

# Expresión de citoqueratinas en el cáncer de mama y subtipos tumorales por inmunohistoquímica

Drs. Vilma Rebolledo Pulido <sup>1,2,3</sup>, Carla Colombo Silvestre <sup>3</sup>, Luis Rebolledo Pulido <sup>4</sup>

## RESUMEN

**Objetivo:** Caracterizar el cáncer de mama en subtipos moleculares mediante la expresión inmunohistoquímica de las Ck5/6, Ck7, Ck8 y Ck18 asociados a los clásicos marcadores determinados y analizar la evolución clínica de los distintos subtipos.

**Métodos:** La muestra fue intencional y de acuerdo con los criterios de inclusión definidos se seleccionaron 149 bloques de parafina de casos con carcinoma ductal infiltrante de la mama. De los resultados previos de marcadores moleculares por inmunohistoquímica que incluyeron RE, RP, Her-2, p53, Bcl2 y Ki-67, se analizó el inmunomarcado de los tres primeros y se estableció el subtipo tumoral. De los bloques de parafina se construyeron 5 micromatrices de tejido y se evaluó la expresión inmunohistoquímica de las Ck5/6, Ck7, Ck8, Ck18 de acuerdo al subtipo tumoral.

**Resultados:** El promedio de edad de las pacientes fue 51,32 años. Los tumores luminal A y B expresaron Ck8 y Ck18 en más del 80 % de los casos. Los tumores Her-2+ expresaron en más del 80 % de los casos Ck7 y Ck18, la proteína Bcl2 y la p53 marcaron en menos del 25 % y 39 % de los mismos. Los tumores TN expresaron Ck5/6, Ck7, Ck8 y Ck18 de forma variables. La proteína p53 y Bcl2 inmunomarcaron en porcentaje variable de casos y la Ki-67 en casi la totalidad. Presentaron recurrencia la mayoría con tumores Her-2+ y TN, la supervivencia global fue menor en los casos con esos subtipos.

**Conclusión:** El análisis de los biomarcadores moleculares en este estudio proporciona una mejor definición de cada tumor.

**Palabras clave:** Carcinoma de mama. Citoqueratinas. Subtipo molecular.

## SUMMARY

**Objective:** To characterize breast cancer molecular subtypes by immunohistochemical expression of Ck5 / 6, Ck7, and Ck18 Ck8 markers associated with certain classical and analyze the clinical evolution of different subtypes.

**Methods:** Sample was intentional and according to defined criteria including paraffin blocks 149 cases with infiltrating ductal carcinoma of the breast was selected. Previous results of molecular markers by immunohistochemistry that included ER, PR, Her-2, p53, Bcl-2 and Ki-67 immunostaining of the first three was analyzed and tumor subtype was established. Paraffin blocks 5 tissue microarrays were constructed and immunohistochemical expression of Ck5/6, Ck7, Ck8, Ck18 according to tumor subtype was evaluated.

**Results:** The mean age of patients was 51.32 years. The A and B luminal tumors expressed CK18 Ck8 and over 80 % of cases. The Her-2 + tumors expressed in over 80 % of Ck7 and Ck18 cases, the Bcl2 protein and p53 marked in less than 25 % and 39 % thereof. TN tumors expressed Ck5/6, Ck7, and Ck18 Ck8 variable form. p53 and Bcl2 protein immunostained in variable percentage of cases and Ki-67 in almost all. They showed most tumor recurrence Her-2 + and TN, overall survival was lower in patients with these subtypes.

**Conclusion:** The analysis of molecular biomarkers in this study provides a better definition of each tumor.

**Key words:** Breast carcinoma. Cytokeratin. Molecular subtype

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres en todo el mundo. De acuerdo

<sup>1</sup> Clínica Docente los Jarales.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC).

<sup>3</sup> Departamento Clínico Integral del Sur, Universidad de Carabobo.

<sup>4</sup> Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo.

a estadísticas internacionales, anualmente se registran más de 1 millón de casos nuevos y la mitad de los mismos fallece por su causa (1,2).

En Venezuela según datos disponibles del Ministerio Popular para la Salud, los casos nuevos y fallecidos por la enfermedad han aumentado progresivamente desde el año 2005, constituyendo la primera causa de morbi-mortalidad por cáncer para la mujer en nuestro país hasta la fecha (3,4). Es de resaltar que al momento del diagnóstico clínico más del 70 % de los casos presentan tumores localmente avanzados (5,6) cuya evolución no es la más favorable, comportamiento que se ha observado en algunos con menor estadio.

