



**Facultad de Medicina
Centro de Investigaciones Biomédicas**

**“Comparación de subtipos
moleculares de cáncer de mama,
entre tumor primario y su metástasis
de ganglio linfático axilar.”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular.**

Rodrigo Zúñiga Moreta.

Director de Tesis: Dr. Pablo Olivero Rebolledo.

Supervisor Programa: Dr. Mario Párraga San Román.

24 Julio 2015

INDICE

Resumen.....	4
Marco teórico.....	6
Hipótesis y objetivos.....	21
Materiales y métodos.....	22
Resultados.....	27
Discusión.....	34
Conclusiones.....	39
Bibliografía	40
Apéndices.....	46

Abreviaturas.

RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona

H: Her2 (receptor)

LA: Luminal A

LB: Luminal B

LB/H: Luminal B, Her2 positivo

H: HER2 (subtipo molecular)

TN: Triple Negativo

IHQ: Inmunohistoquímica

FISH: Hibridación in situ por fluorescencia

RTU: *Ready to use*

RESUMEN

Introducción. Actualmente gran parte de la información pronóstica, junto con la elaboración de la estrategia de tratamiento (citotóxica, terapia endocrina o anticuerpo anti her2) y clasificación de subtipo molecular del cáncer de mama, se realiza a partir del fenotipo inmunohistoquímico del tumor primario. Sin embargo, la heterogeneidad intrínseca de las células neoplásicas en general apreciada en el cáncer de mama hace considerar la posibilidad que la expresión de los marcadores tumorales usados actualmente en la clínica, podría ser modificada durante el desarrollo tumoral y diseminación. **Materiales y Métodos.** Sesenta y seis muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama de Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, fueron estudiadas con hetatoxilina y eosina (ver apéndice B), inmunohistoquímica para la expresión de Her2, RE (Receptor de estrógeno), RP (Receptor de progesterona) y Ki67 (ver apéndice C, D y E) tanto, tumor primario y sus metástasis a linfonodos axilares. Ambas muestras se clasificaron en subtipos: Luminal A, Luminal B, Luminal B/Her2+, HER2 y Triple Negativo y se compararon. **Resultados.** No se encontró diferencias significativas entre la expresión de ER, PR, Her2 y Ki67 del tumor primario y las metástasis a los ganglios linfáticos ($p > 0,05$). 21 casos (31,8%) cambiaron su clasificación molecular entre el tumor primario y sus respectivas metástasis a ganglios linfáticos (ver apéndice F). El subtipo Triple Negativo cambió a subtipos moleculares de mejor pronóstico, en los ganglios linfáticos en 6 de 10 casos, pero no en la dirección opuesta ($p = 0,03$). De todos los casos en que hubo cambio, 16 (24,2%) estarían subtratados según los protocolos de tratamiento para los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama. **Conclusión.** Los cambios observados en los subtipos moleculares entre los tumores primarios y sus ganglios linfáticos en este estudio implican un cambio a subtipos con otras características tumorales y tratamientos. Este último punto debería modificarse, si considera esta información complementaria.

SUMMARY

Introduction. Currently much of the prognostic information, along with the development of treatment strategy (cytotoxic, endocrine therapy or anti HER2 antibody) and classification of molecular subtype of breast cancer, is from the immunohistochemical phenotype of the primary tumor. However, the intrinsic heterogeneity of neoplastic cells in general appreciated in breast cancer does consider that expression of the tumor markers currently used in the clinic, could be modified during tumor development and spread. **Materials and methods.** Sixty-six samples of patients diagnosed with breast cancer at Carlos Van Buren Hospital, Valparaiso, Chile were studied with hematoxylin and eosin (see Appendix B), immunohistochemistry for the expression of HER2, ER (estrogen receptor), PR (Receptor progesterone) and Ki67 (see Appendix C, D and E) in both primary tumor and axillary lymph nodes metastases. Both samples were classified into subtypes: Luminal A, Luminal B, Luminal B / Her2, HER2 and Triple Negative and compared. **Results.** No significant differences between the expression of ER, PR, HER2 and Ki67 in primary tumor and lymph node metastasis ($p > 0.05$) were found. 21 cases (31.8%) changed their molecular classification between the primary tumor and their lymph node metastases (see Appendix F). Triple Negative subtype changed to molecular subtypes with better prognosis, in lymph nodes in 6 out of 10 cases, but not in the opposite direction ($p = 0.03$). In all cases where there was a change, 16 (24.2%) the patients would be undertreated according to treatment protocols designed for different molecular subtypes of breast cancer. **Conclusion.** The observed changes in molecular subtypes between primary tumors and lymph nodes in this study imply changes to other tumor subtypes with different treatment characteristics. The latter point should be amended, if one consider this additional information.

Marco teórico

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL CÁNCER DE MAMA.

La presencia global de cáncer continua incrementándose debido al envejecimiento y el crecimiento de la población, junto con la adopción de comportamientos que predisponen al cáncer, particularmente el consumo de tabaco (Jemal et al, 2011). A nivel mundial el cáncer lidera la causa de muerte de países desarrollados y es la segunda causa en países en vías de desarrollo. Cerca de 12.7 millones de casos y 7,6 millones de muertes fueron estimados para el año 2008. Según esas estadísticas, los cánceres más frecuentes por sexo, fueron el de mama para mujeres y de pulmón para los hombres, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Jemal et al, 2011). En este marco, el cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado y lidera la mortalidad por cáncer en mujeres, alcanzando un 23% (1,38 millones) del total de casos estimados y un 14% (458.400) del total de muertes por cáncer el año 2008 (Jemal et al, 2011).

El cáncer de mama es un problema de salud pública importante en Chile. El cambio del perfil epidemiológico de la población junto con el aumento de la esperanza de vida al nacer ha provocado un aumento de enfermedades crónicas como el cáncer, constituyendo un importante problema de salud pública en términos de morbilidad y mortalidad. En este contexto el cáncer de mama ocupa el segundo lugar entre las principales causas de mortalidad en los últimos 30 años. Durante el año 2008 alcanzó una tasa de mortalidad observada de 14,5 por 100.000 mujeres (MINSAL, 2011).

Aspectos histopatológicos del cáncer de mama.

El cáncer de mama incluye un grupo heterogéneo de neoplasias con una historia natural diferente. Desde el punto de vista histológico se evalúa el grado de invasión (penetración o no de la membrana basal a microscopia de luz), el grado de diferenciación celular (en relación al tejido de origen) y el grado nuclear (alteraciones morfológicas del núcleo), todos ellos con un valor diagnóstico y pronóstico. De este modo, un tumor puede ser infiltrante o in situ,

bien, moderado o escasamente diferenciado, y tener un grado nuclear bajo, intermedio o alto. Además la clasificación se realiza de acuerdo al sitio donde se originó el crecimiento anormal, conductos (carcinomas ductales) o lóbulos (carcinomas lobulillares).

Las neoplasias benignas de mama son poco frecuentes y dentro de ellas la más común es el fibroadenoma, correspondiendo a una proliferación localizada de conductos y estroma mamario, que se presentan en mujeres de 25 a 35 años de edad. El tumor filodes está también formado por elementos epiteliales y estromales, la cual la mayoría aparecen después de los 40 años de edad, con un aspecto histológico variable y se pueden clasificar en benignos (90%) y potencialmente maligno “borderline” o claramente maligno (10%) donde se observan signos atípicos en el elemento estromal, con polimorfismo y mitosis. Otro tumor benigno con importancia clínica es el papiloma intraductal benigno que suele ocurrir como una lesión solitaria en uno de los conductos mamarios mayores (Stevens et al. 2001).

La enfermedad más importante y frecuente de la mama son los adenocarcinomas invasivos. Existen también estadios previos a la invasión, en forma de carcinoma *in situ* de los conductos o lobulillos mamarios (carcinoma intraductal e intralobulillar) constituyendo un factor de riesgo para el desarrollo de un carcinoma invasivo. Dentro de la categoría de infiltrantes, son todos en el cual existe una invasión estromal local detectable y tienen una alta probabilidad de metástasis. Al igual que en los *in situ* se pueden dividir en dos grandes grupos; ductal infiltrante y lobulillar infiltrante. Además existen otros tipos donde su patrón histológico y cuya frecuencia es variable (ver Figura. 1) (Stevens et al., 2001).



Figura 1. Frecuencia de los principales tipos histológicos de carcinoma infiltrante de la mama (Stevens et al., 2001).

En la clínica, se utiliza de rutina: el tamaño del tumor, tipo histológico del mismo, pleomorfismo celular y nuclear, índice mitótico, presencia de necrosis, invasión vascular y de los ganglios linfáticos. Sin embargo, estos parámetros no son suficientes para predecir el curso de la enfermedad. Con más del 50% de los tumores de mama clasificados solo como carcinoma ductal invasivo, claramente hay más biodiversidad en el cáncer de mama que la clasificación histopatológica nos puede ofrecer. Para ello es necesario usar técnicas y marcadores adicionales (moleculares), que nos permitan determinar un fenotipo tumoral más certero.

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA.

Genética.

Las anomalías hereditarias en pacientes con cáncer de mama, se observan en la minoría de los casos; las mutaciones en la línea germinal generalmente se presentan en genes supresores de tumores como p53 y se asocian a síndromes poco frecuentes como el de Li-Fraumeni (Osborne et al., 2004; Walsh et al., 2007); sin embargo se sabe que p53 está alterado en el 20 a 30% de los casos, con cerca de 1400 mutaciones somáticas descritas. Estas se presentan en tumores muy agresivos, sin embargo, frecuentemente se asocian con otros factores de mal pronóstico (ausencia de receptores de estrógeno y progesterona, alto grado histológico y amplificación de Her2), por lo que su valor pronóstico es controvertido (Olivier et al., 2006).

Destacan las mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2 que se encuentran en el 50% y el 30% de los casos de cáncer de mama familiar respectivamente. BRCA1 regula diversos puntos del ciclo celular, la señalización y la susceptibilidad a apoptosis, su deficiencia causa inestabilidad genómica (aneuploidia, amplificación y aberraciones cromosomales). Las funciones de BRCA2 aún no se conocen con exactitud; sólo se sabe que participa en la reparación del ADN (Yoshida et al., 2004; Yarden et al., 2006). Tumores en los que se expresa BRCA 1 y 2, presentan una baja frecuencia de amplificación de Her2; sin embargo, en mujeres con cáncer de mama esporádico y asociado a BRCA1, la enfermedad progresa rápidamente (Yarden et al., 2006). Aunque se desconoce el papel exacto que desempeñan estas mutaciones en la progresión

tumoral, su impacto clínico en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama hereditario es indiscutible (Osborne et al., 2004).

Receptores Hormonales y Her2.

Receptor de Estrógeno.

El cáncer de mama es una enfermedad hormono-dependiente; el entendimiento sobre el mecanismo de acción de estrógeno y la regulación de RE se basaba en un modelo simplista que consideraba a un solo receptor (ahora denominado RE α). Sin embargo, ahora se sabe que los RE pueden ser tres tipos: los comúnmente llamados clásicos: RE α y RE β , y el reciente descrito GPR30 (Sommer et al., 2001).

RE α y RE β pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares; modulan la expresión génica al unirse a sus elementos de respuesta en el núcleo y además inducen respuestas rápidas (no genómicas). Estas últimas también pueden iniciarse por la transactivación de RE vía receptores tirosina quinasa (TK) y/o por los componentes de sus vías de señalización (Matthews et al., 2003). Una vez activados, los RE activan a las MAPK y algunos intermediarios de la señalización (PI3K y AMPc). La interacción entre ambos tipos de respuesta conlleva a la regulación de la activación transcripcional y la modulación de su actividad específica (Norman et al., 2004). De GPR30 se sabe que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G; que se une con alta especificidad al estrógeno. Su localización subcelular se encuentra en controversia (Thomas et al., 2005).

El RE α se expresa en aproximadamente el 50-75% de las pacientes con cáncer de mama, haciéndolas susceptibles al beneficio de la terapia anti-estrógeno, una de cada cuatro pacientes presenta resistencia al tratamiento con progresión de la enfermedad, lo que se ha atribuido a su interacción con otros receptores como el IGFR y Her2; conduciendo a la activación de las vías AKT y MAPK (Moy et al., 2006).

Receptor de Progesterona.

Tanto RE α como los RP son biomarcadores predictivos que juegan un papel importante en la determinación de la terapia de las pacientes con cáncer de mama invasivo. Actualmente es obligatorio evaluar la expresión del RE y del

RP en todos los carcinomas mamarios invasores, con el fin de predecir la respuesta terapéutica. RE α regula la expresión de RP, por lo que la presencia de RP por lo general, indica que la vía de RE se encuentra funcionalmente intacta (Mohsin et al., 2004).

El RP es activado por la hormona progesterona para ayudar a regular varias funciones celulares normales, incluyendo la proliferación celular. El RP se expresa en los núcleos del 60 a 70% de carcinomas invasores de mama, la expresión puede variar en un continuo que va desde 0% hasta cerca de 100% de células positivas. Existe una correlación directa entre los niveles del RP y la respuesta a la terapia hormonal. Los tumores con niveles aún muy bajos de expresión del RP ($\geq 1\%$) tienen una importante oportunidad de responder (Mohsin et al., 2004). La expresión de RP también se asocia con reducción de la recurrencia local en pacientes con carcinomas ductal in situ, tratadas con lumpectomía y radioterapia seguida de la terapia endocrina (Allred et al, 2012). En un estudio que compara a pacientes con carcinoma mamario invasor tratadas con tamoxifeno adyuvante, el riesgo relativo de recurrencia de la enfermedad fue 28% mayor en las pacientes con RE+/RP- que en los casos con tumores RE+/RP+ (Bardou et al., 2003; Cui et al., 2005).

Actualmente en la clínica, la forma habitual de evaluar la expresión de estos receptores es por medio de Inmunohistoquímica (IHQ). Según estándares internacionales como la del consenso de St. Gallen y la ASCO/CAP, se pueden clasificar como tumores positivos o negativos para ambos receptores (Goldhirsch et al, 2011).

Receptor del Factor de crecimiento Epidérmico Humano 2 (Her2).

Los avances en la biología molecular han aportado nuevos blancos terapéuticos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, ejemplo de esto es el gen de Her2/neu en cáncer de mama. El crecimiento de las células de cáncer de mama está regulado por la estimulación autocrina o paracrina de receptores de factores de crecimiento; así, los receptores de tirosina quinasa (TK), localizados en la membrana plasmática, son los mejor caracterizados.

El gen Her2/neu (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2, también conocido como Her2/neu o c-ErbB-2) se encuentra localizado en el cromosoma 17, en la posición 17q21, que codifica para una glicoproteína

transmembrana de 185 kDa, con actividad intrínseca tirosina quinasa (Casalini et al., 2004). Es un miembro de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, EGFR o ErbB (ver Tabla 1). Esta familia de proteínas consiste en cuatro grupos de receptores relacionados: ErbB (Her-1), ErbB-2 (Her-2/neu), ErbB-3 (Her-3) y ErbB-4 (Her-4), cada uno con afinidad por ligandos de activación específicos (Mendelsohn et al., 2000).

Tipo de receptor de factor de crecimiento	Ligando
HER1 (ErbB1 o EGFR)	EGF, TGF- α , HB-EGF, AR, Epi, VGF
HER2/neu (ErbB-2)	<i>Receptor huérfano</i>
HER3 (ErbB-3)	Herregulinas
HER4 (ErbB-4)	NRG2, NRG3, herregulinas, β -celulinas

Tabla 1. Tipos de receptores de factor de crecimiento epidermal (EGFR/Her).

*Abreviaturas: EGF:factor de crecimiento epidermal; TGF- α :factor de transformación de crecimiento alfa; HB-EGF:union a heparina EGF; AR:antiregulina; Epi:epinefrina; VGF: factor de crecimiento vascular; NRG2: neurogulina 2; NRG3: neurogulina 3; β -celulinas: betacelulinas. (Gutierrez et al, 2011).

Esta familia de receptores se encuentra localizada en la membrana plasmática de las células y cada uno de ellos está compuesto por un dominio extracelular (rico en cisteína) de unión al ligando o a sustancias circulantes que se unen al receptor y lo activan, un segmento lipofílico transmembrana de anclaje y un dominio intracelular catalítico que constituye el segmento carboxiterminal con actividad TK (excepto HER-3), susceptible de fosforilarse por degradación del ATP y de transmitir una señal hacia el interior de la célula a través de cascadas de señalización (Mendelsohn et al, 2000).

