



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de

INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**“EVALUACIÓN DEL PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO EN
PACIENTES DIAGNOSTICADAS CON CARCINOMA INFILTRANTE DE
MAMA, IPBM ARIAS STELLA, 2015 – 2017”**

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

HISTOTECNOLOGÍA

AUTOR

Alvarez Rivera Eduardo Rafael

ASESOR

Lagos Catillo Moraima Angélica

JURADOS

Garay Bambaren Juana Amparo

Prado Maggia Carlos Toribio

Retamal Salazar Alejandro Augusto

Lima – Perú

2021

**EVALUACIÓN DEL PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO EN
PACIENTES DIAGNOSTICADAS CON CARCINOMA
INFILTRANTE DE MAMA, IPBM ARIAS STELLA, 2015 – 2017**

Dedicatoria

Para Nicolás y María Fernanda,
por ser mi mayor motivación en la vida.

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo incondicional.

A mi asesora y docentes por la entrega de sus

conocimientos y a la jefatura del laboratorio

Unilabs- Arias Stella por darme las facilidades

para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Descripción y formulación del problema.....	12
1.2 Antecedentes.....	13
1.3 Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
1.4 Justificación.....	16
1.5 Hipótesis.....	17
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 Bases teóricas sobre el tema de la investigación.....	18
2.1.1 Epidemiología.....	18
2.1.2 Características clínicas y patológicas.....	18
2.1.3 Clasificación genotípica y fenotípica del carcinoma de mama.....	19
2.1.4 Inmunohistoquímica (IHQ) en el carcinoma de mama.....	23
III. MÉTODO.....	27
3.1 Tipo de investigación.....	27
3.2 Ámbito temporal y espacial.....	27

3.3 Variables.....	27
3.4 Población y muestra.....	27
3.5 Instrumentos.....	28
3.6 Procedimientos.....	28
3.7 Análisis de datos.....	32
3.8 Consideraciones éticas	33
IV. RESULTADOS.....	34
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
VI. CONCLUSIONES.....	43
VII. RECOMENDACIONES.....	44
VIII. REFERENCIAS.....	45
IX. ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de frecuencias de acuerdo a subtipo molecular versus grupo etario, grado nuclear, lateralidad y patrón histológico.....	34
Tabla 2 Distribución de frecuencias para la expresión de Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP) y ambos (RE y/o RP)	36
Tabla 3 Distribución de frecuencias para la expresión de Receptor Her-2/neu mediante técnica de inmunohistoquímica y amplificación del gen HER2 mediante test de SISH	37
Tabla 4 Estudios clínicos para determinar perfil inmunohistoquímico y clasificación molecular en pacientes diagnosticadas con carcinoma de mama realizados a nivel nacional y en el extranjero	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática de la glándula mamaria con sus tipos celulares y marcadores.....	20
Figura 2 Valoración (Score) de la proporción e intensidad de los receptores hormonales mediante IHQ	32
Figura 3 Imágenes obtenidas en la evaluación microscópica (40x) donde se representa cada uno de los subtipos moleculares basados en la expresión inmunohistoquímica de los marcadores Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP), Her-2 y Ki67.....	50

RESUMEN

Objetivos: Determinar el perfil inmunohistoquímico (*pIHQ*) en pacientes con diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama.

Metodología: Estudio de tipo descriptivo, cualitativo, se incluyeron un total de 330 pacientes diagnosticadas previamente con carcinoma infiltrante de mama, a quienes se les realizó un análisis mediante inmunohistoquímica (IHQ) para los marcadores tumorales: *Receptor de estrógeno (RE)*, *Receptor de progesterona (RP)*, *Receptor Her-2* y proteína *Ki67*. En el análisis estadístico se evaluaron las frecuencias relativas, absolutas, promedio, media. Se utilizó el test de chi-cuadrado de Pearson (χ^2), con un nivel de significancia del 5%.

Resultados: Luego de realizar el análisis de IHQ en las biopsias de las 330 pacientes participantes, los resultados fueron los siguientes: subtipo *Luminal A* con 131 (39.7%), *Luminal B* con 64 (19.4%), *Basal* con 49 (14.8%), *Luminal B (Her-2+)* con 47 (14.2%) y *Her-2* con 39 (11.8%). No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias relativas encontradas en la población en estudio al compararlas con lo reportado en otros estudios.

Conclusión: La clasificación del subtipo de cáncer de mama es importante para evaluar el pronóstico de la enfermedad, pero también para determinar y proporcionar una terapia adecuada. Por lo tanto, determinar el subtipo de cáncer de mama es necesario para el análisis histopatológico de rutina.

Palabras claves: Inmunohistoquímica, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, Her-2, Ki67, luminal, basal-triple negativo.

ABSTRACT

Objectives: To determine the immunohistochemical profile (pIHC) in patients diagnosed with infiltrating breast carcinoma.

Methodology: A descriptive, qualitative, study included a total of 330 patients previously diagnosed with infiltrating breast carcinoma, who underwent an analysis by immunohistochemistry (IHC) for tumor markers: *Estrogen receptor (ER)*, *Progesterone receptor (PR)*, *Her-2 receptor* and *Ki67* protein. In the statistical analysis the relative, absolute, average, average frequencies were evaluated. Pearson's chi-square test (χ^2) was used, with a significance level of 5%.

Results: After performing the IHC analysis in the biopsies of the 330 participating patients, the results were as follows: Luminal A subtype with 131 (39.7%), Luminal B with 64 (19.4%), Basal with 49 (14.8%), Luminal B (Her-2 +) with 47 (14.2%) and Her-2 with 39 (11.8%). No significant differences were found in the relative frequencies found in the study population when compared to those reported in other populations.

Conclusion: The classification of the breast cancer subtype is important to assess the prognosis of the disease, but also to determine and provide adequate therapy. Therefore, determining the subtype of breast cancer is necessary for routine histopathological analysis.

Keywords: Immunohistochemistry, estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2, Ki67, luminal, basal-triple negative.

I. INTRODUCCIÓN

El carcinoma infiltrante de mama (CIM) es una enfermedad heterogénea cuya valoración pronóstica clásica se ha basado en parámetros clínicos e histopatológicos (morfológicas). La estadificación de la enfermedad se ha fundamentado esencialmente en parámetros como el tamaño tumoral y la afectación ganglionar. Sin embargo, estos parámetros morfológicos no terminan de valorar con suficiente especificidad el comportamiento biológico de este tipo de neoplasia. La clasificación TNM de la Comisión Americana Conjunta sobre el Cáncer (*American Joint Commission on Cancer*, AJCC), se basa en tres parámetros: i) El tamaño tumoral (T), ii) La afectación a los ganglios linfáticos (nódulos, N) cercanos y iii) Si el cáncer ha hecho metástasis (M); estos parámetros TNM permiten agrupar a los pacientes en distintos estadios que representan diferentes probabilidades de recidiva y, por tanto, establecen un pronóstico y ayudan a indicar terapias adyuvantes al tratamiento quirúrgico.

Hoy en día, en la práctica rutinaria de la anatomía patológica además de la clasificación morfológica, la detección de *Receptor de estrógeno (RE)*, *Receptor de progesterona (RP)*, *Receptor Her-2* y *proteína Ki67*, en el CIM es un factor pronóstico significativo, solo o en combinación. El perfil de expresión de estos marcadores tumorales permite clasificar el CIM en 5 subtipos moleculares: *luminal A*, *luminal B*, *luminal B (Her-2+)*, *Her-2* y *triple negativo o basal*. En el presente trabajo, apoyados en estudios previos y las recomendaciones del Consenso de expertos internacionales en cáncer de mama de *St. Gallen* 2013, y empleando la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) se pudo agrupar y clasificar los CIM de un grupo de mujeres peruanas afectadas por esta patología.

1.1 Descripción y formulación del problema

En los últimos años, se ha progresado considerablemente en los tratamientos terapéuticos, lo que ofrece nuevas perspectivas para el manejo del cáncer de mama. En la actualidad hay una diversidad de opciones terapéuticas disponibles para combatir la progresión de la enfermedad y prolongar el tiempo de vida de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad. Dentro de la gama de opciones terapéuticas se encuentran la cirugía, radiación, hormonoterapia (antiestrogénica) o quimioterapia, es decisión del médico tratante elegir cual es el tratamiento más beneficioso para la paciente, pero para tomar la decisión correcta, el médico debe respaldarse en el diagnóstico histopatológico para conocer mejor la biología y predecir el comportamiento de la neoplasia. De tal manera, que siguiendo las sugerencias de los comités internacionales en el manejo clínico y terapéutico del cáncer de mama, los tumores del tipo carcinoma infiltrante de mama (CIM), en sus distintas variedades, debieran ser clasificados de acuerdo a su estado de expresión tanto para el receptor *Her2/neu* así como para los receptores hormonales (estrogénicos y progestágenos), ambos involucrados en vías de señalización que controlan la proliferación a nivel celular. En base a estos estos dos blancos terapéuticos, se han propuesto algoritmos para el manejo clínico y terapéutico del carcinoma de mama infiltrante. Por lo tanto, es indispensable hoy en día realizar exámenes complementarios empleando técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular para una correcta elección de la terapia farmacológica.