Hoy se conoce que lo utilizado usualmente en la rutina para el diagnóstico y manejo de nuestras pacientes no explica suficientemente el comportamiento biológico del tumor (7-16).

En otros países es con propósito de un enfoque con valor predictivo para el comportamiento y la terapéutica, la identificación del subtipo molecular tumoral (luminal A, luminal B, Her-2+ y Basal) por análisis de expresión génica (7-10) considerado lo ideal o bien mediante técnica inmunohistoquímica (IHQ) (11-15) con incorporación a la lista de los clásicos marcadores pronósticos (RE, RP, Her-2) distintas citoqueratinas (Cks) (12-17). Sin embargo, a pesar de que existen diversos estudios realizados con ese fin por dicha técnica usando esas citoproteínas (12-17) en Venezuela son muy escasas las investigaciones científicas al respecto (18).

Las Cks son polipéptidos fibrosos que constituyen el principal tipo de filamento intermedio en el citoesqueleto de la mayoría de células epiteliales (incluyendo mucosa y glándulas), así como en algunas no epiteliales.

En la glándula mamaria humana, el epitelio de los conductos está constituido por dos capas de células que expresan distintas Cks (20). Las células de la capa interna o luminal se sabe expresan inmunorreactividad ante la Ck8 y Ck18, mientras que las de la capa externa a lo largo de la membrana basal y así denominadas son reactivas a las Ck5 y Ck6 (12-17,19,20).

Basados en el significado para la paciente con cáncer de mama del análisis inmunohistoquímico y el de la diferenciación molecular de tumor en la actualidad, el objetivo de este estudio es caracterizar el cáncer de mama en subtipos moleculares mediante la expresión inmunohistoquímica de las Ck5/6, Ck7, Ck8 y Ck18 asociados a los clásicos marcadores determinados y analizar la evolución clínica de los

distintos subtipos considerando la recidiva tumoral y la sobrevida global.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, correlacional de diseño no experimental (21) de casos con cáncer de mama de los que se elaboraron micromatrices de tejido (TMAs) (23). Previa autorización del Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC) e institución asistencial privada (consulta de mama), se revisó el archivo general de estudios IHQ y de bloques de parafina convencional resguardados en el CIMBUC de acuerdo a las normas para la investigación en muestras biológicas humanas según el Código de ética para la vida 2011 (22). La muestra fue intencional, no probabilística y se conformó con 149 casos de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: sexo femenino, cualquier edad, diagnóstico de carcinoma de mama ductal infiltrante sin otra especificación o mixto con componente ductal infiltrante predominante, estudio IHQ antes de tratamiento neoadyuvante para RE, RP, Her-2, Ki-67, p53 y Bcl2 determinados en un solo momento y realizados en el Laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte, lámina de hematoxilina eosina (HE) del estudio IHQ previo preservada, tejido tumoral producto de biopsia incisional o excisional del tumor primario recolectada antes de cualquier tratamiento, óptimas condiciones del bloque de parafina, datos clínicos de interés. Se excluyeron los casos que no cumplieron los criterios de inclusión.

A continuación se evaluó el resultado del inmunomarcaje del RE, RP, Her-2 clasificándose a los tumores de acuerdo a los subtipos moleculares, empleando de la literatura para ello los trabajos Wiechmann (17) para los luminales A y B y de Carey (18) y Wiechmann (17) para los Her-2 y triple negativo (TN). Definiendo así: Luminal A: RE y/o RP (+), Her-2 (-); Luminal B: RE y/o RP (+), Her-2 (+) o (-); Her-2+: RE/RP (-); Her-2(+) y TN: RE/RP/Her-2 (-). Establecidos los anteriores y de acuerdo a los mismos seguidamente se valoró la expresión de Ki-67, p53, Bcl2, como posteriormente la expresión de las Cks propuestas.

La información de interés fue obtenida de los datos anexos al estudio IHQ y del historial clínico accesible.