Esta familia de receptores está involucrada en la división y proliferación celular, primordialmente en la comunicación célula-célula y célula-estroma, proceso conocido como transducción de señal, en el cual factores de crecimiento externos, o ligandos, afectan la transcripción de varios genes por fosforilación o desfosforilación. La activación del receptor requiere tres variables: un ligando, un receptor y un compañero dimerizado.

Los receptores de la familia ErbB son activados por dimerización, que puede darse entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la misma familia (heterodimerización). Los mecanismos que provocan la dimerización son:

- a. La unión del ligando (factor de crecimiento).
- b. La sobreexpresión del receptor
- c. La transactivación de un receptor homólogo (heterodimerización)

Tras la dimerización se produce una activación de la función tirosina-quinasa de la porción intracelular del receptor; este es el suceso clave que inicia la cascada de señales de transducción intracelulares, estimuladoras de la actividad mitogénica, como Ras/Raf/MEK/MAPK o PI3K/Akt. Estas proteínas con actividad TK regulan la proliferación, diferenciación, supervivencia celular y angiogénesis. La estimulación constitutiva de estas vías, por medio de mecanismos autocrinos o de otros mecanismos, se asocia con varios tipos de cáncer humano, donde se induce la proliferación celular, la resistencia a radioterapia y quimioterapia, se provoca fenómenos antiapoptóticos, de angiogénesis y los fenómenos de invasión y metástasis (Pao et al., 2005).

El gen Her2/neu está amplificado a bajos niveles en muchos tejidos normales, incluyendo tejido mamario sano, y se cree que regula el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular a ese nivel (Slamon et al., 1989).

La sobreexpresión de la proteína Her2/neu es el resultado de anomalías en la amplificación del gen Her2/neu (incremento en el número de copias), en el 90 a 95% de los casos. La proteína Her2/neu se encuentra sobreexpresada entre un 25% a 30% de los cánceres de mama; así, el oncogen Her2/neu es el más frecuente amplificado en el cáncer de mama y está directamente asociado con la malignización de las células epiteliales (Jarvinen et al., 2000). Se estima que las células epiteliales normales tienen entre 20.000 y 50.000 receptores Her2/neu de membrana, mientras que las células tumorales en cáncer de mama que sobreexpresan el Her2/neu pueden llegar a tener hasta 2 millones de receptores en su membrana (Horton, 2001).

Los cánceres de mama con sobreexpresión de Her2/neu suelen tener un fenotipo de tumor agresivo y unas características histológicas particulares, como son: alto grado nuclear, actividad mitótica aumentada (alta fracción de la fase S) y ausencia de receptores hormonales (Slamon et al., 2001). Este es un

cáncer con aumento del número de recaídas y disminución del tiempo de supervivencia del paciente. Se considera la sobreexpresión de Her2/neu como marcador de mal pronóstico y de potencial utilización como diana terapéutica, lo que valida para el tratamiento de esta enfermedad el uso de anticuerpos monoclonales específicos que se unen al dominio extracelular del receptor, como el trastuzumab (Slamon et al, 2001).

Existe un gran número de métodos disponibles para la detección y medición de la expresión de Her2; uno se basa en la sobreexpresión de la proteína con el uso de IHQ y otros evalúan la amplificación del gen con diferentes técnicas como son: hibridación in situ por fluorescencia (FISH), hibridación in situ cromogénica (CISH) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

La IHQ es una técnica semicuantitativa usada para la evaluación de la expresión de proteínas; revela diferentes epítopes de las proteínas presentes en la membrana celular, citoplasma o núcleo y es la técnica más usada para detectar y cuantificar la proteína Her2 en primera instancia (Ross et al., 2003). Son muchas las variables que afectan el resultado de la IHQ: fijación, almacenamiento de los tejidos, recuperación antigénica, tipo de anticuerpo, sistema de medición y variabilidad de interpretación entre observadores (Yeh, 2002).

La interpretación de los resultados de IHQ se basa en la valoración de la intensidad de la coloración de las membranas celulares y el porcentaje de las células tumorales positivas (Figura 2). Los resultados se reportan en una escala de 0 a 3+ (ver Tabla 2) (Gutierrez et al, 2011).

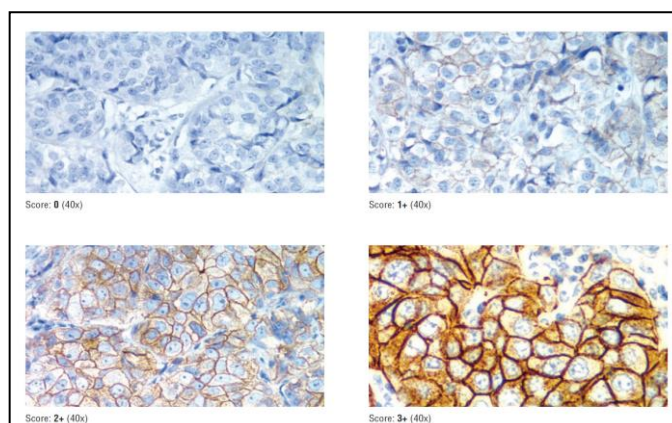


Figura 2. Imagen representativa de la expresión de Her2 con IHQ (Hercep Test Interpretation Manual, Dako, 2006)

Escala	Interpretación	Reporte
0	No hay coloración de la membrana	Negativo
1+	Coloración parcial y débil de las membranas en más del 30% de las células tumorales	Negativo
2+	Coloración débil a moderada de la membrana completa en más del 30% de las células tumorales	Débilmente positivo
3+	Coloración fuerte y completa de la membrana en más del 30% de las células tumorales	Fuertemente positivo

Tabla 2. Escala de interpretación de Her2 por IHQ (Hercep Test Interpretation Manual, Dako, 2006).

La hibridación in situ por fluorescencia (FISH) o cromogénica (CISH) es un método molecular que permite cuantificar el número de copias de un gen. El principio de la hibridación in situ es simple: Sondas de DNA complementaria a las secuencias génicas de interés son generadas, luego se hibridan con el tejido para estudio. FISH puede ser aplicada a un amplio rango de muestras desde líneas celulares, tejido congelado, tejido incluido en parafina y microtissue array. En el caso del cáncer de mama, esta técnica permite ver la amplificación del gen de Her2 en los núcleos de las células neoplásicas (ver Figura 3) comparando el número de señales del gen y el número de señales que marcan el cromosoma 17 donde se encuentra el locus de Her2 (Gutierrez et al, 2011).

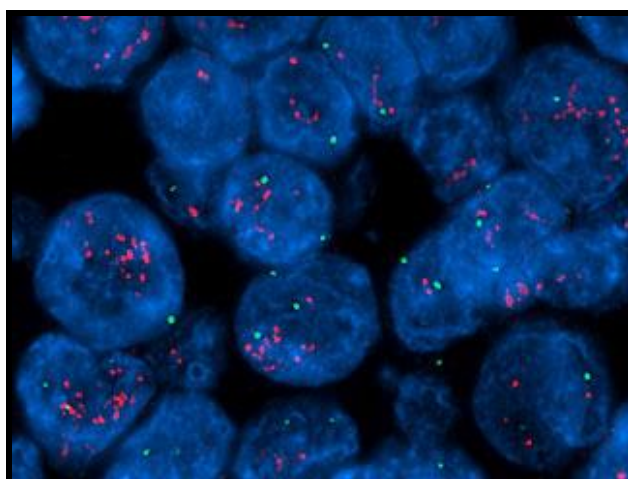


Figura 3. Imagen representativa de la amplificación del gen Her2/neu con FISH en núcleos interfásicos de células neoplásicas de cáncer de mama (señal verde: centríolo cromosoma 17; señal roja: gen Her2/neu) (Hercep Test Interpretation Manual, Dako, 2006).

Clasificación molecular del Cáncer de mama.

La clasificación molecular del cáncer de mama representa el fundamento del tratamiento de selección para la temprana y avanzada enfermedad.

El perfil del cáncer de mama puede realizarse sobre *microarray* de ADN utilizando grandes series de genes con tejido congelado o fresco, o pueden evaluarse en series pequeñas de genes mediante RT-PCR o también IHQ (Mauriac et al., 2005). Debido a que no es factible para todos los laboratorios contar con la información de la expresión génica por medio de *microarray*, se ha optado por una versión simplificada utilizando IHQ. Con IHQ para receptores de estrógeno, progesterona y Her2, se reconocen principalmente cuatro subtipos, de mejor a peor pronóstico (ver Figura 4): Luminal A (RE y/o RP+, Her2-), Luminal B (RE y/o RP+, Her2+), Her2 (RE-, RP-, Her2 + y/o FISH Amplificado) y Triple Negativo (RE-, RP-, HER-2-) (Goldhirsch et al, 2011).

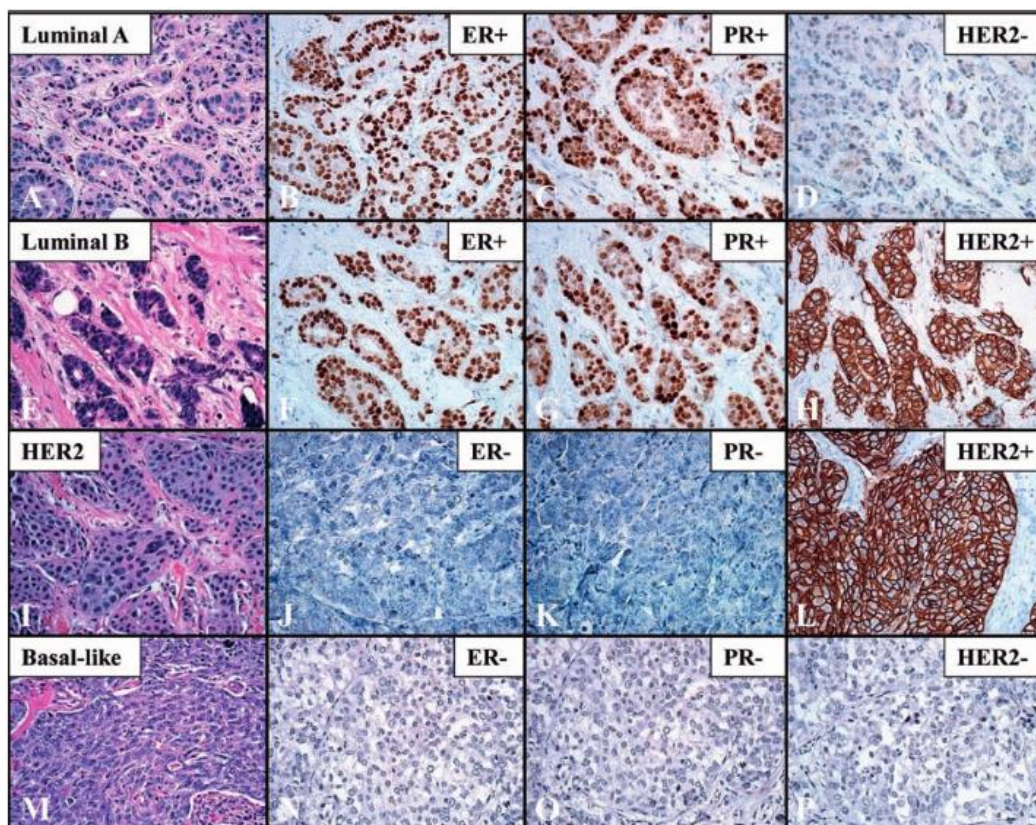


Figura 4. IHQ diferencial de RE, RP y Her2 entre los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama (Sandhu et al., 2009).

Tumores receptores hormonales positivos.

Este grupo de tumores expresan receptores hormonales y tienen un patrón que concuerda con el componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Expresan citoqueratinas lumbales 8/18, RE y genes asociados con su activación, como LIV1 y CCND1 (Perou et al., 2000). Menos del 20% de los tumores lumbales tiene mutación en el p53 y frecuentemente son de grado 1. Existen dos subtipos: Luminal A y B. Luminal A tiene alta expresión de genes relacionados con RE y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular comparado con Luminal B (Sorlie et al., 2003).

Su diagnóstico por IHQ se puede realizar usando el consenso St. Gallen del año 2011; Luminal A (RE y/o RP+, Her2-), Luminal B (RE y/o RP+, Her2+), logrando una diferenciación entre ambos subtipos (Goldhirsch et al, 2011).

Sobre la respuesta al tratamiento, estos subtipos lumbales son de buen pronóstico, sin embargo el Luminal B, tiene peor pronóstico que A, esto se debe a la variación en la respuesta al tratamiento (ver Tabla 3).

La incorporación de Ki67 al panel de IHQ, ha permitido distinguir claramente un nuevo subtipo, este es; Luminal B Her2 negativo (LB/Her2-). Este subtipo expresa al igual que Luminal A, receptores hormonales positivos y Her2 negativo, pero Luminal B/Her2- tiene una alta marcación de Ki67, diferenciándolo del Luminal A que presenta una baja proliferación según Ki67 (Goldhirsch et al, 2011).

Tumores receptores hormonales negativos.

La identificación por *microarray* de un subtipo HER2 de cáncer de mama confirmó que los tumores con sobreexpresión de Her2 han sido sistemáticamente distintos. El subtipo HER2 designado por *microarray* no debe ser confundido con los tumores que expresan la proteína Her2 por inmunohistoquímica o por FISH, ya que de estos últimos no todos muestran cambios en la expresión de ARN para definir al grupo. El subtipo HER2 por *microarray* se refiere a un gran grupo de tumores RE- (baja expresión de RE y genes relacionados) identificados por expresión genética. La mayoría de tumores que son Her2+ por IHQ o FISH, pueden caer dentro del subtipo HER2 por *microarray*. Sin embargo, existen otros tumores Her2+ por IHQ o FISH que también pueden expresar los receptores hormonales, y muchos de ellos

pertenece a los subtipos luminales (Luminal B por ejemplo) (Sorlie et al., 2001; Weigelt et al., 2003).

La sobreexpresión de Her2 en las células tumorales implica un pobre pronóstico, también muestra alta sensibilidad a quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos, encontrando respuesta significativamente más alta comparado con los subtipos luminales. Como con el subtipo Triple Negativo (o también llamado “basal”), el pobre pronóstico del HER2 se origina en su alto grado de recaída temprana (Rouzier et al., 2005).

El subtipo Triple Negativo o basal, es llamado así por su patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario (Perou et al., 2000). Este parecido es producto de la falta de expresión de RE y genes relacionados, baja expresión de Her2, intensa expresión de citoqueratinas 5, 6 y 17, y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Se definió por IHQ como RE-, RP- y Her2-, y citoqueratinas 5/6 o Her1 positivos. Se ha demostrado la existencia de células luminales normales que expresan citoqueratina 5/6, las cuales actúan como células madres. Estas células bajo transformación maligna originan el fenotipo basal del cáncer de mama. Bajo circunstancias normales, BRCA1 puede regular la proliferación de estas células, sin embargo, la baja regulación de BRCA1 podría estimular la expresión de p63, llevando a crecimiento anormal de estas células citoqueratina 5/6 positivas. Estos tumores tienen la tendencia a ser muy adhesivos, con mutación de p53 y son de alto grado (Foulkes et al., 2004).

Tratamiento según Subtipo Molecular.

Varios estudios reportan que los tumores RE+ responden poco a la quimioterapia convencional y se ha demostrado que los pacientes con tumores RE- tiene más posibilidad de respuesta completa a la quimioterapia neoadyuvante que los RE+ (Ring et al., 2004; Rouzier et al., 2005). Los tumores luminales tienen 6% de respuesta completa a quimioterapia preoperatoria basada en paclitaxel seguida de 5-fluoracilo, doxorubicina y ciclofosfamida, contrario al 45% de respuesta en los subtipos basal y HER2 (Rouzier et al., 2005).

Los tumores Luminal A pueden ser tratados solo con hormonoterapia, y los Luminal B, que tienen más genes ligados a proliferación celular, se pueden beneficiar de quimioterapia junto con hormonoterapia. Los Luminal B tienen peor resultado que Luminal A al usar tamoxifeno (Brenton et al., 2005).

Los subtipos Triple Negativo y HER2, que representan la mayoría de los cánceres RE- de mama, que se beneficiarían más con los avances en la quimioterapia, pero HER2, también cuenta con blancos moleculares, como el anticuerpo monoclonal antiHer2, trastuzumab (ver tabla 3).

