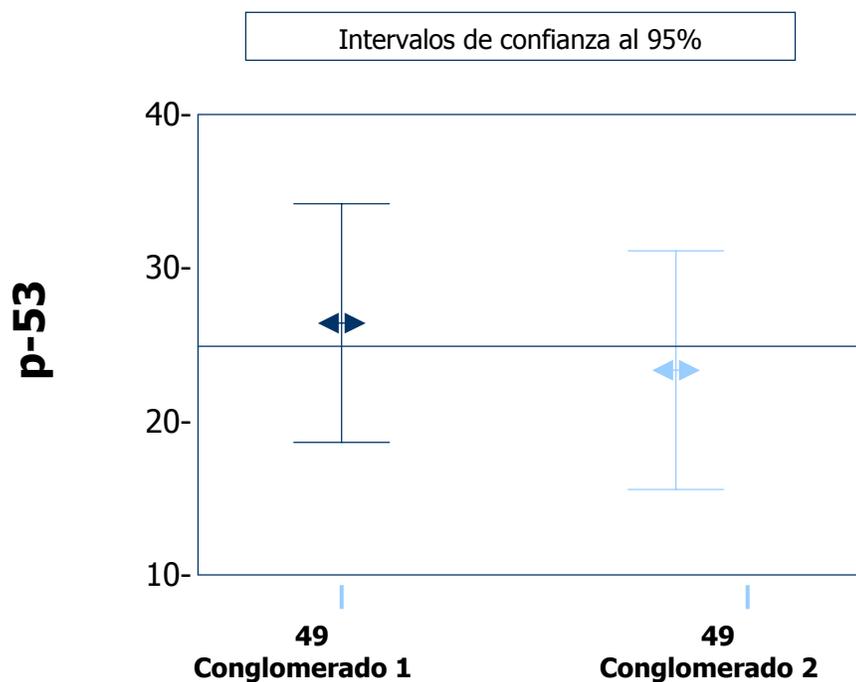
Graf.43.-Representación gráfica de distribución en conglomerados según expresión de p53.

Si consideramos la variable p-53 como numérica, con el fin de conocer la media de su valor en cada uno de los conglomerados:

		p-53		
Conglomerado		Media	Intervalo de confianza	
			Limite sup	Limite inf
1		27.41	36.23	18.59
2		24.49	32.08	16.90
	Combinados	26.95		

Tabla 95.-Distribución en cada conglomerado según la media de p53.

Observamos una distribución muy similar entre ambos conglomerados, con valores algo superiores dentro del conglomerado 1.



La línea de referencia es la media global = 25.95.

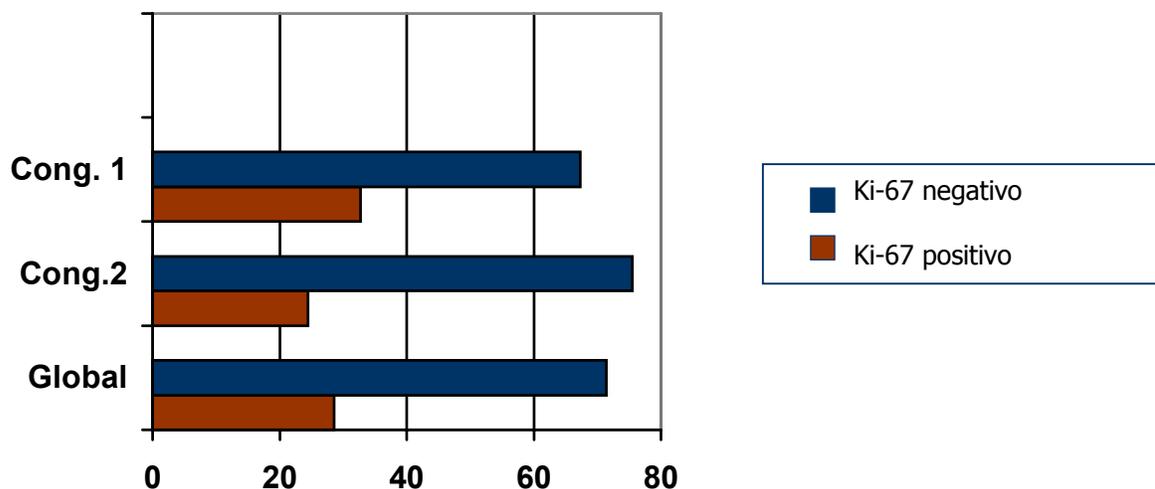
Graf.44.- Representación de las medias d cada conglomerado.

1.7.-Ki 67.

Utilizando la variable Ki-67 de forma dicotomizada, observamos un comportamiento y distribución similar a P-53 entre los conglomerados:

			Ki-67		TOTAL
			Negativo	Positivo	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	33		49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	67.3%	32.7%	100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	37	12	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont		24.5%	100%
TOTAL		Recuento	70	28	98
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	71.4%		100.0%

Tabla 96.-Distribución en conglomerados según la expresión de Ki67



Graf.45.-Representación gráfica según distribución de Ki67 en los conglomerados.

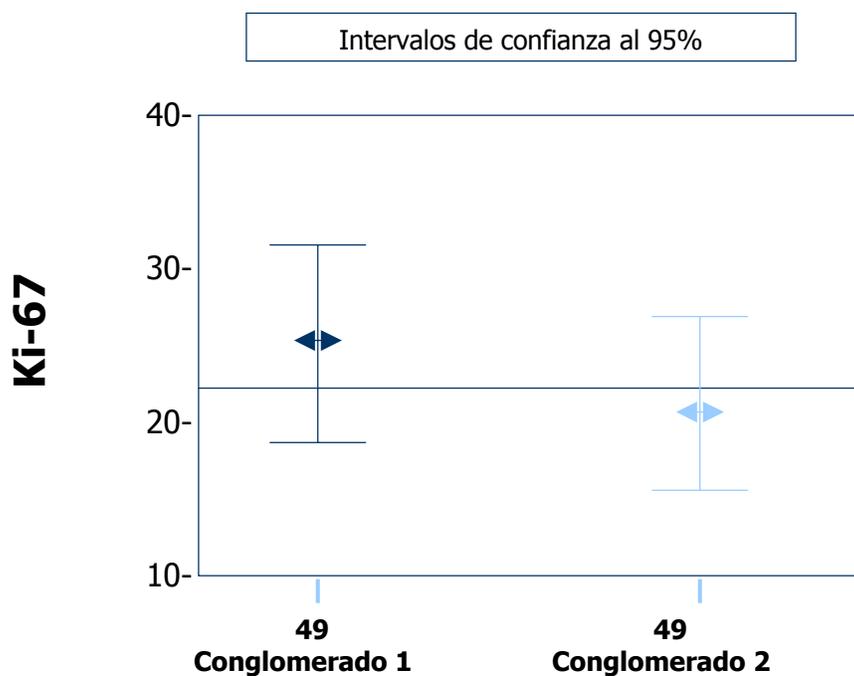
Si utilizamos la variable de forma continua:

		<i>Ki-67</i>		
Conglomerado		Media	Intervalo de confianza	
			Limite sup	Limite inf
	1	25.65	32.45	18.86
	2	21.04	26.36	15.72
	Combinados	23.35		

Tabla 97.-Medias de Ki 67 en cada conglomerado.

Observamos de nuevo una distribución muy similar a la que habíamos observado en el estudio de p-53.

La representación gráfica:



La línea de referencia es la media global = 23.35.

Graf.46.-Representación de la distribución según medias de Ki67

1.8.-Receptores de estrógenos.

Como en el estudio estadístico preliminar consideramos positivos los receptores estrogénicos cuando más del 75% de las células lo expresan en la inmunohistoquímica (es decir ++ y +++), considerando negativo el resto.

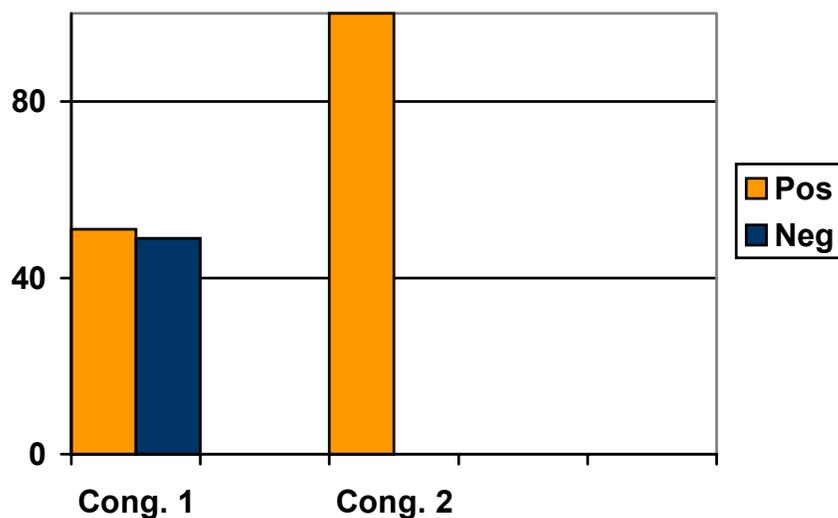
Observamos que para el estudio de conglomerados los receptores estrogénicos es un **elemento diferenciador** para la clasificación de las pacientes en uno u otro conglomerado por el sistema estadístico, de tal manera que las pacientes con receptores hormonales estrogénicos negativos se asignan en el 100% al conglomerado 1. La distribución entre los conglomerados es:

			RECEPTORES ESTROGÉNICOS		TOTAL
			NEGATIVO	POSITIVO	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	24	25	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	49.0%	51.0%	100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	0		49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	0.0%	100.0%	100%
TOTAL		Recuento	24	74	98
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	24.5%	75.5%	100.0%

Tabla 98.-Distribución en los conglomerados según expresión de Rc de estrógenos.

Los valores entre los distintos conglomerados muestran que en el estudio estadístico que estamos aplicando, las distintas variables se asignan en uno u otro conglomerado según su relación a variables con grandes diferencias entre sus componentes , siendo una de ellas los receptores hormonales estrogénicos.

La representación gráfica de los porcentajes entre los conglomerados es como sigue:



Graf.47.-Representación gráfica según distribución en conglomerados en función de expresión de receptores de estrógenos.

Aplicando tests estadísticos de contraste:

	Valor	gl	Sig.asintótica (bilateral)	Sig.exacta (bilateral)	Sig.exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	31.784 ^b	1	0.000		
Corrección por continuidad ^a	29.190	1	0.000		
Razón de verosimilitud	41.197	1	0.000		
Estadístico exacto de Fisher				0.000	0.000
Asociación lineal por lineal	31.459	1	0.000		
N de casos válidos	98				

a.- calculado sólo para una tabla de 2x2

b.- 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. la frecuencia mínima esperada es 12.00.

Tabla 99.-Aplicación de tests estadísticos para χ -cuadrado.

Obtenemos valores **ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (<0.001).**

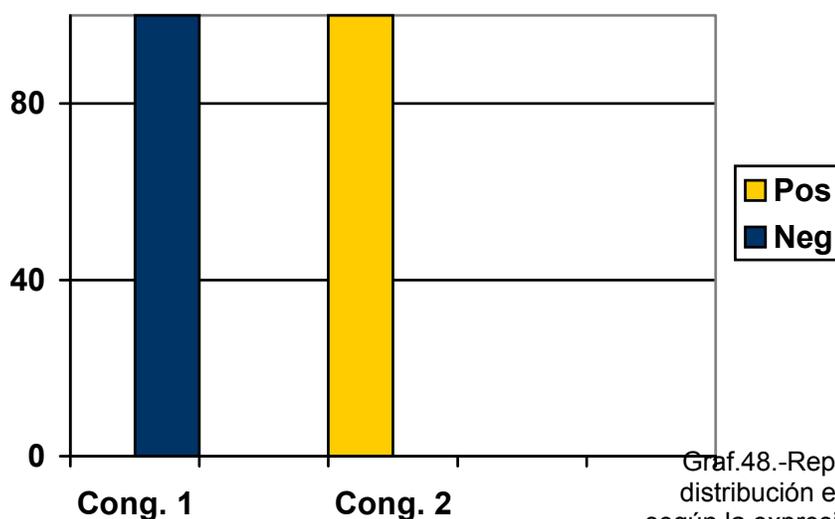
1.9.-Receptores de progesterona.

En cuanto a los receptores de progesterona:

			RECEPTORES PROGESTERONA		TOTAL
			NEGATIVO	POSITIVO	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	Conglomerado 1	Recuento	49	0	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	100%	0.0%	100.0%
	Conglomerado 2	Recuento	0	49	49
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	0.0%	100%	100%
TOTAL		Recuento	49	49	98
		%de 2 grupos de conglomerados con variables cont	50.0%	50.0%	100.0%

Tabla 100.-Distribución en los conglomerados según la expresión e receptores de progesterona.

Observamos que ocurre como en los receptores de estrógenos pero de forma aún más evidente: en el conglomerado 1 los receptores de progesterona son 100% negativos y en el conglomerado 2 los receptores son 100% positivos. Por tanto los receptores de progesterona son también un ELEMENTO DIFERENCIADOR para asignar las variables en uno u otro conglomerado:



Graf.48.-Representación de la distribución en conglomerados según la expresión de receptores de progesterona.

Aplicando tests estadísticos de contraste:

	<u>Valor</u>	gl	Sig.asintótica (bilateral)	Sig.exacta (bilateral)	Sig.exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	98.000 ^b	1	0.000		
Corrección por continuidad ^a	94.041	1	0.000		
Razón de verosimilitud	135.857	1	0.000		
Estadístico exacto de Fisher				0.000	0.000
Asociación lineal por lineal	97.000	1	0.000		
N de casos válidos	98				

a.- calculado sólo para una tabla de 2x2

b.- 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. la frecuencia mínima esperada es 24.50.

Tabla 101.-Aplicación de tests estadísticos para χ -cuadrado.

obtenemos valores **ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS** con un valor de $p < 0.001$

1.10.-Coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona

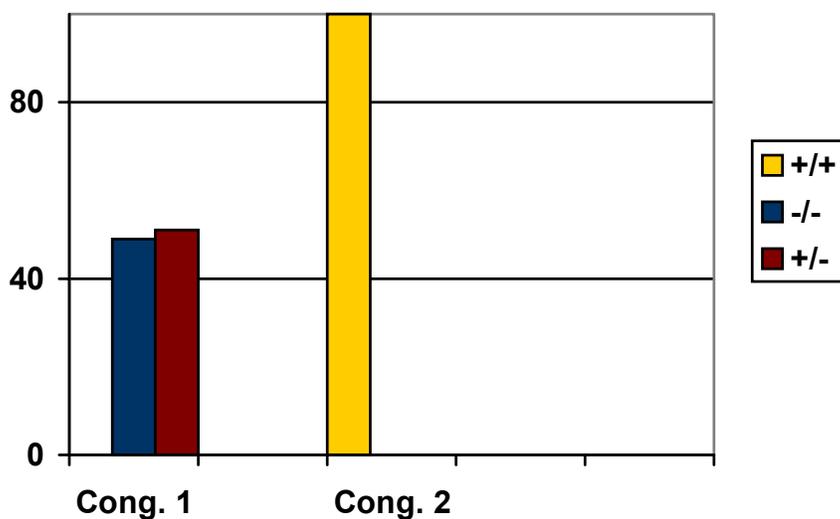
Analizando la coexpresión de estrógenos y progesterona es lógico pensar que existen relaciones muy significativas entre los conglomerados :

Obtenemos la siguiente distribución entre los conglomerados:

			Coexpresión estrógenos/ progesterona			TOTAL
			-/-	+/+	+/-	
2 grupos de conglomerados con variables continuas	1	Recuento % de 2 grupos de conglomerados con variables continuas	24 49%	0 0.0%	25 51.0%	49 100.0%
	2	Recuento % de 2 grupos de conglomerados con variables continuas	0	49 100%	0 0.0%	49 100.0%
TOTAL		Recuento % de 2 grupos de conglomerados con variables continuas	24 24.5%	49 50.0%	25 25.5%	98 100%

Tabla 102.- Distribución en conglomerados según coexpresión de Rc. de estrógenos y progesterona.