En el Perú, el Instituto de Patología y Biología Molecular Arias Stella, es un laboratorio privado de referencia para el diagnóstico histopatológico, inmunohistoquímico y molecular del cáncer, que brinda servicios a instituciones de salud públicas y privadas a lo largo de todo el país. Es por ello, que aprovechando esta situación se ha visto la oportunidad para realizar una evaluación inmunohistoquímica

y clasificación molecular en pacientes peruanas diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama y compararlas con las de otras poblaciones descritas en la literatura científica.

Formulación del problema

Problema general

- ¿Cuál es el perfil inmunohistoquímico (*pIHQ*) en pacientes con carcinoma infiltrante de mama?

Problemas específicos

- ¿Cuál es el fenotipo de expresión de los receptores hormonales de estrógeno (*RE*) y progesterona (*RP*) mediante técnica de inmunohistoquímica (IHQ), en pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama?
- ¿Cuál es el fenotipo de expresión del receptor *Her2/neu* mediante técnica de inmunohistoquímica (IHQ), en pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama?
- ¿Cuál es el fenotipo de expresión de la proteína Ki67 mediante técnica de inmunohistoquímica (IHQ), en pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama?

1.2. Antecedentes

Bray y colaboradores (2018), en la última publicación de GLOBOCAN 2018: “Estimaciones de incidencia y mortalidad en todo el mundo para 36 cánceres en 185 países “ de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, señalan que la incidencia mundial estimada para cáncer de mama en el 2018 fue de 2’088,849 nuevos casos y 626,679 muertes.

Sorlie y colaboradores (2001), en un trabajo publicado acerca de “*Los patrones de expresión génica de los carcinomas de mama distinguen las subclases*

de tumores con implicaciones clínicas”, consiguió un gran impacto en el conocimiento biológico del cáncer de mama proponiendo que: (a) Existen diferencias fundamentalmente a nivel transcriptómico entre los cánceres de mama Receptor de Estrógeno positivos (RE+) y negativo (RE-), (b) El cáncer de mama puede dividirse en al menos cuatro subtipos moleculares: **luminal A**, **luminal B**, **Her2** y de **tipo basal**.

Mendoza y colaboradores (2015) indican en su trabajo *“Perfil inmunohistoquímico del cáncer de mama en pacientes de un hospital general de Arequipa, Perú”*, que el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres con una incidencia de 35,7 casos por cada 100 000, y en la ciudad de Arequipa ocupa el segundo lugar, después del cáncer de cérvix o cuello uterino, con una incidencia de 26,1 casos por cada 100 000 mujeres. En este trabajo, realizado en el Hospital Goyeneche, en una población de 65 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama, se realizó el estudio de los receptores hormonales y Her2/neu mediante técnica de IHQ, encontrando que el 50,8% de casos expresaron RE, el 44,6% expresaron RP y el 23,1% expresaron Her-2/neu. El 30,8% de mujeres con cáncer de mama fue triple negativo.

Colombo y colaboradores (2011), en el trabajo titulado *“Microarrays en la década de 2010: la contribución de los perfiles de expresión génica basados en microarrays a la clasificación, el pronóstico y la predicción del cáncer de mama”*, hacen referencia a la relevancia clínica de análisis de cáncer de mama basado en microarrays y su impacto en el manejo terapéutico del paciente..

Garcés y colaboradores (2012) evaluaron retrospectivamente 20147 pacientes con cáncer de mama para determinar la “influencia de los subtipos de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica en la recurrencia local y a distancia en

pacientes sometidas a cirugía como tratamiento inicial”, encontrando que los subtipos de triple negativo y HER2 mostraron mayor incidencia de recurrencia a nivel local o a distancia.

Goldhirsch y colaboradores (2013) en un artículo especial hacen referencia a los aspectos más destacados del Consenso de expertos internacionales realizado en *St. Gallen*, sobre la terapia del cáncer de mama, donde se destaca la clasificación basada en el perfil inmunohistoquímico, que a pesar de su validación limitada, puede ser aplicable por su bajo costo en comparación con pruebas moleculares de última generación.

1.3 Objetivos

Objetivo General

- Determinar el perfil inmunohistoquímico (*pIHQ*) en pacientes con carcinoma infiltrante de mama.

Objetivos Específicos

- Determinar la expresión de los receptores hormonales de estrógeno (*RE*) y progesterona (*RP*) mediante técnica de inmunohistoquímica (IHQ), en pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama.
- Determinar la expresión del receptor *Her2/neu* mediante técnica de inmunohistoquímica (IHQ), en pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama.
- Determinar la amplificación del gen *Her2* mediante técnica de hibridación in situ (*HIS*), en pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama.
- Determinar la expresión de la proteína *Ki67* mediante técnica de inmunohistoquímica (*IHQ*), en pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama.

- Clasificar los carcinomas infiltrantes de mama, según subtipo molecular en la población en estudio, basados en recomendaciones de guías internacionales.
- Comparar los perfiles inmunohistoquímicos y los subtipos moleculares de la población estudiada con el de otras poblaciones, reportadas en la literatura.

1.4. Justificación

El carcinoma de mama se constituye como una de las causas principales de muertes por cáncer a nivel global, pese a que los gobiernos han impulsado políticas de salud pública, para disminuir las tasas de incidencia y mortalidad, todavía no se han conseguido los resultados deseados, ya que existe un gran porcentaje de pacientes en los que el cáncer de mama es detectado en etapas tardías de la enfermedad, en donde la cirugía debe de ser complementada con un tratamiento farmacológico adyuvante para poder combatir el desarrollo de la neoplasia. En los últimos años, se viene realizando una reunión de expertos internacionales en el manejo clínico y terapéutico del carcinoma de mama, quienes recomiendan su tipificación con el empleo de un panel de marcadores inmunohistoquímicos, y en los casos que sea posible utilizando técnicas de biología molecular, para de esta manera, poder orientar la conducta terapéutica y pronosticar la sobrevivencia, como estrategia para elegir adecuadamente a los pacientes que se pueden favorecer de las terapias farmacológicas disponibles. En nuestro país, muchos centros asistenciales que cuentan con servicios de anatomía patológica, no tienen implementado técnicas de inmunohistoquímica y mucho menos de biología molecular para poder complementar el diagnóstico anatomopatológico, y por ende los datos epidemiológicos con respecto a la clasificación molecular del carcinoma de mama son escasos y limitados. Es por esta razón, que el presente trabajo tiene por finalidad

determinar el perfil inmunohistoquímico en carcinoma de mama infiltrante para los marcadores tumorales: *receptor de estrógeno (RE)*, *receptor de progesterona (RP)*, *receptor Her2/neu (Her2)* y la proteína *KI67*, en una población de mujeres diagnosticadas con esta enfermedad, provenientes de distintas zonas del país, como una manera de aportar al conocimiento del comportamiento biológico del carcinoma de mama en nuestra población.

1.5 Hipótesis

No se plantea.

II. MARCOTEORICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1 Epidemiología

El carcinoma de mama es el cáncer que afecta a mujeres con más frecuencia a nivel mundial. Según las estimaciones GLOBOCAN 2018 de incidencia y mortalidad por cáncer producidas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer, la incidencia mundial estimada en el 2018 fue 2'088,849 nuevos casos y 626,679 muertes (Bray, y otros, 2018). Sólo el cáncer de mama representa el 25% de todos los casos de cáncer y el 15% de todas las muertes por cáncer entre las mujeres (Torre, y otros, 2015) (Mendoza, Echegaray, & Caso, 2015). En el Perú, no existe un registro epidemiológico del cáncer a nivel nacional, sin embargo según los reportes epidemiológicos del Instituto de Enfermedades Neoplásicas del Perú (INEN) para el año 2017 se registraron 1291 nuevos casos de cáncer de mama, representando el 18,2 % de todos los casos de cáncer en mujeres (INEN, 2017) .

2.1.2 Características clínicas y patológicas

El tratamiento clínico actual del carcinoma de mama se basa en una amplia variedad de factores pronósticos clínicos y patológicos, a partir de los cuales es factible establecer grupos de riesgo y tomar decisiones terapéuticas individualizadas. Estas características clínicas y patológicas del carcinoma de mama pueden variar en las diferentes poblaciones en relación con aspectos genéticos y de estilo de vida (Maffus-Azis, Labastida-Almandaro, Espejo-Fonseca, & Rodriguez-Cuevas, 2017) . Durante mucho tiempo, la clasificación del carcinoma de mama se basó en características histológicas como el tamaño del tumor, grado histológico, índice mitótico y otros factores clinicopatológicos como la edad al diagnóstico, estado menopáusico, entre otros (Piñero,

y otros, 2008) (Arrechea, y otros, 2011). El panorama de la investigación sobre el carcinoma de mama cambió drásticamente con la publicación de estudios de perfiles de expresión génica basados en microarreglos (microarrays), seminales y de clase, en los que la heterogeneidad y la complejidad de los carcinomas de mama se redescubrieron a nivel molecular, y gracias a la clasificación aportada por Perou y colaboradores a comienzos del presente siglo, se consiguió un gran impacto en el conocimiento biológico del carcinoma de mama ya que se demostró que: (a) Existen diferencias fundamentalmente a nivel transcriptómico entre los carcinomas de mama Receptor de Estrógeno positivos (RE+) y negativo (RE-), (b) El carcinoma de mama puede dividirse en al menos cinco subtipos moleculares: *luminal A*, *luminal B*, *luminal B similar Her-2*, *Her2* y de *tipo basal* (Colombo, Milanezi, Weigelt, & Reis-Fiho, 2011) (Widodo, Dwianingsih, Triningsih, & Utoro, 2014).