Varios estudios han demostrado el pobre pronóstico de Triple Negativo (Sorlie, Perou et al., 2001; Sorlie, Tibshirani et al., 2003; Nielsen et al., 2004). No está claro aún si el mal pronóstico se debe a falta de opciones terapéuticas o a una agresividad inherente (Brenton et al., 2005). Por ser triple negativo (RE, RP, Her2 negativos) no es susceptible a tratamientos blancos convencionales, sin embargo, presenta alta sensibilidad a la quimioterapia (Rouzier et al., 2005).

Subtipo	Terapia
<i>Luminal A</i>	Terapia endocrina
<i>Luminal B (Her2 negativo)</i>	Terapia endocrina + citotóxica
<i>Luminal B (Her2 positivo)</i>	Terapia citotóxica+anti-Her2+endocrina
<i>HER2</i>	Terapia citotóxica + anti Her2
<i>Triple Negativo</i>	Terapia citotóxica

Tabla 3. Terapias sistémicas para los subtipos moleculares de cáncer de mama. (Modificado de Goldhirsch et al, 2011).

Diferencias genotipo y fenotipo, entre tumor primario y metástasis de cáncer de mama.

Actualmente en los servicios de salud del país, la determinación del nivel de expresión de estas proteínas es realizada por medio de IHQ en el tumor primario, asumiendo que la expresión se mantiene sin cambios a través de la progresión tumoral. Este último punto está en controversia.

Se piensa que una preexistente población celular en el tumor primario posee un alto potencial metastásico y que este grupo puede migrar a nuevos sitios (Fidler et al., 1982; Weiss et al., 1983). Alternativamente, se cree que el tumor primario mismo puede progresivamente y colectivamente alcanzar la capacidad de invadir y metastizar. A pesar de aquello, la metástasis es mediada por genes multifuncionales cuyos productos digieren membranas basales, interactúan con las proteínas de la matriz extracelular, otorgan protección a la muerte celular y promueven la angiogénesis. Desde hace tiempo que investigaciones comparan al tumor primario y su metástasis en ganglios linfáticos (Chen et al., 1992; Bonsing et al., 1993), estos hallazgos apoyan el modelo de progresión colectiva. Sin embargo, solo un pequeño grupo de células en realidad migran de tumor primario a ganglios linfáticos. Esto sugiere que un, relativamente delicado evento o eventos moleculares, separan las metástasis de ganglio linfático de su correspondiente tumor primario.

Existen diferencias en la citogenética entre tumor primario y sus metástasis, que revelan una menor heterogeneidad de atipias citogenéticas (aneuploidías, aberraciones estructurales cromosómicas) en las metástasis (selección clonal) y una mayor complejidad de los cariotipos en las metástasis respecto a sus tumores primarios, lo que habla de una evolución clonal (Nishizaki et al., 1997; Pandis et al., 1998).

La interrogante es, ¿son las células del tumor primario de mama representativas de la metástasis ganglionar?, ¿qué ocurre con la expresión de RE, RP y Her2?.

Son varios los trabajos que muestran pérdida de la concordancia en la expresión por separado de RE, RP y Her2 entre tumor primario y las metástasis a distancia y recomiendan el uso de esta última para la determinación por IHQ (Zidan et al., 2005; Guarneri et al., 2008; Broom et al., 2009). Otros autores sin embargo, muestran en sus trabajos que no existe una diferencia significativa de

la expresión de esos marcadores (Chan et al.; Gancberg et al., 2002; Gomez-Fernandez et al., 2008).

El objetivo de este estudio es evaluar y comparar los subtipos moleculares por IHQ y FISH y la expresión por separado de RE, RP, Her2 y Ki67, entre el tumor primario de mama y sus respectivas metástasis en linfonodos axilares, obtenidas en la misma mastectomía, en una población chilena, esperando abrir un debate de cómo evaluar esta información y dar nueva evidencia que permita considerar el patrón de expresión de las células de la metástasis ganglionares, como una información complementaria a la hora de proponer un tratamiento.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Pregunta de investigación.

¿Existe diferencia en la clasificación de subtipos moleculares entre células del tumor primario de mama y su metástasis a ganglios linfáticos axilares?

2.1 Hipótesis.

Dada la heterogeneidad del cáncer de mama, la clasificación de subtipos moleculares cambiará entre el tumor primario y su metástasis a ganglios linfáticos axilares.

2.2 Objetivo general.

- Comparar los subtipos moleculares entre tumores primarios de mama y sus metástasis en ganglios linfáticos axilares.

2.3 Objetivo específico

- Evaluar la discordancia en la expresión de HER2, entre el tumor primario de mama y sus respectivas metástasis en linfonos axilares.
- Evaluar la discordancia en la expresión Receptores Hormonales (Estrógeno y Progesterona), entre el tumor primario de mama y sus respectivas metástasis en linfonos axilares.
- Evaluar la discordancia en la expresión de Ki67, entre el tumor primario de mama y sus respectivas metástasis en linfonos axilares.
- Clasificar y determinar los subtipos moleculares, con protocolo de St. Gallen, los tumores primarios de cáncer de mama.
- Clasificar y determinar los subtipos moleculares, con protocolo de St. Gallen, las metástasis en linfonodos axilares de cáncer de mama.
- Evaluar con prueba de asociación estadística los cambios en el protocolo de St. Gallen entre el tumor primario y sus metástasis a linfonodos axilares, por cada subtipo molecular.
- Evaluar el porcentaje de casos que estarían subtratados por cambio de subtipo molecular del protocolo St. Gallen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras.

Se recolectaron tacos de parafina de 70 casos de mastectomías con linfanedectomía axilar, por carcinoma mamario invasor (sin importar tipo histológico en específico), que presentaran una o más metástasis en ganglios linfáticos axilares (en caso de tener más de dos ganglios se seleccionaron los dos de mayor tamaño). Las muestras pertenecen a la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, en el periodo comprendido entre 1 de enero del año 2010 al 30 de Junio del año 2012. Cada paciente firmó un consentimiento informado para su intervención quirúrgica (ver Apéndice A), donde fue autorizado el uso de sus tejidos para propósitos científicos.

Confección de *Tissue Array*.

Se seleccionaron zonas representativas de los tumores primarios en los tacos de parafina y también de una o dos metástasis de ganglios linfáticos axilares. Se extrajeron cilindros de tejido de 0,2 cm de diámetro y se reincluyeron en moldes de parafina diseñados para los cilindros de tejido (ver Figura 2 y Apéndice B). Se realizó una tinción de hematoxilina y eosina en cada molde para comprobar la presencia de tumor en los tejidos en cada cilindro (ver Apéndice C).

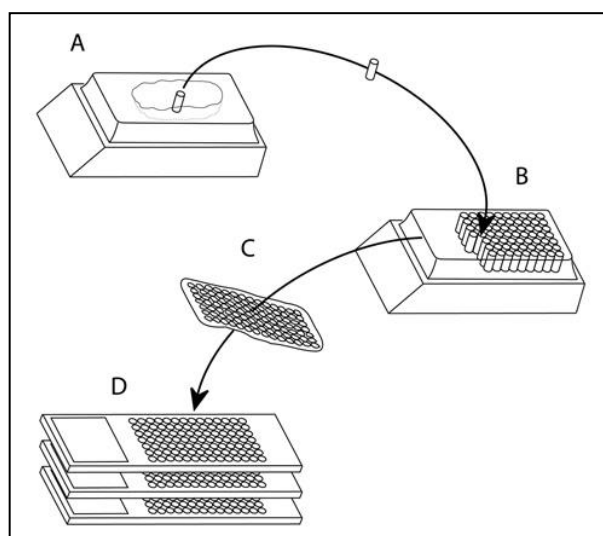


Figura 5. Esquema de procedimiento de confección de *Tissue array*. A) Taco de parafina con la muestra de tumor, se extrae un cilindro de 0,2 cm. B) se confecciona un nuevo taco de parafina donde están los cilindros extraídos. C) Se realizan cortes histológicos. D) se obtienen láminas de los tacos de tissue array, listas para IHQ o FISH.

Inmunohistoquímica.

Las muestras de tumores fueron fijadas con formalina al 10% durante 24 hrs. De los tacos de Arreglo de tejido se obtuvieron láminas con cortes de 4µm de grosor. La desparafinización, hidratación y recuperación del antígeno se realizó en el equipo PT Link DAKO, usando EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH DAKO (1:50). La determinación por IHQ fue en el equipo *Autostainer LINK48 DAKO*.

Los anticuerpos utilizados fueron; para RE, estrogen receptor α clon 1D5 RTU, DAKO; RP, clon PqR, RTU, DAKO; Her2, clon PgR 636 DAKO 1:400; Ki67, clon MIB-1 DAKO RTU, los tiempos fueron según las especificaciones técnicas de cada anticuerpo (ver Apéndice D).

El anticuerpo secundario utilizado fue *EnVision FLEX/HRP*, DAKO, durante 20 min. El sistema de revelado utilizado fue con cromógeno DAKO, *EnVision FLEX DAB+Cromogen*, durante 5 min.

La tinción nuclear se realizó con Hematoxilina de Harris durante 1 min y luego deshidratación con alcoholes ascendentes, xilol, montaje con resina sintética y cubre objeto.

Evaluación de RE, RP, Her2 y Ki67

Un médico anatómopatólogo y un citólogo evaluaron la expresión de RE, RP, Her2 y Ki67 en doble ciego.

El algoritmo para la puntuación de RE y RP fue Allred Score (ver Figura 3) sugerida por la ASCO/CAP y la guía de evaluación DAKO. (Hammond et al.2010; Allred et al., 1998) Se asigna un “*Proportion Score*” (PS) que representa a la proporción de tumor con células con tinción nuclear positiva, que va en un rango de categorías de 0 a 5. Se asigna también un “*Intensity Score*” (IS) que representa la intensidad de la tinción promedio de todas las células con tinción positiva nuclear, que va en un rango de 0 a 3. Luego se obtiene un “*Total Score*” (TS) que es la sumatoria de PS e IS, con resultado entre un rango de 0, 2 - 8, en que las muestras negativas tendrían una TS de 0 y 2, mientras las muestras positivas tendrían un TS de 3 a 8. (ver Tabla 4)

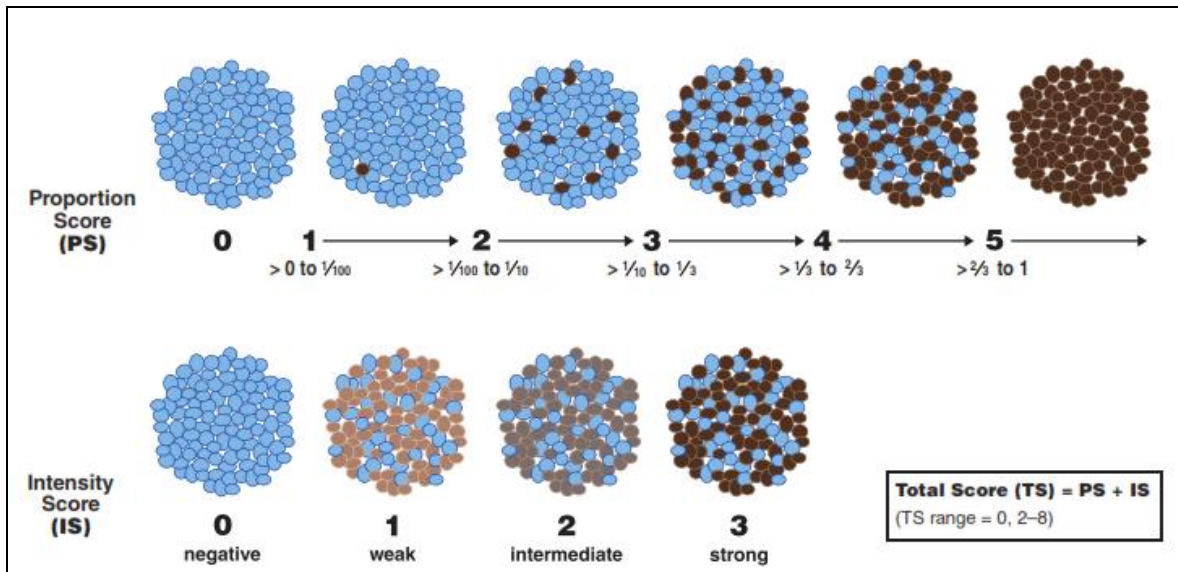


Figura 6. Allred Score. Guía de evaluación de la IHQ para RH según Allred Score.

Total Store (TS)	Interpretación
0, 2	Negativo
≥ 3	Positivo

Tabla 4. Tabla de interpretación de los resultados obtenidos con Allred Score.

La determinación de Her2, fue evaluado semicuantitativamente acorde a las guías ASCO/CAP y guías de evaluación de DAKO con las siguientes categorías, en un campo de 10X:

Score 0: No hay tinción en la membrana.

Score 1+: Tinción parcial de la membrana, en $>10\%$ de las células tumorales.

Score 2+: Tinción completa débil en $>10\%$ de las células tumorales.

Score 3+: Tinción fuerte completa de la membrana en $>10\%$ de las células tumorales (Wolff et al. 2013).

Se consideraron negativos los tumores con score 0, 1+. Como equívoco aquellos con score 2+ (destinados a FISH) y positivos score 3+ por IHQ.

Se consideró como un Ki67 alto, cuando el tumor tenía un $\geq 14\%$ de marcaje positivo a nivel nuclear y un Ki67 bajo cuando tenía $<14\%$ de marcaje positivo (Goldhirsch et al, 2011).

Hibridación in situ por fluorescencia (FISH)

FISH fue realizado para la confirmación de las muestras con score 2+ equívoco por IHQ de Her2. Se utilizó el HER2 FISH pharma Dx Kit (Dako), según el protocolo incorporado en el kit (ver Apéndice E).

La amplificación o no del gen se determinó según las guías de evaluación de Dako, la cual cuantifica las señales verdes (sonda gen HER2) y las señales rojas (sonda centríolo del cromosoma 17), luego se determina la relación (Her2/Cen-17) y las muestras se consideran positivas o amplificadas si dicha relación es ≥ 2 y negativas si es < 2 (Wolff et al. 2013).

Clasificación de subtipo molecular.

La clasificación fue basada en la expresión de RE, RP, HER2 y Ki67 como lo recomienda el St. Gallen internacional Breast Cancer Conference 2011 (Goldhirsch et al, 2011). Con los resultados obtenidos por IHQ y FISH, se clasificaron los tumores primarios y sus metástasis en linfonodos axilares en las siguientes categorías: Luminal A, (RE+ y/o RP+, Ki67 bajo y Her2-); Luminal B (RE+ y/o RP+, Ki67 alto, Her2-); Luminal B/Her2 (RE+ y/o RP+, Her2+), HER2 (RE-, RP-, Her2+), Triple Negativo (RE-, RP-, Her2-). (ver Tabla 5)

	Her2	RE	RP	Ki67	FISH
LA	-	+	+	< 14%	No A
LB	-	+	+	> 14%	No A
LB/H	+	+	+		A
H	+	-	-		A
TN	-	-	-		No A

Tabla 5. Clasificación subtipos moleculares.

LA, Luminal A; LB, Luminal B; LB/H, Luminal B Her2 positivo, H, HER2; TN, Triple Negativo. NoA, No amplificado; A, Amplificado.

Análisis Estadístico.

Los marcadores moleculares (RE, RP, H y Ki67) y los subtipos moleculares (LA, LB, LB/H, H, TN), se analizaron en categorías, aceptadas según la literatura.

Receptores Hormonales (RE y RP): Allred Score

Her2: Asco/Cap.

Ki67: <14%/ ≥ 14%

Subtipos moleculares: Clasificación según St. Gallen

Las variables cualitativas marcadores tumorales y subtipos moleculares fueron comparadas entre tumor primario de cáncer de mama y su metástasis en linfonodos axilares, usando la prueba de McNemar, con un nivel de confianza mayor al 95%. La hipótesis nula de esta prueba es que la matriz formada por tabulación cruzada de los datos es simétrica y la alternativa es que no lo es. Una desviación significativa indica un cambio no al azar de la expresión o la clasificación del tumor primario al ganglio linfático.

RESULTADOS

Características de las muestras de tumor primario y metástasis.

Se recolectaron 70 casos, todos de mujeres con cáncer de mama invasivo, de los cuales 66 lograron los criterios de inclusión y tenían disponibles los tacos de parafina de las muestras del tumor primario y sus metástasis. La media de edad al momento de diagnóstico fue de 57 años, con un rango de 25 a 84 años. De los 66 casos, 47 de ellos poseían más de un ganglio linfático con metástasis, de los cuales se eligieron los dos mayores para el estudio y 19 contaban con solo un ganglio linfático afectado. Los tipos histológicos predominantes fueron carcinoma ductal y lobulillar, 51,5% y 33,3% respectivamente. (ver tabla 6)

Resultados Receptores Hormonales, Her2 y Ki67.