En el conglomerado 2 están asignados únicamente valores positivos para coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona. La representación gráfica:



Graf.49.-Representación gráfica según coexpresión de Rc.estrógnos y progesterona en cada conglomerado.

Aplicando test estadísticos de contraste:

	<u>Valor</u>	gl	Sig.asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	98.000 ^a	2	0.000
Razón de verosimilitud	135.857	2	0.000
Asociación lineal por lineal	0.020	1	0.887
N de casos válidos	98		

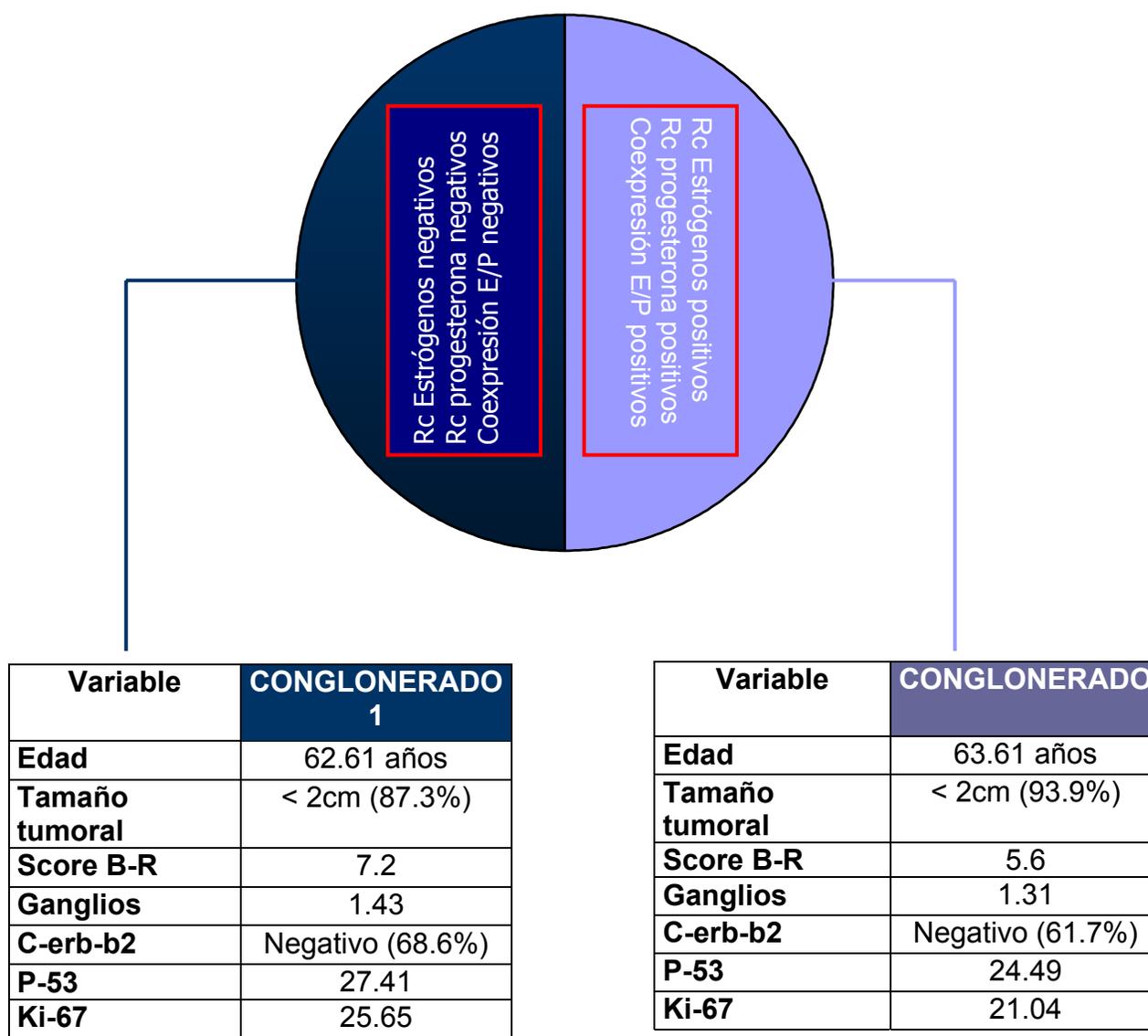
a.-0 casillas (0.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 12.00.

Tabla 103.- Aplicación de tests estadísticos para χ -cuadrado.

Observamos de nuevo que existe una **relación ALTAMENTE SIGNIFICATIVA entre ambos conglomerados (<0.001).**

2.- DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIABLES EN EL ANÁLISIS CLUSTER. *Perfiles de pacientes.*

Por último, y en resumen, con el análisis estadístico aplicado hemos separado dos grupos de pacientes en función de los resultados de distintas variables que se agrupan en torno a la expresión de receptores hormonales, obteniendo la existencia de dos perfiles de pacientes en función de las variables que agrupan:



V.-ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIAS

Por último, vamos a realizar un análisis de supervivencias mediante curvas de Kaplan-Meyer y análisis de regresión de Cox.

El tiempo de seguimiento total de las pacientes, cerrado en Agosto del 2004, ha sido de 65 meses (5 años y 4 meses), durante el cual, analizamos tiempo libre de enfermedad, recurrencia, meses de remisión total y parcial de la enfermedad, y tiempo de supervivencia global. El tiempo de seguimiento medio ha sido de 50 meses (4,16 años).

En conjunto, hemos tenido los siguientes eventos, durante el periodo de seguimiento:

- Casos de recidiva: **15**
- Casos de muerte: **14**
 - Muerte relacionada con cáncer: 9 casos (64,28%)

Es evidente, que el escaso número de eventos, consecuencia del escaso tiempo de seguimiento, impedirá, en gran medida, el hecho de poder poner de manifiesto relaciones estadísticamente significativas entre variables y sesgará, por tanto, las conclusiones de nuestro estudio.

Analizamos, a continuación , los casos de recidiva y muerte en función del perfil de las pacientes.

1.- ANALISIS DE RECIDIVAS

1.1.-Casos de Recidiva en función de datos anatomopatológicos

1.1.1.- Recidiva en relación a tamaño tumoral.

Analizaremos a continuación si existe alguna relación entre el tamaño del tumor en el momento de la cirugía y la recidiva de la enfermedad.

Tamaño	Total	Número de eventos	Meses remisión completa	Error estandar	Intervalo confianza (95%)
≤ 2 cm	102	15	59	2	56-63
>2 cm	15	0			
	117	15			

Tabla 104.-Relación entre recidivas y tamaño tumoral

Observamos que todos los eventos ocurren en pacientes con tamaño tumoral inferior o igual a dos centímetros, teniendo en cuenta que corresponden a más del 80% de las pacientes de nuestro estudio, lo cual, hace que la diferencia no tenga ningún valor estadístico:

	Estadístico	df	p
Log Rank	2,43	1	0,1193

Tabla 105.-Análisis de Kaplan-Meier en relación al tamaño tumoral.

1.1.2.- Recidiva en relación a grado histológico.

Pretendemos analizar si existen relaciones entre la existencia de recidiva tumoral (entendiendo la no recidiva como meses de remisión completa) y el grado histológico tumoral.

Score Bloom-Richardson	Total	Número de eventos	Meses de remision completa	Error estandar	Intervalo de confianza (95%)
3-6	53	7	60	2	55;64
7-9	54	6	61	2	57;65
	107	13			

Tabla 106.- Relacion entre recidivas y Score Bloom-Richardson

Observamos que el número de recidivas no difiere básicamente en uno y otro grupo; Aplicando estadísticos de contraste (Kaplan-Meyer):

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,05	1	0,8300

Tabla 107.- Análisis de Kaplan-Meier en relación a grado histológico

Es decir, en nuestro estudio, no existe relación entre la recidiva tumoral y el grado histológico.

1.1.3.- Recidiva en relación a existencia de metástasis linfáticas en el momento de la cirugía.

Relacionamos a continuación la relación, ampliamente demostrada, entre la existencia de metástasis linfáticas en el momento de la cirugía y la disminución en el número de meses de remisión completa.

Metástasis linfáticas	Total	Número de eventos
Axila negativa	62	3
Axila positiva	54	12
	116	15

Tabla 108.- Relación entre recidiva y ganglios metastásicos

Observamos, que respecto al tiempo de remisión completa:

Axila negativa (n=62 casos)

	T medio de remisión completa (meses)	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
N de casos	62	1	60;64

Tabla 109.- meses de remisión completa para axila negativa

Axila positiva(n=54 casos)

	T medio de remisión completa (meses)	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
N de casos	56	3	50;61

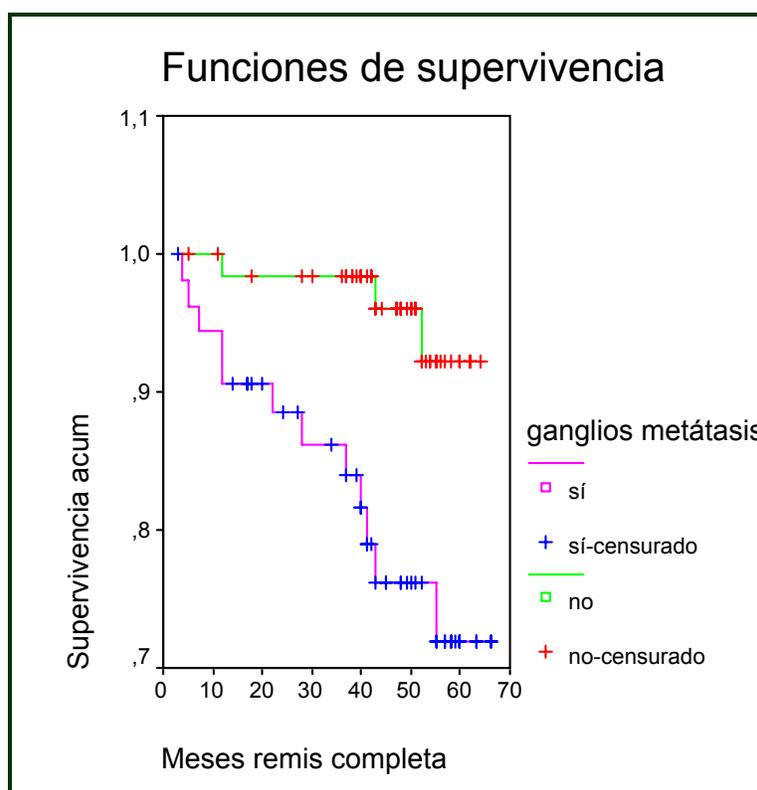
Tabla 110.- meses de remisión completa para axila positiva

Observamos, la existencia de un número mucho mayor de eventos en el caso de aquellas pacientes con afectación metastásica linfática en el momento de la cirugía, asociado a un menor tiempo de meses de remisión completa. Aplicando análisis de Kaplan-Meier:

	Estadístico	df	p
Log Rank	8,19	1	0,0042

Tabla 111.- Análisis de Kaplan-Meier en relación a metástasis linfáticas.

Observamos una diferencia estadísticamente significativa (**0,0042**)
La representación gráfica:



Graf.50.-Representación gráfica análisis Kaplan-Meier

1.2.-Casos de Recidiva en función de análisis inmunohistoquímico

1.2.1.- Recidiva en relación a sobreexpresión de CerbB2.

De la misma manera, realizamos análisis de recidiva respecto a la sobreexpresión de CerbB2 en las células tumorales.

CerbB2	Total	Número de eventos	Meses de remisión completa	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	38	7	59	2	55;64
Negativo	76	8	61	2	57;64
	114	15			

Tabla 112.-Relación entre recidivas y CerbB2

Observamos, que el número de eventos ocurre de manera independiente a la sobreexpresión de CerbB2 , sin diferencias respecto al tiempo de remisión completa, aplicando test estadísticos:

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,91	1	0,34

Tabla 113.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a CerbB2

1.2.2.- Recidiva en relación a sobreexpresión de p53

Analizamos a continuación si existen o no diferencias entre la sobreexpresión de p53 y el tiempo de remisión completa e la enfermedad.

Establecemos, como en apartados anteriores, la consideración de p53 positivo cuando se expresa en más del 25% de las células tumorales.

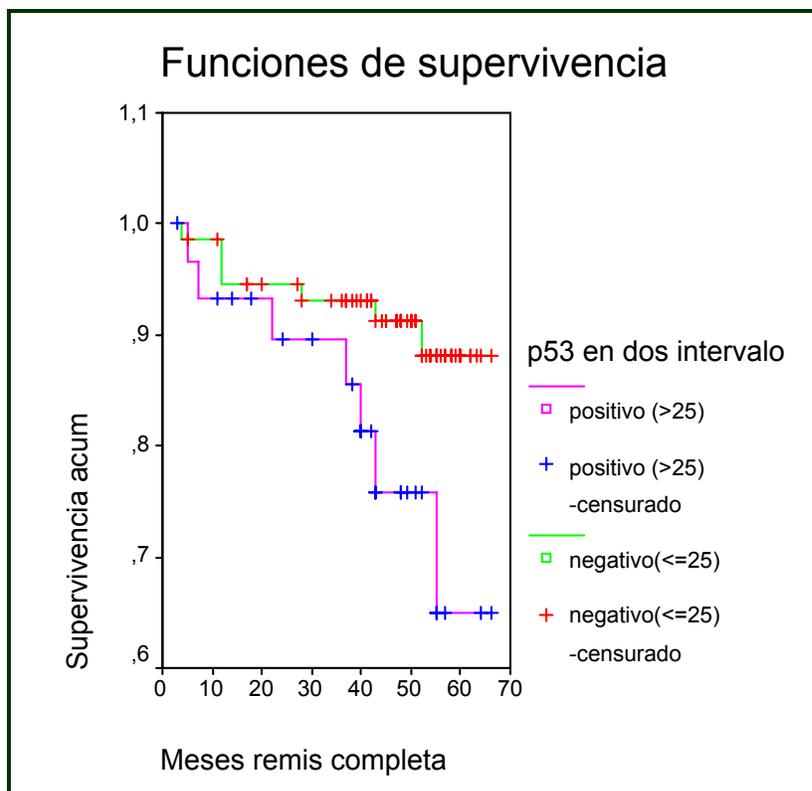
P53	Total	Número de eventos	Meses de remisión completa	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	31	7	56	3	49;62
Negativo	75	7	62	2	58;65
	114	15			

Tabla 114.-Relación entre recidivas y P53

Observamos el mismo número de eventos, con mucho menor número de pacientes para el grupo de p53 positivos, con menor media en cuanto a meses de remisión completa, lo que hace suponer diferencias estadísticamente significativas, como efectivamente sucede:

	Estadístico	df	p
Log Rank	4,21	1	0,0402

Tabla 115.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a P53



Graf.51.-Kaplan-Meier respecto a expresión de P53 y meses de remisión completa

1.2.3.- Recidiva en relación a sobreexpresión de Ki 67

Realizamos estos mismos análisis con la expresión de Ki 67.