**Construcción de las micromatrices de tejido (TMAs)**

Todas las muestras tumorales en su momento, se fijaron en formol al 10 % e incluyeron en parafina, procesándose de forma rutinaria. Las TMAs (23) se realizaron en el CIMBUC de forma manual. Bajo el microscopio de luz con objetivos crecientes (10, 20, 40x) se examinaron las láminas de HE y se seleccionaron las zonas con tumor, empleando dichas láminas se marcó la misma área en el bloque de parafina convencional (bloque de parafina donante). Seguidamente se elaboró un topograma o plantilla de localización en papel y se estableció el orden, posición y secuencia que tendrían los tumores en el bloque receptor para su identificación posterior y la lectura de la expresión de las Cks en estudio. El troquelado de los bloques de parafina receptores se confeccionó con la guía de una laminilla multifenestrada (acrílica de 30x50 mm con múltiples orificios ordenados por filas y columnas de 2 mm diámetro e igual distancia entre los mismos) y un trocar cilíndrico con 2 mm de diámetro. En cada uno se realizaron dos secciones de 30 cortes separados entre sí por una distancia de 5 mm (sección A y B de las TMAs). Seguidamente de la zona seleccionada de cada bloque donante se realizaron 2 cortes de forma separada y sucesiva con un trocar de 1 mm de diámetro, insertando cada cilindro en el bloque receptor de acuerdo a la plantilla de localización. Al culminar todos los bloques receptores la consolidación y homogeneización se realizó mediante calor en estufa a 45° grados centígrados por 3 minutos. En total se

construyeron cinco TMAs.

**Técnica inmunohistoquímica**

La determinación de los marcadores previos y de las CKs en estudio se realizó, por el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa con el sistema inmuno de la casa comercial respectiva (Dako/Invitrogen) con los anticuerpos, clones, dilución y marcaje detallados (Cuadro 1).

De las TMAs se realizaron secciones de 3  $\mu$ m que se llevaron a estufa a 60 °C por 2 horas, se desparafinaron y deshidrataron con xylol y alcohol en concentración decreciente (100, 95, 70 %). La recuperación antigénica se realizó en la solución Retrieval en baño María por 40 minutos a 95-99 °C. El bloqueo de la peroxidasa, se realizó con 1 gota de peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol por 10 minutos. En cámara húmeda se agregó 1 gota del anticuerpo primario a temperatura ambiente que se dejó por 1 hora, luego se colocó 1 gota del anticuerpo secundario marcado por 30 minutos. Se reveló la reacción enzimática con 3' 5'-diaminobencidina, agregando 1 gota del cromógeno entre 5 a 10 minutos. Entre cada paso se lavaron las preparaciones 3 veces con buffer PBS a pH 7.4. Se realizó la coloración con HE y el montaje.

Seguidamente cada cilindro de las TMAs fue analizado microscópicamente. Los tumores se consideraron positivos ante la coloración marrón dorada del citoplasma. De acuerdo a la extensión de la tinción en las células tumorales la expresión

Cuadro 1

Anticuerpos monoclonales previos y en estudio (clon, dilución, fuente e inmunomarcaje)

Biomarcador	Clon	Dilución	Fuente del marcaje	Localización
RE	1D5	1:100	Dako	Nuclear
RP	PgR 636	1:100	Dako	Nuclear
Her-2	CerbB2	1:250	Dako	Membrana
Ki67	MIB-1	1:100	Dako	Nuclear
p53	D07	1:100	Dako	Nuclear
Bcl2	124	1:100	Dako	Membrana
Ck5/6	D5/16B4	Prediluido	Invitrogen	Citoplasma
Ck8	35 $\beta$ H11	1:50	Dako	Citoplasma
Ck18	DC10	1:50	Dako	Citoplasma
p73	p73-9F7	1:25	Invitrogen	Nuclear
CD10	56C6	1:80	Dako	Nuclear
EGFR	H11	1:200	Dako	Membrana

fue focal cuando las células positivas están aisladas en pequeños grupos o dispersas y son menos o igual al 50 % y difusa cuando más del 50 % de células neoplásicas son teñidas (19). Se capturaron imágenes con una cámara marca Labophot®, incorporada al microscopio y a una computadora Pentium E 3300 de 2 GB de memoria RAM con un monitor Samsung de 32 pulgadas. Todos los datos recogidos se anotaron en un instrumento diseñado para tal fin.

### Análisis estadístico

El análisis e interpretación de los resultados se realizó a través del programa SSPS/PC versión 17. El estudio descriptivo, se realizó utilizando para las variables cuantitativas las llamadas tendencias centrales (media) y medidas de dispersión (desviación standard) como para las cualitativas el número absoluto y frecuencia (porcentaje). La asociación entre variables se analizó con la prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ ) y el test exacto de Fisher para las muestras con menos de 5 sujetos (casos). La evolución clínica se valoró mediante la recurrencia tumoral y la supervivencia global. El estudio de la supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y el ajuste de modelos de regresión de Cox. Se consideraron significativos valores de  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS

Se logró obtener la edad de los 149 casos, la edad media de las mujeres para el momento del diagnóstico fue 51,32 años con un rango de 65 años (24-89 años) y una desviación estándar de 11,34 años. De la totalidad de las mismas más de 59 % tenían edad menor o igual a 50 años. Clínicamente más del 70 % se presentaron con un tumor entre 2 y 5 cm y un plastrón axilar, 60,40 % resultaron localmente avanzados.