2.1.3 Clasificación genotípica y fenotípica del carcinoma de mama

Hoy en día, el perfil genético del carcinoma de mama se puede estudiar empleando técnicas de secuenciación masiva de múltiples genes a partir del ADN tumoral, con tejido congelado o fresco, o pueden evaluarse en series reducidas de genes mediante la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) o incluso inmunohistoquímica. En base a estas metodologías de estudio se ha propuesto separar el carcinoma de mama en subtipos moleculares fundamentados en la presencia de expresión genética del Receptor de Estrógeno (RE), el cual se ha observado como el mayor factor discriminador del subtipo molecular (Zepeda, Recinos, Cuéllar, Robles, & Maafs, 2008).

2.1.3.1 Tumores Receptor Estrógeno positivo (RE+)

a. Subtipo Luminales A y B

Este grupo de tumores engloba a los tumores luminales, los cuales presentan un perfil inmunofenotípico comparable al componente epitelial del lumen de la glándula mamaria, de ahí que se les denomine subtipo *luminal*. Se ha visto que expresan Citoqueratinas (CK) luminales (CK7, CK8, CK18, CK19 entre otras), Caderina-E, *RE+* y genes asociados a su activación (*LIVI* y *CCND1*) (**Figura 1**). Preferentemente son de bajo grado histológico y poseen mutación de p53 en menos del 20%. Existen varios subtipos, sin embargo los más considerados por su frecuencia son el **Luminal A** y **B**. El subtipo Luminal A es el más frecuente, correspondiendo al 67% de los tumores, posee alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. A la inversa el subtipo Luminal B presenta niveles menores de RE y altos niveles de genes de proliferación. Estos tumores al ser RE+ pueden tratarse con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa pero muestran una baja respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (Zepeda, Recinos, Cuéllar, Robles, & Maafs, 2008) (Piñero, y otros, 2008) (Imigo, Mansilla, Delama, Poblete, & Fonfach, 2011).

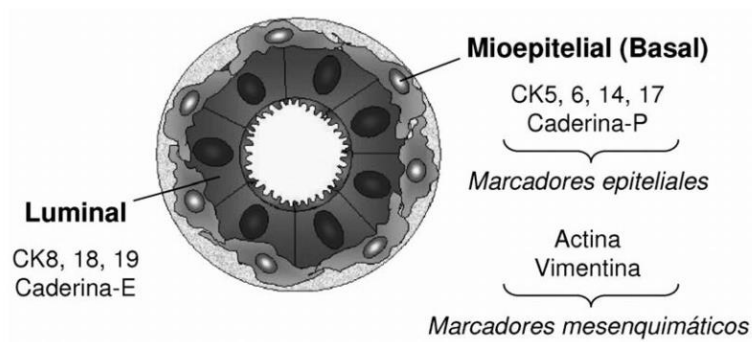


Figura 1: Representación esquemática de la glándula mamaria con sus tipos celulares y marcadores
Tomado de: (Imigo, Mansilla, Delama, Poblete, & Fonfach, 2011)

2.1.3.2 Tumores Receptor Estrógeno negativo (*RE*-)

Existen dos grandes grupos: El subtipo con sobre-expresión de *HER2/neu* y el subtipo basal.

a. Subtipo HER2 positivo (HER2 +)

El carcinoma de mama *HER2+* es una enfermedad clínica y biológicamente heterogénea. Este subtipo corresponde entre el 10 a 15% de los carcinomas de mama. Desde una perspectiva molecular, los tumores *HER2+* son caracterizados por alta expresión de EGFR-2 (G y otros genes del cromosoma 17q, tales como el growth factor receptor bound protein 7 (GRB7) y baja o moderada expresión de genes luminales tales como ESR1 (RE) y PGR (RP), la amplificación del gen ERBB2 y/o sobreexpresión de su proteína *HER2/neu*, se asocian con caracteres histopatológicos relacionados a mal pronóstico, un alto grado histológico, baja expresión de receptores hormonales, además de mala respuesta a terapia (McCafferty, Healy, & Kerin, 2009) (Imigo, Mansilla, Delama, Pobleto, & Fonfach, 2011). Similar a los tumores subtipo basal, los subtipos *HER2+* tienen alta proporción de mutaciones en el p53 (40 a 80 %) y usualmente son de grado 3 ($p = 0.0002$) (Zepeda, Recinos, Cuéllar, Robles, & Maafs, 2008).

Se ha caracterizado, que este subtipo es resistente a la terapia hormonal, debido a la ausencia de receptores hormonales. Por el contrario, los tratamientos basados en el anticuerpo monoclonal recombinante (Trastuzumab/Herceptin) producen una mejoría significativa en los pacientes que presentan alteraciones en el estado del gen ERBB2 o proteína *Her-2/neu*. La amplificación del gen ERBB2 y la sobre-expresión de su proteína *HER2/neu* puede ser evaluada con precisión mediante hibridación in situ o inmunohistoquímica, respectivamente. Los protocolos actualizados de inmunohistoquímica definen como negativo la tinción 0 o 1+ y positivo 3+, requiriendo

confirmación de la amplificación por hibridación in situ los casos 2+. El silenciamiento génico por metilación parece estar disminuida en este subtipo de tumores respecto a los luminales (Imigo, Mansilla, Delama , Poblete, & Fonfach, 2011).

b. Subtipo basal o triple negativo (BTN)

Este subtipo expresa Citoqueratinas de alto peso molecular (CK5, CK6, CK14, CK17) en sus células mioepiteliales. Es por ello, que también se denomina basal/mioepitelial (**Figura 1**), corresponde entre el 2 al 18% del total de los carcinomas de mama (Imigo, Mansilla, Delama , Poblete, & Fonfach, 2011). En nuestro país, según antecedentes bibliográficos recientes se reportó que este subtipo representa alrededor del 15% de los carcinomas de mama (Medina, 2017). El subtipo triple negativo se define por falta de expresión de RE (*RE-*), RP (*RP-*) y falta de expresión y/o amplificación genética de HER2 (*HER2-*) (Sharma, 2016). Es un subgrupo que expresa genes asociados a células mioepiteliales cuyo inmunofenotipo corresponde a CK5, CK17, c-kit (una tirosina quinasa del epitelio mamario), factores de crecimiento de hepatocito e Insulina, Calponina 1, Caveolina y Laminina. Los datos clínicos actuales muestran que es el subtipo más agresivo, cuya sobrevida total y libre de enfermedad es baja, debido a que las terapias endocrinas y con anticuerpo monoclonal recombinante (Trastuzumab/Herceptin) son ineficaces en este grupo de tumores (Sharma, 2016) (Soutiriu & Pusztai, 2009) (Imigo, Mansilla, Delama , Poblete, & Fonfach, 2011). En distintos estudios realizados se ha demostrado el pobre pronóstico de este subtipo (Sorlie, y otros, 2003) (Nielsen , y otros, 2004) (Carey, y otros, 2004) (Foulkes , y otros, 2004) (Ribeiro-Silva, y otros, 2005) (Zepeda, Recinos, Cuéllar, Robles, & Maafs, 2008). Las mujeres afroamericanas premenopáusicas tienen dos veces más riesgo de desarrollar este subtipo que cualquier otro grupo, esta alta proporción se vincula al pobre pronóstico que experimentan estas mujeres (Foulkes , y otros, 2004). No es claro aún si este pronóstico se debe a falta de

opciones terapéuticas o a una agresividad inherente. Por ser triple negativo (*RE-*, *RP-* y *HER2-*) no es susceptible a tratamientos blanco convencionales. Sin embargo, presentan alta sensibilidad a la quimioterapia (Zepeda, Recinos, Cuéllar, Robles, & Maafs, 2008).