<i>Ki 67</i>	Total	Número de eventos	Meses de remisión completa	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	30	3	61	3	55;66
Negativo	82	11	60	2	57;63
	112	14			

Tabla 116.-Relación entre recidivas y Ki 67

Al aplicar análisis estadístico no encontramos diferencias significativas.

	<i>Estadístico</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>Log Rank</i>	0,15	1	0,70

Tabla 117.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a Ki 67.

1.2.4.- Recidiva en relación a sobreexpresión de receptores de estrógenos

Considerando como en análisis previos como positivos aquellos tumores que expresan receptores de estrógenos en más del 50% de las células tumorales, analizamos esta variable en relación al número de eventos, en este caso, recidivas

<i>Receptores estrógenos</i>	Total	Número de eventos	Meses de remisión completa	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	90	13	59	2	56;63
Negativo	26	2	61	2	57;65
	116	15			

Tabla 118.-Relación entre recidivas y Receptores de estrógenos.

Sin encontrar diferencias estadísticamente significativas:

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,84	1	0,360

Tabla 119.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a Rc de estrógenos.

1.2.5.- Recidiva en relación a sobreexpresión de receptores de progesterona

Considerando como positivos aquellos tumores que sobreexpresan receptores de progesterona en más del 50% de las células tumorales, al igual que los receptores de estrógenos, no encontramos relación entre la sobreexpresión o no de los mismos y la aparición de recidivas.

Receptores progesterona	Total	Número de eventos	Meses de remisión completa	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	65	6	58	2	54;61
Negativo	51	8	60	2	55;64
	116	14			

Tabla 120.-Relación entre recidivas y Receptores de progesterona

Aplicando los tests estadísticos:

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,55	1	0,45

Tabla 121.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a Rc de progesterona.

1.3.-Análisis multivariante (análisis de regresión de COX)

Con el fin de establecer si existen relaciones cruzadas entre las variables del estudio y el tiempo de remisión completa, realizamos un estudio multivariante sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

		N	Porcentaje
Casos disponibles en el análisis	Evento(a)	11	9,1%
	Total	80	66,1%
	Casos con valores perdidos	91	75,2%
	Casos con tiempo negativo	29	24,0%
	censurados antes del evento más temprano en un estrato	0	
	Total	1	,8%
	Total	30	24,8%
Total		121	100,0%

a Variable dependiente: Meses remisión completa completa

Tabla 122.- Resumen del procesamiento de datos para el análisis de Cox.

Paso	-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior		
		Chi-cuadrado	gl	Sig.	cuadrado	gl	Sig.	cuadrado	gl	Sig.
1(a)	88,782	4,501	1	,034		1	,048	3,906	1	

a Variables introducidas en el paso número 1: P_53_2

b Bloque inicial número 0, función log de la verosimilitud inicial: -2 log de la verosimilitud: 92,688

c Bloque inicial número 1. Método = Por pasos hacia adelante (Razón de verosimilitud)

Tabla 123.- Análisis de datos.

2.- ANALISIS DE SUPERVIVENCIA.

2.1.-Casos de Mortalidad en función de datos anatomopatológicos

2.1.1- Mortalidad en relación a tamaño tumoral

Analizamos si existe relación entre los casos de muerte y el tamaño tumoral en el momento de la cirugía;

Tamaño	Total	Número de eventos	Meses de supervivencia	Error estandar	Intervalo confianza (95%)
≤ 2 cm	99	14	60	2	57-63
>2 cm	13	0			
	117	15			

Tabla 124.-Relación entre mortalidad y tamaño tumoral

Como en el caso de las recidivas ningún evento ocurre en el grupo de tumores más grandes, sesgado y no valorable por la diferencia numérica entre ambos grupos.

	<i>Estadístico</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>Log Rank</i>	2,66	1	0,1030

Tabla 125.-Análisis de Kaplan-Meier en relación al tamaño tumoral.

2.1.2- Mortalidad en relación a grado histológico

De la misma manera que analizamos el grado histológico para comprobar si existe relación respecto al número de casos de muerte, no encontramos ninguna relación entre ambas variables

Score Bloom-Richardson	Total	Número de eventos	Meses de supervivencia	Error estandar	Intervalo de confianza (95%)
3-6	52	5	62	2	59;65
7-9	51	8	59	2	54;64
	103	13			

Tabla 126.- Relacion entre mortalidad y Score Bloom-Richardson

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,55	1	0,4595

Tabla 127.-Análisis de Kaplan-Meier en relación al grado histológico.

2.1.3- Mortalidad en relación a metástasis linfáticas

Analizando el número de eventos acontecidos en caso de axila positiva o negativa:

Metástasis linfáticas	Total	Número de eventos
Axila negativa	60	5
Axila positiva	52	9
	112	14

Tabla 128.- Relación entre mortalidad y ganglios metastásicos

Aplicamos los tests correspondientes, observando que no existen diferencias estadísticamente significativas, probablemente explicable por el escaso tiempo de seguimiento para el análisis de mortalidad:

	Estadístico	df	p
Log Rank	2,21	1	0,1367

Tabla 129.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a ganglios metastásicos

2.2.-Casos de Mortalidad en relación a variables inmunohistoquímicas.**2.2.1.- Mortalidad en relación a sobreexpresión de CerbB2.**

De la misma manera que realizamos el análisis de las recidivas, realizamos el análisis de mortalidad en relación a expresión de CerbB2 sin encontrar relaciones estadísticamente significativas:

CerbB2	Total	Número de eventos	Meses de remisión completa	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	38	7	59	2	55;64
Negativo	72	7	62	2	58;65
	110	14			

Tabla 130.-Relación entre mortalidad y CerbB2

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,84	1	0,3586

Tabla 131.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a CerbB2

2.2.2.- Mortalidad en relación a sobreexpresión de P53.

En relación a los casos de muerte,establecemos el análisis con la expresión de P53, dela misma forma que hicimos con los casos de recidiva:

P53	Total	Número de eventos	Meses de supervivencia	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	29	4	59	3	53;65
Negativo	72	10	60	2	57;64
	101	14			

Tabla 132.-Relación entre mortalidad y P53

Sin encontrar relación entre la sobreexpresión de p53 y los casos de mortalidad:

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,01	1	0,91

Tabla 133.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a p53

2.2.3.- Mortalidad en relación a sobreexpresión de Ki-67.

Clasificando Ki67 en positivo o negativo como lo hicimos en el caso de la recidiva, no encontramos relación entre la sobreexpresión de Ki 67 los casos de mortalidad.

Ki 67	Total	Número de eventos	Meses de supervivencia	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	27	3	60	3	57;64
Negativo	80	11	62	2	56;67
	101	14			

Tabla 134.-Relación entre mortalidad y Ki 67

Aplicando análisis de Kaplan-Meier, no encontramos evidencias de relación estadísticamente significativa:

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,43	1	0,511

Tabla 135.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a Ki 67.

2.2.4.- Mortalidad en relación a sobreexpresión de receptores de estrógenos

Analizamos esta relación sin encontrar diferencias estadísticamente significativas:

Rc estrógenos	Total	Número de eventos	Meses de supervivencia	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	86	14	59	2	56;63
Negativo	25	0			
	111	14			

Tabla 136.-Relación entre mortalidad y receptores de estrógenos

Al no tener ningún evento en el grupo con receptores de estrógenos negativos las diferencias no son valorables

	Estadístico	df	p
Log Rank	4,25	1	0,0393

Tabla 137.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a receptores de estrógenos.

2.2.5.- Mortalidad en relación a sobreexpresión de receptores de progesterona.

Analizamos la relación entre receptores de progesterona y mortalidad, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas como expresamos a continuación:

Rc progesterona	Total	Número de eventos	Meses de supervivencia	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Positivo	61	8	57	2	53;60
Negativo	50	6	62	2	58;65
	111	14			

Tabla 138.-Relación entre mortalidad y receptores de progesterona.

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,49	1	0,4827

Tabla 139.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a receptores de progesterona.

3.- ANALISIS DE RECIDIVAS Y SUPERVIVENCIA EN EL ANALISIS DE CONGLOMERADOS.

3.1-Análisis de recidivas

Realizamos a continuación análisis de recidivas en cada uno de los conglomerados descritos, para reconocer si existen diferencias en cuanto al período libre de enfermedad en uno u otro grupo de pacientes según la asociación de factores pronósticos que constituyen cada uno de los perfiles.

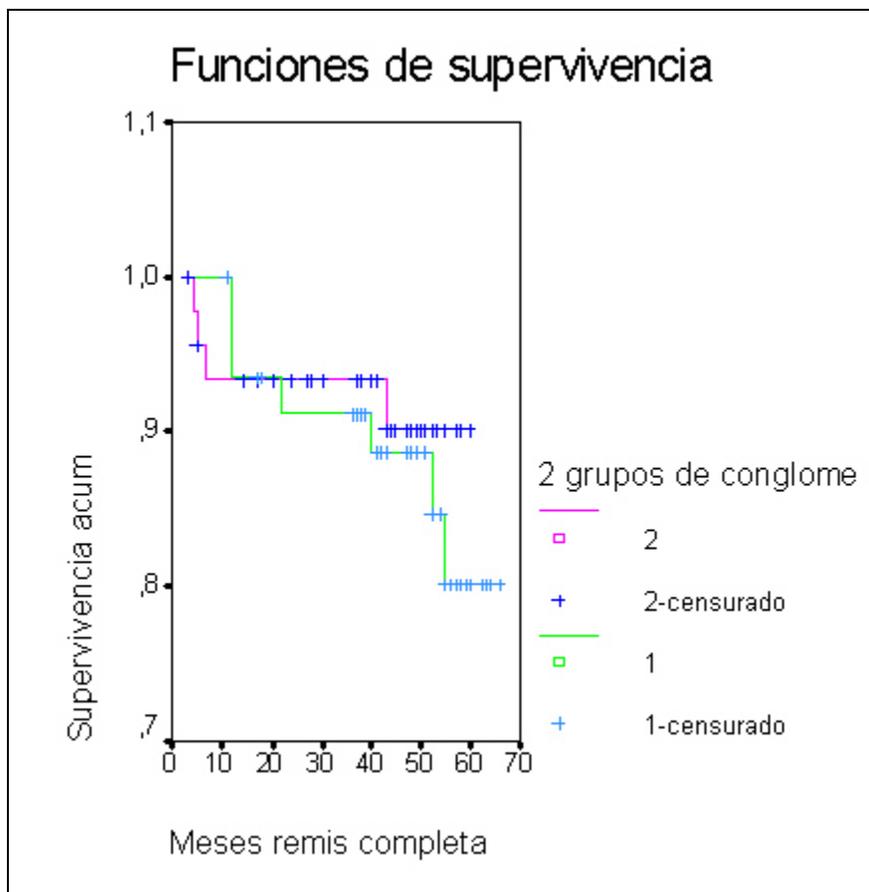
Conglomerado	Total	Número de eventos	Meses de remisión completa	Error standar	Intervalo de confianza (95%)
Grupo 1	47	7	60	2	55;64
Grupo 2	47	4	56	2	52;60
	94	11			

Tabla 140.-Análisis de recidivas en los dos grupos de conglomerados

	Estadístico	df	p
Log Rank	0,37	1	0,5408

Tabla 141.-Análisis de Kaplan-Meier en relación a recidivas según perfil de pacientes.

Si bien estrictamente la diferencia no es estadísticamente significativa, observamos una tendencia a que los dos grupos de conglomerados tengan un comportamiento distinto respecto a las recidivas. La representación gráfica la exponemos a continuación:



Graf.52.-Kaplan Meyer en los conglomerados

EN RESUMEN:

Obtenemos los siguientes datos de asociación entre variables:

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS:

- Mayor Sobreexpresión de receptores de hormonas esteroideas en menores de 50 años.
- Para receptores de estrógenos $p < 0,027$
- Mayor sobreexpresión de Ki67 y P53 en este grupo (N.S)

ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Encontramos relaciones entre las siguientes variables:

- $p < 0,05$:
 - Score Bloom-Richardson y Receptores de estrógenos (mayores grado histológico a menor sobreexpresión de receptores de estrógenos).
 - Metástasis ganglionares con cifras altas de p53.
 - Sobreexpresión de CerbB2 y sobreexpresión de Ki67.
- $P < 0,01$:
 - Encontramos relación con score Bloom-Richardson y receptores de progesterona al igual que con receptores de estrógenos pero con mayor significación estadística.
 - Relación entre score Bloom-Richardson y sobreexpresión de Ki-67, de tal manera que relacionamos alto grado istológico con la sobreexpresión de Ki67.
 - Relacionamos sobreexpresión de Ki67 con la sobreexpresión de p53, y observamos, como ya hemos visto, un comportamiento y relaciones bastante similares.
 - Asociación muy significativa entre expresión de receptores de estrógenos y progestágenos, como es esperable.
 - Fuerte asociación entre sobreexpresión de Ki-67 y receptores de estrógenos negativos

Parece que con esos datos podríamos establecer relaciones que nos hagan suponer:

1.- Pacientes con fenotipo tumoral menos agresivo:

- Pacientes con receptores de estrógenos positivos se asocian a :
 - Receptores de progesterona positivos
 - Mayor edad al diagnóstico
 - Grado histológico más bajo
 - Cifras de Ki67 más bajas.

2.- Pacientes con fenotipo tumoral más agresivo:

- Tumores de alto grado histológico:
 - Valores altos de Ki67
 - Receptores de estrógenos negativos.
 - Receptores de Progesterona negativos.

- Sobreexpresión de P53:
 - Valores altos de Ki67.
 - Metástasis ganglionares.
 - MAYOR TASA DE RECIDIVAS.

- Sobreexpresión de CerbB2:
 - Valores altos de Ki67

DISCUSION

La identificación de marcadores moleculares pronósticos se ha convertido en uno de los objetivos de los estudios actuales de cáncer de mama. Estos marcadores, potencialmente deben servir como complemento al estadiaje clínico-patológico de la enfermedad, con el fin de identificar aquellos pacientes con un riesgo incrementado de progresión o recurrencia de la enfermedad que precisaran de un tratamiento sistémico.

Los candidatos a marcadores en cáncer de mama, incluyen índices de proliferación celular como Ki-67; sobreexpresión de receptores estrogénicos y de progesterona; marcadores de sobreexpresión oncogenética, como C-erb_b2, Factor transformante de crecimiento α (TGF- α); indicadores de desbalances en la apoptosis celular, incluyendo sobreexpresión de bcl-2 y incremento en relación bax/bcl2; marcadores de pérdida de señal celular, como el acúmulo de la proteína nuclear p53; marcadores de alteración de señales de diferenciación celular, como el acúmulo de c-myc; marcadores de pérdida de diferenciación celular como TGF- β ; y, por último, marcadores de angiogénesis tumoral como la sobreexpresión de el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

La sobreexpresión de los oncogenes C-erb-B2 y P-53 son las anomalías genéticas más comúnmente asociadas al cáncer de mama, demostrándose la relación existente respecto a la disminución de la supervivencia en pacientes con tumores que sobreexpresan C-erb-B2 y p53.