La positividad para Her2 en el tumor primario fue observada en menor porcentaje (28,8%) que en los linfonodos metastásicos (33,3 y 38,3% para ambos ganglios evaluados por tumor primario). Por otro lado, la positividad para RE fue mayor (78,8%) que si lo comparamos con los linfonodos con metástasis (66,6 y 75,5% para ambos ganglios estudiados). En el caso de RP, la positividad (72,7%) resultó bastante parecida a los ganglios linfáticos estudiados (75,8 y 72,3%). La proliferación celular, que fue evaluada con Ki67, presentó un porcentaje por sobre el 14% en 53% de los casos de tumor primario. En las muestra de metástasis mostró un aumento en los dos grupos de ganglios (54,5% y 61,7%). La expresión inmunohistoquímica en tumor primario y ganglios para los marcadores en el presente estudio son mostrados en la tabla 6.

Distribución de subtipos moleculares según muestra.

La distribución de subtipos moleculares en los tumores primarios demostró que el subtipo Luminal A fue el predominante (33.3%) en las muestras de tumor primario, mientras el subtipo Her2 fue el de menor presencia (4,6%).

En el primer grupo de ganglios analizados se observa que se mantiene misma distribución anterior, eso si con leves diferencias, por ejemplo el subtipo HER2 continua siendo el de mejor presencia, pero mayor comparado al grupo tumor

primario. En el caso del segundo grupo de ganglios analizados, la distribución cambia, siendo el subtipo Luminal B/Her2 el de mayor frecuencia (29,8), mientras HER2 continua siendo el de menor presencia (8,5%). Los resultados del subtipo molecular identificados en el tumor primario y los dos grupos de ganglios linfáticos analizados se observa en la tabla 6.

Variable			
Nº pacientes	66		
Media edad	56,6		
Rango Edad	25-84		
Tipo Histológico			
Ca. Ductal	34 (51,5%)		
Ca. Lobulillar	22 (33,3%)		
Ca. Mixto	7 (10,7%)		
Ca. Mucinoso	1 (1,5%)		
Ca. Medular	1 (1,5%)		
Ca. Apocrino	1 (1,5%)		
	Tumor primario (%)	Ganglio 1 (%)	Ganglio 2 (%)
Her2			
Negativo	47 (71,2)	44 (66,7)	29 (61,7)
Positivo	19 (28,8)	22 (33,3)	18 (38,3)
RE			
Negativo	14 (21,2)	22 (33,3)	12 (25,5)
Positivo	52 (78,8)	44 (66,6)	35 (74,5)
RP			
Negativo	18 (27,3)	16 (24,2)	13 (27,7)
Positivo	48 (72,7)	50 (75,8)	34 (72,3)
Ki67			
≥14%	35 (53)	36 (54,5)	29 (61,7)
<14%	31 (47)	30 (45,5)	18 (38,3)
Subtipos			
Luminal A	22 (33,3)	21 (31,8)	11 (23,4)
Luminal B	15 (22,7)	17 (25,8)	13 (27,7)
Luminal B/ Her2	16 (24,2)	17 (25,8)	14 (29,8)
HER-2	3 (4,6)	5 (7,5)	4 (8,5)
Triple Negativo	10 (15,2)	6 (9,1)	5 (10,6)
TOTAL	66 (100)	66 (100)	47 (100)

Tabla 6. Características clínico-patológicas y distribución de los subtipos moleculares.

Cambios en la expresión de los RE, RP, HER-2 y Ki67, entre tumor primario y metástasis a ganglio axilar.

Se determinó como cambio en la expresión de RE, RP, Her2 y Ki67, si ésta ocurría en al menos uno de los ganglios linfáticos con metástasis estudiados. No hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) si los cambios fueron de negativo a positivo o en el sentido contrario.

En Her2 el 62,2% de los casos se mantuvo negativo y el 27,3% positivo. Siete casos cambiaron de expresión, 6 a positivo (ver figura 7) y 1 a negativo. 19 casos presentaron expresión 2+ para IHQ, lo que fueron corroborados con FISH, todos resultaron No Amplificado.

Para RE y RP, el 15,2% y 21,2% de los casos se mantuvieron negativos respectivamente, mientras el 68,1% y 71,2% se mantuvieron positivos respectivamente (ver figura 8). Para RE, 4 casos cambiaron a positivo y 7 a negativo, mientras que para RP 4 casos cambiaron a positivo y 1 la negativo.

La expresión de Ki67 que se mantuvo $< 14\%$ fueron del 34,9% de las pacientes, y las que se mantuvieron $\geq 14\%$ fueron del 43,9% (ver figura 8). Ocho pacientes cambiaron a tener una mayor proliferación celular en el ganglio linfático, mientras 6 cambiaron a tener una menor proliferación celular comparado al tumor primario. Los resultados de los cambios de expresión de RE, RP, Her2 y Ki67 en tumor primario y los dos grupos de ganglios linfáticos analizados de observa en la tabla 7.

Tumor primario/metástasis ganglio linfático

	- / -	- / +	+ / -	+ / +	Total	McNemar test
Her2	41 (62,2)	6 (9)	1 (1,5)	18 (27,3)	66 (100)	P= 0.13
RE	10 (15,2)	4 (6,1)	7 (10,6)	45 (68,1)	66 (100)	P=0.54
RP	14 (21,2)	4 (6,1)	1 (1,5)	47 (71,2)	66 (100)	P=0.37
Ki67	23 (34,9)	8 (12,1)	6 (9,1)	29 (43,9)	66 (100)	P=0.78

Tabla 7. Análisis estadístico tomando en cuenta los cambios en la expresión de los diferentes biomarcadores clasificados como variables dicotómicas (positivo o negativo).

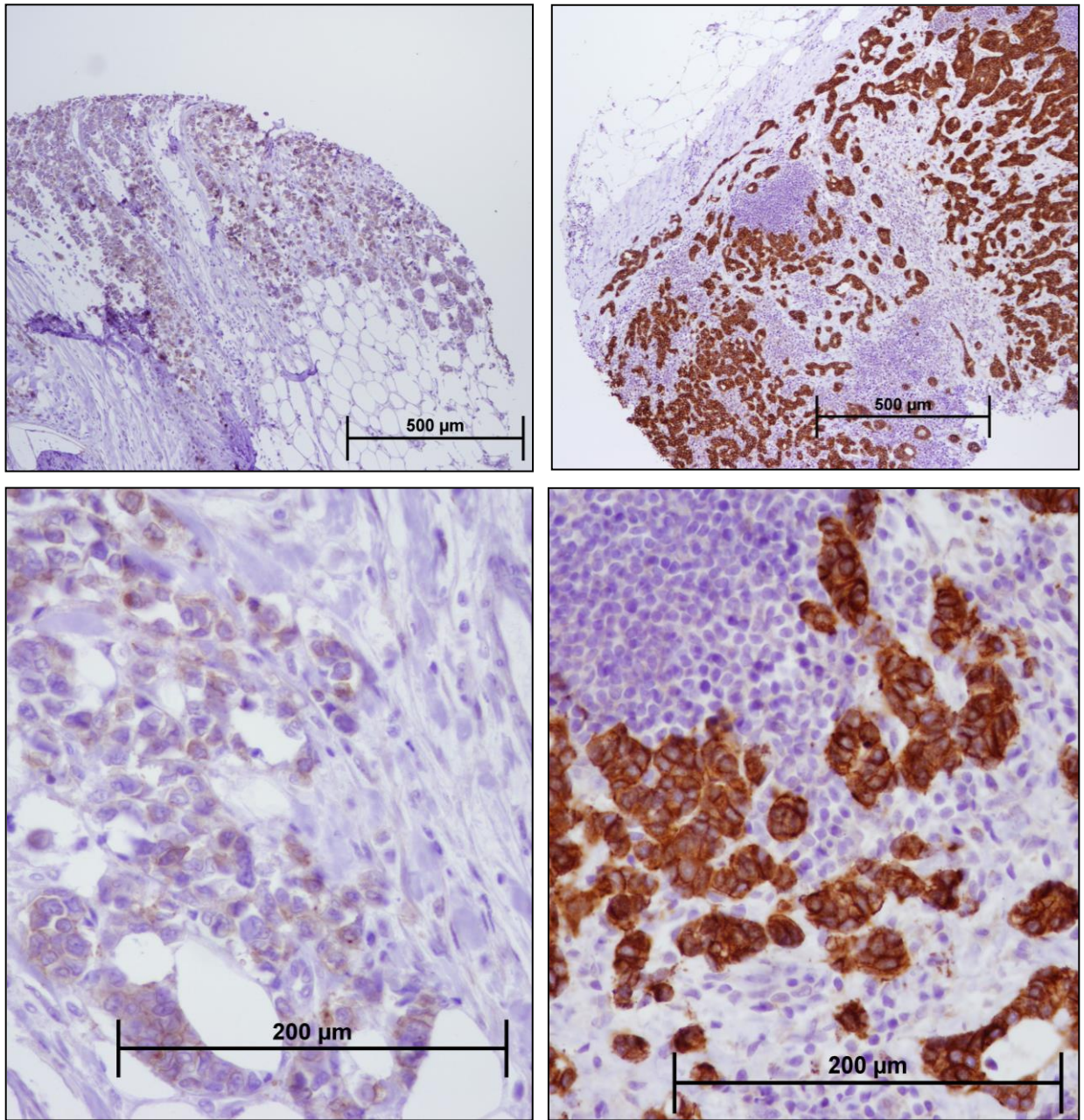


Figura 7.- IHQ patrón de membrana para Her2. Izquierda arriba: Tumor primario más células adiposas (4X). Abajo izquierda: células tumorales, con patrón de membrana débil, score 1+ para Her2 (10X). Derecha arriba: Metástasis de cáncer de mama invadiendo el parénquima y estoma de un ganglio linfático axilar (4X). Derecha abajo: Células de cáncer de mama con un patrón de membrana fuerte, score 3+ de Her2 (10X).

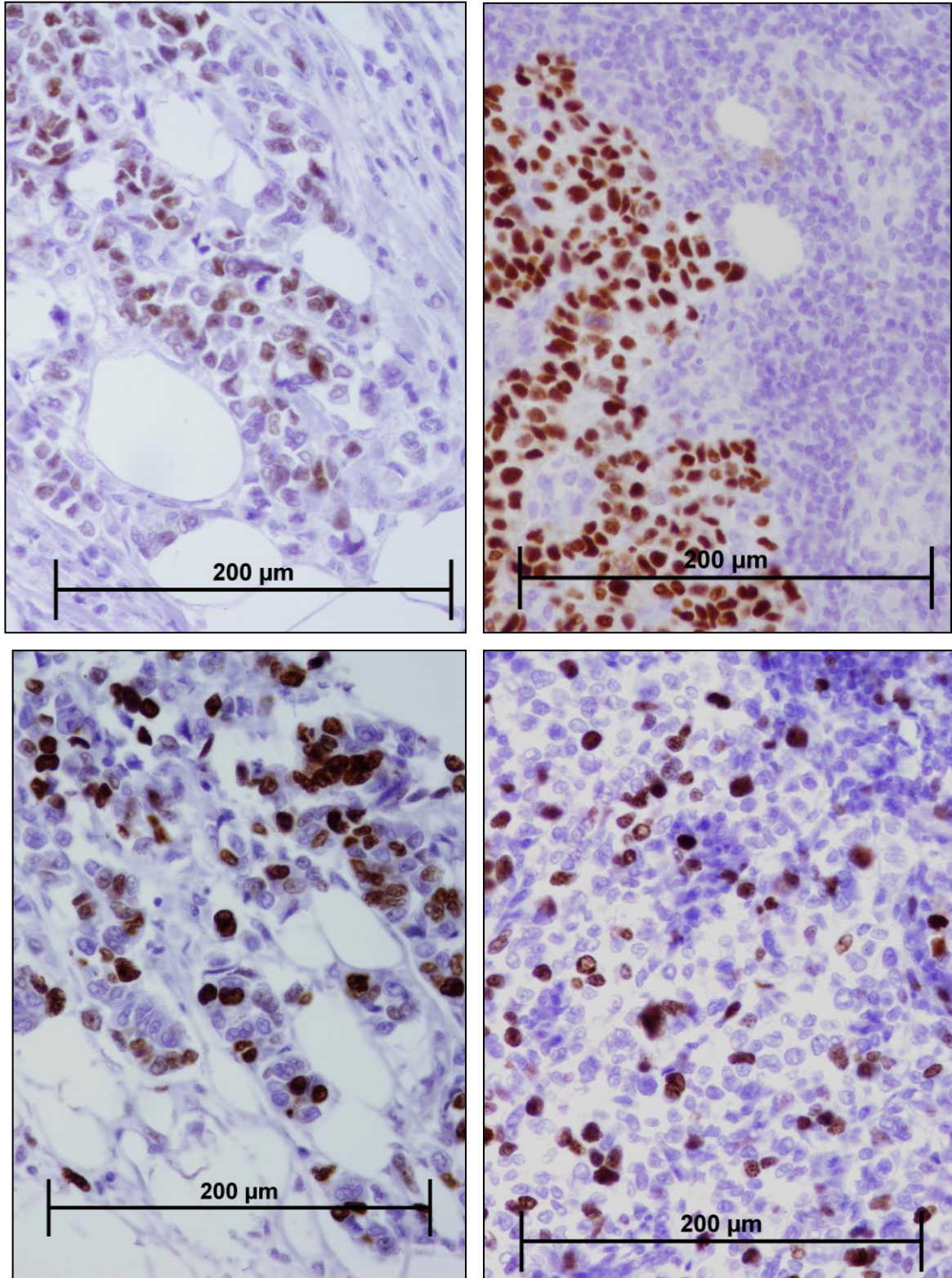


Figura 8.- IHQ patrón nuclear para Estrógeno y Ki67. Izquierda superior: Células tumorales de tumor primario que expresan RE con un Total Store 3 (Proportion Score 2 + Intensity Score 1) (10X). Superior derecha: Células tumorales de metástasis en linfonodo axilar que expresan RE con un Total Store 7 (Proportion Score 5 + Intensity Score 2) (10X). Izquierda inferior: Células tumorales de tumor primario que expresan Ki67 > 14% (10X). Derecha inferior: Células de cáncer de mama en linfonodo axilar que expresan Ki67 > 14% (10X).

Cambios según clasificación molecular entre tumor primario y sus metástasis.

Los tumores que cambiaron su subtipo molecular entre el tumor primario y al menos una de sus metástasis fueron 21, representando el 31,8%.

De los 22 tumores primarios que eran Luminal A, 8 (36,4%) de ellos cambiaron de subtipo en su metástasis ganglionar. Para Luminal B, 15 casos de tumor primario tenían aquella clasificación y 4 (26,7%) de ellos cambiaron de subtipo en la metástasis. En Luminal B/Her2 de un total de 16 casos, solo 2 (12,5%) cambiaron de subtipo. En HER2, de 3 casos, uno (33,3%) cambio de subtipo. En Triple Negativo de los 10 pacientes con esa clasificación, 6 cambiaron a otro subtipo en el ganglio linfático (ver Tabla 9). Según la estadística en este grupo de pacientes, hay una asimetría significativa en el cambio producido ($p < 0,05$). No hubo pacientes en los que el cambio implicara una pérdida total de expresión de RH y/o Her2, al llegar las células a los ganglios linfáticos. Los resultados de los cambios de subtipo molecular identificados entre tumor primario y los dos grupos de ganglios linfáticos analizados se observa en la tabla 8.

		Subtipos Metástasis Ganglio Linfático.					Total	McNemar test
		Luminal A	Luminal B	Luminal B/Her2	HER2	Triple Negativo		
Subtipos Tumor Primario n(%)	Luminal A	14 (63,6)	6 (27,3)	2 (9,1)			22 (100)	P=0.39
	Luminal B	3 (20)	11 (73,3)	1 (6,7)			15 (100)	P=0.27
	Luminal B/Her2		1 (6,25)	14 (87,5)	1 (6,25)		16 (100)	P=0.45
	HER2			1 (33,3)	2 (66,7)		3 (100)	P=0.62
	Triple Negativo	1 (10)	2 (20)	1 (10)	2 (20)	4 (40)	10 (100)	P=0.03
	Total	18	20	19	5	4	66 (100)	

Tabla 8. Distribución de los subtipos de tumor primario y en sus metástasis de ganglios linfáticos.