2.1.4 Inmunohistoquímica (IHQ) en el carcinoma de mama

En los últimos años se han publicado trabajos enfocados a subtipificar los carcinomas de mama utilizando paneles de inmunohistoquímica (IHQ), como una forma de acercar estos hallazgos a la práctica rutinaria de los laboratorios de patología (Sorlie, y otros, 2003) (Zepeda, Recinos, Cuéllar, Robles, & Maafs, 2008) (Vallejos, y otros, 2010) (Imigo, Mansilla, Delama, Poblete, & Fonfach, 2011). En este sentido, un aporte valioso al estudio de los tumores luminales fue publicado por Cheang y colaboradores (Cheang, y otros, 2009), quienes probaron un panel de IHQ que consistió de cuatro marcadores, que establecen el estado de los receptores de *estrógeno (RE)* y *progesterona (RP)*, el receptor *HER2/neu* y el índice de proliferación determinado por la expresión de *Ki-67*, el cual corresponde a un antígeno nuclear que participa en la fase proliferativa del ciclo celular. Se estudió un número de 357 cánceres de mama con este panel, siendo posible discriminar entre los tumores Luminal A y Luminal B (Spitale, Mazzola, Soldini, Mazzuccheli, & Bordoni, 2009).

El Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen propuso en el 2013 un nuevo sistema de clasificación para el carcinoma de mama basado en cuatro subgrupos intrínsecos. Los criterios para identificar los subtipos fueron refinados recientemente en la Conferencia del 2018, en donde se modificaron definiciones clínico-patológicas, las cuales son presentadas en la Tabla 1 (Goldhirsch, y otros, 2013) (Balic, Thomssen, Würtle, Gnant, & Harbeck, 2019).

Estudios posteriores determinaron que mediante la evaluación inmunohistoquímica del *RE*, *RP*, *HER2/neu*, *EGFR* y *CK5/6* (los dos últimos para

determinar los fenotipos basales), se podría categorizar dichos subtipos sin la necesidad de realizar complicadas técnicas moleculares (Zepeda, Recinos, Cuéllar, Robles, & Maafs, 2008) (Imigo, Mansilla, Delama, Poblete, & Fonfach, 2011).

Clasificación de los tumores según perfil inmunohistoquímico.

Subtipo	RE	RP	Her2/neu	Ki-67
Luminal A	+	+	-	Bajo (< 14%)
Luminal B	+	+ o -	-	Alto (> 14%)
Luminal B (Her2+)	+	+ o -	+	Cualquiera
Her2	-	-	+	Cualquiera
Triple negativo/Basal	-	-	-	Cualquiera

Fuente: Elaboración propia

La ventaja del estudio IHQ es que utiliza marcadores que se encuentran disponibles y pueden aplicarse sobre material parafinado del que se puede obtener información clínica y evolutiva. En nuestro medio, los principales marcadores inmunohistoquímicos (mIHQ) de utilidad terapéutica para la tipificación del carcinoma de mama son: *RE*, *RP*, *HER-2/neu* y *Ki-67*.

2.4.1.1 Receptores hormonales: *Receptor de Estrógeno (RE)* y *Progesterona (RP)*

Los *RE* y *RP* son proteínas localizadas principalmente en el núcleo, que al unirse a las hormonas esteroideas regulan procesos de transcripción célula. En la glándula mamaria se expresan ambos tipos de receptores. Estos receptores se encargan de llevar a cabo procesos de replicación que en condiciones fisiológicas mantienen el equilibrio celular, pero en procesos tumorales permiten la replicación de células que los sobreexpresan y generan el rápido crecimiento del tumor (Martinez & Socorro, 2017).

La determinación de *RE* y *RP* en las biopsias de carcinoma de mama previo al comienzo de la terapia farmacológica se ha hecho una práctica habitual en el tratamiento de pacientes con estas neoplasias. La mayoría de los autores afirman que existe una asociación positiva entre la expresión de receptores hormonales en el carcinoma de mama y un pronóstico más favorable (Martinez & Socorro, 2017).

La expresión de *RE* implica que los mecanismos celulares intrínsecos para producir esta hormona se mantienen conservados a pesar de la transformación neoplásica, especialmente si conjuntamente se expresa el *RP* el cual lo hace solo después de la activación transcripcional de su gen por un complejo funcional receptor de estrógeno-estrógeno. La importancia clínica del *RP* se relaciona con el hecho de que su presencia identifica tumores que son sensibles al tratamiento hormonal con el antagonista correspondiente donde cerca de un 50 – 60 % de las pacientes responden favorablemente a este tipo de terapia endocrina. Un porcentaje mayor de tumores responde si se expresan tanto el *RP* como el *RE* y la intensidad de tinción de este último es alta. Los subtipos que expresan los *RE/RP* tienen el mejor pronóstico y responden a la terapia endocrina (Martinez & Socorro, 2017)

2.4.1.2 *Her-2/neu*

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*Her2/neu*) es una proteína, cuyo rol biológico es actuar como un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa, la cual es codificada por el gen *ERBB2* ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q12). La amplificación genética y/o la sobreexpresión de la proteína de *Her2/neu* en las células neoplásicas parecen ser un factor importante en la biología del tumor y se pueden ver en hasta el 20% de los carcinomas primarios de mama, así como en subconjuntos de carcinomas de ovario, gástricos, colorrectales, pancreáticos y endometriales (Solomon et al 2017). La aplicación clínica de determinar el estado de

Her2/neu en tejido tumoral mediante un test de inmunohistoquímica, es de utilidad por su valor pronóstico y predictivo para la evolución de la enfermedad, pero además su determinación precisa es fundamental para la planificación del tratamiento, ya que su positividad permite el uso de terapias moleculares dirigidas. Las inexactitudes en la determinación del estado de *Her2/neu* son perjudiciales, ya que los falsos negativos excluirían a los pacientes de un tratamiento potencialmente efectivo, mientras que los falsos positivos podrían exponerlos a terapias innecesarias con efectos secundarios potencialmente significativos, así como crear una carga económica innecesaria (Solomon, Dell'Aquila, Fadare, & Hasteh, 2017)

2.4.1.3 Ki-67:

La proteína nuclear *Ki-67* está asociada con la proliferación celular, ya que se ha demostrado que *KI-67* está presente en ciertas fases del ciclo celular como: S, G1, G2 y M, mientras que no se ha encontrado en G0. En muestras de tejido mamario normal se ha encontrado que *KI-67* no es expresado en bajos niveles (<3% de células) en células *RE* negativas, pero contrariamente cuando son *RE* positivas (Inwald y otros, 2013).

El Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen en el 2013 recomienda la valoración porcentual del nivel de expresión de *Ki-67* como marcador fenotípico para diferenciar entre los subtipos moleculares del carcinoma de mama. Existe evidencia científica acumulada en torno al importante papel de la expresión de *Ki-67* en la valoración de la paciente con carcinoma de mama, como factor pronóstico y predictivo. Se ha demostrado también la asociación entre la expresión del *Ki-67*, riesgo de recidiva, disminución de SLE y disminución de la SG (Navarro y otros, 2018).

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

El presente estudio es de tipo descriptivo, cualitativo, retrospectivo y transversal.

- Por su finalidad el estudio fue descriptivo, ya que describió la frecuencia y las características más importantes de una población determinada.
- Es cualitativo porque propone evaluar, ponderar e interpretar la información obtenida del perfil fenotípico de cada sujeto.
- El estudio fue retrospectivo, ya que el diseño del estudio fue posterior a los hechos estudiados.
- Según la secuencia temporal el estudio fue transversal, ya que los datos de cada sujeto representaron esencialmente un momento del tiempo.

3.2 Ámbito temporal y espacial

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Patología y Biología Molecular Arias Stella, en la sede central de Lima, entre el período de Agosto 2015 a Julio del 2017.

3.3 Variables

- Receptor de Estrógeno (RE)
- Receptor de Progesterona (RP)
- Her-2/neu (Her-2)
- Proteína Ki67 (Ki67)

3.4 Población y muestra

La población en estudio estuvo representada por las biopsias de 330 pacientes remitidas al Laboratorio de Patología y Biología Molecular Arias Stella, entre el período de Agosto 2015 a Julio del 2017. La población en estudio fue proveniente de las ciudades de Lima (238), Arequipa (40), Cusco (9), Trujillo (48) y Piura (3).

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Pacientes previamente diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama.
- Biopsias excisionales o incisionales obtenidas quirúrgicamente por resección.
- Biopsias preservadas con fijador histológico (preferentemente formalina tamponada al 10) e incluidas en parafina y con adecuada cantidad de material (tejido) para realizar el análisis.
- Solicitud de estudios inmunohistoquímicos para panel de marcadores tumorales de cáncer de mama.

Criterios de exclusión:

- Pacientes diagnosticadas con carcinoma in-situ de mama.
- Biopsias mal preservadas o con escasa cantidad de material (tejido) para realizar el análisis.

3.5 Instrumentos

Para la recolección de datos se utilizaron los siguientes instrumentos:

1. Los resultados de los perfiles inmunohistoquímicos de cada paciente, se registraron se ordenaron en una planilla computacional para el registro y análisis de la información.
2. De la solicitud de examen de laboratorio de cada paciente se obtuvieron datos tales como edad, sexo, procedencia, diagnóstico anatomopatológico, localización anatómica del tumor, tipo de biopsia, gradación del tumor, entre otras variables.