La demostración de la asociación de la sobreexpresión de una oncoproteína y su comportamiento biológico puede ser usada para interferir en un papel central en el fenotipo maligno. Puede ser el caso de C-erb-B2 donde se ha demostrado peor pronóstico en pacientes con C-erb-B2 positivo conjuntamente a la suposición de que C-erb-B2 juega también un importante papel en la progresión del cáncer.

Estos biomarcadores indican un proceso molecular que está siendo perturbado y la mayoría de ellos resultan en la sobreexpresión o el acúmulo de una sustancia que puede ser demostrado por técnicas inmunohistoquímicas.

Conocemos como **factores pronósticos** en cáncer de mama, las características clínicas, anatomopatológicas y biológicas del tumor que confieren a la paciente afectada de la enfermedad una determinada probabilidad de supervivencia y recurrencia de enfermedad en ausencia de tratamiento, aunque en la práctica nos referimos a la ausencia de tratamiento adyuvante después de la cirugía inicial; En contraposición, conocemos como **factores predictivos** en cáncer de mama las características clínicas, anatomopatológicas y biológicas del tumor que son usadas para estimar la probabilidad de respuesta a un determinado tipo de terapia adyuvante.

En conjunto, entre el 40-50% de las pacientes que desarrollan cáncer de mama morirían con el tiempo por causas relacionadas con su enfermedad. Para mejorar estas perspectivas se añade terapia adyuvante tras la cirugía inicial. Aunque esta terapia es potencialmente beneficiosa, este tipo de fármacos citotóxicos y hormonales no están carentes de importantes efectos secundarios, por lo que lo ideal sería restringir este tipo de drogas únicamente para pacientes destinados a tener recurrencias o morir debido a la enfermedad. Desafortunadamente, no existen factores pronósticos o predictivos que identifiquen de manera inequívoca aquellos pacientes en los que existirá recidiva, muerte o buena o mala respuesta a la quimioterapia. Los metaanálisis que combinan resultados de los grandes estudios sobre cáncer de mama muestran que añadiendo quimioterapia y hormonoterapia la mortalidad por cáncer de mama se reduce hasta en el 30% en conjunto¹⁸⁷. Esto viene a significar que si por ejemplo un oncólogo tratara con quimioterapia a 100 pacientes cuya estimación de mortalidad sea de un 50% , salvará no más de 15 vidas adicionales (50% de mortalidad reducida al $30\% = 50 \times 0,3 = 15$); por el mismo razonamiento si tratamos con quimioterapia a 100 pacientes con una tasa de mortalidad del 30% , estaremos salvando no más de 9 vidas adicionales ($30 \times 0,3 = 9$); Cuando la mortalidad por cáncer está estimada en un 10% sólo 1 ó 2 pacientes de un grupo de 100 seán beneficiadas con el tratamiento, lo que es lo mismo que el número de pacientes que tendrán efectos secundarios graves con resultado de muerte debido a la toxicidad de la quimioterapia. El límite del 10% de mortalidad estimada para cáncer de mama se ha convertido, de este modo, en el límite que muchos clínicos utilizan para no aplicar quimioterapia a estas pacientes.

El único factor aceptado por todos como pronóstico de cáncer de mama de manera inequívoca, con el suficiente poder como para identificar pacientes con un mal pronóstico de la enfermedad es el TNM. Como ya hemos visto, en la base de todos los estudios a este respecto, sabemos que las pacientes con tumores pequeños (<1 cm) y axila negativa tienen una mortalidad esperada en torno a algo menos de un 10% . Sobre este tipo de tumores hemos por tanto que aunar esfuerzos primero para identificarlos mediante un diagnóstico precoz del cáncer de mama y segundo para identificar nuevos factores pronósticos y predictivos y apostar por ellos en la práctica para lo que necesitamos estudios rigurosos que los validen.

La literatura muestra ,como hemos comentado previamente a lo largo de esta tesis, más de 100 factores pronósticos relacionados con el cáncer de mama; para que un determinado factor sea considerado como “oficial” dentro de las Guías Clínicas del cancer de mama, con utilidad como para ser recomendado deben de cumplirse tres condiciones indispensables: debe estar **técnicamente validado** (la técnica usada para medir el factor debe ser específica, sensible, reproducible e interpretada de manera uniforme de laboratorio a laboratorio); debe estar **clínicamente validado**, es decir debe identificar grupos de pacientes con diferente riesgo para recurrencia ,supervivencia o respuesta a un tratamiento de manera independiente a otros factores; y por último, debe ser **útil**, lo que significa que debe estar siendo usado por los clínicos para tomar decisiones terapéuticas.

Los únicos factores conocidos que cumplen estos requisitos son el estadiage TNM (para estimar pronóstico) y la determinación de receptores de estrógenos y

progesterona (para predecir respuesta a hormonoterapia). Estos últimos han variado en cuanto a su determinación, siendo validada la inmunohistoquímica como la técnica “gold standar” en el momento actual (reemplazando la que durante años ha sido la determinación “oficial” por métodos bioquímicos como también hemos discutido en capítulos anteriores); con el desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímicas determinados factores están siendo aceptados, entre ellos, en particular CerbB2, p53 y Ki-67 en cuyas determinaciones nos basamos en esta tesis.

Por tanto, en este trabajo pretendemos destacar el papel de los marcadores inmunohistoquímicos (p-53, C-erb-B2, Ki-67, Receptores de estrógenos y progesterona) en relación a variables clinicopatológicas para conformar un perfil de paciente en el que puedan ser aplicados otros factores de orden pronóstico y predictivo.

1.- CERBB2 Y CANCER DE MAMA.

Muchos son los estudios que han demostrado que la amplificación de C-erb-b2 se correlaciona con peor pronóstico y disminución del tiempo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama^{150 188 189 190 191 192}.

En numerosos estudios clínicos la sobreexpresión de CerbB2 ha sido asociada a gran número de factores pronósticos adversos: asociación con negatividad en receptores de estrógenos y progesterona, edades más jóvenes de las pacientes, grado histológico más agresivo (Grado 3 de Bloom-Richardson), y aumento del número de lesiones linfáticas metastásicas.^{193 194}

Según la literatura, la sobreexpresión inmunohistoquímica de C-erb-b2 en cáncer invasivo de mama es de 20-30%^{116 195 196}. En los distintos estudios consultados, en la práctica y dado que se considera como positivos los casos 3+ este porcentaje es menor, en torno a un 15%, como se demuestra en un trabajo muy reciente, publicado en Octubre del 2003, de Sussane Taucher¹⁹⁷, usando, al igual que nosotros el HercepTest de DAKO.

Sabemos que las técnicas de detección de la sobreexpresión de HER-2/neu son de dos tipos: técnicas basadas en la expresión morfológica de la sobreexpresión (técnicas de inmunohistoquímica) y técnicas basadas en la detección molecular de la amplificación del gen o de la sobreexpresión de la proteína (p 185^{HER2}).

Como sabemos las técnicas inmunohistoquímicas son métodos semicuantitativos más que cualitativos, dado que la expresión de Her2/neu se localiza en todas las células epiteliales de la mama. Por ello es necesario

establecer una relación entre la expresión de la intensidad inmunohistoquímica y el número de receptores de Her2/neu en la superficie celular. Así se ha demostrado que el score 0 en inmunohistoquímica se corresponde a 20.000 receptores en la superficie celular, 1+ corresponde a unos 100.000 receptores, 2+ a unos 500.000 receptores y 3+ en 2.300.000 receptores (en todos los casos, como ya explicamos en el apartado de material y métodos en más del 10% de las células). Cuando las técnicas de inmunohistoquímica están rigurosamente procesadas, se ha demostrado que existe una excelente correlación con el estatus de amplificación génica y la sobreexpresión de la oncoproteína^{198 199 200}.

Desde que la FDA aprobó el uso de Trastuzumab en cáncer metastásico de mama, la detección de C-erbB2 se ha convertido en esencial. El primer test clínico aprobado por la FDA para la detección de la expresión de C-erbB2 es el DAKO Hercept-test. Sólo los resultados 3+ en este test se correlacionan con los resultados con Trastuzumab en los CLINICAL TRIALS. Scores 2+ no se correlacionan del todo bien y se han demostrado insuficientes para el tratamiento con Trastuzumab²⁰¹ a menos que este resultado se confirme mediante técnicas de FISH^{202 203 204 205}.

En el trabajo publicado por Jeffrey Ross en Agosto de 2003²⁰⁶ donde realiza un análisis de Her-2/ neu en relación a su papel como marcador pronóstico de cáncer de mama, deteniéndose sobre todo en determinar cual es la técnica más adecuada para la detección de la sobreexpresión, de 81 estudios consultados, considerando un total de 27.161 pacientes, en 73 (90%) encontraron que tanto la detección de la amplificación del gen Her-2/neu como la sobreexpresión de la oncoproteína p 185^{HER2} son predictores del pronóstico del cáncer de mama tanto en análisis univariantes como en multivariantes. En 52 (71%) de 73 estudios de carácter multivariante, el significado pronóstico adverso de la amplificación del gen HER-2/neu, el receptor, o la sobreexpresión de la oncoproteína fueron independientes de el resto de las variables pronósticas del cáncer de mama. Sólo en 8 de los estudios (10%) no muestran relación entre el estatus de Her-2/neu y el pronóstico. De éstos, en 5 de los estudios, usan inmunohistoquímica en tejidos incluidos en parafina, 2 de ellos usan análisis de Southern-Blot y uno de ellos PCR (Polymerase Chain Reaction). Todos los estudios que analiza el autor que usan técnicas de FISH (Fluorescence in situ hybridization) (8 estudios) demuestran relación pronóstica en cuanto a la amplificación del gen y el pronóstico de la enfermedad.

Las desventajas de las técnicas de FISH incluyen el elevado coste que suponen, mayor tiempo en el procesamiento de los especímenes, requerimiento de microscopio fluorescente, y a veces dificultad para identificar las células invasivas tumorales. La FDA tiene aprobados dos de estas técnicas de FISH: el INFORM-test® (Ventana Medical System) y el Abbott-Vysis Path Vysion® (Abbott Laboratories). Estudios demuestran que ambos tests se correlacionan casi al 100%²⁰⁷.

La FDA aprueba el uso sistemático de técnicas de FISH únicamente para un grupo de pacientes seleccionadas para tratamiento con Trastuzumab.

Teniendo en cuenta estos datos, y como desarrollamos en el apartado de material y métodos, nosotros únicamente consideramos como positivos aquellos casos en los que encontramos 3+, lo que representa en nuestra muestra un porcentaje del 33,9% de los casos, es decir, un porcentaje algo alto según los estudios consultados ^{195,196,197,206,253}.

Intentamos desvelar el significado pronóstico de la sobreexpresión de C-erbB2 en asociación a otros factores pronósticos conocidos para cáncer de mama en el grupo de pacientes de nuestro estudio.

Estudios previos han demostrado la relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de c-erb-b2 y la diferenciación histológica tumoral ^{73,208}. Parece que la sobreexpresión de c-erb-b2 puede tener su papel principal en un aumento del potencial del crecimiento tumoral.

De los estudios “pronósticos” consultados, que incluyen más de 15.000 pacientes afectas de cáncer de mama, la mayoría de ellos encuentran algún tipo de relación, en mayor o menor grado, entre sobreexpresión de C-erb-b2 y peor pronóstico de la enfermedad ^{115,196,209,210, 211, 212, 213 214 215 216 217}. Una cuidadosa revisión de estos artículos, sin embargo, sugiere que la implicación de C-erb-B2 en cáncer de mama puede ser más predictiva que pronóstica. Por ejemplo, de 24 estudios todos ellos con pacientes con axila negativa (la mayoría de ellos no recibieron quimioterapia adyuvante), en 11 de ellos ^{148 216 218 219} no encontraron relación entre la sobreexpresión de C-erb-B2 y el pronóstico de la enfermedad, y 13 fueron positivos ^{153,214,223,226,220} en cuanto al hallazgo de relación entre sobreexpresión y pronóstico aunque algunos de ellos fueron solo significativos en pequeños grupos de pacientes ^{153 221}. Estos resultados ambiguos, lo único que hacen es sugerir que C-erb-B2 es un débil factor pronóstico. En contraste a estos datos, de 22 estudios con pacientes con axila positiva, la mayoría de las cuales recibieron quimioterapia adyuvante, 19 de ellos mostraron una relación fuertemente positiva entre C-erb-B2 y pronóstico de la enfermedad ^{53,213,227}. Algunos estudios randomizados han demostrado además una relación directa entre sobreexpresión de C-erb-B2 y resistencia a ciclofosfamida y metrotexate ^{134,222,223}, así como en el estudio publicado por Muss y Thor ¹²⁹ se demuestra una mejor respuesta a adriamicina en pacientes con sobreexpresión de C-erb-B2, validado en un estudio prospectivo posterior del mismo autor ²²⁴; otros estudios han demostrado, como hemos visto, relación con resistencia a tamoxifeno ²²⁵.

En cuanto a datos epidemiológicos generales, no encontramos en nuestro estudio relación estadísticamente significativa entre C-erb-b2 y edad de la paciente existiendo en la literatura estudios que correlacionan con edad joven de la paciente la sobreexpresión de C-erb-b2 ^{54,229}; en octubre del 2003, en Cancer, Taucher ¹² encuentra una fuerte relación con edad joven con $p < 0,00064$. así mismo son múltiples los estudios en los que, como en nuestro estudio, no se

encuentra asociación entre sobreexpresión de C-erbB2 y edad de la paciente.^{229,233,226 227 228 229}

Observamos que en el análisis cluster el grupo de pacientes con C-erb-B2 más alto presentan edades ligeramente más jóvenes (rango entre 58 y 66 años), sin ser estadísticamente significativo.

No encontramos relación entre C-erbB2 y el estatus menopáusico, al componente comedocarcinoma del tumor, a la afectación linfática (sí observamos mayor sobreexpresión de C-erbB2 en el grupo de pacientes con metástasis linfáticas, no estadísticamente significativa) ni al Score Bloom-Richardson. Respecto a su distribución en el análisis cluster hablaremos al final de este apartado.

En cuanto a la relación de C-erbB2 con el resto de los datos en el estudio inmunohistoquímico de la pieza quirúrgica, no encontramos relación entre C-erbB2 y p53 (ampliamente demostrada en diversos estudios en el estudio publicado por Barbareschi²³⁰ relación entre P53 y C-erbB2 $p < 0,005$), aunque sí encontramos relación estadísticamente significativa entre sobreexpresión de C-erbB2 y sobreexpresión de KI-67 ($p < 0,05$); dado que en nuestro estudio se demuestra una fuerte correlación entre el comportamiento de p53 y el de KI-67, es probable que con el aumento del tamaño muestral la relación de C-erbB2 y P53 se mostrara significativa.

Tampoco encontramos en nuestro estudio relación estadísticamente significativa entre C-erbB2 y receptores hormonales.

2.- P53 Y CÁNCER DE MAMA

Muchos son los estudios que evalúan las implicaciones pronósticas y predictivas de p-53 en cáncer de mama²³¹.

La gran mayoría muestra una fuerte relación entre la mutación de p-53 y mal pronóstico de la enfermedad^{226 232 233 234}.

En los estudios de Friedrichs y Silvestrini^{233,234} se demuestra la asociación entre la sobreexpresión de p-53 y el mal pronóstico de la enfermedad en pacientes con axila negativa sin tratamiento adyuvante. La mayoría de estudios con pacientes con axila positiva, que reciben terapia adyuvante, demuestran que la sobreexpresión de p53 también está relacionada con peor pronóstico de la enfermedad, sugiriendo que p53 podría ser un factor predictivo y además un factor pronóstico^{235 236}.

