

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN:
CIRUGÍA ONCOLÓGICA

VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
ENTRE LOS COMPONENTES INTRADUCTAL E INFILTRANTE
DEL CARCINOMA DE MAMA

AUTOR: DRA. VILMA E REBOLLEDO PULIDO

VALENCIA, 2008

**VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
ENTRE LOS COMPONENTES INTRADUCTAL E INFILTRANTE
DEL CARCINOMA DE MAMA**



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN:
CIRUGÍA ONCOLÓGICA



VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
ENTRE LOS COMPONENTES INTRADUCTAL E INFILTRANTE
DEL CARCINOMA DE MAMA

AUTOR: DRA. VILMA E REBOLLEDO PULIDO

VALENCIA, 2008



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN:
CIRUGÍA ONCOLÓGICA



VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
ENTRE LOS COMPONENTES INTRADUCTAL E INFILTRANTE
DEL CARCINOMA DE MAMA

TUTOR: ALDO REIGOSA YANIZ

TRABAJO DE ESPECIALIZACIÓN PRESENTADO ANTE EL ÁREA DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN CIRUGÍA
ONCOLÓGICA

VALENCIA 2008



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN:
CIRUGÍA ONCOLÓGICA



VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
ENTRE LOS COMPONENTES INTRADUCTAL E INFILTRANTE
DEL CARCINOMA DE MAMA

AUTOR: DRA. VILMA E REBOLLEDO PULIDO.

APROBADO EN EL ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA
UNIVERSIDAD DE CARABOBO

POR _____

FECHA DE APROBACIÓN: _____

ÍNDICE

General

Resumen.....	viii
Summary.....	x
Introducción.....	1
Objetivos.....	5
Material y Métodos.....	7
Resultados.....	12
Discusión.....	25
Conclusiones	30
Referencias Bibliográficas.....	32

Tablas

1. Características generales de las pacientes con carcinoma de mama con ambos componentes, intraductal - ductal infiltrante.....	15
2. Expresión de los marcadores moleculares (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/ neu) según el componente intraductal - ductal infiltrante en el carcinoma de mama.....	16
3. Variación de la expresión de los marcadores moleculares (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/ neu) según el componente intraductal - ductal infiltrante en el carcinoma de mama.....	16
4. Relación entre la variación de la expresión de los marcadores moleculares (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/ neu) según el componente intraductal - ductal infiltrante y el tamaño tumoral en el carcinoma de mama.....	17
5. Relación entre la variación de la expresión de los marcadores moleculares (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/ neu) según el grado del componente histológico	

en el carcinoma de mama.....	18
6. Relación entre la variación de la expresión de los marcadores moleculares (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/ neu) según el componente intraductal - ductal infiltrante y el estadio clínico en el carcinoma de mama.....	19
7. Relación entre la variación de la expresión de los marcadores moleculares (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/ neu) según el componente intraductal - ductal infiltrante en el carcinoma de mama y el estado de los ganglios linfáticos axilares.....	20
8. Relación entre la variación de la expresión de los marcadores moleculares (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/ neu) según el componente intraductal - ductal infiltrante y la edad en el carcinoma mama.....	21

Figuras

1. Carcinoma de mama. HE 50X.....	8
2. Carcinoma de mama. HE 50X	8
3. Carcinoma de mama. RP 100X.....	13
4. Carcinoma de mama. RP 200X.....	13
5. Carcinoma de mama.P53 100X	14
6. Carcinoma de mama. P53 200X	14
7. Carcinoma de mama. Her-2/neu 200X.....	14
8. Carcinoma de mama. Her-2/neu 400X.....	14

VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ENTRE LOS COMPONENTES INTRADUCTAL E INFILTRANTE DEL CARCINOMA DE MAMA