Al evaluar en los tumores la expresión del RE, RP, Her-2, más de 50 % expresó RE, menos del 50 % RP y más del 28 % Her-2.

El tiempo de seguimiento varió de 18 a 72 meses para las pacientes no fallecidas (vivas). La recurrencia de la enfermedad que se presentó en un 19,46 % de los casos se observó en promedio a los 11,05 meses con rango de 19 (16-35). La supervivencia global (SG) media fue de 40,34 meses, con rango de 54 (18-72) y una desviación típica de  $\pm 12,44$  meses. Un 12 % fallecieron a lo largo del seguimiento por

la neoplasia (Cuadro 2).

De la evaluación de la expresión del RE, RP y Her-2 de acuerdo a los subtipos del carcinoma de mama, se estableció que 61,73 % de los tumores eran luminales, más del 20 % TN y casi 15 % Her-2+.

El p53, Bcl2 y Ki-67 se expresaron en todos los subtipos de forma variable. El marcaje del Ki-67 se apreció en un 92,15 % de los tumores luminal A, 82,92 % de los luminal B, 94,28 % de los Her-2+ y 94,28 % de los TN.

Cuadro 2

Características generales de los casos en estudio

Característica	n	%	
Grupo etario (años)	≤ 40	16	10,73
	41-50	73	48,99
	51-65	43	28,85
Edad de los pacientes (punto de corte)	< 50 años	89	59,73
	≥ 50 años	60	40,26
Estadio clínico TNM (AJCC 2003)	I	19	12,75
	IIa	40	26,84
	IIb	53	35,57
	IIIa	8	5,36
	IIIb	26	17,44
	IIIc	3	2,03
Expresión inmunohistoquímica	RE	81	54,36
	RP	73	48,99
	Her-2	43	28,85
	Ki-67	134	89,93
	p53	71	47,65
	Bcl2	84	56,37
	Ck5/6	13	8,72
	Ck7	79	53,02
	Ck8	119	79,86
	Ck18	95	63,73
	Subtipo molecular	Luminal A	51
Luminal B		41	27,51
Her-2+		22	14,76
TN		35	23,48
Recurrencia	Si	29	19,46
	No	120	80,53
Estatus al inicio del estudio	Vivas	131	87,91
	Fallecidas	18	12,08

Fuente: Datos propios de la investigación. n= 149.

## EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS EN EL CÁNCER DE MAMA

De acuerdo al porcentaje de núcleos teñidos con el Ki-67, se observó que en los tumores luminal A y B un 60,78 % (31/51) y 39,02 % (16/41) respectivamente expresaron índices de proliferación bajos o intermedios, mientras que un índice de proliferación alto se observó en mayor número de casos en los luminal B, como también en los subtipos Her-2+ y TN en un 43,90 % (18/41), 31,81 % (7/22) y 45,71 % (16/35) respectivamente. Se observó asociación estadística significativa entre los subtipos luminal B y Her-2+ con índices de proliferación alto más que con TN.

La proteína p53 se expresó en casi la mitad de los tumores luminal A y en más de la mitad de los luminal B. No obstante menos de la mitad de los tumores Her-2+ y TN expresaron la misma. Asimismo se observó que la proteína Bcl2 se expresó en la mayoría de los tumores luminal A, mientras que en el resto de los subtipos el porcentaje de casos que inmunomarcaron la misma fue menor. No se apreció significancia estadística de la expresión de p53 con los subtipos, pero sí de la expresión Bcl2 en los subtipos luminal B y A.

Al evaluar la inmunotinción de las Cks (Figura 1)