3.6 Procedimientos

A partir de las biopsias de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (TFFIP), se obtuvieron cortes histológicos (CH) de 3 micras de grosor realizados con micrótopo de rotación. Para el estudio, se requirieron 5 láminas por cada muestra: 1 para

realizar tinción de Hematoxilina-Eosina (HE), y las restantes 4 para la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), para ello se emplearon láminas portaobjetos con superficie hidrofílica, para evitar el desprendimiento del tejido durante el procesamiento.

Previo a iniciar la corrida de IHQ, el médico patólogo evaluó al microscopio la lámina de HE para identificar y seleccionar el área de tejido tumoral apropiada para el estudio. Posteriormente el Tecnólogo Médico procedió a delimitar el área de tejido tumoral previamente seleccionada, con la finalidad de realizar el estudio de IHQ exclusivamente en el área de interés. Se evaluó el perfil de expresión de los marcadores RE, RP, Her-2 y Ki67 utilizando los anticuerpos primarios: **CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1)** Rabbit Monoclonal (IgG), **CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2)** Rabbit Monoclonal (IgG), **PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)** Rabbit Monoclonal, y **CONFIRM anti-Ki-67 (30-9)** Rabbit Monoclonal (IgG), marca Ventana Medical System, Inc. (Ventana- Roche).

3.6.1 Determinación por inmunohistoquímica en tejido fijado en formalina e incluido en parafina (TFFIP)

El protocolo de cada prueba se realizó bajo las siguientes condiciones:

3.6.1.1 Receptor de Estrógeno (RE) y Progesterona (RP):

1. Horneado durante 32 minutos a 70°C
2. Desparafinización en solución EZ Prep 1X a 72°C
3. Recuperación Antigénica en Buffer CC1 (Condition Cell 1) pH. A 94°C por 76 min.
4. Incubación del Anticuerpo primario para RE o RP, anti-ER (SP1) o anti-PR (1E2), respectivamente, durante 16 minutos a 36°C.
5. Incubación con polímero HRP por 8 minutos a 36°C.
6. Revelado con cromógeno DAB por 8 minutos a 25°C

7. Tinción de contraste con Hematoxilina y azulado con solución Bluing por 4 minutos a 25°C.
8. Finalmente se procedió al montaje de las láminas con medio de montaje histológico sintético y cubreobjetos de 22x40 mm, para su evaluación microscópica.

3.6.1.2 Her-2/neu:

1. Horneado durante 32 minutos a 70°C
2. Desparafinización en solución EZ Prep 1X a 72°C.
3. Recuperación Antigénica en Buffer CC1 (Condition Cell 1) pH. A 94°C por 36 min.
4. Incubación del Anticuerpo primario *PATHWAY anti-HER-2/neu*, durante 48 minutos a 36°C.
5. Incubación con polímero HRP por 8 minutos a 36°C.
6. Revelado con cromógeno DAB por 8 minutos a 25°C
7. Tinción de contraste con Hematoxilina y azulado con solución Bluing por 4 minutos a 25°C.
8. Finalmente se procedió al montaje de las láminas con medio de montaje histológico sintético y cubreobjetos de 22x40 mm, para su evaluación microscópica.

3.6.1.3 Proteína Ki-67:

1. Horneado durante 32 minutos a 70°C
2. Desparafinización en solución EZ Prep 1X a 72°C
3. Recuperación Antigénica en Buffer CC1 (Condition Cell 1) pH. A 94°C por 64 min.
4. Incubación del Anticuerpo primario anti-Ki-67 (30-9), durante 16 minutos a 36°C.
5. Incubación con polímero HRP por 8 minutos a 36°C.
6. Revelado con cromógeno DAB por 8 minutos a 25°C
7. Tinción de contraste con Hematoxilina y azulado con solución Bluing por 4 minutos a 25°C.

8. Finalmente se procedió al montaje de las láminas con medio de montaje histológico sintético y cubreobjetos de 22x40 mm, para su evaluación microscópica.

Equipo

Las pruebas de inmunohistoquímica fueron realizadas en el instrumento automatizado Benchmark Ultra (Ventana-Roche).

3.6.2 Evaluación microscópica e interpretación de la reacción inmunohistoquímica en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina

La interpretación de la reacción inmunohistoquímica estuvo a cargo de un médico patólogo calificado por medio de microscopía óptica convencional con aumento de 40X. Para validar el procedimiento técnico de las láminas evaluadas, se corrió conjuntamente con la muestra problema un control positivo y negativo de marcación, que sirvió como control de calidad del protocolo ejecutado.

3.6.2.1 Recomendaciones para la interpretación de inmunoreactividad de

Receptor de Estrógeno (RE) y Progesterona (RP):

- **Positivo para RE o RP:** si se detecta inmunomarcación $\geq 1\%$ de los núcleos de células tumorales.
- **Negativo para RE o RP:** si la inmunomarcación se detecta en $<1\%$ de los núcleos de células tumorales, en presencia de evidencia de que la muestra puede expresar RE y/o RP. Además, de evaluar controles intrínsecos positivos.
- **No se puede interpretar para RE o RP:** si se encuentra que ningún núcleo tumoral es inmunoreactivo y que elementos epiteliales internos presentes en la muestra carecen de tinción nuclear.

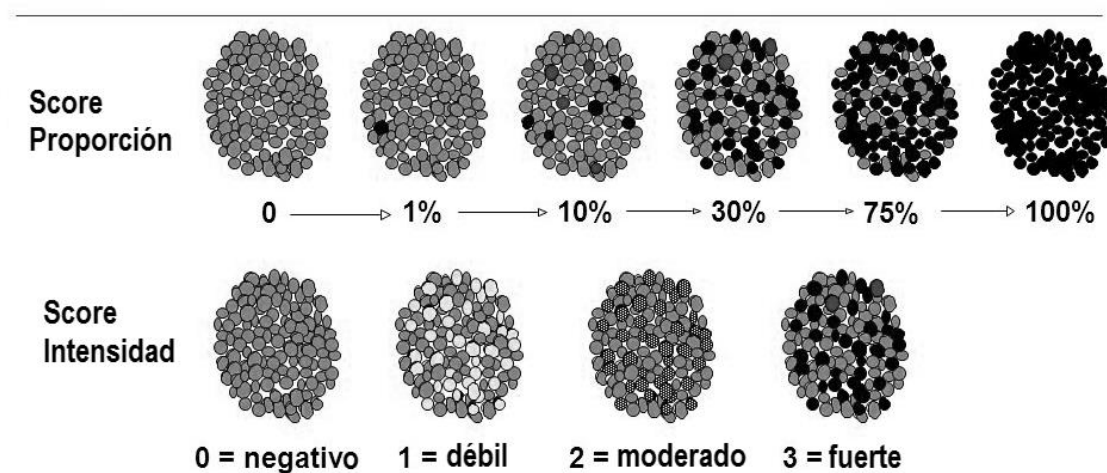


Figura 2: Valoración (Score) de la proporción e intensidad de los receptores hormonales mediante IHQ

[Tomado de: Dabbs David MD. Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and Genomic Applications 3ª Edition. Saunders Elsevier. 2010]

3.6.2.2 Recomendaciones para la interpretación de inmunoreactividad de proteína KI67:

- **Alto grado:** si se detecta inmunomarcación de $\geq 14\%$ de los núcleos de células tumorales.
- **Bajo grado:** si se detecta inmunomarcación de $<14\%$ de los núcleos de células tumorales.

3.7. Análisis de Datos.

Los datos recolectados fueron registrados en un el programa computacional Microsoft Excel 2010 donde también fueron realizados las tablas y estadística. Se comparó las frecuencias obtenidas en nuestra población con las frecuencias de otros estudios realizados previamente empleando el test estadístico de chi cuadrado y se estableció como nivel de significancia un valor menor a 0,05

3.8. Consideraciones Éticas.

Se estableció las coordinaciones respectivas y se contó con el consentimiento informado de las autoridades correspondientes al Instituto de Patología y Biología Molecular Arias Stella, se tuvo el debido cuidado de mantener la confidencialidad y anonimato de los pacientes.

IV. RESULTADOS

Tabla 1

Distribución de frecuencias de acuerdo a subtipo molecular versus grupo etario, grado nuclear, lateralidad y patrón histológico.

Subtipo molecular						
	Luminal A	Luminal B	Luminal B (Her-2 +)	Her-2	Basal	Total
Edad						
Media	53.8	53.09	48.45	55.78	53.4	52.904
0 - 39 años	20	10	11	2	8	51
40- 60 años	71	35	29	24	27	186
>61 años	37	17	6	11	13	84
N/C edad	3	2	1	2	1	9
	131	64	47	39	49	330
Grado nuclear						
1	29	4	3	6	2	44
2	59	32	23	11	17	142
3	14	21	15	9	23	82
	102	57	41	26	42	268
Lateralidad						
Derecha	66	35	19	13	21	154
Izquierda	46	21	22	18	17	124
	112	56	41	31	38	278
Patrón histológico						
Ductal	88	56	37	25	37	243
Lobulillar	11	3	1	2	3	20
Apocrino	0	0	1	1	0	2
Papilar	4	1	0	0	1	6
Mixto	2	0	0	1	0	8
Mucinoso	4	0	0	0	0	4
Tubular	2	0	0	0	0	2
NOS	0	0	1	1	1	3
	111	60	40	30	42	288

Fuente:elaboración propia

En la tabla 1, se describen los datos clínico-patológicos de los 330 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se debe indicar que en algunos casos las solicitudes médicas de laboratorio no contaban con información completa para las variables examinadas tales como: edad del paciente, patrón histológico, grado nuclear y lateralidad; por lo que, las sumatorias de estas variables no son iguales en todos los casos.