Del total de los casos, 16 (24,2%) estarían subtratados según los protocolos de tratamiento de los subtipos moleculares de cáncer de mama. Los casos que cambiaron su subtipo a uno de peor pronóstico fueron, 10 y hacia una clasificación menos agresiva fueron 11 (ver tabla 9).

nº	Tumor Primario	Ganglio 1	Ganglio 2		
3	TN	LA	LA	Verde	Celeste
5	LA	LA	LB/H	Rojo	Celeste
18	LB	LA	-	Verde	
19	LB/H	H	H	Rojo	
20	LA	LB	LA	Rojo	Celeste
21	LA	LB	LB	Rojo	Celeste
22	LB	LA	-	Verde	
25	LA	LB	LB	Rojo	Celeste
29	LA	LA	LB	Rojo	Celeste
35	TN	TN	LB	Verde	
37	TN	H	H	Verde	Celeste
38	TN	H	TN	Verde	Celeste
41	TN	TN	LB	Verde	Celeste
46	LB/H	LB	LB	Verde	
47	H	LB/H	LB/H	Verde	Celeste
48	LB	LB/H	LB/H	Rojo	Celeste
53	LA	-	LB/H	Rojo	Celeste
55	LA	LB	LA	Rojo	Celeste
59	TN	LB/H	TN	Verde	Celeste
68	LB	LA	LA	Verde	
69	LA	LB	-	Rojo	Celeste

Tabla 9. Detalle de los 21 casos, en los que el subtipo molecular del tumor primario, cambio en la metástasis de ganglio linfático.

LA: Luminal A; LB: Luminal B; LB/H: Luminal B Her2+; H: HER2; TN: Triple Negativo

Verde: cambio a buen pronóstico.

Rojo: cambio a mal pronóstico.

Celeste: casos subdiagnosticados.

DISCUSIÓN.

Actualmente en Chile, los parámetros de predicción como la expresión de RE, RP y Her2, son la base del tratamiento para el cáncer de mama. Estos son medidos exclusivamente en una muestra del tumor primario, asumiendo a su vez que se mantienen en la metástasis. Sin embargo, es sabido que la célula tumoral experimenta cambios genotípicos durante su invasión y diseminación, junto con modificaciones en la regulación, expresión y función de proteínas. Entonces es de suponer que la expresión de los marcadores tumorales ocupados habitualmente en cáncer de mama, también podría cambiar en el proceso de metástasis.

La mayoría de las investigaciones de este tipo, se basan principalmente en la comparación de la variación de estos marcadores tumorales de forma individual entre tumor primario y su metástasis a distancia en diferentes órganos como hueso, sistema nervioso central, ganglio linfático, piel, hígado, partes blandas, pulmón, pleura (Chan et al 2012.; Zidan, Dashkovsky et al., 2005; Gomez-Fernandez, Daneshbod et al., 2008; Broom, Tang et al., 2009). En esta tesis se privilegió, a diferencia de otros trabajos, el uso de linfonodo axilar como muestra de metástasis para evaluar cambio de expresión de proteínas en cáncer. Esto evita posibles diferencias de expresión producidas por agentes externos como son los tratamientos antineoplásicos (selección de clones), como podría ocurrir en el caso de usar muestras de metástasis a distancia y no sincrónicas, es decir, después de años desde la extracción del tumor primario. Además en esta investigación se decidió por contar en lo posible con más de una muestra de metástasis de linfonodo del vaciamiento axilar (parte de la mastectomía radical) por tumor primario, contando con 49 casos con dos linfonodos para la evaluación de la expresión de los marcadores para este estudio, con el fin de mejorar la probabilidad de encontrar diferencias entre tumor primario y sus metástasis.

Los cánceres de mama con sobreexpresión de Her2 suelen ser un fenotipo de tumor agresivo y unas características histológicas particulares, como alto grado nuclear, actividad mitótica aumentada, ausencia de receptores hormonales, aumento de recaídas y disminución del tiempo de supervivencia del paciente. Se considera la sobreexpresión de Her2 como un marcador de mal pronóstico y

de potencial utilizaron como diana terapéutica, válida para el tratamiento de esta enfermedad con el uso de anticuerpos monoclonales específicos que se unen al dominio extracelular del receptor, como el trastuzumab. Diferentes estudios sugieren una fuerte asociación de este marcador con un alto riesgo a recurrencia en estados tempranos de cáncer de mama, un grado inferior de resistencia a la terapia hormonal (mayormente en tamoxifeno que en inhibidores de aromatasas) y resistencia a terapias citotóxicas convencionales. Particularmente, con esquemas que indican ciclofosfamida, metrotexato y fluoracilo. Y un aumento en la sensibilidad a la doxorubicina y a las terapias basadas en taxanos y antraciclinas. Por estos motivos, es importante hacer la medición de la amplificación de este gen o de la proteína como factor predictivo de terapia, y de pronóstico de supervivencia. En este trabajo se observó que la expresión de Her2, cambió en 7 de 66 (10,6%). En 6 casos la expresión fue negativa a positiva, mientras que en solo un caso ocurrió una pérdida en la expresión. En la literatura, la discordancia en la expresión de Her2 entre primario y su metástasis ha sido medida con IHC y/o FISH, estando en el rango de 0% a 28% (Chan et al. 2012). Similar es el estudio de Guarneri, donde de un total de 75 pacientes, un 16% de las muestras fueron discordantes, en donde 2 pacientes cambiaron de positivo a negativo, mientras 10 lo hicieron de negativo a positivo (Guarneri et al., 2008). Zidan, en una serie de 58 pacientes encontró una discordancia de un 14%, donde 7 (12%) pacientes ganan expresión en metástasis y 1 (2%) la pierde (Zidan et al., 2005). Por otro lado Carlsson, en 47 pacientes no encontró diferencias drásticas en la expresión de Her2, al comparar el tumor primario con sus correspondientes metástasis a ganglios linfáticos. Solo se observó leves cambios, seis casos que cambiaron de 1+ a 0 y uno de 3+ a 2+ (Carlsson et al., 2004). Si bien se muestra que existe una variación notable en el porcentaje de discordancia de expresión de Her2 entre tumor primario y metástasis (0 a 28%), se observa que en general existe una tendencia a la ganancia de expresión, lo que concuerda con los resultados de esta tesis. Es probable que la expresión de Her2 sea un determinante para la supervivencia celular en el microambiente tumoral secundario como lo es el linfonodo y esto concuerda claramente con la relación de este receptor y vías de señalización implicadas con consecuencias como; aumento de proliferación,

fenómenos antiapoptóticos, angiogénesis, resistencia a radio y quimioterapia. (Pao et al., 2005).

Sobre discordancias en la expresión de los RH, la información en la literatura es limitada y los métodos de evaluación heterogéneos. En esta tesis se optó por calificar la expresión según Allred score y se encontró discordancia en la expresión de RE en 11 casos (16,7%) y para RP en 5 casos (7,6%), además, en RE fueron 4 casos que cambiaron de negativo a positivo y 7 en el sentido contrario, mientras para RP 4 casos cambiaron de negativo a positivo y sólo 1 en sentido contrario. Broom reporta discordancias de 17,7% para RE y de 37,3% para RP, concluyendo que existe una discordancia significativa en los RH, particularmente frecuente en RP (Broom et al., 2009). Guameri reporta un cambio del estatus de RH en un 21% (16 casos); nueve casos pasan de positivo a negativo y siete de negativo a positivo (Guarneri et al., 2008). En un estudio con 278 casos encontraron que la expresión de RE era bastante estable, teniendo el 96,8% la misma expresión en el tumor primario y metástasis. En 9 pacientes (3,2%) cambio de positivo en el tumor primario a negativo en la metástasis, mientras que no hubo casos en el sentido contrario (Gomez-Fernandez et al., 2008).

El mecanismo responsable para el cambio de la expresión de RH y Her2 no ha sido completamente revelado. Explicaciones posibles incluyen; alteraciones cromosómicas durante la progresión tumoral (deleciones, amplificaciones, traslocaciones, aneuploidías, etc) que resultaría en la generación de clones tumorales (Pandis et al., 1998), cambios epigenéticos en el genoma tumoral (Cavalli et al., 2003) y presión selectiva ejercida por las terapias (Guarneri et al., 2008).

La clasificación molecular de cáncer de mama representa el fundamento para la selección de tratamiento para la enfermedad temprana y avanzada. En esta tesis 21 casos (31,8%) cambiaron de clasificación molecular entre tumor primario y su metástasis ganglionar (ver Apéndice F1 y 2). En todos los subtipos moleculares existieron casos que cambiaron en su metástasis, pero fue el grupo Triple Negativo que mostró una diferencia marcada hacia subtipos que expresan RH y/o Her2, mostrando que en la mayoría de los casos que no expresaban RE, RP y Her2 en el tumor primario, en ganglio linfático si lo hicieron (ver Apéndice F2). En ninguna de las pacientes su tumor primario

cambió a Triple Negativo en el ganglio linfático, es decir, a una pérdida total de la expresión de RH y/o Her2, este dato es inédito en la literatura. Esto podría reflejar una selección de células que “privilegian” la expresión RH y/o HER2, lo que podría mejorar su supervivencia en su viaje y colonización del ganglio linfático (ver Apéndice F2). Aún no siendo el tema principal de este trabajo, el concepto de evolución clonal podría ser incorporado al trabajar en la clasificación de subtipos moleculares de cáncer de mama, al reconocer que algunos subtipos de cáncer evolucionan más rápidamente, debido a su inherente alta inestabilidad genómica (por ejemplo, triple negativo), esto sugiere que durante la progresión de la enfermedad, el fenotipo del cáncer puede cambiar (Kimberly et al, 2012).

Existen pocos trabajos en la literatura que comparan las clasificaciones moleculares de cáncer de mama y su metástasis. Un estudio similar, usando una cohorte de 85 pacientes, compararon tumor de mama y un ganglio linfático comprometido, reportó en 9 casos (11%) una discordancia de la clasificación de subtipo, donde Luminal A mostraba una marcada tendencia a cambios a subtipos de peor pronóstico, 5 casos a Luminal B y 2 a Triple Negativo (Falck et al., 2013). Esto marca diferencias interesantes con el presente trabajo en dos ámbitos: Primero, utilizaron solo un ganglio como muestra de metástasis, a diferencia de esta tesis donde 45 casos contaban con dos ganglios para evaluar, esto aumenta la probabilidad de encontrar una diferencia de expresión de los marcadores tumorales usados y explicaría la alta frecuencia de casos que cambiaron de subtipos moleculares en comparación con aquella investigación, 31,8% versus 11% respectivamente. Segundo, concluyeron que existía una tendencia significativa a cambios a subtipos con peor pronóstico, a diferencia de esta tesis que destaca los cambios a subtipos de mejor pronóstico o, dicho de otra manera, subtipos que expresaban marcadores moleculares asociados a terapias. Esto abre la discusión de comparar resultados de dos poblaciones diferentes. Si bien es sabida la heterogeneidad tanto en la expresión y la citogenética del cáncer, también lo es entre poblaciones diferentes. Esto podría explicar la diferencia de los resultados al querer compararlos. Un buen ejemplo es el estudio entre pacientes femeninas japonesas y alemanas con cáncer de mama invasor, en donde el promedio de alteraciones citogenéticas fue significativamente más alto en la población

alemana premenopáusica que su contraparte japonesa, además diferencias en las alteraciones estructurales como la pérdida de 8p asociados también a RE- en la población japonesa, mientras en las pacientes alemanas mostraban una ganancia de 3q y 6q también asociadas a la pérdida de expresión de RE (Packeisen et al., 2005).

Otro estudio plantea un escenario diferente, al estudiar las metástasis de cerebro en cáncer de mama concluyeron que pertenecen predominantemente a los subtipos triple negativo y HER2. Si bien sus muestras de tumor primario y metástasis cerebral diferían solo en algunos casos, mostraban una tendencia a la pérdida de la expresión receptores hormonales y otros en una ganancia en la expresión de EGFR y Her2 (Gaedcke et al., 2007).

Del total de los casos, 16 (24,2%) estarían subtratados según los protocolos de tratamiento de los subtipos moleculares de cáncer de mama (ver tabla 9). En esta tesis el número de casos que cambiaron su subtipo a uno de peor pronóstico fueron 10 y hacia una clasificación menos agresiva fueron 11 (ver Tabla 9). Dentro de los 21 casos que cambiaron de subtipo, 17 tenían dos ganglios linfáticos para evaluar, en los cuales los cambios de clasificación que ocurrieron en un solo ganglio fueron 9 casos, a diferencia del resto que cambiaron en los dos ganglios linfáticos (8 casos), lo que apoya la teoría de la heterogeneidad tumoral, no solo entre tumor primario y metástasis, sino también, entre estas últimas (Weigelt et al., 2005) y sugiere además estudios con muestras de distintas metástasis para identificar la mezcla de poblaciones tumorales que podría requerir distintos esquemas de tratamiento, en relación a lo mismo, si bien en esta tesis no se encontraron casos donde había más de un cambio de fenotipo, no se descarta la posibilidad de ese hecho y se necesitaría analizar una mayor cantidad de ganglios linfáticos por caso para comprobar ese escenario. Es posible que sea necesario en el futuro un estudio en que se evalúe la expresión de estos marcadores en la totalidad de los ganglios linfáticos extraídos, para la posible determinación de un nuevo parámetro pronóstico.

CONCLUSIÓN.

La naturaleza retrospectiva de este análisis y el número relativamente limitado de pacientes incluidos, no permite formar una conclusión firme. Sin embargo con los resultados obtenidos, claramente se observa que un cambio en el subtipo molecular de un cáncer de mama, puede ocurrir con el tiempo suficiente, destacando los siguientes puntos:

1.- El 31,8% de los casos cambiaron de subtipo molecular entre tumor primario y su metástasis de ganglio linfático. Además del total de casos, 16 de ellos (24,2%) estarían subtratados, según el cambio de subtipo que experimentaron sus células en la metástasis ganglionar.

2.- Triple Negativo, fue el subtipo que tuvo una marcada tendencia a cambios a subtipos de buen pronóstico o que expresaban RH y/o Her2. No se observaron ejemplos en dirección contraria.

3.- Se observó, según los datos de este trabajo, que los cambios de expresión de los marcadores tumorales; Her2, RE, RP y Ki67 evaluados por separado entre tumor primario y metástasis en linfonodo axilar, fueron al azar y no tenían un patrón distintivo (positivo a negativo o negativo a positivo)

4.- Es necesario ampliar la muestra de metástasis para evaluar el cambio de expresión de los marcadores usados en cáncer de mama, ya que por lo visto en este trabajo existe una variabilidad de expresión entre metástasis llevando esto a un subdiagnóstico si solo se evalúa un solo ganglio linfático. En este punto la técnica de Arreglo de tejido es muy útil al poder evaluar varias muestras al mismo tiempo.

5.- Bajo la necesidad de un certero diagnóstico para el uso adecuado de las terapias coadyuvantes, el uso del ganglio linfático puede ser un complemento de la información al momento de otorgar un tratamiento adecuado a un caso de cáncer de mama, ya que en este estudio un tercio de las pacientes tienen dos poblaciones celulares neoplásicas diferentes y las medidas terapéuticas deberían considerar este hecho, debido a que no es posible determinar cual población “prevalecerá” en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

Allred, D. C., Anderson, S. J., Paik, S., Wickerham, D. L., Nagtegaal, I. D., Swain, S. M., Mamounas, E. P., Julian, T. B., Geyer, C. E., Jr., Costantino, J. P., Land, S. R. and Wolmark, N (2012). Adjuvant tamoxifen reduces subsequent breast cancer in women with estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ: a study based on NSABP protocol B-24. *J Clin Oncol* 30, 1268-1273.

Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M. and Clark, G. M. (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11, 155-168.

Bardou, V. J., Arpino, G., Elledge, R. M., Osborne, C. K. and Clark, G. M. (2003) Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21, 1973-1979.

Bonsing, B. A., Devilee, P., Cleton-Jansen, A. M., Kuipers-Dijkshoorn, N., Fleuren, G. J. and Cornelisse, C. J. (1993) Evidence for limited molecular genetic heterogeneity as defined by allelotyping and clonal analysis in nine metastatic breast carcinomas. *Cancer Res* 53, 3804-3811.

Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A. and Caldas, C. (2005) Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 23, 7350-7360.

Broom, R. J., Tang, P. A., Simmons, C., Bordeleau, L., Mulligan, A. M., O'Malley, F. P., Miller, N., Andrulis, I. L., Brenner, D. M. and Clemons, M. J. (2009) Changes in estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2/neu status with time: discordance rates between primary and metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 29, 1557-1562.