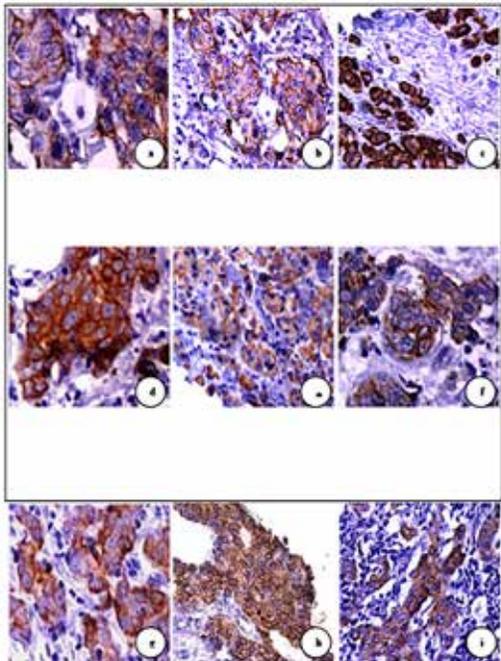


Figura 1. Imágenes microscópicas: a. Ck5/6 (200x), b. Ck5/6 (100x), c. Ck5/6 (100x), d. Ck8 (200x), e. Ck8 (100x), f. Ck8 (100x), g. Ck18 (200x), h. Ck18 (100x), i. Ck18 (100x). Fuente. Imágenes de la investigación.

en estudio en las secciones histológicas de los TMAs, se observó un porcentaje de casos no valorables por su desgaste que osciló entre 9,39 y 12,75 % correspondientes a la Ck18 y Ck7. La Ck5/6 se observó en todos los subtipos, particularmente en los tumores TN el porcentaje de casos que inmunomarcó la proteína fue mayor que en el resto, aunque no en todos los TN ocurrió el marcaje de la misma, hecho que diferenció a estos tumores en TN basal (TNB) encontrando un caso, de TN no basal (TNnB) por falta de su expresión. La Ck7 inmunomarcó prácticamente en casi todos tumores de cada subtipo.

La expresión de la Ck8 se observó en todos los luminal A, 97 % de los luminal B, 94 % de los Her-2+, y 60 % de los TN. Asimismo se observó marcaje de Ck18 en la totalidad de los luminal A, 86 % de los luminal B, y en un 67 al 51 % en los Her-2+ y TN respectivamente (Cuadro 3).

Cabe destacar que al prestar atención en cuanto al subtipo y aspecto clínicos como la edad y estadio, se observó que las pacientes con tumores TN son más jóvenes, y la edad media es inferior a 50 años en relación a los otros subtipos, mientras que en aquellas con tumores luminal A, la edad media fue obviamente superior, encontrando diferencia significativa entre los tumores luminal A con los Her-2 y TN, y entre los tumores luminal B y TN en relación con la edad media. Igualmente se halló que más de la mitad de los casos clasificados estadio II correspondieron a tumores luminal (A, B) y los estadio III a Her-2+ y TN, encontrando asociación significativa entre los estadios II y III respectivamente con los subtipos luminal (A, B) y Her-2+ y TN.

Al evaluar la evolución clínica de los casos, se observó que la media del seguimiento fue de 47, 45, 29,77 y 32 meses de acuerdo a cada subtipo tumoral. Durante el tiempo de seguimiento se identificaron 29 casos con recurrencia de la enfermedad, correspondiendo los mismos a aquellos con tumores del subtipo luminal A, Her-2+ y TN, el análisis demostró diferencia estadística significativa entre los subtipos ( $P=0,016$ ). El intervalo libre de enfermedad por subtipo fue de 34, 20 a 34 y 15 a 29 meses respectivamente (luminal A, B, Her-2+, TN). El sitio de recurrencia más frecuente fue pulmón seguido de la piel cercana a la cicatriz la mayoría se observaron en los pacientes con tumores TN y Her-2+ (Cuadro 4), en particular en el caso TNB la recurrencia ocurrió en ganglios axilares a los 22 meses. La supervivencia global (SG) de la población en estudio a 50 meses fue estimada en más de 85 %.

Cuadro 3. Expresión de marcadores en estudio Ck5/6, Ck7, Ck8, Ck18 según subtipo molecular

Inmunomarcaje		Luminal A n (%)	Luminal B n (%)	Her-2+ n (%)	TN n (%)
Ck5/6	Positivo	3 (6,52)	2 (5,71)	3 (15)	5 (15,62)
	Negativo	43 (93,47)	33 (94,28)	17 (85)	27 (84,37)
	Total	46 (34,58)	35 (26,31)	20 (14,49)	32 (23,18)
Ck7	Positivo	22(50)	21(61,74)	16(84,21)	20(90,90)
	Negativo	22(50)	13(38,23)	3(15,78)	12(54,54)
	Total	44(36,97)	34(28,57)	19(15,96)	22(18,48)
Ck8	Positivo	45 (100)	37 (97,36)	18 (94,73)	19 (61,29)
	Negativo	-	1 (2,63)	1 (5,26)	12 (38,70)
	Total	45 (33,83)	38 (28,57)	19 (14,28)	31 (23,30)
Ck18	Positivo	42 (100)	31 (86,11)	13 (61,90)	17 (51,51)
	Negativo	-	5 (13,88)	8 (38,09)	16 (48,48)
	Total	42 (31,11)	36 (26,66)	21 (15,55)	33 (24,44)

Fuente: Datos propios de la investigación.