Para el presente estudio, el grupo etario de mayor presentación fue entre los 40-60 años con 186 casos (58%), seguido del grupo sobre 61 años con 84 (26%) y por último menores de 40 años con 51(16%), la edad media de presentación fue de 53 años con un valor mínimo de 24 años y un máximo de 90 años.

Basados en la clasificación propuesta por el Consenso de St. Galen el 2013 se categorizo a cada carcinoma de mama de la población estudiada con un subtipo molecular, como se ilustra en la figura 2, teniendo en cuenta los siguientes criterios derivados del perfil inmunohistoquímico: **Luminal A**: RE(+), RP (+) Her-2/neu (-) y Ki67 <14%; **Luminal B**: RE(+), RP (+ ó -) Her-2/neu (-) y Ki67 >14%; **Luminal B (Her-2+)** RE(+), RP (+ ó -) Her-2/neu (+) y Ki67 cualquier %; **Her-2**: RE(-), RP (-) Her-2/neu (+) y Ki67 cualquier %; **Basal**: RE(-), RP (-) Her-2/neu (-) y Ki67 cualquier %. Es así como, que en nuestro estudio los carcinomas más frecuentes fueron de tipo *Luminal A* con 131 (39.7%), *Luminal B* con 64 (19.4%), *Basal* con 49 (14.8%), *Luminal B (Her-2+)* con 47 (14.2%) y *Her-2* con 39 (11.8%).

En cuanto a la estimación del grado nuclear, se encontró la mayor frecuencia para el grado 2 con 142 casos (53%), seguido por el grado 3 con 82 casos (31%), y el grado 1 con 44 casos (16%). Por otro lado, para la variable lateralidad, la localización anatómica con mayor frecuencia fue la mama derecha con 154 (55%) seguida por la mama izquierda con 124 (45%).

Al categorizar los carcinomas de mama según su patrón histológico fundamentado en las características morfológicas y arquitecturales de las células tumorales, se obtuvo un predominio del carcinoma tipo ductal con 243 (84%), seguido por el lobulillar con 20 (7%), el mixto con 8(2%), el papilar con 6 (2%), y las otras variantes histológicas con 1%.

Tabla 2

Distribución de frecuencias para la expresión de Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP) y ambos (RE y/o RP)

Estado receptores hormonales mediante IHQ						
Expresión	RE	%	RP	%	RE y/o RP	%
Positiva	235	70.4	202	60.5	244	73
Negativa	99	29.6	132	39.5	90	27
Total	334	100	334	100	334	100

Fuente:elaboración propia

En la tabla 2, se detalla el análisis exclusivo para la positividad de los receptores hormonales en la población de estudio, encontrándose que en 235/334 casos se encontró positividad para el RE (70,4%), mientras que 202/334 fueron positivos para el RP (60,5%), mientras que si se consideramos la positividad combinada de estos marcadores (RE y/o RP) para cada paciente, los resultados nos indican que en 244/334 casos (73%) se encontró expresión de al menos uno de los dos marcadores tumorales mencionados.

Tabla 3

Distribución de frecuencias para la expresión de Receptor Her-2/neu mediante técnica de inmunohistoquímica y amplificación del gen HER2 mediante test de SISH

Score IHQ	HER-2/neu		Score SISH	HER-2/Cen17		HER-2/neu	
	N	%		N	%	N	%
Negativo	205	61.4				232	71.8
DUDOSO	54	16.2	No amplificado	27	62.8		
			amplificado	16	37.2		
Positivo	75	22.4				91	28.2
Total	334	100				323	100

Fuente: elaboración propia

En la tabla 3, se muestra el análisis desglosado del marcador Her2/neu, mediante la técnica de IHQ y basados en el score de puntuación para la prueba de Her-2 recomendados por el Colegio Americano de Patólogos (CAP por sus siglas en inglés: Colleague American Pathologist), se logró pesquisar que 75/334 casos (22.4%) fueron positivos para la expresión de este marcador, mientras que 205/334 casos (61.4%) fueron negativos para la expresión del marcador Her2/neu. Sin embargo, en 54/334 casos (16.2%) los resultados no fueron concluyentes mediante esta prueba, y se tuvo que recurrir al test de Hibridación in situ con Plata (*SISH* por sus siglas en inglés: *Silver In Situ Hybridization*), recomendado para este tipo de casos, ya que al tratarse de una un test genético permite evaluar correctamente el estado de amplificación del gen *HER2*, pero debido a que en 11 casos no se realizó la mencionada prueba en el laboratorio, el análisis global se realizó sobre 323 casos, dando como resultado, que 91/323 casos (28,2%) fueron positivos para la sobreexpresión de la proteína y/o amplificación del gen *HER2*, ya sea que se haya detectado por las pruebas de IHQ o SISH, respectivamente.

Tabla 4

Estudios clínicos para determinar perfil inmunohistoquímico y clasificación molecular en pacientes diagnosticadas con carcinoma de mama realizados a nivel nacional y en el extranjero

Trabajos Nacionales y Extranjeros	Nro pacientes	POSITIVIDAD %			CLASIFICACIÓN MOLECULAR				
		RE	RP	HER-2	LUMINAL A	LUMINAL B	LUMINAL B (Her-2 +)	HER-2	BASAL
Autor (Año) - Ciudad o País									
Pinto (2011) Chiclayo	117	54	46	34					
Mendoza (2015) Arequipa	65	50.8	44.6	23.1					
Adebamowo (2008) Nigeria	192	65.1	54.7	20.1					
Mostafa (2008) Bangladesh	1339	66.7	70	30.7					
Garcés (2012) Lima	2830	65.8	52.3	20.2					
Rebolledo (2012) Venezuela	179	58.1	43.3	35.7					
Presente estudio (2017) Perú	334	70.4	60.5	28.2	39.7	19.4	14.2	11.8	14.8
Piñero (2008) España	194				50.5	18.6	9.3	6.7	15.9
Uribe (2010) Venezuela	320				60.9	1.6		8.8	28.7
Su Yinghao (2011) China	2791				48.6	16.7	8.1	13.7	12.9
Garcés (2012) Lima	2047				58.2	10.1		10.1	21.6
Rebolledo (2012) Venezuela	179				42.4	16.7		18.9	21.7
Maffuz-Aziz (2016) México	4411				65.7		10.9	8.7	14.6
Medina (2017) Perú	280				37.5	31.4		16.4	14.6

Fuente: elaboración propia

Finalmente, en la tabla 4 se muestra la clasificación molecular obtenida para el grupo de pacientes enrolados en el presente estudio, en base al perfil inmunohistoquímico para *RE*, *RP*, *Her-2* y *Ki67* complementado con el test de SISH en los casos donde se hizo necesario determinar con mayor precisión el estado de *HER-2/neu*, se logró asignar a cada paciente un subtipo molecular, empleando los criterios propuestos en el consenso de expertos de St. Galen 2013, y se compararon con los resultados obtenidos en algunas publicaciones nacionales y extranjeras, para de esta manera contrastar los resultados obtenidos para los subtipos moleculares en el carcinoma infiltrante de mama.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El carcinoma de mama es una enfermedad heterogénea con una amplia variedad de presentaciones clínicas e histopatológicas, que presentan diferentes expresiones genéticas en varios subtipos y perfiles moleculares, por lo que ofrecen diferentes características predictivas y pronósticas para las pacientes. Los avances en el campo de la genética molecular en las últimas décadas, han permitido proponer cambios en la clasificación del carcinoma de mama, apoyados en varios estudios basados en los perfiles de expresión empleando microarreglos genéticos han ampliado nuestro conocimiento acerca de la heterogeneidad, complejidad y taxonomía molecular del carcinoma de mama. Sin embargo, las metodologías para la identificación de los subtipos moleculares y ensayos clínicos prospectivos para validar la contribución de estos subtipos moleculares todavía no son factibles de alcanzar para los centros asistenciales de salud públicos principalmente por razones económicas y de infraestructura. En ese sentido el estudio inmunohistoquímico del carcinoma de mama ha sido aceptada como una herramienta fundamental para definir subtipos de carcinoma de mama la población de pacientes que padecen de esta enfermedad una alternativa mucho más asequible.