Carlsson, J., Nordgren, H., Sjostrom, J., Wester, K., Villman, K., Bengtsson, N. O., Ostenstad, B., Lundqvist, H. and Blomqvist, C. (2004) HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br J Cancer* 90, 2344-2348.

Casalini, P., Iorio, M. V., Galmozzi, E. and Menard, S. (2004) Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol* 200, 343-350.

Cavalli, L. R., Urban, C. A., Dai, D., de Assis, S., Tavares, D. C., Rone, J. D., Bleggi-Torres, L. F., Lima, R. S., Cavalli, I. J., Issa, J. P. and Haddad, B. R. (2003) Genetic and epigenetic alterations in sentinel lymph nodes metastatic lesions compared to their corresponding primary breast tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 146, 33-40.

Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C. K. and Lee, A. V. (2005) Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 23, 7721-7735.

Chan, A., Morey, A., Brown, B., Hastrich, D., Willsher, P. and Ingram, D. (2012) A retrospective study investigating the rate of HER2 discordance between primary breast carcinoma and locoregional or metastatic disease. *BMC Cancer* 12, 555.

Chen, L. C., Kurisu, W., Ljung, B. M., Goldman, E. S., Moore, D., 2nd and Smith, H. S. (1992) Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 84, 506-510.

Falck, A. K., Ferno, M., Bendahl, P. O. and Ryden, L. (2013) St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases--aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. *BMC Cancer* 13, 558.

Fidler, I. J. and Hart, I. R. (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217, 998-1003.

Foulkes, W. D., Brunet, J. S., Stefansson, I. M., Straume, O., Chappuis, P. O., Begin, L. R., Hamel, N., Goffin, J. R., Wong, N., Trudel, M., Kapusta, L., Porter, P. and Akslen, L. A. (2004) The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res* 64, 830-835.

Gaedcke, J., Traub, F., Milde, S., Wilkens, L., Stan, A., Ostertag, H., Christgen, M., von Wasielewski, R. and Kreipe, H. H. (2007) Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. *Mod Pathol* 20, 864-870.

Gancberg, D., Di Leo, A., Cardoso, F., Rouas, G., Pedrocchi, M., Paesmans, M., Verhest, A., Bernard-Marty, C., Piccart, M. J. and Larsimont, D. (2002) Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 13, 1036-1043.

Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thurlimann, B. and Senn, H. J. (2011) Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736-1747.

Gomez-Fernandez, C., Daneshbod, Y., Nassiri, M., Milikowski, C., Alvarez, C. and Nadji, M. (2008) Immunohistochemically determined estrogen receptor phenotype remains stable in recurrent and metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol* 130, 879-882.

Guarneri, V., Giovannelli, S., Ficarra, G., Bettelli, S., Maiorana, A., Piacentini, F., Barbieri, E., Dieci, M. V., D'Amico, R., Jovic, G. and Conte, P. (2008) Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. *Oncologist* 13, 838-844.

Gutierrez, C. and Schiff, R. (2011) HER2: biology, detection, and clinical implications; in *Arch Pathol Lab Med* Vol. 135, pp. 55-62.

Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J. N., Sweep, F. C., Taube, S., Torlakovic, E. E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R. B., Wittliff, J. L. and Wolff, A. C. (2010) American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 28, 2784-2795.

Horton, J. (2001) Her2 and trastuzumab in breast cancer. *Cancer Control* 8, 103-110.

Jarvinen, T. A., Tanner, M., Rantanen, V., Barlund, M., Borg, A., Grenman, S. and Isola, J. (2000) Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156, 839-847.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.

Kimberly H., Allison MD. (2012) Molecular Pathology of Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* 138, 770-780.

Matthews, J. and Gustafsson, J. A. (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3, 281-292.

Mauriac, L., Debled, M. and MacGrogan, G. (2005) When will more useful predictive factors be ready for use? *Breast* 14, 617-623.

Mendelsohn, J. and Baselga, J. (2000) The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-6565.

MINSAL (2011) Guía Clínica CÁNCER DE MAMA. MINISTERIO DE SALUD.

Mohsin, S. K., Weiss, H., Havighurst, T., Clark, G. M., Berardo, M., Roanh le, D., To, T. V., Qian, Z., Love, R. R. and Allred, D. C. (2004) Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol* 17, 1545-1554.

Moy, B. and Goss, P. E. (2006) Estrogen receptor pathway: resistance to endocrine therapy and new therapeutic approaches. *Clin Cancer Res* 12, 4790-4793.

Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M. and Perou, C. M. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 5367-5374.

Nishizaki, T., DeVries, S., Chew, K., Goodson, W. H., 3rd, Ljung, B. M., Thor, A. and Waldman, F. M. (1997) Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 267-272.

Norman, A. W., Mizwicki, M. T. and Norman, D. P. (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 3, 27-41.

Olivier, M., Langerod, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., Theillet, C., Rodriguez, C., Lidereau, R., Bieche, I., Varley, J., Bignon, Y., Uhrhammer, N., Winqvist, R., Jukkola-Vuorinen, A., Niederacher, D., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P. and Borresen-Dale, A. L. (2006) The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1157-1167.

Osborne, C., Wilson, P. and Tripathy, D. (2004) Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9, 361-377.

Packeisen, J., Nakachi, K., Boecker, W., Brandt, B., Buerger, H. (2005) Cytogenetic differences in breast cancer sample between German and Japanese Patients. *J Clin Pathol* 58, 1101-1103.

Pandis, N., Teixeira, M. R., Adeyinka, A., Rizou, H., Bardi, G., Mertens, F., Andersen, J. A., Bondeson, L., Sfikas, K., Qvist, H., Apostolikas, N., Mitelman, F. and Heim, S. (1998) Cytogenetic comparison of primary tumors and lymph node metastases in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 122-129.

Pao, W. and Miller, V. A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 23, 2556-2568.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. and Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Ring, A. E., Smith, I. E., Ashley, S., Fulford, L. G. and Lakhani, S. R. (2004) Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer* 91, 2012-2017.

Ross, J. S., Fletcher, J. A., Linette, G. P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Symmans, W. F., Pusztai, L. and Bloom, K. J. (2003) The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8, 307-325.

Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J. S., Hortobagyi, G. N. and Pusztai, L. (2005) Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11, 5678-5685.

Sandhu, R., Parker, J.S., Jones, W. D., Livasy, C. A., Coleman W. B. (2009) Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Lab Medicine* 41, 364-372.

Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. and Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.

Sommer, S. and Fuqua, S. A. (2001) Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 11, 339-352.

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lonning, P. E. and Borresen-Dale, A. L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lonning, P. E., Brown, P. O., Borresen-Dale, A. L. and Botstein, D. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8418-8423.

Stevens A., Lowe J. (2001) *Anatomía Patológica. Segunda edicion. Editorial Harcourt. Madrid. España.*

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. and Dong, J. (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632.

Walsh, T. and King, M. C. (2007) Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 11, 103-105.

Weigelt, B., Glas, A. M., Wessels, L. F., Witteveen, A. T., Peterse, J. L. and van't Veer, L. J. (2003) Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15901-15905.

Weigelt, B., Peterse, J. L. and van 't Veer, L. J. (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591-602.

Weiss, L., Holmes, J. C. and Ward, P. M. (1983) Do metastases arise from pre-existing subpopulations of cancer cells? *Br J Cancer* 47, 81-89.

Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Mangu, P. B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G. and Hayes, D. F. (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31, 3997-4013.

Yarden, R. I. and Papa, M. Z. (2006) BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions. *Mol Cancer Ther* 5, 1396-1404.

Yeh, I. T. (2002) Measuring HER-2 in breast cancer. *Immunohistochemistry, FISH, or ELISA?* *Am J Clin Pathol* 117 Suppl, S26-35.

Yoshida, K. and Miki, Y. (2004) Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95, 866-871.

Zidan, J., Dashkovsky, I., Stayerman, C., Basher, W., Cozacov, C. and Hadary, A. (2005) Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br J Cancer* 93, 552-556.

Apéndices

Apéndice A: Consentimiento informado, Unidad Obstetricia y Ginecología

Ministerio de Salud
Servicio de Salud Valparaíso San Antonio
Hospitál Carlos Van Buren
UNIDAD DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA



CONSENTIMIENTO INFORMADO **PROCEDIMIENTOS E INTERVENCIONES ELECTIVAS O URGENCIAS**

Autorizo al personal del Hospital Carlos Van Buren, a proceder a la realización del procedimiento _____ dado mi enfermedad consistente en _____

Se me ha explicado la naturaleza de mi enfermedad y propuesto un tratamiento.

Esta autorización comprende el uso de los procedimientos quirúrgicos correspondientes, la decisión sobre el tipo de anestesia aconsejable y que se me pueda examinar, disponer y utilizar los tejidos u órganos extirpados con propósitos científicos o docentes.

He sido debidamente informado que mi negativa podrá dañar mi salud y eventualmente poner en peligro mi vida, por lo que asumo toda responsabilidad derivada de ello. Libero por lo tanto de toda responsabilidad al Hospital "Carlos Van Buren", así como al personal que de él depende.

En caso de ser Testigo de Jehová y no aceptar sangre: declaro conocer los riesgos que ello implica.

CERTIFICACIÓN DEL PACIENTE/PARIENTE/REPRESENTANTE LEGAL:

Yo: _____ RUT _____

Declaro ser mayor de 18 años, o ser pariente o el tutor legal de

_____ RUT _____ y

certifico que he sido informado detalladamente y en lenguaje comprensible sobre los objetivos de la intervención, sus características, sus potenciales riesgos y complicaciones; que los he comprendido correctamente, y que las dudas e inquietudes fueron resueltas adecuadamente, por lo cual, en plena posesión de mis facultades intelectuales.

ACEPTO

RECHAZO

a que se me practique la intervención en el entendido de que en cualquier momento puedo revocar mi decisión.

En constancia firmo: _____ Fecha: ____/____/____

Profesional Tratante: _____ Firma: _____



REVOCACION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por el presente acto, expreso mi voluntad de **REVOCAR** el consentimiento para efectuar el procedimiento indicado por mi médico tratante consistente en:

y declaro que me han sido explicados, en detalle y lenguaje comprensible, los riesgos y perjuicios que esta decisión implica para mi salud actual y futura.

Paciente, Pariente y/o Representante Legal:

Nombre _____ RUT: _____

Firma _____

Profesional Tratante:

Nombre _____ Firma _____

Fecha : ____/____/____

Documento para Archivar en la Ficha Clínica del Paciente

Apéndice B: Procedimiento de Tissue array.

- a) Selección del histomolde de parafina del tumor primario y su(s) correspondiente metástasis.
- b) Selección de la zona del tumor con mayor cantidad celular.
- c) Con un trocar de 0.2 cm se extrae un tubo de tejido tanto del histomolde del tumor primario como en el los ganglios.
- d) Los cilindros de tejido son depositados en un molde de parafina con orificios (previamente confeccionado), en donde serán depositados los cilindros de tejidos extraído en el paso anterior.
- e) Dejar el molde de parafina con cilindros en un histomolde metálico en estufa de 60 °C, para homogeneizar y fusionar.
- f) Depositar el histomolde metálico en una placa fría, endureciendo el molde de parafina con los cilindros para el procedimiento de corte en micrótopo rotatorio.

Apéndice C: Protocolo de Hematoxilina –Eosina.

Desparafinación.

Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Xilol III	10 minutos

Hidratación.

Alcohol 100° I	5 minutos
Alcohol 100° II	5 minutos
Alcohol 95°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Agua destilada	5 minutos

Coloración con Hemtatoxilina de Mayer.

	20 segundos
Viraje en agua corriente	5 minutos
Agua destilada	5 minutos

Coloración con Eosina Acuosa.

30 segundos

Deshidratación.

Alcohol 96°	3 minutos
Alcohol 100° I	10 minutos
Alcohol 100° II	10 minutos
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Xilol III	10 minutos

Cubrir con resina sintética y cubreobjetos

Apéndice D: Protocolo Inmunohistoquímica (IHQ)

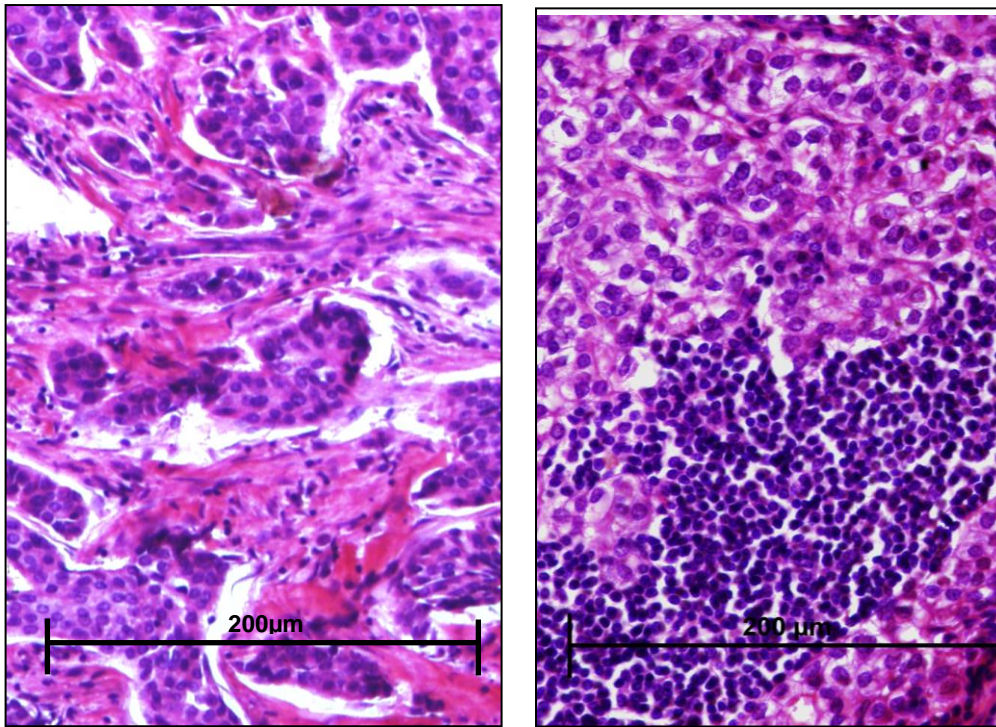
- a) Los moldes creados de arreglo de tejido son cortados en un micrótopo rotatorio obteniendo secciones de 4 micrones de espesor con navajas desechables.
- b) Se realizan cortes del mismo molde para; receptores estrógenos, progesterona y HER2.
- c) Los cortes se estiran en baños termorregulados a 40 °C
- d) Los cortes se extraen del agua en láminas de carga positiva.
- e) Se dejan secar durante 12 horas en estufa de 37°C.
- f) Recuperación antigénica en equipo *PT Link DAKO*, usando *EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH DAKO (1:50)*
- g) Lavado *FLEX Wash Buffer (1:20)*
- h) Bloqueo de peroxidasa endógena, con sistema *EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent*.
- i) Lavado *FLEX Wash Buffer (1:20)*
- j) Anticuerpo primario DAKO
 - 1.- Ac primario Estrógeno, 20 min.
 - 2.- Ac primario Progesterona, 20 min.
 - 3.- Anticuerpo primario, HER2, 20 min.
 - 4.- Anticuerpo primario Ki67, 20 min.
- k) Lavado *FLEX Wash Buffer (20x)*
- l) Ac secundario DAKO, *EnVision FLEX/HRP*, 20 min.
- m) Sistema de revelado con cromógeno DAKO; *EnVision FLEX DAB + Cromogen*, 5 min.
- n) Lavado en agua destilada, 10 min
- o) Tinción nuclear con Hematoxilina de forma progresiva, 1 min.
- p) Lavado en agua corriente, 5 min.
- q) Deshidratación con alcoholes ascendentes de 70%, 95% y 100%, 3 min cada uno.
- r) Aclaración con 3 pasos en xilol, 4 min cada uno.
- s) Cubrir los portaobjetos con resina y cubreobjetos.

Apéndice E: Protocolo Hibridación in situ (FISH).