RESUMEN

Se realizó un estudio basado en un diseño no experimental, transversal de tipo descriptivo correlacional, del resultado inmunohistoquímico de pacientes con el diagnóstico de carcinoma de mama y dicho análisis practicado en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte, durante el periodo 1999-2006. De 1096 casos con carcinoma de mama, se seleccionaron 1090 del sexo femenino y de ellos 243 de histología ductal infiltrante con componente intraductal, al examinar de cada uno de los anteriores la lámina de hematoxilina eosina al microscopio luz. Seguidamente se les valoró la expresión de los marcadores moleculares RE, RP, P53, BCL2, Her-2/neu en ambos componentes histológicos. De los casos objeto del estudio se conoció la edad en 205, donde el promedio de la misma fue de 42,13 años y de ellos 48,14% eran menores de 50 años. Los marcadores moleculares más realizados fueron receptores hormonales, Her-2/neu y la proteína p53. En relación al grado histológico de cada componente, en el intraductal más del 60% fue de bajo grado, y en el ductal infiltrante, más del 30% fue grado II del total de casos donde ésta característica se conoció. El tamaño tumoral en 44,02% de los casos, fue menor a 5 cm. De los 115 casos donde se conoció el estadio clínico y el estado nodal, 23,86% eran estadio II y 25,92% presentaron enfermedad metastásica nodal

axilar. Los marcadores moleculares RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu, se expresaron en ambos componentes (intraductal e infiltrante) del tumor en más del 70% de los casos, presentando la expresión de cada uno diferencias, según el tipo histológico. El Bcl2, RE, RP y p53 fueron más positivos en el componente infiltrante que en intraductal, siendo significativa la diferencia para el RP ($p=0,04$) y la proteína p53 ($p=0,00001$), el Her-2/neu se observó más positivo en el componente intraductal que en el invasor ($p=0,02$). Al considerar la intensidad del inmunomarcaje o la tinción, el RP y p53 se expresaron con un comportamiento de más ganancia que pérdida en la tinción en el componente infiltrante, contrario a lo observado para el Her-2/neu. En la correlación de la expresión de los marcadores moleculares entre ambos componentes histológicos y la edad de la paciente, el RE, RP, Bcl2 y proteína p53 se comportaron con ganancia en el inmunomarcaje en el componente infiltrante en mayores de 50 años, resultando significativa la asociación para el RE ($p=0,04$). El análisis de las otras variables del estudio no demostró asociación estadísticamente significativa entre las mismas. Conclusión: la variación de la expresión de los marcadores moleculares entre el componente intraductal e infiltrante en el carcinoma de mama se asocia al grado de malignidad de la lesión.

Palabras claves: cáncer de mama, expresión proteica, carcinogénesis.

VARIATION IN THE EXPRESSION OF MOLECULAR MARKERS BETWEEN THE COMPONENTS OF INTRADUCTAL E INFILTRATING BREAST CANCER

SUMMARY

A study was conducted based on a non-experimental design, cross-descriptive correlational, the results of immunohistochemical patients with the diagnosis of breast carcinoma and the analysis performed in the laboratory of Pathology of the North Metropolitan Hospital during the period 1999-2006. 1096 cases of breast carcinoma were selected 1090 female and 243 of them with ductal histology intraductal component, in considering each of the previous layer hematoxylin eosin the light microscope. Then they assessed the expression of molecular markers RE, RP, P53, BCL2, HER-2/neu in both histological components. Of the cases under review, was met at age 205, where the average it was 42.13 years and 48.14% of them were under 50 years. The molecular markers were made more hormone receptors, Her-2/neu and protein p53. In relation to the histological grade of each component in the intraductal over 60% was low grade, and in infiltrating ductal, over 30% were grade II of all cases where it became known feature. The tumor size in 44.02% of the cases, was less than 5 cm. Of the 115 cases where we knew the clinical stage and nodal status, were 23.86% and 25.92% stage II presented axillary nodal metastatic disease. The molecular markers RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu, were expressed in both components (intraductal infiltrating e) of the tumor in more than

70% of cases, introducing the expression of individual differences, according to the pathological. The Bcl2, RE, RP and p53 were more positive than in infiltrating the intraductal component, the difference being significant for the RP ($p=0.04$) and protein p53 ($p=0.00001$), Her-2/neu was observed more positive in the intraductal component than the invader ($p=0.02$). In considering the intensity of immunomarcage or staining, the RP and p53 were expressed with a performance gain over that loss in the staining in infiltrating component, contrary to what was observed for Her-2/neu. In the correlation of the expression of molecular markers between the two components histological and age of the patient, the RE, RP, Bcl2 and protein p53 behaved with the immunomarcage gain in component infiltrating older than 50 years, resulting in significant association for the RE ($p=0.04$). Analysis of the other variables in the study did not demonstrate statistically significant association between them. Conclusion: The variation in the expression of molecular markers between the intraductal component and in infiltrating breast carcinoma is associated with the degree of malignancy of the lesion.