Cuadro 4

Análisis del patrón de recurrencia de la enfermedad según el subtipo molecular

Recurrencia	Luminal A n° (%)	Luminal B n° (%)	Her-2+ n° (%)	TN n° (%)	P
Aparición*					
Media	35	-	24,11	21,75	0,0160
Rango	-	-	21-35	16-30	
Sintomatología	Nódulos	-	-	5(62,5)	7(35)
Disnea	1(100)	-	2(25)	6(30)	
Tos	-	-	1(12,5)	3(15)	
Dolor	-	-	-	2(10)	
Ninguna	-	-	-	2(10)	
Total	1(3,44)	-	8(27,58)	20(68,96)	0,0000
Ubicación	Piel	-	-	5(62,5)	4(20)
G. axila	-	-	-	3(15)	
Pulmón	1 (100)	-	3(37,5)	9(45)	
Hígado	-	-	-	2(10)	
Hueso	-	-	-	2(10)	
Total	1(3,44)	-	8(27,58)	20(68,96)	0,0000

Fuente. Datos propios de la investigación. \*Expresado en meses.

No obstante se apreció que para el mismo período de tiempo para los pacientes con carcinomas luminal la supervivencia fue de 98 % a 100 %, presentando mejor supervivencia aquellos con tumores luminal A que B, mientras que para los pacientes con tumores Her-2+ y TN la misma fue de 60 %. Asimismo al estimar el seguimiento a 72 meses se apreció que la SG se hace menor para los pacientes con tumores

TN que para aquellos con otros subtipos. En el caso del tumor TNB, la SG fue aún más corta y falleció a los 36 meses del diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte la supervivencia global media fue de  $70 \pm 2$  meses para los luminal A; de  $71 \pm 1$  meses para los luminal B; de  $46 \pm 2$  meses para la clase Her-2+ y  $41 \pm 2$  meses para los TN ( $P < 0,000$ ).

**DISCUSIÓN**

La edad media de 51,32 años de las pacientes, es muy similar al estudio de Cheang (14) y cercano al de O'Brien (24) que refirió la misma alrededor de los 50 años, hallazgo que difiere de los trabajos de Reigosa (18) y Arrechea (25) donde fue reportada en 49,62 y 59,8 años.

En este estudio se observó predominio del subtipo luminal, con una proporción mayor a favor de los luminal A, hallazgo que si bien es similar en la distribución a lo descrito en los estudios de Carey (19), Ihemelandu (26), Matos (27), Piñero (28) y Sallia<sup>®</sup> (29) difiere con los mismos en la proporción de la totalidad de casos luminal y sus subtipos (A y B). En los estudios citados las frecuencias oscilaron para los carcinomas luminal entre 64,5 y 75,6 %, como para el subtipo A entre 47,9 al 57,6 % y para el subtipo B entre 6,9 al 11,6 %, diferencias que se acentúan aún más por el porcentaje obtenido de 27,5 % para los últimos en el presente, aunque al respecto con los análisis de Muñoz (30) y O'Brien (24) se encontró similitud con este hallazgo.

El porcentaje de tumores Her-2+ de 14,8 %, que resultó similar a lo descrito por Muñoz (27) y Arrechea (25) fue disímil al estudio de Jorge (31) y Ramírez (32) por un porcentaje menor y variable entre 5,6 % y 13,3 %.

En relación con los tumores TN la proporción de 23,5 % aunque es comparable con lo señalado por Carey (19) y O'Brien (24), difiere notablemente del 3 % al 15 % de lo reportado en el resto de la literatura y encontrado en países desarrollados. No obstante, es de resaltar que las poblaciones abordadas en las citadas investigaciones estaban conformadas por mujeres afroamericanas e hispanicas, que si bien son consideradas por separado parecidas a nuestra población en la literatura, hay que admitir que el mestizaje es lo más común en la misma.

En el presente el marcaje del Ki-67 predominante en los TN y Her-2+ difiere de lo reportado por Jorge (28). Sin embargo, la expresión en un porcentaje del subtipo luminal A que llamó la atención no difirió de la publicación de Munirah (10). Por otra parte cuando se valora el porcentaje de núcleos teñidos los tumores luminal B expresaron un índice de proliferación celular más alto ( $\geq 25$  %) que los luminal A, hallazgo también presente en los subtipos Her-2+, TNnB y TNB, aspecto que coincide con lo señalado por otros estudios (26,30).