Actualmente, en nuestro medio las decisiones sobre el tratamiento sistémico adyuvante de las pacientes con carcinoma de mama se basan principalmente en criterios histopatológicos que incluyen el tipo histológico del tumor, tamaño del tumor, el compromiso ganglionar, y el análisis inmunohistoquímico de por lo menos los marcadores tumorales *RE*, *RP*, *HER-2* y *KI67*. Estos parámetros han sido aceptados en las guías clínicas tanto a nivel nacional: *Guía de práctica clínica cáncer de mama* (INEN, 2011) e internacionales: *St. Gallen International Breast Cancer Conference 2018* (Balic, Thomssen, Würstlein, Gnant, & Harbeck, 2019), en esta última guía se proponen 5

subtipos moleculares de carcinoma de mama (*luminal A*, *luminal B*, *luminal B similar Her-2*, *Her2* y de *tipo basal*), basados en la expresión de receptores en la superficie de la célula tumoral (*RE*, *RP* y *Her-2*) y los valores de medición de Ki67.

El subtipo molecular más frecuentemente en carcinoma de mama es el luminal A, que es encontrado en 50-72% de los pacientes con carcinoma de mama. Los pacientes con este subtipo tienen mejor pronóstico, es decir, bajo índice proliferativo, buena diferenciación celular, con el menor riesgo de recurrencia local y recaída. Sin embargo, hay diferentes valores registrados en literatura sobre este subtipo: Italia 34%, Arabia Saudita Arabia 3.9%, China 65.3% y Japón 71%. La terapia sugerida para estos pacientes es inhibidores de la aromatasa de tercera generación en mujeres posmenopáusicas, moduladores selectivos de los receptores de estrógenos como el tamoxifeno.

En nuestro estudio, se observó que el fenotipo molecular predominante fue el subtipo luminal A con 39.6% (131/330) de los casos, seguido por subtipo luminal B con 19.3% (64/330). Así mismo, agrupando ambos subtipos obtuvimos un total de 58.9% (195/330) de casos luminales. Al comparar la distribución del total de casos luminales, encontramos que un 67.2% (131/195) fue luminal A y un 32.8% (64/195) resultó ser luminal B, similar a lo observado por Reigosa y colaboradores (Reigosa, y otros, 2016) quienes obtuvieron un total de 62.7% de casos luminales con una distribución de 67.6% de luminal A y 32.4% de luminal B. Sin embargo, estos resultados difieren con la información reportada por Blows y colaboradores (Blows, 2010) quienes al estudiar 10,159 casos de carcinoma de mama procedentes de doce estudios diferentes, y al clasificarlos en 5 distintos subtipos, obtuvieron que 7,882 de casos correspondían a carcinomas luminales lo que representaba un 78% de la población estudiada, y de ellos, el 92% fue equivalente al subtipo luminal A (7,243/7,882) y el 8% fue de subtipo luminal B (639/7,882), no obstante el estudio en mención presentó la limitante de que el análisis

inmunohistoquímico se llevó a cabo en diferentes laboratorios utilizando diferentes métodos para la tinción y la puntuación y, como resultado, es inevitable una clasificación errónea de los subtipos de tumores.

En cuanto a la expresión de los receptores hormonales (RE y/o RP), encontramos que un 73% (244 casos) resultaron positivos al análisis inmunohistoquímico, similar a lo reportado por el estudio multicéntrico de casos y controles en América Latina *PRECAMA* (Olivier, Bouaoun, Villar, Robitaille, & Cahais, 2019), realizado en mujeres pre-menopáusicas, donde obtuvieron un 72% (168/233) de positividad para el mismo análisis. Así mismo, se encontró un porcentaje de reproductibilidad de la técnica de inmunohistoquímica semejante al estudio en mención, ya que por sobre el 98% de las muestras analizadas marcaron para alguno de los 4 marcadores en estudio.

El análisis inmunohistoquímico negativo para: RE(-), RP(-) y Her-2(-) denominados también triple negativos o basales (TNoB), se encontró en un 14,8% (49/330) de los casos, similar a lo reportado en un estudio realizado en una población hispánica de Puerto Rico (Rodríguez-Velasquez, y otros, 2018) donde obtuvieron un 15,4% (193/1254) para este subtipo molecular, pero distinto a lo reportado en un estudio realizado una población similar realizado en México (Lara-Medina, Pérez-Sánchez, Saavedra, Blake, & Arce, 2011) donde se obtuvo una prevalencia de 23,1% (479/2074) de estos casos luego del análisis inmunohistoquímico. En nuestro estudio, la prevalencia del carcinoma de mama TNoB fue mayor a lo reportado en pacientes caucásicos (10-13%), pero menor a lo reportado en pacientes afro-americanas (Lara-Medina, Pérez-Sánchez, Saavedra, Blake, & Arce, 2011), basados en estudios similares se ha encontrado una variación de acuerdo a la etnicidad entre población hispánica y no hispánica.

En cuanto a la distribución de los grados tumorales el mayor número de casos se presentó en el grado 2 para el subtipo luminal A con 59 casos, sin embargo para el grado

3 el mayor número de casos se presentó en el subtipo basal o triple negativo, lo que coincide con lo reportado por Rodríguez-Velasquez (2018), quienes encontraron que la distribución de los grados tumorales variaron de acuerdo a los subtipos moleculares, encontrándose que el grado 2 fue el más frecuente para el subtipo Luminal A, y el grado 3 más frecuente en el subtipo basal o triple negativo.

VI. CONCLUSIONES

1. La determinación del perfil inmunohistoquímico para los receptores hormonales (*RE* y *RP*), el receptor *Her2/neu* y la proteína *KI67*, en la población estudiada demostró que el subtipo molecular más frecuente es el Luminal A representando un 39.6% (131/330), seguido por el subtipo luminal B con 19.3% (64/330), el tercer lugar lo ocupó el subtipo basal o triple negativo con 14.8% (49/330), el cuarto puesto fue para el subtipo para el luminal B (*Her-2* +) con 14.2% (47/330), y en último lugar de esta clasificación lo ocupó el subtipo *Her-2* con 11.8% (39/330).
2. El resultado de estos subtipos clasificados de acuerdo al perfil de expresión inmunohistoquímico, no presenta diferencias significativas con lo reportado en estudios similares realizado en otras poblaciones.
3. Podemos considerar que la técnica de inmunohistoquímica cuando se realiza bajo condiciones estandarizadas, puede ser una herramienta útil para clasificar adecuadamente a las pacientes que requieren someterse a un tratamiento anti-neoplásico.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda complementar el diagnóstico histopatológico del cáncer de mama con la información molecular que nos puede proporcionar el estudio de marcadores tumorales mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ).
2. Asimismo, el estudio de marcadores tumorales de mama, se debería implementar como rutina en los centros asistenciales que cuentan con este tipo de servicios, ya que representan una alternativa más accesible para los laboratorios de anatomía patológica, y la infraestructura y equipamiento que se requiere puede ser asequible para la inversión pública y privada.
3. Se plantea la posibilidad de realizar estudios para conocer cuál es la respuesta de la población de mujeres al tratamiento de cáncer de mama avanzado con quimioterapia, en términos de supervivencia libre de enfermedad y relacionarlos con los subtipos estudiados y compararlo con otras poblaciones.

VIII. REFERENCIAS

- Arrechea, M., Vicente, F., Córdova, A., Ibáñez, B., Santamaría, M., & Guillén, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *34(2): 219-233*.
- Balic, M., Thomssen, C., Würtle, R., Gnant, M., & Harbeck, N. (2019). St. Gallen/Vienna 2019: A Brief Summary of the Consensus Discussion on the Optimal Primary Breast Cancer Treatment. *14:103–110*.
- Blows, D. K. (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *5(7(5))*.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *68:394–424*.
- Carey, L., Perou, C., Dressler, L., Livasy, C., Geradts, J., & Cowan, D. (2004). Race and the poor prognosis basal-like breast cancer (BBC) phenotype in the population-based Carolina Breast Cancer Study. *22(14): 9510-9510*.
- Cheang, M., Cjia, S., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider J., Nielsen, T. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *101:736-750*.
- Colombo, P., Milanezi, F., Weigelt, B., & Reis-Fiho, J. (2011). Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *13(3): 212*.
- Foulkes, W., Brunet, J., Stefansson, I., Straume, O., Chappuis, P., & Bejin, L. (2004). The prognostic implication of the basal-like (cyclin

- Ehigh/p27low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1- related breast cancer. *64*:830-835.
- Garcés, M., Pinto, J., Marcelo, M., & Gómez, H. (2012). Influencia de los subtipos de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica en la recurrencia local y a distancia en pacientes sometidas a cirugía como tratamiento inicial. *2(1)*: 3-12.
- Goldhirsch, A., Wiener, E., Coates, A., Gelber, R., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *24(9)*: 2206–2223.
- Holm, K., Hegardt, C., Staaf, J., Vallon, J., Jönsson, G., & Olsson, H. (2010). Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *12(3)*, R36. doi:10.118.
- Imigo, F., Mansilla, S., Delama , I., Poblete, M., & Fonfach, C. (2011). Molecular Classification of Breast Cancer. *25*: 67-74.
- INEN. (2011). *Guía de Práctica Clínica Cáncer de Mama*. Lima: Instituto de Enfermedades Neoplásicas.
- INEN. (2017). *INEN-CASOS-NUEVOS-2000-2017_VF*. Recuperado el 09 de AGOSTO de 2019, de PORTAL INEN: https://portal.inen.sld.pe/wp-content/uploads/2019/04/INEN-CASOS-NUEVOS-2000-2017_VF.pdf
- Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djurisic, I., . . . Jancic, S. (2014). Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *2014(8)*: 107-111.
- Lara-Medina, F., Pérez-Sánchez, V., Saavedra, D., Blake, M., & Arce, C. (2011). Triple-Negative Breast Cancer in Hispanic Patients. *117(16)*:3658-3669.