Keywords: breast cancer, protein expression, carcinogenesis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es considerado debido a su frecuencia, a la cantidad de recursos que consume y a la alarma social que genera, un problema de salud generalmente prioritario para las administraciones sanitarias en todo el mundo. De manera global se ha registrado un incremento marcado en su incidencia, que al parecer está relacionado con la edad, ya que es mayor en mujeres de edad avanzada, al desarrollo de campañas de divulgación y detección más intensa, o a un comportamiento cambiante de los factores de riesgo. Sin embargo, algunos análisis concluyen que las causas de ese aumento no se pueden explicar con facilidad, mientras que otros argumentan que esas razones son en gran medida desconocidas (1-8).

De las estadísticas internacionales se desprende, que para los países industrializados ésta constituye la primera causa de mortalidad oncológica para su población femenina, en donde 75% de los casos se diagnostica en estadios iniciales. En Venezuela, donde representa también la primera causa de muerte por cáncer en la mujer, la situación es completamente inversa, ya que el mayor porcentaje de casos se diagnostica en estadios avanzados, cuya evolución y pronóstico resultan ser desafortunados (9,10).

De una paciente a otra, el curso clínico del carcinoma de mama infiltrante es muy heterogéneo, en relación a las alteraciones que implican su origen y desarrollo, a la gran diversidad genética y fenotípica, como a la capacidad de respuestas del sistema inmunológico de cada una frente al tumor (11-15).

Para predecir el curso de la enfermedad, es fundamental conocer los elementos del tumor que implican la capacidad o el potencial de invasión del mismo, como las características morfológicas, biológicas y aquellas de carácter clínico (11,12,16-24).

En ese sentido y con el fin de comprender el comportamiento del carcinoma de mama, son numerosos los trabajos que se han desarrollado y publicado en la literatura médica en los últimos 40 años. Desde los que se enfocaron en las características morfológicas, determinaron por primera vez los receptores hormonales (16,17,18,20-31) correlacionaron los anteriores y otras características patológicas, identificaron y localizaron varias isoformas, como los mecanismos de regulación, o determinaron otros marcadores moleculares de forma aislada o simultáneamente (12,30-67) hasta los basados en la secuencia y organización del genoma humano con métodos de alto rendimiento (*High-throughput Analysis*) han permitido construir la base de los conocimientos actuales (68-75).

Los métodos de alto rendimiento, basados en el análisis masivo de múltiples moléculas de ADN, ARN o proteínas como marcadores genéticos, permitieron identificar perfiles de expresión de ésta neoplasia, proporcionando las bases para mejorar la taxonomía y su clasificación molecular, como el agrupamiento jerárquico (68-75).

Así mismo, el análisis de los patrones de expresión proteica por inmunohistoquímica en correlación con los microarrays, ha contribuido en su caracterización y clasificación (73-76), arrojando algunas luces acerca de su progresión, la cual aún se trata de definir en base a cuadros moleculares, morfológicos e inmunohistoquímicos (15,77,78). Es así que se puede afirmar que los carcinomas de bajo grado expresan receptores hormonales, proteína p53, Her-2/neu negativo y pérdida 16q, mientras los de alto grado se muestran negativos para los receptores hormonales y sobreexpresan el Her-2/neu con cariotipos complejos (15,70,71).

Indudablemente, los hallazgos de las dos últimas décadas agregaron nuevos conocimientos sobre su biología, donde un aspecto de importancia, es conocer que su origen no sólo responde a influencia hormonal y del medio ambiente, sino también que es el resultado de la acumulación de una serie de mutaciones genéticas (amplificación y mutación de un número de oncogenes, como la inactivación de genes supresores), y su desarrollo, un proceso secuencial de múltiples etapas, que se

inicia con las alteraciones en el epitelio de la unidad ductolobular normal, determinando en conjunto la aparición y progresión del carcinoma (13,63,64,65).