La expresión de p53 en los luminal A y B fue similar al estudio Cheang (14) y distinto al de Piñero (28). En tanto en los TN y Her-2+ el resultado no difirió de análisis de otras publicaciones (9,31). En este estudio el porcentaje de casos que expresó la proteína Bcl2 en los luminal A y B fue similar a lo señalado por Arrechea (25) y en los Her-2+ y TN la proporción de casos fue relativamente más bajo comparado con los otros subtipos, resultado que difiere de lo publicado por Jorge (31) y al respecto se concuerda en que los TN más que los Her-2+ muestran una elevada expresión de la proteína p53.

Las Ck8 y Ck18 se expresaron en todos los tumores luminal A y en los luminal B en la mayoría, y aunque también se apreció en los Her-2+ y TN, la explicación pudiese tener fundamento en el origen de las células primitivas con potencial de diferenciación dual y predominio de un linaje (16). Por otra parte la Ck5/6, se expresó en muy pocos tumores del subtipo luminal A, B y Her-2+ pero en un 15,62 % en los tumores TN, hallazgo que difiere notablemente del rango entre 50 % a 80 % de lo encontrado en algunas publicaciones (14,18).

Consecutivamente al subtipo tumoral es posible mencionar que los resultados obtenidos parecen confirmar que hay diferencias importantes entre los inmunofenotipos considerados de la literatura (7,8,11,12,19,27,28,34) de tal forma que la clasificación mediante los biomarcadores moleculares expuestos permitiría discernir formas con diferente pronóstico que ciertamente es importante conocer ante cada caso con la enfermedad.

Finalmente, se puede argumentar que este estudio mostró de los tumores de mama un retrato molecular no conocido y heterogeneidad en los subtipos moleculares por porcentajes de expresión muy variados para los marcadores moleculares analizados (17,32), destacándose un patrón de expresión proteica que difiere de lo publicado hasta hoy (16,28,14), y que pudiese ser el punto de partida para explicar y/o comprender los hallazgos clínicos en nuestras pacientes.

Todo lo anterior nos lleva a concluir lo siguiente:

El análisis en conjunto de los biomarcadores moleculares en este estudio proporciona una mejor definición de cada tumor para completar el diagnóstico de la neoplasia (perfil IHQ).

El perfil de moléculas proteicas expresadas (perfil IHQ) y los inmunofenotipos resultantes proporcionar aproximaciones al comportamiento teórico del tumor y por tanto al pronóstico de las afectadas con

estratificaciones reales de riesgo adicional para los sistemas de clasificación utilizados en la actualidad, aunque se reconoce la necesidad de otros estudios.

Definitivamente se han expuesto otras moléculas proteicas claves en la naturaleza maligna del tumor que influyen en la caracterización molecular y que no eran conocidas en nuestra población afectada.

## AGRADECIMIENTOS

A los licenciados Lisbeth Silva, Andrius Tapia y Mai-Lyng Hung por colaboración en la construcción de las micromatrices de tejido, la realización de los cortes histológicos y la técnica de inmunohistoquímica. Al doctor Aldo Reigosa en la lectura de la técnica inmunohistoquímica.

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), según oficio Nro. CDCH-260 2011.

**Correspondencia:** rebvilma@hotmail.com

## REFERENCIAS

1. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, López AD, Murray CJ, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. *Lancet*. 2011;378(9801):1461-1484.
2. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines Version 3, 2012. Breast Cancer.
3. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de morbilidad 2011. [Documento en línea, consultado en febrero 2014]. Disponible: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915).
4. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de mortalidad 2011. [Documento en línea, consultado en febrero 2014]. Disponible: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915).
5. Rebollo V, Sucre L, Capocéfallo M, Saldivia F. Cirugía de rescate en carcinoma de mama localmente avanzado. *Salus*. 2009;13(3):14-19.
6. Bolívar AE, Betancourt L, Godoy A, Martínez P, Romero G, Bergamo L, et al. Distribución fenotípica del carcinoma de mama en Venezuela. *Rev Senol*