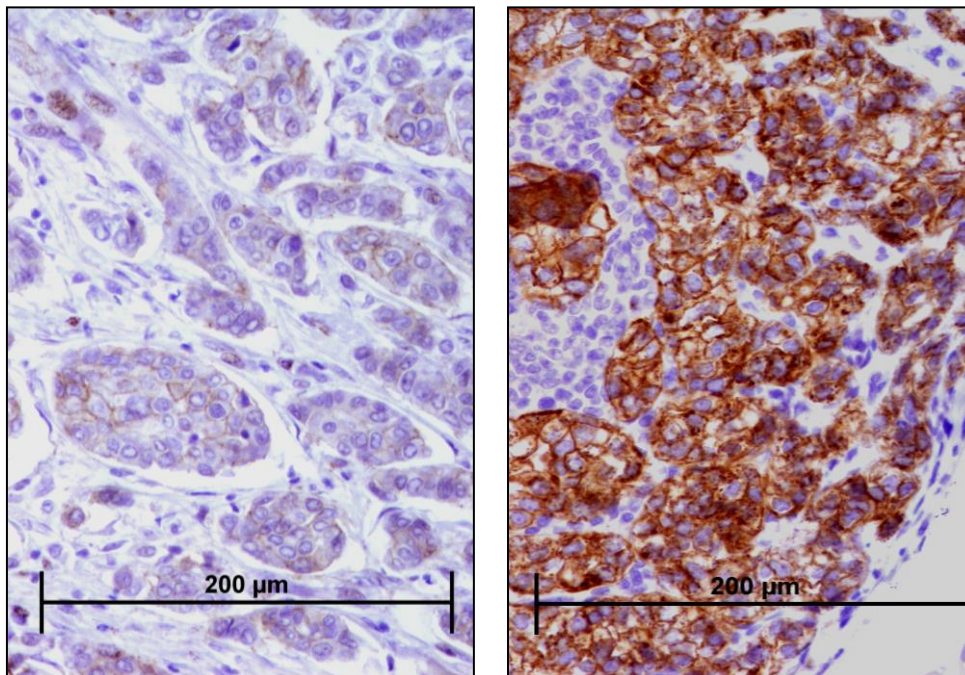
- a) Desparafinar hasta Hidratar en solución Wash Buffer (Dako 1:20)
 - b) Sumergir placas en pre-treatment solution (Dako 1:20) calentada en baño entre 95-99 °C por 10 min.
 - c) Remover copping del baño y dejar enfriar 15 min.
 - d) Lavar placas 2 veces en Wash Buffer 3 min.
 - e) Quitar exceso de buffer y secar la placa cuidadosamente con papel secante
 - f) Aplicar 250 µL de Pepsina o hasta que cubra el tejido e incubar 10 min a T° Ambiente
 - g) Lavado 2 veces en Wash Buffer por 3 min.
 - h) Deshidratar placas en series ascendentes de etanol (70%,85%, 96%) cada paso 2 min y secar al aire
 - i) Aplicar 10 µL de HER2/CEN-17 Probe Mix (Dako), cubrir inmediatamente con cubreobjetos (recomendación 20 x 20 mm) y sellar
 - j) Programar Dako Hibridizer 5 min denaturación 85 °C y 14-20 hrs de hibridación 45 °C
 - k) Remover sellante, retirar cuidadosamente cubreobjetos y colocar en recipiente con Stringent Wash Buffer (Dako 1:20)
 - l) Tratamiento en Stringent Wash Buffer precalentado en baño a 65 °C 10 min.
 - m) Lavado 2 veces en Wash buffer 3 min.
 - ñ) Repetir Proceso de deshidratación y secar al aire
 - o) Aplicar 15 µL de medio de Montaje Fluorescence Mounting Medium with DAPI (Dako)
- Almacenaje en oscuridad entre 2 a 8 °C.

Apéndice F:

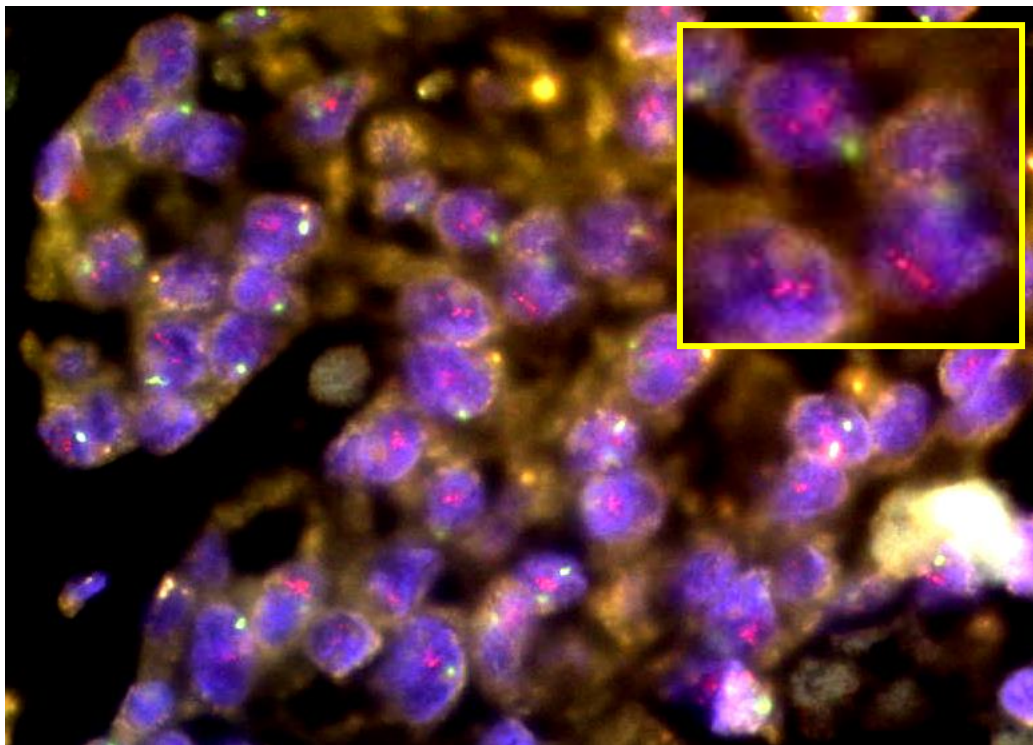
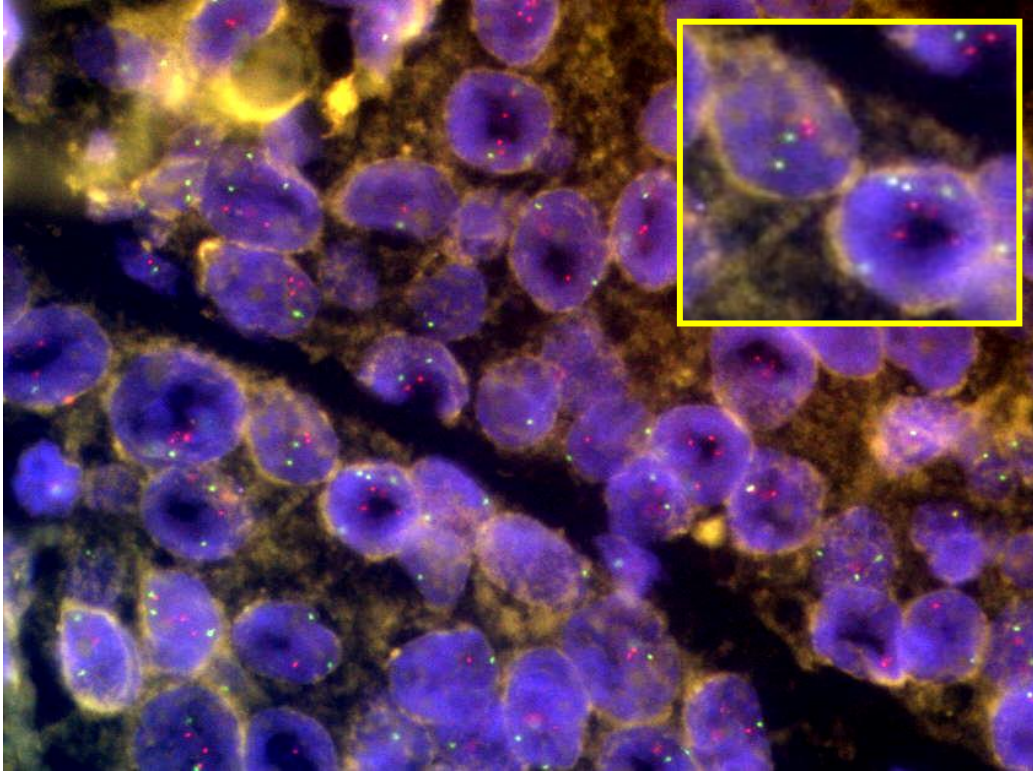
1.- Caso 53. Cambio subtipo Luminal A a Luminal B/Her2



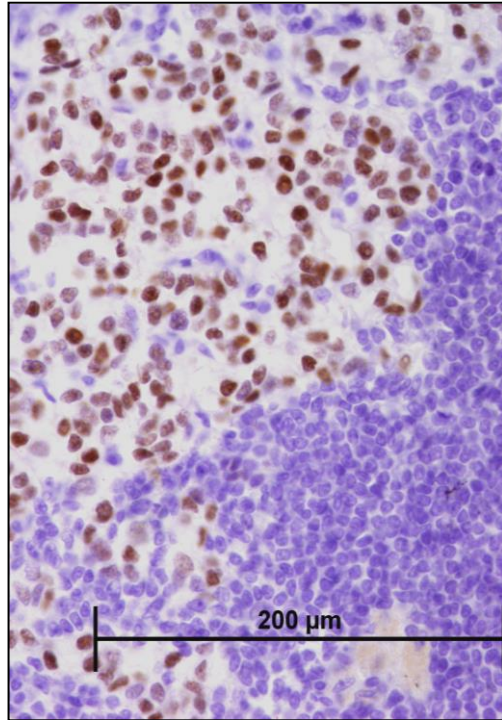
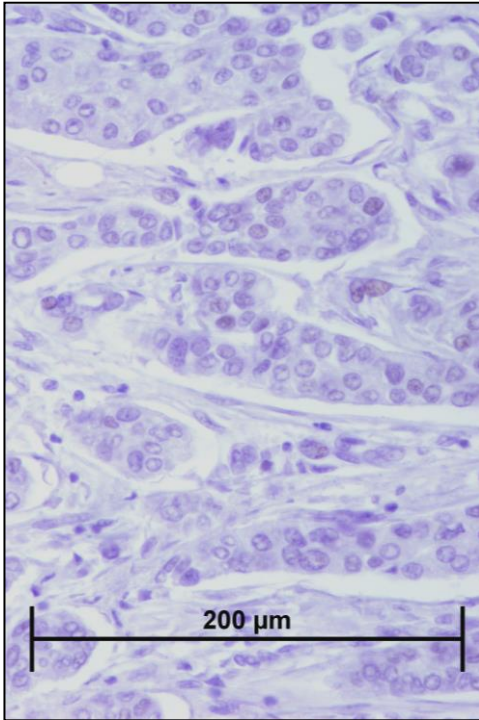
H&E del caso 53 (10X). Izquierda: Tumor primario de mama de histología ductal, que invade el estroma mamario que lo rodea. Derecha: metástasis de un ganglio linfático axilar de histología similar al del tumor primario. Se observa además restos del parénquima del ganglio linfático.



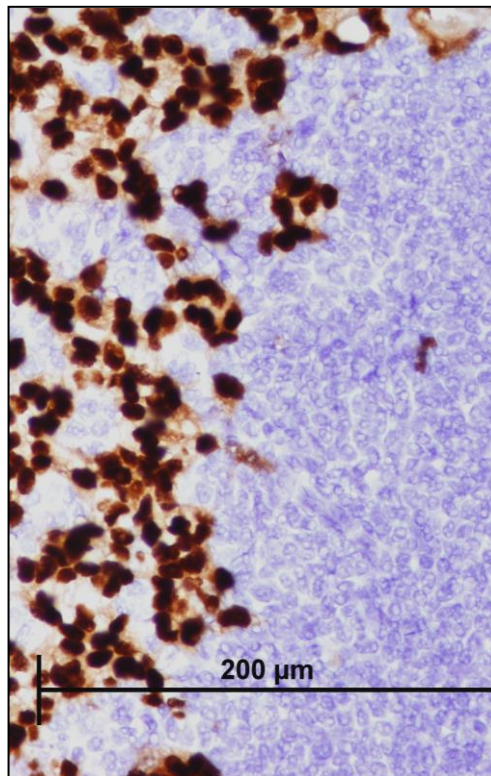
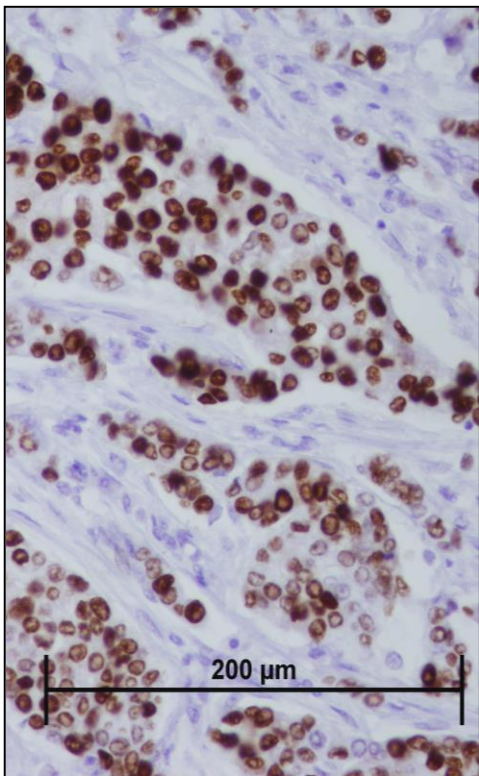
IHQ Her2 caso 53 (10X). Izquierda: Tumor primario con expresión 1+ de Her2. Derecha: Metástasis ganglio linfático de cáncer de mama con expresión 3+ de Her2.



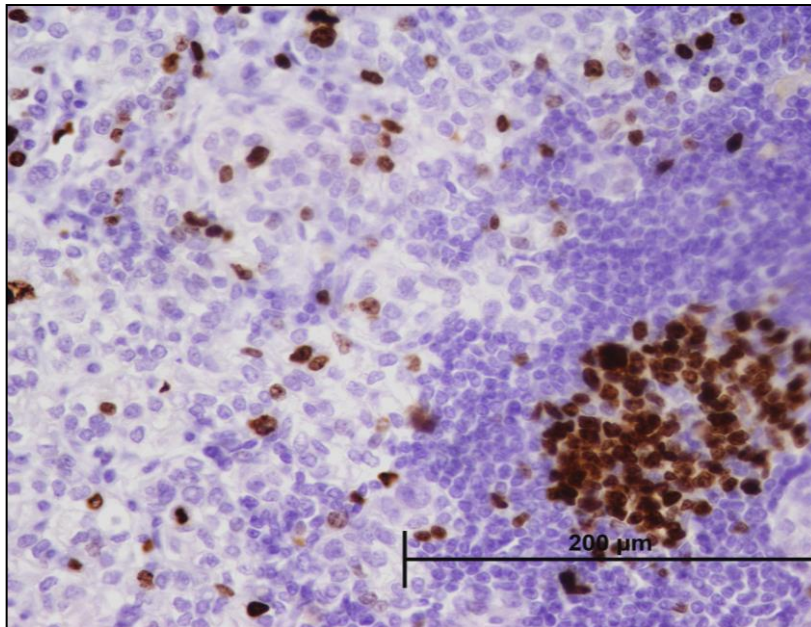
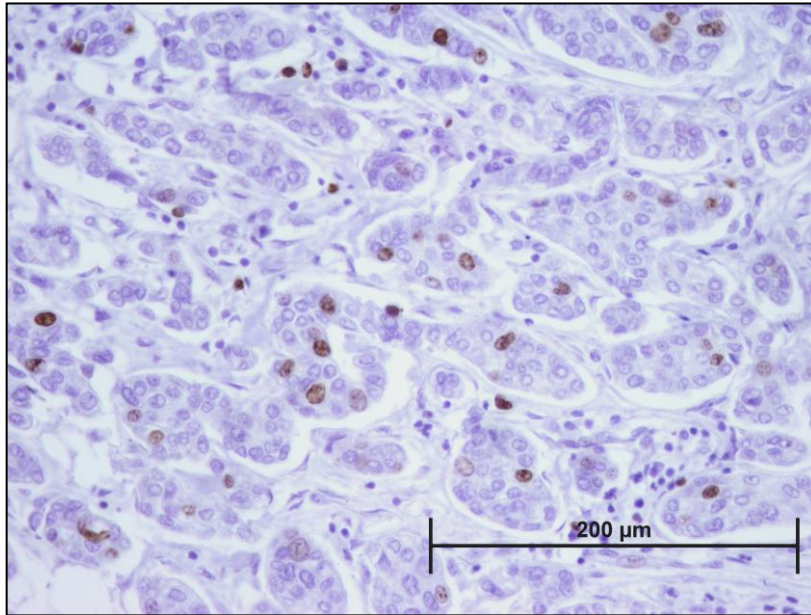
FISH caso 53 (100X). Arriba: Células de tumor primario de cáncer de mama. Los núcleos muestran hibridación de sonda hacia gen de Her2 (rojo) y sonda hacia centríolo de cromosoma 17 (verde), relación gen/centríolo < 2.0 que demuestra una no amplificación del gen. Abajo. Células de metástasis de ganglio linfático axilar de cáncer de mama, según la relación gen/centríolo $> a 2.0$ muestra una amplificación del gen de Her2.