Existen evidencias de que p53 es un fuerte e independiente factor pronóstico, válido sobre todo para categorizar tumores asociados a alto riesgo (mal pronóstico de la enfermedad), pero no lo suficientemente válido en tumores de bajo riesgo o asociados a pronósticos favorables, como para modificar la terapia adyuvante habitual en función a la no sobreexpresión de este factor.

Así, la mayoría de oncólogos usan actualmente la determinación de p-53 en cáncer de mama como ayuda para elaborar decisiones de tratamiento para pacientes con indicaciones borderline o complicados por otros factores.

En el trabajo publicado por Cattoretti y cols²³⁷ donde estudian la asociación entre p53 y otros factores pronósticos, encuentran significativa la asociación con la carencia de receptores de estrógenos pero sin encontrar relación estadísticamente significativa con el tamaño tumoral, grados B-R, o afectación linfática. Ostrowsky and cols²³⁸ encontraron una pobre asociación entre la sobreexpresión de P-53 y los bajos niveles de Rc de estrógenos y el estatus postmenopáusico, encontrando relación entre p-53 y alto grado tumoral. Encontraron que los pacientes con sobreexpresión de p-53 tenían peor pronóstico, aunque no estadísticamente significativo.

En nuestro estudio, observamos un 71% de los casos no sobreexpresan p-53 frente al 29% que sí lo hacen, comparado con el 35.6% de los casos en el trabajo de Ostrowsky , y el 45,5% reportado por Cattoretti y colaboradores . Es decir observamos una proporción de sobreexpresión de p-53 algo menor, lo cual puede ser explicable por la técnica usada, ya que Ostrowsky usa para la detección inmunohistoquímica el anticuerpo Pab1801 (anticuerpo derivado de clon obtenido de SV-40 transformado de línea celular de fibroblastos humanos que reacciona con epitope de la proteína p-53) y nosotros usamos proteína p-53 recombinante, clon DO7, que reacciona con el extremo N-terminal de p-53.

En el último trabajo revisado hasta la fecha, en Noviembre de 2003, se identifica expresión de p-53 en el 72% de los cánceres de mama estudiados (43 de 60)²³⁹ . En este trabajo, encuentran asociación únicamente, y de manera muy significativa con los receptores estrogénicos negativos .En nuestro estudio $p=0,1$ y no existe correlación entre receptores de estrógenos y p53 estadísticamente significativa en Spearman. Sin embargo, observamos asociación estadísticamente significativa entre la coexpresión de estrógenos y progesterona y P53, de tal manera que observamos cifras de P53 más bajas en aquellos casos en los que existe coexpresión de receptores de hormonas esteroideas, con $p=0,036$.

Analizaremos a continuación los hallazgos obtenidos en relación a p-53 y el resto de variables estudiadas.

La relación entre C-erb-B2 y p-53 no es estadísticamente significativa ($p=0.805$) , aunque se aprecia mayor número de casos p-53 negativos en caso de no sobreexpresión de C-erb-B2.

En la segunda parte de nuestro estudio analítico, comparamos la sobreexpresión de p-53 en relación a datos clinicopatológicos, encontrando, respecto a la edad de las pacientes una mayor sobreexpresión en pacientes menores de 50 años, pero sin ser estadísticamente significativo ($p=1$); este resultado es equiparable al encontrado en el estudio realizado por Takashi Yokota con $p=0.79$ ¹⁴⁵.

Respecto al estado menopaúsico, encontramos una mayor sobreexpresión en postmenopaúsicas, no estadísticamente significativo ($p=1$). En el estudio nombrado anteriormente, tampoco se encontró relación entre la menopausia y la sobreexpresión de p-53 ($p=0.83$). En el trabajo publicado por Ostrowsky²⁴⁶, se observa una mayor sobreexpresión de p-53 en pacientes postmenopaúsicas con $p<0,1$.

No encontramos relación entre los receptores estrogénicos y la expresión de p53. En el último trabajo revisado hasta la fecha, publicado en Noviembre de 2003 en Cancer²⁴⁷ encuentran asociación únicamente, y de manera muy significativa con los receptores estrogénicos negativos (en nuestro estudio $p=0,1$ y no existe correlación entre receptores de estrógenos y p53 estadísticamente significativa en Spearman). No encontramos relación con los receptores de progesterona.

Encontramos una relación muy fuerte entre p-53 y Ki-67 ($p<0,0001$), comportándose ki-67 de manera similar a p-53 aunque con más relaciones estadísticamente significativas como veremos más adelante.

En cuanto a la relación entre p-53 y el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica, encontramos, respecto al tamaño tumoral una mayor sobreexpresión de p-53 y Ki-67 en tumores mayores de 2 cm, pero sin significación estadística, lo cual es equiparable a lo publicado por Takashi ($p=0.026$). Este mismo autor relacionó la existencia de sobreexpresión de p-53 con la existencia de metástasis ganglionares en el momento de la cirugía con $p=0,062$; con respecto a este punto, **encontramos en nuestro estudio relación estadísticamente significativa entre la afectación linfática y la sobreexpresión de p-53 con $p=0,034$.**

En el estudio publicado por Banu en Noviembre de 2003²⁴⁷, donde se analizaron 60 pacientes con diagnóstico de cancer de mama y metástasis linfáticas mediante test de correlación de Sperman, observaron que en los casos donde no existía sobreexpresión de receptores de estrógenos existía mayor número de pacientes on afectación axilar de forma estadísticamente significativa, demostrando que p53 se expresa en el 60% de las metástasis linfáticas , pero no pudieron demostrar relación con la supervivencia debido la escaso tiempo de seguimiento.

En cuanto al grado histológico (Score Bloom-Richardson y modificación de Elston-Ellis), y la sobreexpresión de p-53, observamos en nuestro estudio una menor sobreexpresión de p-53 en pacientes con grado histológico más bajo pero sin significación estadística ($p=0.64$). Encontramos, sin embargo, una fuerte

asociación estadística ($p=0.001$), entre el grado histológico y la sobreexpresión de Ki-67. En el trabajo publicado por Takashi¹⁴⁵, tampoco encuentran relación estadísticamente significativa con $p=0,17$.

En el trabajo publicado por Ostrowosky²⁴⁶, donde se analizaron a 90 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama, y cuyo objetivo fue determinar el significado pronóstico de p-53 y cáncer de mama determinado por inmunohistoquímica y su relación a otros factores pronósticos, con un período medio de observación de 28 ± 7.2 meses, con seguimiento mínimo de 15 meses, encontraron relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de p-53 y el estatus menopáusico ($p<0,1$), el alto grado histológico con $p<0.05$, y con el hallazgo de axila positiva en el examen anatomopatológico, así como una fuerte relación entre la coexpresión de receptores de estrógenos y progesterona con $p<0,005$.

No encontraron relación entre la sobreexpresión de p-53 y los receptores estrogénicos ($p<0,1$)

Demostraron además supervivencias más cortas en tumores con p-53 más alto, sin resultados estadísticamente significativos, así como mayores supervivencias en pacientes con Rc de progesterona positivos con $p<0,025$, pero no en relación a receptores estrogénicos.

En el estudio publicado por Barbareshi²³⁰ donde se analizan 97 casos de cáncer de mama (83 carcinomas ductales infiltrantes; 8 casos de carcinomas lobulillares infiltrantes; 6 carcinomas ductales in situ), junto con 20 casos de lesiones no malignas de mama (fibroadenomas, adenosis e hiperplasias epiteliales) estudian la sobreexpresión de C-erbB2, P53, Ki-67 y estatus hormonal en relación al tamaño tumoral, estatus de invasión linfática, edad de la paciente, grado histológico y recuento de mitosis. Respecto al comportamiento en aquellos tumores que sobreexpresan p53 encontraron una fuerte asociación con KI-67, alto recuento mitótico, C-erb-b2, receptores hormonales negativos y grado histológico. No encontraron relación estadísticamente significativa entre la edad de la paciente, la invasión linfática, estatus menopáusico y tamaño tumoral. Demostraron además que todos los casos de carcinoma lobulillar infiltrante y en todos los casos de lesiones no malignas p53 fue negativo.

3.- RECEPTORES HORMONALES Y CÁNCER DE MAMA

Múltiples publicaciones han demostrado el valor pronóstico del estatus de los receptores de estrógenos y progesterona estando de acuerdo en que los tumores con receptores hormonales negativos poseen un mayor grado de malignidad^{240 241}

En el artículo publicado por Takashi Yokota,¹⁴⁵ donde se estudiaban a 70 pacientes con cáncer de mama para estudiar factores pronósticos en estudio inmunohistoquímico, se observó una correlación estadísticamente significativa entre receptores de estrógenos y de progesterona ($p=0,0101$) y relación inversa con p-53 ($p=0,0026$). No encontraron correlación con el estatus menopáusico, la edad de las pacientes, el estadio al diagnóstico ni con el grado histológico. Encontraron relación estadísticamente significativa entre la afectación linfática y los receptores de progestágenos negativos ($p=0,0253$).

Existen varias publicaciones que relacionan la invasión linfática con el estatus de los Rc de Pg^{238, 242}

En el artículo publicado por Ostrowski²³⁶ se encontró en el estudio de 90 casos de cáncer de mama en estadio operable, relación entre receptores de progesterona positivos y mayor supervivencia ($p<0.025$) sin encontrar relación entre supervivencia y estatus de receptores de estrógenos.

Pinder et al²⁴³ demostró que no existía correlación entre niveles de receptores de estrógenos y progesterona y el grado histológico e invasión linfática.

Considerando como positivos en técnicas de inmunohistoquímica, como ya hemos repetido en varias ocasiones, únicamente los casos con alta positividad (+++) en nuestro estudio el 61,9% de las pacientes mostraron receptores de estrógenos positivos, y el 31,4 % de pacientes receptores de progesterona positivos, lo cual es concordante respecto a los estudios publicados en la literatura. (66% positivos rc estrógenos según Miles D et al¹⁶² ; el 67% en el trabajo de Angelika Reiner²⁴⁴

En nuestro estudio no hemos encontrado relación entre los receptores esteroideos y la sobreexpresión de c-erb-b2; son varios los estudios en los que se manifiesta una relación estadísticamente significativa entre los receptores de progesterona negativos y sobreexpresión de C-erb-b2²³⁸. En este estudio de Ostrowsky y Sawam se analizan 97 casos de cáncer de mama (83 carcinomas ductales infiltrantes; 8 casos de carcinomas lobulillares infiltrantes; 6 carcinomas ductales in situ), junto con 20 casos de lesiones no malignas de mama (fibroadenomas, adenosis e hiperplasias epiteliales). Relacionan la sobreexpresión de C-erbB2, P53, Ki-67 y estatus hormonal respecto al tamaño tumoral, estatus de invasión linfática, edad de la paciente, grado histológico y recuento de mitosis. Encontraron relación estadísticamente significativa entre grado histológico y receptores de hormonas esteroideas, de tal manera que a mayor grado histológico menor expresión de hormonas esteroideas; encontraron asociación significativa además entre expresión de hormonas esteroideas y ki67, de tal manera que a mayor expresión de Ki67 menor expresión de hormonas esteroideas; en nuestro estudio hemos obtenido resultados similares encontrando, relación estadísticamente significativa entre el grado histológico y receptores de estrógenos ($p< 0,05$), y con receptores de progestágenos ($p<0,01$); se demuestra también relación entre receptores de estrógenos y Ki67 con $p<0,01$.

En el estudio de conglomerados encontramos que los receptores de hormonas esteroideas son el elemento diferenciador entre los dos grupos definidos, como veremos a continuación, de tal manera, que en nuestro trabajo, los receptores de hormonas esteroideas podríamos decir que son el elemento dentro del fenotipo tumoral alrededor del cual van a agruparse el resto de factores pronósticos que van a definir la agresividad tumoral.

4.- Ki-67 Y CÁNCER DE MAMA.

La sobreexpresión de Ki67, como índice de proliferación celular, se ha relacionado con un peor pronóstico en cáncer de mama en múltiples estudios²⁴⁵.

En nuestro estudio observamos que la sobreexpresión de Ki67 se comporta de manera muy similar a la expresión de p53 en las pacientes estudiadas, como ya han puesto de manifiesto diversos autores como Catoretti²³⁵ y Barbareschi²³⁸

En nuestro estudio el porcentaje de sobreexpresión de Ki67 demostrado mediante inmunohistoquímica fue del 26,7%, cifras concordantes con lo publicado en estudios similares²⁴⁶. En números absolutos, la media de expresión de Ki67 en nuestro estudio fue de $15 \pm 5,5/30$, cifra muy similar a la encontrada en la series publicadas como en el estudio de Mattia Barbareschi (media de $15 \pm 16/10$)²³⁸.

En cuanto a la relación entre la sobreexpresión de Ki67 y CerbB2, en nuestro estudio no encontramos relación estadísticamente significativa en el estudio inicial, encontrándola con $p < 0,05$ en el análisis de Spearman, existiendo en la literatura tanto estudios en los que sí encuentran relación estadísticamente significativa^{247,230}, algunos de ellos han puesto de manifiesto además relación entre Ki67, cerbB2 e intervalos libre de enfermedad más cortos²⁴⁸, como estudios en los que no se demuestra dicha relación^{249, 250}

En la relación entre la expresión de Ki 67 y factores clinicopatológicos, no encontramos relación estadísticamente significativa con la edad de las pacientes, encontrando, sin embargo, relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de Ki67 y el estatus menopáusico, de tal manera que demostramos una mayor sobreexpresión en pacientes premenopáusicas, tal y como ocurre con p53, con $p 0,029$.

Con respecto al estudio histológico, no hemos demostrado asociación entre Ki67 y el tamaño tumoral, ni con la afectación linfática, encontrando una fuerte asociación entre el grado tumoral y Ki67 estadísticamente significativo ($p 0,001$), comportándose de nuevo de manera paralela a la sobreexpresión de p53.

En el estudio realizado por Barbareschi²³⁸, en el que se prestó especial atención al comportamiento de Ki67 en relación a otros factores pronósticos de cáncer de mama, encontraron asociación entre Ki67 y alto grado histológico tumoral, receptores de progesterona negativos y altas cifras de P53; no encontraron

asociación entre Ki67 y el estatus menopáusico, el tamaño tumoral, las metástasis linfáticas y los receptores de estrógenos.

Así como en la literatura existen numerosos estudios con p53, no son tantos los encontrados con Ki67, ya que, si bien es éste el índice de proliferación celular más aceptado existen otros parámetros como KiS1, la topoisomerasa II, Histona H3, mitosina y otros; consultamos 14 estudios, que incluyen en total a unas 4000 pacientes^{232,251,252,253}, acerca de las implicaciones pronósticas de Ki67 en cáncer de mama. Casi todos estos estudios encuentran alguna relación entre la sobreexpresión de Ki67 y mal pronóstico de la enfermedad, sobre todo en lo que se refiere a metástasis linfáticas, enfermedad a distancia y tasas de supervivencia. En nuestro estudio observamos la relación entre Ki67 y P53 y un comportamiento bastante similar observando sobre todo asociación entre ki67 y factores de mal pronóstico como son el alto grado histológico, sobreexpresión de CerbB2 y receptores de estrógenos negativos; no podemos concluir en cuanto a su importancia en lo que se refiere a período libre de enfermedad, aunque se demuestra asociación entre sobreexpresión de P53 y recidiva de la enfermedad primaria.