7. Patol Mamar. 2013;26(4):129-133.
7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752.
8. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, AAS T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(19):10869-10874.
9. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(14):8418-8423.
10. Munirah MA, Siti-Aishah MA, Reena MZ, Sharifah NA, Rohaizak M, Norlia A, et al. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *RomJ Morphol Embryol*. 2011;52(2):669-677.
11. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-5374.
12. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19(2):264-271.
13. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2329-2334.
14. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368-1376.
15. Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, Maiorano E, Golouh R, Carbone A, et al. Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: Assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(21):1571-1581.
16. Gusterson BA, Ross D, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005;7(4):143-148.
17. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, et al. Presenting feature of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(10):2705-2710.
18. Reigosa A, Fernández A, Gutiérrez D, Caleiras E, Hardisson D, Espig H, et al. p63 y citoqueratina 5/6 en los diferentes tipos moleculares del carcinoma de mama. *Rev Esp Patol*. 2010;43(2):79-85.
19. Carey L, Perou C, Livasy C, Dressler L, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-2502.
20. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins:

- Biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(6):705-733.
21. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. México DF: Mcgraw Hill; 2006.
  22. Código de ética para la vida 2011. [Documento en línea, consultado en febrero 2014]. Disponible:<http://www.coordinv.ciens.ucv.ve/investigacion/coordinv/index/CONCIENCIA/codigoe.pdf>.
  23. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. Tejido de microarrays. *Método Mol Med.* 2005;114(2):257-268.
  24. O'Brien KM, Cole SR, Tse, CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res.* 2010;16(24):6100-6110.
  25. Arrechea IM, Vicente GF, Córdoba IA, Ibáñez BB, Santamaría MM, Guillén GF. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *An Sist Sanit Navar.* 2011;34(2):219-233.
  26. Ihemelandu CU, Leffall LD Jr, Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: Age-specific prevalence and survival. *Surg Res.* 2007;143(1):109-118.
  27. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. P63, cytokeratin 5, and P-cadherin: Three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2000;447(4):688-694.
  28. Piñero MA, Polo GL, Alonso RJ, Salinas RJ, Canteras JM, Sola PJ, et al. Características inmunohistoquímicas del cáncer de mama: ¿hacia una nueva clasificación?. *Cir Esp.* 2008;84(3):138-145.
  29. Sallia B, Tapia C, Ishak EA, Gaber S, Berghuis B, Hussain KH, et al. Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology. *BMC Womens Health.* 2011;11(44):1-9.
  30. Muñoz DM, Fernández AM, Salvadores P, Schneider J. Utility of a simplified molecular classification of tumors for predicting survival of patients with invasive ductal breast carcinoma. *Anticancer Res.* 2009;29(11):4727-4730.
  31. Jorge BD, Zarate O.A. Carcinoma mamario con inmunofenotipo similar al de células basales. Estudio morfológico y perfil de expresión inmunohistoquímica en 54 casos triple negativos. *Patol.* 2008;46(3):303-308.
  32. Ramírez CA, Italo BG. Carcinoma de la mama triple negativo aspectos morfológicos y expresión de Ck 5/6. *Rev Venez Oncol.* 2011;23(1):2-13.
  33. Rebolledo PV, Ferri NN, Reigosa YA, Caleiras PE, Fernández RY. Caracterización molecular del carcinoma de mama en una población venezolana. *Rev Venez Oncol.* 2012;24(1):42-51.
  34. Hidalgo MA, Jiménez SG. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Pública de México.* 2009;51(Supp 2):S197-S207.

---

*Viene de pág. 84*

## Consejo para la Práctica: Pesquisa del cáncer de mama (final)

### REFERENCIAS

1. Oeffinger KC, Fontham ET, Etzioni R, Herzig A, Michaelson JS, Shih YC, et al. Breast cancer screening for women at average risk: 2015 guideline update from the American Cancer Society [published erratum appears in *JAMA* 2016;315:1406]. *JAMA* 2015;314:1599-614. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=2463262>. Retrieved May 19, 2016. PMID: 26501536.
2. Siu AL. Screening for breast cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2016;164:279-96. Available at: <http://annals.org/article.aspx?articleid=2480757>. Retrieved May 19, 2016. PMID: 26757170.
3. Breast cancer screening. Practice Bulletin No. 122. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2011;118:372-82. Available at <http://www.acog.org/Resources-And-Publications/Practice-Bulletins/Committee-on-Practice-Bulletins-Gynecology/Breast-Cancer-Screening>. Retrieved May 19, 2016. PMID: 21775869.

Traducido por Rogelio Pérez D'Gregorio de: American College of Obstetricians and Gynecologists. Disponible en: <http://www.acog.org/About-ACOG/News-Room/Practice-Advisories/Practice-Advisory-Breast-Cancer-Screening>