La mayoría de esas alteraciones genéticas, conocidas en el carcinoma infiltrante, también están presentes en el intraductal (77-89) y más recientemente, se han identificado otras anormalidades del mismo orden en las células epiteliales normales adyacentes a las neoplásicas, como en los cambios proliferativos benignos. Sin embargo, los procesos de iniciación, como las vías precisas de la génesis tumoral de la mama son aun poco conocidas, apuntando la evidencia clínico-patológica actual, la teoría de que la mayoría de las lesiones invasoras se desarrollan a partir de las lesiones intraductales, sin aún descifrar, el crítico acontecimiento de inicio y la subsecuente secuencia de eventos celulares asociados con dicha progresión, ni con los que ocurren para una metástasis regional, a distancia o en una lesión recurrente (13,15,68-76).

Partiendo de esa secuencia de eventos desconocidos dentro del epitelio mamario para la progresión de un carcinoma no invasor a infiltrante y representando los marcadores moleculares la expresión de los productos proteicos del perfil genético de la neoplasia que pueden contribuir a identificar dichos cambios, se planteo realizar un análisis de la variación en la expresión de los marcadores moleculares, más comúnmente determinados por técnica de inmunohistoquímica, entre el componente intraductal y el ductal infiltrante presentes en el mismo tumor.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Analizar la variación de la expresión de los marcadores moleculares más comúnmente determinados por técnica de inmunohistoquímica (estrógeno, progesterona, p53, Her-2/neu y Bcl2) entre el componente intraductal y el ductal infiltrante del carcinoma de mama, presente en el mismo tumor, en las pacientes a las cuales se le realizó estudio de inmunohistoquímica en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte, en el período comprendido entre 1999-2006.

Objetivos específicos

- Determinar la expresión de los marcadores moleculares realizados por técnica de inmunohistoquímica (estrógeno, progesterona, p53, Her-2/neu y Bcl2) en el componente intraductal y ductal infiltrante del mismo tumor.
- Comparar la expresión de los marcadores moleculares realizados, entre el componente intraductal y ductal infiltrante del mismo tumor.
- Determinar la relación entre la variación expresión de los marcadores moleculares y el tamaño del tumor.

- Determinar la relación entre la variación expresión de los marcadores moleculares y el estado de los ganglios linfáticos.
- Determinar la relación entre la variación expresión de los marcadores moleculares y el estadio clínico.
- Determinar la relación entre la variación expresión de los marcadores moleculares y el grado histológico.
- Determinar la relación entre la variación expresión de los marcadores moleculares y la edad.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio no experimental, transversal de tipo descriptivo-correlacional, del resultado inmunohistoquímico de pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama.

Mediante la revisión del archivo de láminas de inmunohistoquímica del laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte, se identificaron 1096 casos con el diagnóstico de carcinoma de mama y su correspondiente estudio inmunohistoquímico, realizados durante el periodo 1999-2006.

Se examinaron al microscopio de luz 1090 láminas de hematoxilina eosina de casos que cumplieron el criterio de sexo femenino e histología ductal infiltrante con componente intraductal (figura 1 y 2) verificado en 243, a los que seguidamente se les valoró la expresión de los marcadores moleculares para receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), la proteína p53, Bcl2 y Her-2/neu en ambos componentes histológicos, excluyendo los estudios inmunohistoquímicos que mostraran sobrefijación de la muestra, representados por la negatividad de todos los marcadores moleculares, en especial del Ki67.

Consecutivamente se recopiló la información de las láminas pertinentes, como del análisis anatomopatológico definitivo y de las historias clínicas disponibles, evaluando además el tamaño tumoral, estado de los ganglios linfáticos, grado histológico, estadio clínico y la edad.

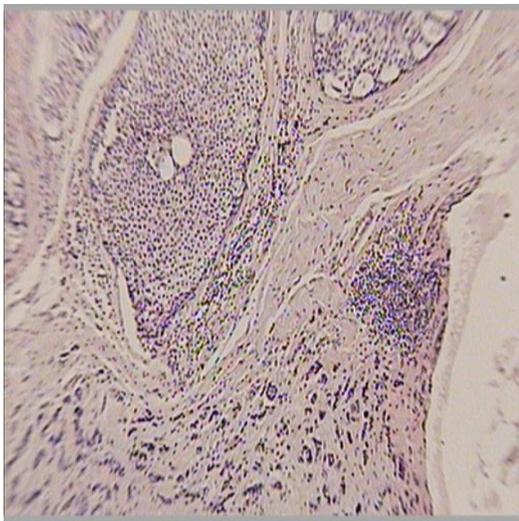


Figura 1. HE 50X.