5.- ANÁLISIS CLUSTER.

Como hemos observado, en nuestro estudio encontramos relaciones parciales entre variables, que nos hacen suponer asociaciones de mal o buen pronóstico en pacientes afectas por cáncer de mama; debido a la limitación que tenemos dado el escaso período de seguimiento, decidimos hacer un estudio multivariante exploratorio, o análisis de conglomerados o cluster, que trata de establecer “perfiles” dentro de los grupos de pacientes que estadísticamente se seleccionan en torno a una o más variables; observamos que en nuestro estudio, las variables se aglomeran en torno a tres: Receptores de estrógenos, receptores de progesterona y Coexpresión de receptores hormonales, de tal manera que se establecen dos grupos de pacientes repartidos al 50%, un grupo en torno a pacientes con receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos y con ambos receptores hormonales negativos y un grupo con receptores de estrógenos positivos, de progesterona positivos y coexpresión de ambos positiva. Se puede establecer, por tanto dos perfiles de pacientes:

-Perfil 1.- Receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos, coexpresión de receptores negativa que agrupan pacientes con media de edad menor (62 años), tamaño tumoral menor de 2 cms en un 87% de los casos, grado histológico de 7.2, afectación linfática media 1.43, CerbB2 negativo en el 68% de las pacientes, p53 con media de 27 y Ki67 de 25

-Perfil 2.- Receptores de estrógenos positivos, receptores de progesterona positivos, coexpresión de receptores positiva que agrupan pacientes con edad media superior a los del perfil 1 (63 años), con tamaño tumoral menor de 2 cms en un 93.9% de las pacientes, con un grado histológico menor (5.6), con una afectación linfática de 1.31 de media, con CerbB2 negativo en el 61% de los casos, p53 de media 24 y Ki 67 21.

Es decir, en el intento de conglomerar variables para buscar perfiles de pacientes encontramos una tendencia a asociar factores de mejor pronóstico en el conglomerado 2, observando que con receptores de hormonas positivos existe una tendencia a que las variables que estudiamos en este grupo tengan mejor pronóstico. Observamos el efecto contrario en el Conglomerado 2, en el que la existencia de receptores hormonales negativos asocia perfiles de variables con peor perfil pronóstico.

Intentos de encontrar perfiles de pacientes que definan grupos pronósticos respecto a distintos factores de riesgo existen varios en la literatura como el publicado en el año 2001 por Pinto²⁵⁴, en el que estudia 306 pacientes con Cáncer de mama, estudiando factores pronósticos clásicos como el tamaño tumoral, la existencia de invasión ganglionar, grado histológico y receptores hormonales, realizando estudio multivariante mediante regresión de Cox, y encontrando en este estudio que Cerbb2 es un factor pronóstico independiente al resto y que identifica a un grupo de pacientes con peor respuesta a terapia con tamoxifeno.

Actualmente, se están investigando con técnicas de microarrays alteraciones genéticas en las células tumorales, que una vez estudiadas en un análisis multivariante nos permiten conocer de forma rápida las características pronósticas y predictivas de respuesta en cada tumor. Con estas técnicas podríamos separar grupos de tumores en fases tempranas. La técnica consiste en establecer un panel de alteraciones genéticas relacionadas con la evolución y la respuesta al tratamiento. Se pueden estudiar cientos de ellas al mismo tiempo.²⁵⁵

6.- ANALISIS DE SUPERVIVENCIAS.

Hemos analizado las recidivas y la supervivencia global de nuestras pacientes en función de los factores pronósticos estudiados. Tenemos un tiempo máximo de seguimiento de 65 meses con un tiempo medio de 50 meses. Es evidente, que en el caso de cáncer de mama, se precisa un tiempo de seguimiento

mayor para obtener resultados, aunque el período de tiempo marcado inicial para este trabajo fue de 5 años, tiempo que se estimó como suficiente para obtener resultados sobre todo analizando tasa de recidivas; el tiempo medio de un estudio de supervivencias de cáncer de mama, se estima en torno a los 10 años de seguimiento, obteniéndose resultados más valorables a partir de los 15 años de seguimiento.

Así, los autores que estudian como nosotros correlaciones entre factores pronósticos presentan grupos de pacientes con escaso tiempo de seguimiento, que cuando supera los 5 años, añaden algún resultado desde el punto de vista sobre todo de recidiva tumoral, que suele ser bastante pobre, o no tan significativos como se esperaba. Son ejemplos los trabajos de Jasminka Javik, K.Tandon, Sussane Taucher, L.Ostrowski, o Takashi Yokota^{144, 209,196,236,145}. En cambio, los grandes estudios de supervivencia de cáncer de mama, sobre todo en los casos en los que se distingue entre axila positiva y negativa, son estudios de largo seguimiento como el de Henche Reed, con 613 pacientes y 30 años de seguimiento¹⁴⁶, el de M. Rudas, con 121 pacientes y 17 años de seguimiento²⁵⁶, o el de David Miles con 274 pacientes y 16 años de seguimiento¹⁶².

Con estas premisas, en nuestro trabajo encontramos en cuanto al análisis de recidiva únicamente asociación con las metástasis axilares en el momento de la cirugía, y asociación entre periodo libre de enfermedad y p53; si aumentáramos el tiempo de seguimiento nuestro estudio, quizás encontraríamos relación entre variables en las que hemos observado tendencia a la significación, como Ki67 de comportamiento muy similar en nuestro estudio a P53, o los receptores hormonales. Así mismo, no podemos sacar conclusiones respecto al análisis de mortalidad, por una parte por el escaso número de eventos, algunos de ellos debidos a causas no relacionadas directamente con la enfermedad, y por otra, al escaso tiempo de seguimiento.

CONCLUSIONES

1.- En nuestro estudio CerbB2 no se comporta como un factor predictivo ni pronóstico sin encontrar relación con tasa de supervivencia y recidiva de la enfermedad.

2.- No encontramos relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de CerbB2 y el resto del estudio inmunohistoquímico a excepción de la sobreexpresión de Ki67 .

3.- Demostramos que existe asociación entre sobreexpresión de p53 y Ki 67, comportándose ambos de manera similar respecto a otras relaciones con el resto de parámetros del estudio clínico, anatomopatológico e inmunohistoquímico.

4.- Existe asociación entre la edad de las pacientes y expresión de hormonas esteroideas así como entre estatus menopáusico y sobreexpresión de P53 y Ki 67.

5.- Hemos encontrado asociación entre existencia de metástasis ganglionares en el estudio de la pieza y sobreexpresión de P53, así como asociación entre alto grado histológico con sobreexpresión de P53 y Ki 67 por una parte y receptores hormonales negativos por otra.

6.- P53 se comporta como un factor pronóstico independiente en relación a la recidiva de la enfermedad y como un factor predictivo independiente en cuanto a la existencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico.

7.- Creemos que es el conjunto o la asociación de distintos factores biológicos, en nuestro estudio CerB2, Ki67, P53 y Rc de hormonas esteroideas la que confiere el fenotipo tumoral y predice, junto con factores clínicos y anatomopatológicos el comportamiento y por tanto, el pronóstico del cáncer de mama.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Lorenzo M. Biología molecular de la célula eucariótica. IV Simposium sobre oncogenes y cáncer. Hospital Universitario San Carlos. Madrid, 1998. p 17-22.
- ² Muñoz, A. Cáncer, genes y nuevas terapias. Madrid: Hélice; 1997. 3:48-64
- ³ León Serrano J, García Lobo J.M. Manual de genética molecular. Madrid: Síntesis; 1990.
- ⁴ Izquierdo Rojo, M. Ingeniería genética y transferencia génica. Madrid: Pirámide; 1999. 1:21-40
- ⁵ Bishop J.M. Viral oncoenes. Cell 1985;42:23-38
- ⁶ Cotran RS, Kumar V, Collins T. Neoplasia. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editors. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia, Pennsylvania, USA: W.B. Saunders Company; 1999:260-327
- ⁷ Aboud-Pirak E, Hurwitz E, Pirak ME. Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice. J Natl Cancer Inst 1988;80:1605-1611
- ⁸ Rous, P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J. Exp. Med 1911;. 13 :397-411.
- ⁹ Stehelin, Varmus, Bishop and Vogt. DNA related to the transforming genes of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 1976; 260:170-173
- ¹⁰ Muñoz A. Cáncer, genes y nuevas terapias. Madrid: Hélice ; 1997. 5:114-122
- ¹¹ Bishop J.M, Varmus H.E. Functions and origin of retroviral transforming genes. In: R. Weiss Editor. Molecular Biology of tumor viruses: RNA tumor viruses. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1980.
- ¹² Zur-Hausen H. Viruses in human cancer. Science 1991; 254:1167-1173.
- ¹³ Rabbits, TH. Chromosomal translocations in human cancer. Nature 1994; 372:143-149
- ¹⁴ Gross, L. Oncogenic viruses. 2nd ed. New York : Pergamon Press; 1970.
- ¹⁵ Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr, A. The roles of individual Polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. Nature 1992; 300:713-718
- ¹⁶ Temin H. Nature of the provirus of Rous sarcoma. Nat'l Cancer Institute Monogr. 1964. 17:517-570

- ¹⁷ Tooze J. DNA tumor viruses.. In: R. Weiss Editor .Molecular Biology of tumor viruses. 2nd ed.New York: Cold Spring Harbor Laboratory;1980.
- ¹⁸ Decaprio J.A, Widlow J.W, Figge J .SV40 large tumor antigen forms a specific complex whith yhe product of the retinoblastoma susceptibility genes. Cell 1988; 54:275-283
- ¹⁹ Bikel I ,Montano X, Agha M. SV40 small antigen enhances the transformation activity of limiting concentrations of SV40 large T antigen.Cell 1987;48:321.
- ²⁰ Huebner RJ, Todero G.J. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer.Proc.Nat'l Acad. Sc. USA 64: 1087-1094
- ²¹ Wyke J.A.Viruses and cancer.In: Introduction to the cellular and molecular Biology of cancer.2nd ed. Oxford , UK: oxford university press;1991. p. 203-229.
- ²² Cooper G.M. Oncogenes. Boston: Jones and Barlett; 1990.
- ²³ Martín G . Rous Sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state.Nature 1990;227:1021-1023.
- ²⁴ Downward J, Yarden Y, Mayes E,Scrace G, Totty N ,Isola J,et al. Close similarity of epidermal growth factor.Science 1984; 221:275-276.
- ²⁵ Ushiro H ,Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A431 cell membranes.J Biol Chem 1980;225:8363-8365.
- ²⁶ Hunter T. A thousand and one protein kinases.Cell 1987;45:357-364.
- ²⁷ Stewart T.A,Pattengale P.K , Leder P. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carries and express MTV/myc fusion genes.Cell 1984;38:627-637
- ²⁸ Farrow S.N , Brown R. New members of the Bcl-2 family and their proteins partners. Curr Opin Genet Rev 1996; 6:45-49
- ²⁹ Khandan K,Tucker S .Cyclin E and survival in patients with breast cancer.N Eng J Med 2002; 347:1566-1575.
- ³⁰ Chinnayian A.M, Dixit V.M.Molecular ordering of the cell death pathway. J Biol Chem 1996;271:4573-4576.

³¹ Knudson A.G .Genetic predisposition to cancer. In: Hiatt H, Watson J.D , Winsten JA ,editors. Origins of human cancer.2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory;1997.

³² Mc Donnell T.J. Cell division versus cell death: a functional model of multistep neoplasia.Mol Carcinogenesis 1993; 8:209-213.

³³ Fisher D.E.Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold.Cell 1994; 78:539-542.

³⁴ Mezquita Pla,C. Máster Universitario en patología mamaria-senología. Universidad de Barcelona;1999-2000.

³⁵ Díaz Rubio,E.El proceso biológico de las metástasis . IV Simposyum sobre oncogenes y cáncer.Hospital Universitario San Carlos. Madrid ,1998;p 72-85.

³⁶ Hill,PR. Metastasis.In: Tannock IF,Hill PR, editors. The basic science of oncology. .New York: Pergamon Press; 1987. p.160-175.

³⁷ Aznavoorian S,Liotta LA. La evolución en etapas de la neoplasia invasora:desequilibrio de la regulación positiva y negativa.Madrid:Triángulo ;1993.31:p 25-37.

³⁸ Stetler-Stevenson WG, Talano J, Gallagher M .Inhibition of human type IV colagenase by a highly conserved peptide sequence derived for its prosegment. Am J Med Scie 1991;302:163-170.

³⁹ Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Principles of molecular cell biology of cancer:Cancer metastasis.In: DeVita VT, Hellman S,editors. Cancer:Principes and Practice of Oncology. Philadelphia :J.B. Lippincott Co;1993.p 134-149.

⁴⁰ Clark EA, Brugge JS.Integrins and signal transduction pathways:The road taken. Science 1995;268:233-239.

⁴¹ Schultz RM, Silberman. Inhibition by recombinant tissue inhibitor or metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells.Cancer res 1998;48:5539-5545.

⁴² Alvarez OA,Carmichael DF .Inhibition f collagenotyc activity and metastasis of tumor cells by a recombinant humann tissue inhibitor of the metalloproteinases.JNCI 1990;82:589-595.

⁴³ Mignatti P, Tsuboi R,Robbins. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factors induced proteinases. J Cell Biol 1989;108:671-682.

- ⁴⁴ Reich R, Thompson E, Iwamoto. Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenas IV on the invasions of basement membranes by metastatic cells. *Arcerl Res* 1988;48:3307-3312.
- ⁴⁵ Wallet V, Mutzel R. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous in mn23 and awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. *JNCI* 1990;18:1199-1202.
- ⁴⁶ Biggs J, Hersperger E. A Drosophila gene which is homologous to a mammalian metastasis associated gene codes for a nucleoside diphosphatase Kinase. *Cell* 1990;63:933-940.
- ⁴⁸ García MD, Pollán M, López-Abente G. Mortalidad por cáncer de mama en la Comunidad Europea (1970-1985). *Med Clin* 1994;102:125-128.
- ⁴⁹ Esteve J, Kricher A, Ferlay J, Parkin DM. Facts and figures of cancer in the European Community .Lyon (France): Internacional Agency for Research on Cancer Press; 1993.
- ⁵⁰ Bieche I, Lidreau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1995; 14:227-251.
- ⁵¹ Watson PH, Safnek JR. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor and lymph node metastasis. *JNCI* 1993;85:902-907.
- ⁵² Wooster R, Neuhasen SL, Manion J. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA 2 to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 266:66-71.
- ⁵³ Borg A, Baldetorp B, Ferno .ErbB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. *Oncogene* 1991; 6:137-143.
- ⁵⁴ Van dre Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P .Neu-protein overexpression in breast cancer; association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J med* 1988; 319:1239:1245
- ⁵⁵ Marchetti A, Buttita F, Pellegrini S, Campani D, Diella F, Cecchetti D et al. P53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:4665-4669.
- ⁵⁶ Mazars R, Spinardi L, Bencheick M, Simony-Lafontaine J . P53 mutations occur in agresive breast cancer. *Cancer Res* 1992;52:3918-3929.