IHQ Receptor de estrógeno caso 53 (10X). Izquierda: Tumor primario de mama negativo para RE (Total Store: 0). Derecha: Metástasis de ganglio axilar de tumor de mama, positivo para RE (Total Store: 6).

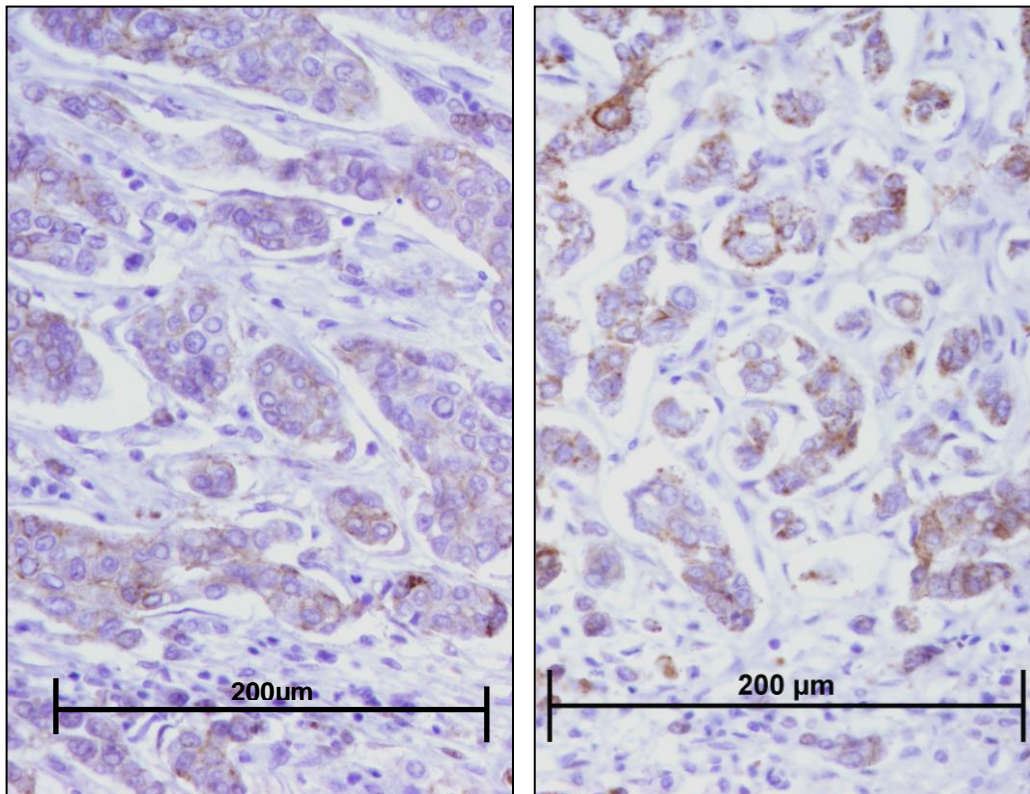


IHQ Receptor de Progesterona caso 53 (10X). Izquierda: Tumor primario de mama positivo para RP (total store= 7). Derecha: Metástasis de ganglio linfático, positivo para RP (total store= 8)

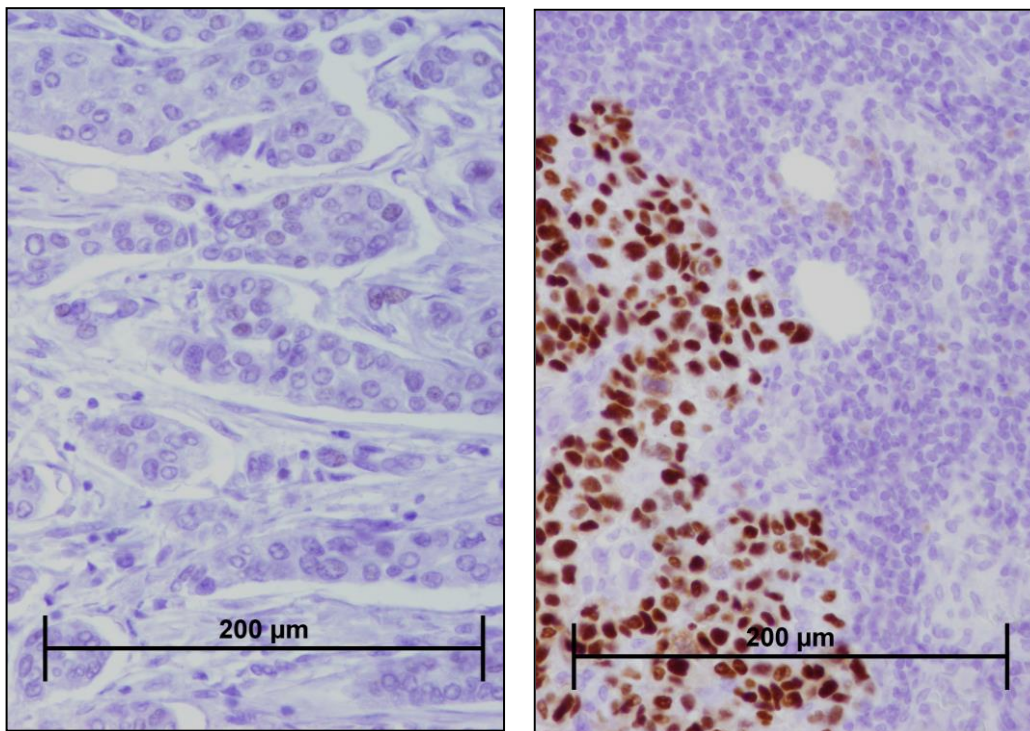


IHQ Ki67 de caso 53 (10X). Arriba, tumor primario cáncer de mama, con expresión de Ki67 <14%. Abajo, Metástasis de cáncer de mama en ganglio linfático axilar, expresión de Ki67 >14% (en el cuadrante inferior derecho un centro germinal que expresa Ki67).

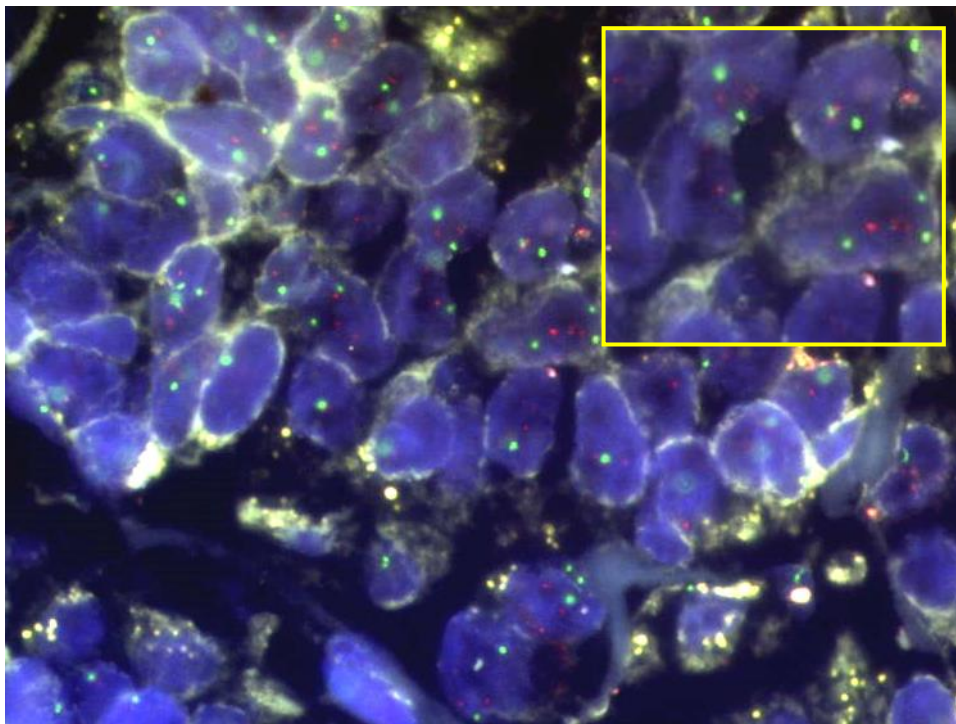
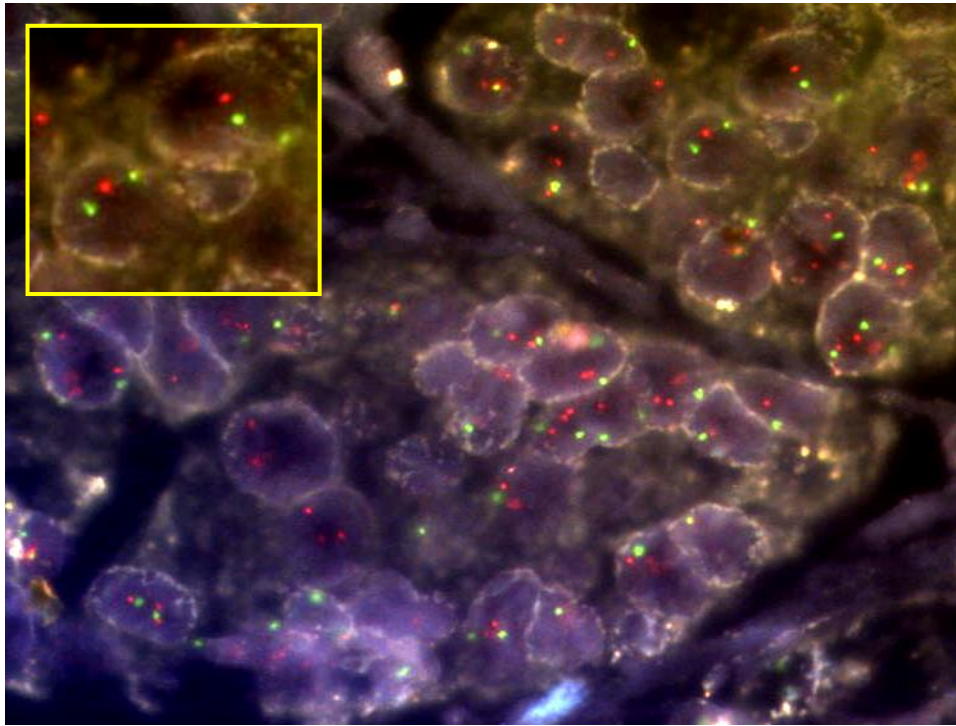
2.- Caso 03. Cambio subtipo Triple Negativo a Luminal A.



IHQ Her2 caso 03 (10X). Izquierda: Tumor primario con expresión 1+ de Her2. Derecha: Metástasis ganglio linfático de cáncer de mama con expresión 2+ de Her2.

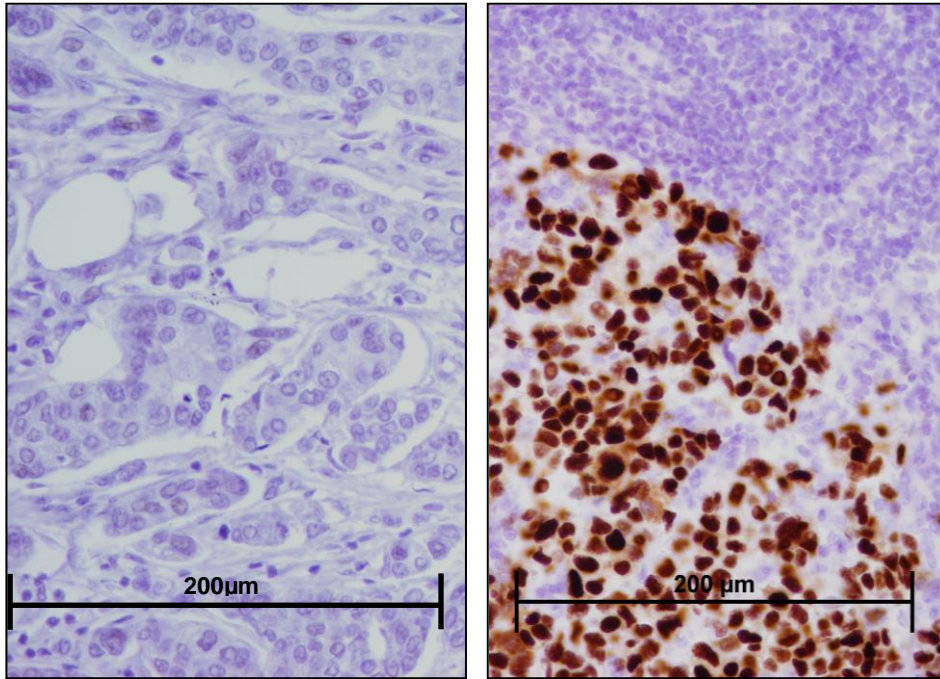


IHQ Receptor de estrógeno caso 03 (10X). Izquierda: Tumor primario de mama negativo para RE (Total Store: 0). Derecha: Metástasis de ganglio axilar de tumor de mama. Células tumorales positivas para RE (Total Store: 7), mientras que a la derecha de la imagen se observa parénquima del ganglio linfático.

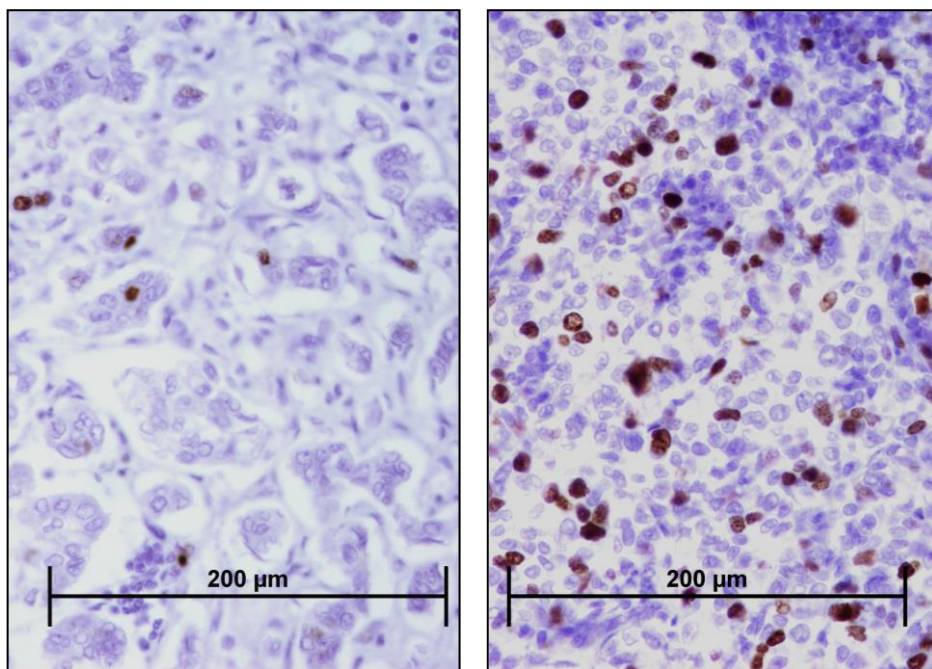


FISH para gen de Her2, caso 03 (100X). Arriba: Células de tumor primario de cáncer de mama. Los núcleos muestran hibridación de sonda hacia gen de Her2 (rojo) y sonda hacia centríolo de cromosoma 17 (verde), relación gen/centríolo < 2.0 que demuestra una no amplificación del gen.

Abajo. Células de metástasis de ganglio linfático axilar de cáncer de mama, según la relación gen/centríolo < 2.0 muestra una no amplificación del gen de Her2.



IHQ Receptor de Progesterona caso 03 (10X). Izquierda: Tumor primario de mama negativo para RP (total store= 0). Derecha: Metástasis de ganglio linfático, células tumorales positivas para RP (total store= 7), mientras que en arriba y derecha se observa parénquima del ganglio linfático.



IHQ Ki67 de caso 03 (10X). Arriba, tumor primario cáncer de mama, con expresión de Ki67 <14%. Abajo, Metástasis de cáncer de mama en ganglio linfático axilar, expresión de Ki67 >14%.