Carcinoma de mama. Lámina de hematoxilina eosina con componente intraductal de bajo grado sin necrosis y componente infiltrante de grado histológico II.

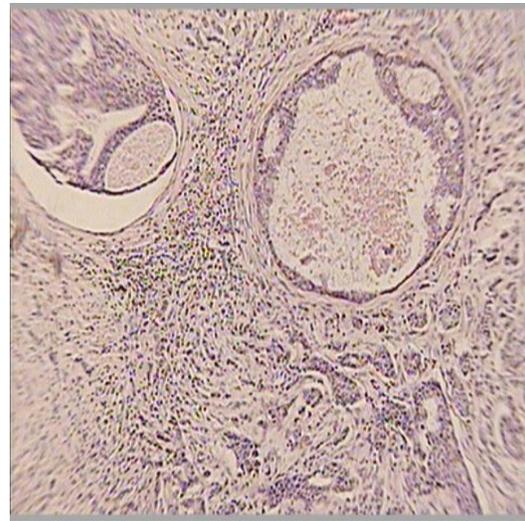


Figura 2. HE 50X.

Carcinoma de mama. Lámina de hematoxilina eosina con componente intraductal de bajo grado con necrosis y componente infiltrante de grado histológico III.

La determinación de la expresión de los marcadores moleculares, se realizó con la técnica de biotina estreptavidina peroxidasa, empleando anticuerpos del receptor de estrógeno (clon 1D5) y progesterona (clon 1A6), como de las proteínas

p53 (clon D0-7), Bcl2 (clon 124) y Her-2/neu (Herceptest), todos de la marca comercial Dako®.

La técnica realizada consistió en 3 a 5 cortes con un espesor de 2 micras del bloque de parafina de cada paciente, los cuales se colocan en una lámina portaobjeto, tratada con la solución recuperadora de antígenos (poli-L-lisina) por 30 minutos, secándose con estufa a temperatura de 96-98°C. Seguidamente y por cambios de 5 minutos cada uno, se desparafinan en xilol, deshidratan con alcoholes al 100% en tres cambios respectivamente e hidratan con alcoholes decrecientes de 95 a 70% en dos cambios, lavándose con agua destilada.

La recuperación antigénica, se efectuó por calor con horno microonda, colocando las láminas en solución buffer citrato pH 6, cada lámina se lava con buffer pH 7,4 y se le coloca una gota de peróxido de hidrógeno al 3% para inhibir la peroxidasa endógena, lavándose tres veces con buffer pH 7,4 para colocarle una gota de bloqueador de proteínas por 30 minutos. Posteriormente se coloca 50 microlandadas del anticuerpo primario previamente diluido con buffer pH 7,4 en una proporción de 1:50 durante 16 horas y luego la biotina como el anticuerpo secundario y la estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 30 minutos cada uno, previo tres lavados con buffer pH 7,4 después de cada anticuerpo y la estreptavidina. Se realiza el revelado colocando una gota de una mezcla obtenida de 1 cc de buffer sustrato con

una gota de diaminobencidina por 30 a 45 segundos, lavándose con agua destilada para darle coloración de fondo con Hematoxilina de Mayer por 60 segundos.

A continuación se lava por 5 minutos en agua, se deshidrata mediante cinco cambios de alcohol al 100%, aclarándose mediante dos cambios con xilol para montar con martex y colocar el cubreobjeto, identificándose finalmente con fecha y número el caso.

El resultado del marcaje inmunohistoquímico en las células tumorales se define por la tinción a nivel nuclear para el receptor de estrógeno, progesterona y p53, citoplasmático para el Bcl2 y de la membrana citoplasmática para el Her-2/neu. La positividad es medida en una escala semicuantitativa en cruces y porcentajes.