- ⁵⁷ Koechli OR, Schaer GN, Seifert B. Mutant p53 protein associated with chemosensitivity in breast cancer specimens. *Lancet* 1994;344:1647-1648.
- ⁵⁸ Faille A, De Cremoux P, Extra JM. P53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *Br J Cancer* 1994; 69:1145-1150.
- ⁵⁹ Tominaa T, Inada K, Toi M. P53 protein expresión is associated with lack of response to endocrine therapy in recurrent breast cancer patients. *Cancer res* 1994;54:3718-3722.
- ⁶⁰ Liu TJ, Zhan W-W, Taylor DL, Roth JA .Growth supresión of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild type p53 gene via a recombinant adenovirus. *Cancer Res* 1994;54:3662-3667.
- ⁶¹ Clayman GL, ElNaar AK, Roth JA, Zhan W-W. Therapeutic effect of retroviral wildtype p53 expression vector in a orthotopic lun cancer model. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1458-1462.
- ⁶² Fujiwara T, Cai DW, Georges RN, Mukhopadhyay .Induction of chemosensitivity in human lun cancer cells in vivo by adenovirusmediated tranfer of the wildtype p53 gene. *Cancer res* 1994;54:2287-2291.
- ⁶³ Patrik L, Fitzgibbons MD, David L. Page, Donald Weaber, MD. Prognostic Factors in Breast Cancer .*Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:966-978.
- ⁶⁴ Noguchi S, Aihara T, Nakamori L. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary limph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 1994;74:1595-1600.
- ⁶⁵ .Sedmak DD, Meineke TA, Knechtges DS, Anderson J. Prognostic significance of cytokeratin-positive breast cancer metastases. *Mod Pathol.* 1989;2516-2520.
- ⁶⁶ International Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *Lancet* 1990;335:1565-1568.
- ⁶⁷ Albertini JJ, Liman GH, Cox C. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 1996;276:1818-1822.
- ⁶⁸ Turner RR, Olilla DW, Stern S, Giuliano AE. Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol.* 1999;23:263-267.

- ⁶⁹ Van Diest PJ, Baak JPA, Matze-Cok P . Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens. *Hum Pathol.*1992;23:603-607.
- ⁷⁰ Allred DC, Harvey JN, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical análisis. *Mod Pathol.*1987;11:155-168.
- ⁷¹ Thor AD, Moore DM, Edgerton SM.Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst.*1992;84:845-855
- ⁷² Tsuda H, Hirohashi S.Asociation among p53 gene mutation, nuclear acumulation of the p53 protein and aggressive phenotypes in breast cancer. *Int J Cancer* 1994;57:498-503
- ⁷³ Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma:and important new indicator of prognosis. *Hum Pathol.*1993;24:469-476.
- ⁷⁴ Malkin D, Li FP,Strong LC.Germline p53 mutations in a familial síndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms.*Science* 1990;20:1234-1238.
- ⁷⁵Sobol H.BCRA1-p53 relationship in hereditary breast cancer.*Int J Oncol.*1997;10:349-353).
- ⁷⁶ Bergh J,Norberg T,Sjogren. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radioteraphy.*Nat Med.* 1995;1:1029-1034.
- ⁷⁷Pinder S,Ellis IO, O'Rourke S.Pathologic prognostic factors in breast cancer:vascular invasión:relationship with recurrence and survival in a large series with long term follow up.*Histopathology* 1994;24:41-47.
- ⁷⁸ Saigo PE, Rosen PP.The application of immunochemical stains to identify endotelial lined channels in mammary carcinoma. *Cancer* 1987;59:51-54.
- ⁷⁹Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma: mitotic figure count, S-phase fraction, proliferation cells, Ki-67 and MIB-1. *Am J Pathol.*1995;104:42-49).
- ⁸⁰ Wenger CR,Clark GM. S-phase fraction and breast cancer: a decade of experience (review). *Breast Cancer Res Treat.*1998,51:255-265.

- ⁸¹ Axelsson K, Ljung BM, Moore DH . Tumor angiogenesis prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:997-1008.
- ⁸² Khanuja PS, Fregene T, Gimmoty P. Angiogenesis does not predict recurrence in patients with primary breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 1993; 12:67.
- ⁸³ Fox SB, Smith K, Hollyer J. The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;29:41-49.
- ⁸⁴ Nicholson S, Wright C, Sainsbury JRC. Epidermal growth factor receptor as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1990;37:811-814.
- ⁸⁵ Elledge RM, Green S, Howes L. Bcl-2, p-53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 1997;15:1916-1922.
- ⁸⁶ Soubeyran I, Quenel N, Coindre JM. pS2 protein: a marker improving prediction of response to neoadjuvant tamoxifen in post-menopausal breast cancer patients. *Br J Cancer.* 1996;74:1120-1125.
- ⁸⁷ Tandon AK, Clark GM. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med.* 1990;322:297-302.
- ⁸⁸ Isola J. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 1993;11:36-43.
- ⁸⁹ Fukushige SI, Matsubara KI, Yoshida M. Localization of a novel v-erbB-2 related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol* 1986; 6:955-958.
- ⁹⁰ Coussens L, Yang-Feng TL, Chen Y-CLE, Gray A, McGray A, McGrath J, Seeburgh PH et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to egf receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230:1132-1139.
- ⁹¹ King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985; 229:974-976.

- ⁹² Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A v-erb B-related protooncogene, c-erb B-2, is distinct from the c-erb B-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6497-6501.
- ⁹³ Kraus MH, Issing W, Miki T. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9193-9197.
- ⁹⁴ Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS. Ligand-specific activation of HER4/p180 erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1746-1750.
- ⁹⁵ Schechter AL. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; 235:177-182.
- ⁹⁶ Lupu R, Colomer R, Zumaier G, Sarup J, Shepard M, Slamon D, Lippman ME et al. A ligand for the erbB-2 oncogene interacts directly with the EGF receptor and p185erbB-2. *Science* 1990; 249: 1552-1555.
- ⁹⁷ Peles E, Yarden Y. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *BioEssays* 1993; 15:815-824
- ⁹⁸ Douall WC, Qian X, Peterson NC, Miller MJ, Samanta A, Greene MI . The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene* 1994; 9: 2109-2123.
- ⁹⁹ Benz CC, Scott GK, Sarup JC . Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 24:85-95.
- ¹⁰⁰ Chazin VR, Kaleko M, Miller AD. Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; 7:1859-1866
- ¹⁰¹ Pauletti G, Godolphin W, Press MF. Detection and quantification of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996; 13:63-72.
- ¹⁰² Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 1987; 2:69-72.

- ¹⁰³ Lonardo F, Di Marco E, King CR. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2:992-1003.
- ¹⁰⁴ Earp HS, Dawson TL, Li X. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35:115-132.
- ¹⁰⁵ Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-182.
- ¹⁰⁶ Saffari B, Jones LA, El-Naggar A. Amplification and overexpression of HER2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: Correlation with overall survival. *Cancer Res* 1995; 55:2693-5698.
- ¹⁰⁷ Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991; 51(1034):1038.
- ¹⁰⁸ Pastorino U, Sozzi G, Miozzo M. Genetic changes in lung cancer. *J Cell Biochem* 1993; Suppl 17F:237-248.
- ¹⁰⁹ Press MF. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: evaluation of immunostaining in multi-tumor tissue blocks of Breast cancers with molecularly characterization application and expression levels. *Cancer Res* 1994; 54:2771-2777.
- ¹¹⁰ Debrin JA, Link VC, Weinberg RA, Greene MI. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene encoded tumour antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:9129-9133.
- ¹¹¹ Grimaux M, Romain S, Remvikos Y, Martin PM, Magdelenat H. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. *Br Cancer Res Treat* 1989; 14:77-90.
- ¹¹² Sainsbury JRC, Farndon JR, Needham GK. Epidermal growth factor receptor status as a predictor of early recurrence and of death from breast cancer. *Lancet* 1987; 2:1398-1402.

- ¹¹³ Kadowaki T, Kasuga M, Tobe K. A Mw 190,000 glycoprotein phosphorylated on tyrosine residues in Epidermal Growth Factor Receptor stimulated KB cells is the product of c-erbB-2 gene. *Biochem Biophys Res Com* 1987; 144:699.
- ¹¹⁴ Kokai Y, Myers J, Wada T. Synergistic interaction of p185c neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 1989; 58:287-292.
- ¹¹⁵ De Potter CR. The neu oncogen: more than a prognostic indicator?. *Human Pathol* 1994; 25:264-268.
- ¹¹⁶ De Potter CR, Schelfhout AM. The neu-protein and breast cancers. *Virchows Arch* 1995; 426:107-115.
- ¹¹⁷ Lammie GA, Barnes DM, Millis RR, Gullick WJ. An immunohistochemical study of the presence of c-erbB-2 protein in Paget's disease of the nipple. *Histopathol* 1989; 15:505-514.
- ¹¹⁸ Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10:2435-2446.
- ¹¹⁹ Pegram MD, Finn RS, Arzoo K. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997; 15:537-547.
- ¹²⁰ Wriht C, Nicholson S, Anus B. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy of breast cancer. *Br J Cancer* 1992; 65:118-121.
- ¹²¹ Press MF, Hung G, Godolphin W. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potencial source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54:2771-2777.
- ¹²² Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-712.
- ¹²³ Gusterson BA. Immunohistochemical localization of c-erbB-2 in human breast carcinomas. *Molec Cell Probes* 1988; 2:383-391.
- ¹²⁴ Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu. ERBB2 amplification in Breast Cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5321-5325.
- ¹²⁵ Molina R. Unidad de estudio del cáncer del Hospital Clinic. Barcelona. Máster de Mastología 1999-2000.

- ¹²⁶ Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK . Overexpression of HER2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1992; 23:974-979.
- ¹²⁷ Niehans GA, Singleton TP, Dykoski D, Kiang DT. Stability of HER2/neu, expression over time and at multiple metastatic sites. *JNCI* 1993; 85:1230-1234.
- ¹²⁸ Molina R, Jo J, Filella X, Zanón G, Farrus B, Muñoz M . C-erbB-2 CEA and Ca 15.3 serum levels in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients. *Anticancer Research* 1999; 19:2551-2556.
- ¹²⁹ Muss HB, Thor AD, Berry DA. C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330:1260-1266.
- ¹³⁰ Farabegoli F, Ceccarelli C, Santini D, Baldini N, Taffurelli M. C-erbB-2 over-expression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 1999; 84: 273-277.
- ¹³¹ Perren TJ. C-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 328-332.
- ¹³² Colomer R, Lupu R, Bacus S, Gelmann EP. ErbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of breast carcinoma cell lines with erbB-2 oncogene amplification. *Br J Cancer* 1994; 70:819-825
- ¹³³ Montero S, Guzman C, Vegh I, Hitt R, Cortés-Funes H, Colomer R. Circulating neu oncogene product in metastatic breast cancer. 85th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Francisco, Abril 1994.
- ¹³⁴ Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC. "HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic, significance of overexpression influence by the presence of in situ carcinoma. *J Clinic Oncol* 1992; 10:599-605.
- ¹³⁵ Schnitt ST, Connolly JL, Harris JR, Hellman S, Cohen RB. Pathologic predictors of early local recurrence in Stage I and II breast cancer treated by primary radiation therapy. *Cancer* 1984; 53:1049-1057.
- ¹³⁶ Jacquemier J, Kurtz JM, Amaalricc R, Branddone H, Ayme Y, Spitalier JM. An assessment of extensive intraductal component as a risk factor for local recurrence after breast-conserving therapy. *Br J Cancer* 1990; 61:873-6.
- ¹³⁷ Jing X, Kennichi K, Murakami M, Nakamura Y . Intraductal spread of Invasive Breast Carcinoma has a positive correlation with c-erbB-2 overexpression and vascular invasion. *Cancer* 1999; 86/3:439-448.

- ¹³⁸ Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 1998; 3(4): 237-252.
- ¹³⁹ Fitzgibbons P, Page D, Weaver D, Thor A et al. Prognostic Factors in Breast Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-978.
- ¹⁴⁰ Colomer R. Genes en cáncer de mama: aplicaciones actuales y futuras. IV Simposium sobre oncogenes y cáncer. Madrid 1999.
- ¹⁴¹ Colomer R. El oncogén erbB-2 como factor pronóstico y predictivo en cáncer de mama. *Annals of Oncology (Edición Española)* 1999; 8 (supl 3):209-214.
- ¹⁴² Tagliabue E, Mènard S, Robertson JFR, Harris L. C-erbB-2 expression in primary breast cancer. *The international Journal of Biological Markers* 1999; 14(1):16-26.
- ¹⁴³ Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-chiu E, Hyams D. ErbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 917-922.
- ¹⁴⁴ Jasminka Jakic-Razumovic, Mladen Petrovecki. Mutual predictive value of c-erbB-2 overexpression and various prognostic factors in ductal invasive breast carcinoma. *Tumori* 2000; 86:30-36.
- ¹⁴⁵ Takashi Yokota, Mikio Imamura, Shin Teshima. C-erb-B2, p53 protein expression and steroid hormone receptors in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Anticancer Res* 1999; 19: 4007-4012.
- ¹⁴⁶ Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S . The prognostic value of p53 and c-erbB-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. A multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. *Cancer* 2000; 88; 4804-813.
- ¹⁴⁷ Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, Rose C, Andersson M, Bach F. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 1997; 337:949-955.
- ¹⁴⁸ Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER 2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer* 1995;75:1320-1326

- ¹⁴⁹ Gasparini G, Gullick WJ, Maluta S . C-erbB-3 and C-erbB-2 protein expression in node-negative breast carcinoma (an immunocytochemical study). *Eur J Cancer* 1994; A 30: 16-22.
- ¹⁵⁰ Gullick WJ, Love SB, Wright C. C-erbB-2 protein overexpression breast carcinoma is a risk factor on patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 1991; 63:434-438.
- ¹⁵¹ Horiguchi J, Lino Y, Takey H. Immunohistochemical study on the expression of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. *Oncology* 1994; 51:47-51.
- ¹⁵² Winstanley J, Cooke T, Murray GD . The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63:447-450.
- ¹⁵³ Paik S, Hazan R, Fisher ER. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast And Bowel Project. Prognostic significance of erbB-2 overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8: 103-112.
- ¹⁵⁴ Oakley CS, Welsch MA, Zhai YF, Chan CC, Gould MN, Welsch CW et al. Comparative abilities of athymic nude mice and severe combined immune deficient (SCID) mice to accept transplants of induced rat mammary carcinomas: enhanced transplantation efficiency of those rat mammary carcinomas that have elevated expression of neu oncogene. *Int J cancer* 1993; 53:1002-1007.
- ¹⁵⁵ Pantel K, Schlimok G, Braun S. Differential Expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 1996; 234:245-47.
- ¹⁵⁶ Press MF, Pike MC, Jones LA. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: Correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 1994; 54(5675):5682.
- ¹⁵⁷ Scorilas A, Trangas T, Yotis J, Pateras C, Talieri M. Determination of c-myc amplification and overexpression in breast cancer patients: evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, Cathepsin-D and clinicopathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;81(8):1385-1391.
- ¹⁵⁸ Scorilas A, Yotis J, Patetas Ch, Trangas T, Talieri M. Predictive value of c-erbB-2 and Cathepsin D for Greek Breast Cancer Patients Using Univariate and Multivariate Analysis. *Clin Cancer Res* 1999; 5:815-821.
- ¹⁵⁹ Hayes DF. Tumor markers for breast cancer. *Ann Oncol* 1993;4:807-810.