- Maffus-Azis, A., Labastida-Almandaro, S., Espejo-Fonseca, A., & Rodriguez-Cuevas, S. (2017). Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. *Cir Cir.* 2017; 85:201-207. 85(3):201-207.
- Martinez, J., & Socorro, C. (2017). Inmunohistoquímica en el cáncer de mama. Herramienta necesaria en la actualidad. *16(1): 209-213.*
- McCafferty, M., Healy, M., & Kerin, M. (2009). Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology.* 15(10): 485-489.
- Medina, G. (2017). Características clínicas y pronósticas de los subtipos moleculares de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica. Arequipa, Perú. *34(3): 472-477.*
- Mendoza, G., Echegaray, A., & Caso, C. (2015). Perfil inmunohistoquímico del cáncer de mama en pacientes de un hospital general de Arequipa, Perú. *26:31-34.*
- Nielsen, T., Hsu, F., Jensen, K., Cheang, M., Karaca G., & Hu, Z. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinom. *10:5367-5374.*
- Olivier, M., Bouaoun, L., Villar, S., Robitaille, A., & Cahais, V. (17 de Enero de 2019). *Molecular features of premenopausal breast cancers in LatinAmerican women: Pilot results from the PRECAMA study.* Recuperado el 04 de Abril de 2019, de Plos One: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210372>
- Perou, C., Sorlie, T., Eisen, M., Van de Rjin, M., Jeffrey, S., & Rees, C. (2000). Molecular portraits of human breast tumors. *406: 747-752.*
- Piñero, A., Polo, L., Alonso, J., Salinas, J., Canteras, M., Sola, J., . . . Parrilla, P. (2008). Características inmunohistoquímicas del cáncer de mama: ¿Hacia una nueva clasificación? *84(3): 138-145.*

- Reigosa, A., Hardisson, D., Sanzi, F., Caleiras, E., Saldivia, F., & Fernández, A. (2016). Subclassification of the molecular types of breast cancer based on the expression of immunohistochemical markers and evolution. *57*((2): 187 - 216).
- Ribeiro-Silva, A., Ramalho, L., García, S., Brandao, D., Chahud, S., & Zucoloto, S. (2005). p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *47*: 458-466.
- Rodriguez-Velasquez, A., Velez, R., Lafontaine, J., Colon-Echevarria, C., Lamboy-Caraballo, R., Ramirez, I., Armaiz-Pena, G. (2018). Prevalence of breast and ovarian cancer subtypes in Hispanic populations from Puerto Rico. *18*:1177.
- Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *21*(9): 1050–1062.
- Solomon, J., Dell'Aquila, M., Fadare, O., & Hasteh, F. (2017). Her2/neu Status Determination in Breast Cancer: A Single Institutional Experience Using a Dual-Testing Approach With Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization. *147*(4): 432-437.
- Sorlie, T., Perou, C., Tibshirani, R., Aas, T., Geister, S., & Johnsen, H. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *98*: 10869-10874.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J., Nobel, A., . . . Pesich, R. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *100*: 8418-8423.
- Soutiriou, C., & Pusztai, L. (2009). Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *360*:790-800.

- Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., Mazzuccheli, L., & Bordoni, A. (2009). Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *20(4): 628-635.*
- Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *65:87-108.*
- Vallejos, C., Gómez, H., Cruz, W., Pinto, J., Dyer, R., Velarde, R., . . . Vigil, C. (2010). Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *10(4): 294-300.*
- Van't Veer, L., Dai, H., Van de Vijver, M., Yudong, D., Hart, A., Mao, M., . . . Friend, S. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *415: 530-536.*
- Weigelt, B., Glas, A., Wessels, L., Witteveen, A., Petersen, J., & Van't Veer, L. (2003). Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *100: 15901-15905.*
- Widodo, I., Dwianingsih, E., Triningsih, E., & Utoro, T. (2014). Clinicopathological Features of Indonesian Breast Cancers with Different Molecular Subtypes. *15: 6109-6113.*
- Zepeda, E., Recinos, E., Cuéllar, M., Robles, C., & Maafs, E. (2008). Clasificación Molecular del Cáncer de Mama. *76:87-93.*

IX. ANEXOS

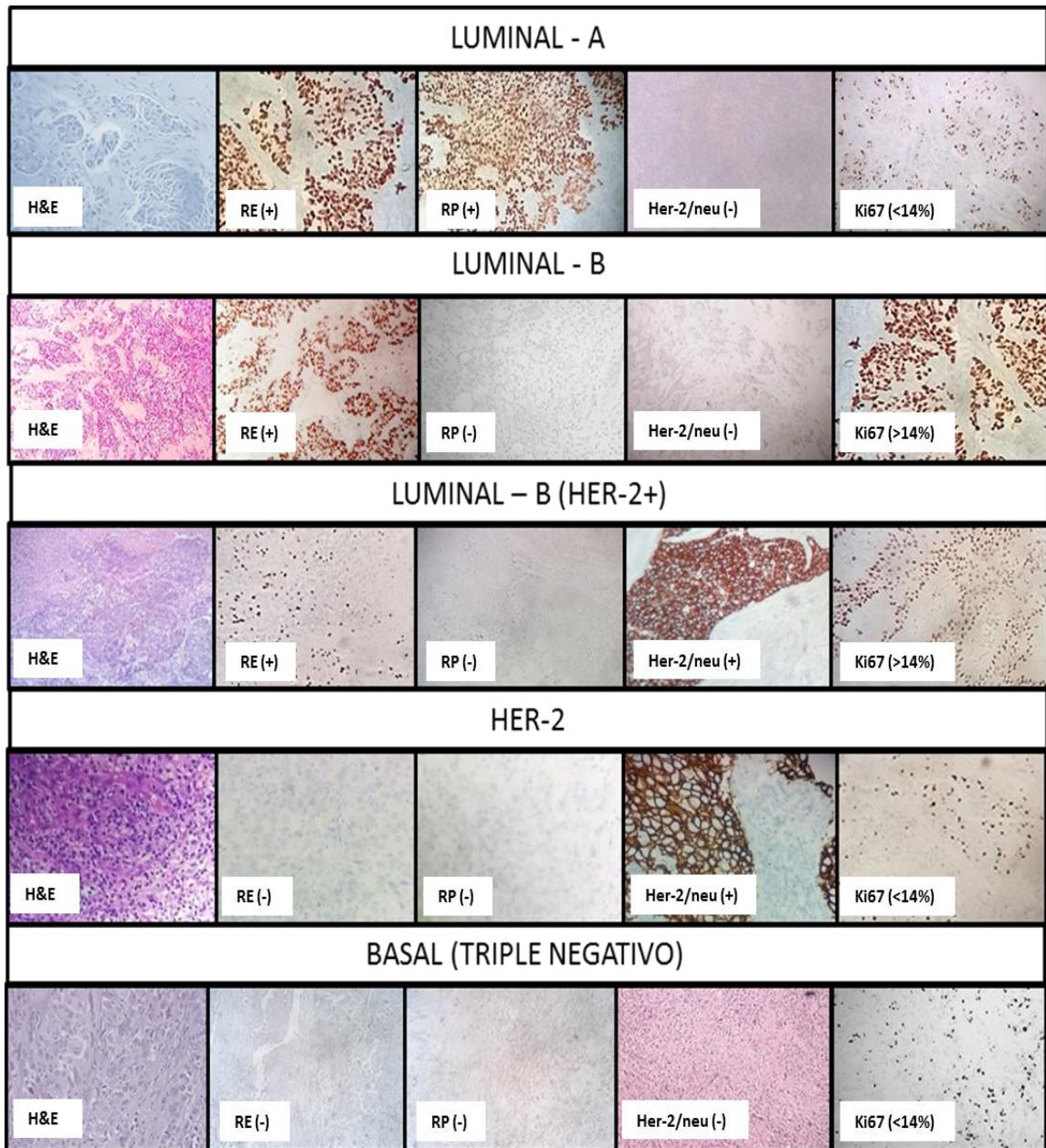


Figura 3: Imágenes obtenidas en la evaluación microscópica (40x) donde se representa cada uno de los subtipos moleculares basados en la expresión inmunohistoquímica de los marcadores Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP), Her-2 y Ki67.