El marcaje del receptor de estrógeno, progesterona, p53 y Bcl2, se tomó como 0 o negativo, cuando no hay tinción, 1+, cuando es leve y corresponde entre 10 a 29% de las células positivas, 2+ al ser moderada y entre el 30 a 69% o 3+ al ser intensa y tiñe el 70 a 100% de los núcleos o el citoplasma según el marcador molecular.

El marcaje del Her-2/neu se tomó como negativo cuando es 0 y no hay tinción de membrana o es 1+ y aquella es débil e incompleta en al menos el 10 % de las células tumorales. Es positivo, 2+ cuando la tinción es moderada y completa en toda

la membrana en más del 10% y 3+ cuando es intensa en toda la membrana celular en más del 10% de la población tumoral.

Al evaluar la expresión de los marcadores moleculares según el componente histológico del tumor desde el carcinoma no invasor al invasor, la inmunotinción permitió distinguir inicialmente tres categorías de la misma: *negativos/positivos*, cuando no existe expresión en el intraductal (negativos) y si en infiltrante (positivos), o lo contrario *positivos/negativos*, e *iguales* para los que mantienen el marcaje, fuera éste negativo o positivo en ambos tipos histológicos, seguidamente y por la variación de la intensidad de la inmunotinción o marcaje, se diferenció también como *ganancia* cuando aumenta la intensidad de expresión por el número de cruces desde el carcinoma intraductal al infiltrante, *pérdida* cuando decrecen aquellas en la misma dirección e *iguales* para los que mantienen su expresión sin cambios en ambos componentes.

Los resultados se distribuyeron en tablas de frecuencia absolutas, relativas y contingencias. Para el análisis e interpretación de los resultados, se procedió mediante el estudio cuantitativo de datos, se utilizó la prueba de χ^2 , bondad de ajuste y homogeneidad de proporciones, considerando el valor de probabilidad estadística significativo para valores de $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

El curso clínico de los pacientes con cáncer de mama es muy heterogéneo en relación a las alteraciones que implican su origen y desarrollo (11,15). La incorporación de marcadores moleculares para la caracterización de estos tumores es útil para la evaluación clínica de los mismos, como también por ofrecer herramientas que puedan ayudar a comprender el proceso de la carcinogénesis (12,15,21,23,24,31,69,70,71,75).

En este estudio fue evidente que los marcadores moleculares RE, RP, p53, Bcl2 y Her-2/neu se expresan tanto en el componente intraductal como en el infiltrante del carcinoma de mama que se presenta en un mismo tumor, aunque con diferencias en el inmunomarcaje según el tipo histológico.

Es así que la inmunotinción fue característicamente más intensa en orden decreciente para p53, RP, RE y Bcl2 en el componente invasor, como el Her-2/neu en el intraductal lo que comparte similitudes y discrepancias con otros estudios (11,12,67,78,79,81,85,90,91), diferencias que pueden ser debidas, en parte, al empleo de distintos anticuerpos o metodologías, la variabilidad de criterios de positividad, el método de contaje, las diferencias en el procesamiento técnico (heterogeneidad en las condiciones de fijación y en las técnicas de desenmascaramiento antigénico) e incluso en el tiempo de almacenamiento de las preparaciones antes de realizar el estudio

inmunohistoquímico.

El RE y RP que normalmente se expresa en las células epiteliales del ducto mamario sin ningún tipo de alteración patológica, suelen encontrarse en el carcinoma intraductal y en el ductal infiltrante con grados de expresión variable como lo señalan algunos autores (12,92,93). El hallazgo que tanto el RE como el RP se expresen en ambos componentes histológicos (intraductal e infiltrante) del mismo tumor, con un patrón que exhibe ganancia del inmunomarcaje en el componente invasor, representa un hallazgo hasta ahora no descrito en ningún otro estudio.

La explicación a ese marcate, muy probablemente es una condición en la evolución del grado de malignidad, relacionado con el grado histológico de cada componente presente en el mismo tumor (bajo grado en el intraductal vs grado I-II en el ductal infiltrante), a lo que la literatura adiciona la negatividad de ambos receptores con presencia de lesiones de alto grado o mal diferenciadas (15,78).