- ¹⁶⁰ Giai M, Roagna R, Ponzone R, De Bortoli M, Dati C, Sismondi P. Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Res* 1994; 14: 1441-1450.
- ¹⁶¹ Stal O, Sullivan S, Wingren S, Skoog L, Rutqvist LE, Carstensen JM, Nordenskjold B. CerbB-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31 A:2185-2190
- ¹⁶² Miles DW, Harris WH, Gilett CE, Smith P, Barnes D. Effect of cerbB-2 an estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1999; 84: 354-359.
- ¹⁶³ Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC et al. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90: 1346-1360.
- ¹⁶⁴ Keith WN. Coamplification of erbB-2, topoisomerase IIa and retinoic acid receptor a enes in breast cancer and allelic loss at topoisomerase I on chromosome 20. *Eur J Cancer* 1993; 29 A:1469-1475.
- ¹⁶⁵ Hochhauser D ,Harris AL. The role of topoisomerase IIa and b in drug resistance. *Cancer Treat Rev* 1993; 19: 181-194.
- ¹⁶⁶ Yu D, Liu B, Tan M, Li J, Wang SS, Hung MC. Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene* 1996; 13: 1359-1365.
- ¹⁶⁷ Archer CD, Ellis PA, Dowsett M, Smith IE. C-erbB-2 positivity correlates with poor apoptotic response to chemotherapy in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 50:237.
- ¹⁶⁸ Willsher PC, Robertson JFR, Chan S, Nicholson RI, Blamey RW. Locally advanced primary breast cancer: a randomised trial of multi-modality therapy versus initial hormone therapy. *Eur J Cancer* 1997; 33:457-459.
- ¹⁶⁹ Baselga L. HER2/neu as a predictor of response to therapy. *Changes in Basic Concepts: Changes in the treatment of breast cancer. (Abst:256).ASCO* 1999;325.
- ¹⁷⁰ Lüftner D, Schnabel S, Possinger K. C-erbB-2 en serum of patients receiving fractionated placitaxel chemotherapy. *The international Journal of Biological Markers* 1999; 14(2):55-59.

- ¹⁷¹ Carlomagno C.C-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol*. 1996; 14:2702-2708.
- ¹⁷² Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13:1129-1135.
- ¹⁷³ Dowsett M, Cooke T, Ellis T, Gullick WJ, Gusterson B . Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how?. *Eur J Cancer* 2000; 36:170-176.
- ¹⁷⁴ Radvin P. Shoud HER2 Status be routinely measured for all breast cancer patients?. *Semin Oncol* 1999;26 (suppl 12): 117-123.
- ¹⁷⁵ Asociation of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. *Mod Pathol* 1996;9(1):77-81.
- ¹⁷⁶ Recommendations for the reporting of resected breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1993;100:240-255
- ¹⁷⁷ Histological Typing of Breast Tumours. 2nd Ed. In: *Internacional Classification of Tumors*. Geneva :World Health Organization;1981.p 19.
- ¹⁷⁸ LH Sobin , Ch Wittekind editors.*TNM Classification of malignant tumours*.5th .Ed. Wiley-Liss, Inc.:New York;1997.
- ¹⁷⁹ Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: The value of histologic grade in breast cancer. Experience of a large study with long term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-10
- ¹⁸⁰ Fleming ID, Cooper JS, Henson DE,editors. *AJCC Cancer Staging Manual* 5^a ed. Philadelphia, PA: Lippincott –Raven; 1997.
- ¹⁸¹ Greene FL, Page DL, Fleming ID. *AJCC Cancer Staging Manual* 6^a ed. New York, NY: Springer-Verlaq;2002.
- ¹⁸² Singletary SE, Allred C, Ashley P . Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3628-36.
- ¹⁸³ Gonzalez Palacios, F; Una nueva modificación en la clasificación TNM del cáncer mamario. *Rev Esp Patol* 2004; 37: 247-252.
- ¹⁸⁴ Carter CL; Allen C; Nelson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-87.

¹⁸⁵ Newman LA; Querer HM. Adverse prognostic significance of infraclavicular nodes detected by ultrasonography in patients with locally advanced breast cancer. *Am J Surg* 2001;181:313-18.

¹⁸⁶ Klauber-De more N . Comprehensive review of the management of internal mammary lymph node metastases in breast cancer. *J Am Coll Surg* 2001;193:547-55.

¹⁸⁷ Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy : 133 randomised trials involving 31.000 recurrences and 24.000 deaths among 75.000 women. *Lancet* 1992; 339:1-15,71-85.

¹⁸⁸ Berger M.S, Locher G.V, Sauer S. Correlation of c-erbB2 gene amplification and protein expression of human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* 1988,48:1238-1243.

¹⁸⁹ Dykins R, Corbett I.P, Henry J.A. Long-term survival in breast cancer related to overexpression of the C-erbB2 oncoprotein: an immunohistochemical study using monoclonal antibody NCL-CB11. *J Pathol* 1991,163:105-110.

¹⁹⁰ Noguchi M, Koyasaki N, Nagayoshi N. C-erbB2 oncoprotein expression versus internal mammary lymph node metastases as additional prognostic factors in patients with axillary lymph node positive breast cancer. *Cancer* 1992, 69:2953-2960.

¹⁹¹ Slamon D.J., Clark G.M. Amplification of C-erbB2 and aggressive human breast tumors? *Science* 1988,24:1795-1798.

¹⁹² Slamon D.J., Clark G.M. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/Neu oncogene. *Science*,235:177-182,1987.

¹⁹³ Konecny G, Pauletti G . Quantitative association between Her-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:142-153.

¹⁹⁴ Querzoli P, Marchetti E, Fabris G. Immunohistochemical expression of c-erbB2 in human breast cancer by monoclonal antibody: correlation with lymph node and ER status. *Tumori.* 1990;76:461-464.

¹⁹⁵ Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1991,51:944-948.

¹⁹⁶ Allred C, Jennet M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998 ,11 (2): 155-168.

- ¹⁹⁷ Taucher S, Rudas M. Do we need Her-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer* 2003 ,98:2547-52.
- ¹⁹⁸ Hayes DF, Thor AD. C-erbB2 in breast cancer: development of the clinically useful marker. *Semin Oncol* 2002; 29:231-235.
- ¹⁹⁹ Massod S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech* 2002;59:102-108.
- ²⁰⁰ Schnitt SJ, Jacobs TW, Ross M. Current status of Her-2/neu testing :caught between a rock and a hard place. *Am J Clin Pathol* 2001; 116:806-810.
- ²⁰¹ Chih Yi-Su, Donald Ming-Tak Ho, MD. Interobserver Reproducibility of Her-2/neu Protein overexpression in invasive breast carcinoma using the DAKO hercepTest. *Am J Clin Pathol* 2002;118:693-98
- ²⁰² Jacobs TW, Gown AM. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the US FDA approved scoring system. *J Clin Oncol*.1999;17:1983-1987.
- ²⁰³ DAKO HercepTest for immunoenzymatic staining. Glostrup, Denmark:DAKO A/S;1999;4-17.
- ²⁰⁴ Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G. Sensitivity of Her-2 neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas : correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol* 2000;113:675-682.
- ²⁰⁵ Tubbs RR, Pettay JD . Discrepances I clinical laboratory testing of eligibility for Trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001;19:2714-2721.
- ²⁰⁶ Ross J, Fletcher J, Linette G .The HER-2/neu Gene and Protein in breast cancer 2003: Biomarker and target of therapy. *The Oncologist* 2003, 4:307-325
- ²⁰⁷ Wang S, Saboorian M, Heinkel E . Laboratory assesement of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays. *J Clin Pathol* 2000;53: 374-381.
- ²⁰⁸ Wright C, Angus B,Nicholson S. Expresión of c-erb-b2 oncoprotein: A Prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1999, 4:2087-2090.
- ²⁰⁹ Borg A, Baldetorp B, Ferno M . C-erbB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. *Oncogene* 1991;6: 137-43.

- ²¹⁰ Tandon AK, Clark GM . Her-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1120-8.
- ²¹¹ Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, Cardona G. Prognostic significance of CerbB2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer* 1993;67:625-9.
- ²¹² Borg A, Tandon AK, Sigurdson H. Her-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50:4332-7.
- ²¹³ McCann AH, Dervan PA, O'Regan M. Prognostic significance of C-erbB2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 1991;51:3296-303.
- ²¹⁴ Nagai MA, Marques LA, Torloni H, Brentani MM. Genetic alterations in C-erbB2 proto-oncogene as prognostic markers in human primary breast tumors. *Ocology* 1993;50:412-17.
- ²¹⁵ Marks JR, Humphrey PA, Wu K. Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early-stage breast cancer. *Annu Surg* 1994;219:332-41.
- ²¹⁶ Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreolla S. Prognostic significance of CerB2 expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 1991;49:44-9.
- ²¹⁷ Hartmann LC, Ingle JN, Wold LE, Farr GH. Prognostic value of CerbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Results from a randomized adjuvant treatment protocol. *Cancer* 1994;74:2956-63.
- ²¹⁸ Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of Her-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-years-follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10:1044-8.
- ²¹⁹ Albanell J, Bellmunt J, Molina R, Garcia M. Node-negative breast cancer with p53(-)/Her2neu(-) status may identify women with very good prognosis. *Anticancer Res* 1996;16:1027-32.
- ²²⁰ Kallionemi OP, Holli K, Visakorpi T. Association of cerbB2 protein overexpression with high rate of cell proliferation increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991;49:650-658.
- ²²¹ Allred DC, Clark GM, Tandon AK. Her-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10:599-605.

- ²²² Gusterson BA, Gelber RD, Price KN. "Prognostic importance of CerbB2 expression in breast cancer" *J Clin Oncol* 1992;10:1049-56.
- ²²³ Stal O, Sullivan S, Wringren S. "CerbB2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer" *Eur J Cancer* 1995;31:2185-90.
- ²²⁴ Thor AD, Budman DR et al. Selecting patients for higher dose adjuvant CAF. C-erb_b2, p-53, dose, and dose intensity in stage II. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997;127-128A.
- ²²⁵ Carlomagno C, Perrone F, Gallo C. CerbB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1999,14:2702-2708.
- ²²⁶ Guerin M, Barrois M, Terrier MJ. Overexpression of either c-myc or cerbB2/neu protooncogenes in human breast carcinomas : correlation with poor prognosis. *Oncogene Res* 1988;3:21-31.
- ²²⁷ Yamashita J, Ogawa M, Sakai K. Prognostic significance of three novel biologic factors in a clinical trial of adjuvant therapy for node-negative breast cancer. *Surgery* 1995;117:601-608.
- ²²⁸ Molina R, Ciocca DR, Tandon AK . Expression of Her-2/neu oncoprotein in human breast cancer: a comparission of immunohistochemical and Western blot techniques .*Anticancer Res* 1992; 12:1965-71.
- ²²⁹ Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/Neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer* 1994;73:2359-2365.
- ²³⁰ Barbareshi MD, Leonardi E .P53 and C-erbB2 pretein expresión in breast carcinomas. An immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers, and clinical stage in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1998:408-418.
- ²³¹ Craig Allred, Jennet MD, Harvey M, Melora B :Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical análisis. *Mod Pathol* 1998;11(2): 155-168.
- ²³² Nakopolou LL . Prognostic significance of the coexpression of p-53 and C-erb-B2 proteins in breast cancer. *J Pathol* 1996;179:31-8.
- ²³³ Silvestrini R, Benini E . p53 as an independent prognostic marker in lymph node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;24:469-76.
- ²³⁴ Friedichs K . Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1999; 72:3641-7.

- ²³⁵ Seshadri R, Leong ASY . Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast cancer prognosis. *Int J Cancer* 1996;69:135-141.
- ²³⁶ Gohring UJ, Scharl A.p53 protein in 204 patients with primary breast carcinoma: immunohistochemical detection and clinical value as a prognostic factor. *Arch Gynecol Obstet* 1995;256:139-46.
- ²³⁷ Cattoretti G,Rike F,Andreola S: P53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41:178-183,1988.
- ²³⁸ Ostrowsky JL,Sawan A, Henry L: P-53 expression in human breast cancer related with survival and prognostic factors: An immunohistochemical study.*J Pathol* 164: 75-81, 1991.
- ²³⁹ Banu A, Goknan K . Correlation of Bcl-2 and p53 expression in primary breast tumours and corresponding metastatic lymph nodes.*Cancer* 2003;98:2554-8.
- ²⁴⁰ Foekens J.A, Peters H . Cell biological prognostic factors in breast cancer. *J Clin Immunoassay* 1991; 14:184-195.
- ²⁴¹ Mc Guire WL, Tandon AK, Allred D .Breast cancer update:prognostic profile markers. Division of speciality lab.INC.How to use prognostic factors in ANN breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 82:1451-1453.
- ²⁴² Oshumi S, Kasara M,Hayashi K, Murakami K, Kuroda M, Miemoto H, Miura F: Cyto-biological análisis of the breast cancer. *Fujita Gakuen Igakkaihi* (in Japanese) 1994;18:217-223.
- ²⁴³ Pinder SE, Wencyk PM, Naylor HE, Bell JA, Elston CW: The assesement of multiple variables on breast carcinoma fine needle aspiration (FNA) cytology spacimens: method,preliminary results and prognostic associations. *Cytophatology* 1995;6:316-324.
- ²⁴⁴ Reiner Angelika,MD, Georg Reiner MD. Histopathologic characterization of human breast cancer in correlation with estrogen receptor status. *Cancer* 1988; 61: 1149-1154.
- ²⁴⁵ Clark Gm. Prognostic and predictive factors. In : Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editors. *Diseases of the Breast*. Philaddelphia: Lippincott-Raven;1996.p.461-85.

- ²⁴⁶ Nicholson R.I, McClelland R.A, Finlay P. Relationship between EGF-R, c-erbB2 protein expresión and Ki67 inmunostaining in breast cancer and hormona sensitivity. *Eur J Cancer* 1993;29:1018-23.
- ²⁴⁷ Yamashita J, Ogawa M, Sakai K Prognostic significance of three novel biologic factors in a clinical trial of adjuvant therapy for node-negative breast cancer. *Surgery* 1995;117:601-8.
- ²⁴⁸ Gerdes J, Lemke H, Baish H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67".*J Immunol* 1984;133:1710-15.
- ²⁴⁹ Arguello F, Baggs RB, Eskenazi AE. Vascular anatomy and organ-specific tumor growth as critical factors in the development of metastases and their distribution among organs. *Int J Cancer* 1991;48:583-90.
- ²⁵⁰ Schoborn I, Zschiesche W, Spitzer E. CerbB2 overexpression in primary breast cancer: independent prognostic factors in patients at high risk. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29:287-95.
- ²⁵¹ Bouzubar N, Walter KJ, Griffiths K, Ellis IO, Lestón CW . Ki 67 inmunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associaioans. *Br J Cancer* 1989;59:943-7.
- ²⁵² Gaglia P, Bernardi A, Venesio T. Cell proliferation of breast cancer evaluated by anti BrdU and antiKi67 antibodies: its prognostic value on short-term recurrentes. *Eur J Cancer* 1993;29A:1509-13.
- ²⁵³ Pierga J-Y, Leroyer A, Viehl P, Mosseri V . Long-term prognostic value of growth factors determination by Ki67 inmunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res treat* 1996;37:57-64.
- ²⁵⁴ Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J .CerbB2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol* 2001;12(4):525-533.
- ²⁵⁵ Eisen Mb, Brown PO .DNA for analysis of gene expression. *Methods in enzymology* 1999; 303:179-82.
- ²⁵⁶ Rudas M, Neumayer R , Gnant S. P53 protein expresión, cell proliferation and steroid hormona receptors in ductal and lobulillar in situ carcinomas of the breast. *Eur J Cancer*, 1997;33:39-44.