Por otra parte, el comportamiento del tumor que expresa RE(-)/RP(-), RE(+)/RP(-) o RE(-)/RP(+) es bien conocido (50,74,78,94), sin embargo, el hallazgo de éste estudio, pudiera inclusive distinguir a un subtipo diferente de lesión histológica dentro del carcinoma de mama, con un comportamiento que revisar.

La expresión de la proteína p53 y Her-2/neu como lo sugieren diversos artículos, es de innegable valor pronóstico tanto en carcinoma intraductal como infiltrante, asociado a la cinética celular y otras características morfológicas, entretanto pocos estudios mencionan los hallazgos de tumores que exhiben ambos tipos histológicos considerando estos y otros marcadores moleculares como el significado para la progresión del carcinoma de mama (17,31,50,52,55,56,61,66,77,78,79,83).

En este estudio, la inmunotinción de la proteína p53 con predominio de la ganancia sobre la pérdida en el inmunomarcaje desde el tipo histológico intraductal al infiltrante, como el comportamiento contrario observado respecto al Her-2/neu, permite definir que la expresión de ambos marcadores que se modifica de uno a otro componente en esa dirección y de ésta forma, se relaciona también con el grado de malignidad, y por lo tanto, estarían implicados en la evolución de lesiones biológicamente más agresivas, aumentando el potencial invasor de las células del ducto alteradas por los cambios neoplásicos, lo que refleja a la par de la adquisición de mutaciones del gen respectivo, la información de unos marcadores de valor pronóstico-predictivo también por el potencial para la progresión (17,52,55,56,61,66,77,78,79,83,85).

La expresión del Bcl2, que se comporta con una ganancia sutil en intensidad del inmunomarcaje hacia el componente infiltrante en relación a los otros,

probablemente sea un inmunomarcador que inicia la aparición en relación inversa a la expresión de los anteriores p53 y Her-2/neu, cuya connotación deba ser mejor soportada con igual número de todos los marcadores a la hora del análisis. Entretanto otras publicaciones han documentado su expresión fuertemente asociada al tipo intraductal, RE negativo con una relación inversa de la proteína P53 y Her-2/neu (86,87).

Aunque la mayoría de los estudios apoyan el papel protector de Bcl-2 (12,50,56,95,96), también se ha asociado su expresión a la progresión en las metástasis del cáncer de mama (97).

Respecto a la variación de la expresión de los marcadores moleculares según el componente histológico y las otras variables del estudio, se evidenció en relación con el tamaño tumoral que la proteína p53, presentó un marcaje más intenso a mayor tamaño de la lesión, sin otro hallazgo en la literatura y explicación por el momento en éste estudio.

Así mismo, el inmunomarcaje del RE, Bcl2 y el Her-2/ neu en relación al grado II-III, fue consistente con un estudio previo (21) que sugiere que la expresión de varios destacados marcadores (p53, Her-2/neu Ki-67, ER, PR, y Bcl2) se correlacionan muy bien con el grado del tumor.

Ante la evidencia de predominio del bajo grado en el carcinoma intraductal (BGSN y BGCN) y grado I-II en la contraparte ductal infiltrante podríamos señalar que las lesiones malignas no invasoras de un determinado grado evolucionan muy probablemente a una invasora de grado similar, lo que comparte similitud con otros artículos en la literatura (69,77,81,83,88). Esto permitiría también apuntar, que la célula que inicialmente se transforma por las alteraciones genéticas determina el fenotipo tumoral y la secuencia genética de eventos a seguir, sin dejar de lado la propuesta que otras alteraciones también pueden ocurrir luego del evento inicial en la transformación neoplásica y en el camino de la agresividad biológica del carcinoma de mama con su subsecuente expresión molecular también variable durante cada etapa de transformación.

La asociación de la variación de la expresión de los marcadores según el componente histológico y la edad desde el carcinoma no invasor a invasor fue significativa para el RE ($p=0,04$). Es bien conocido desde hace un tiempo, que el marcaje de los receptores hormonales, en el carcinoma infiltrante en la población postmenopáusica comparada con la premenopáusica es más frecuente, aunque la expresión simultánea de otros marcadores como Bcl2, p53 y otros más, es algunas veces contradictorio, lo interesante probablemente está observar el marcaje cambiante en relación con los años tanto en el componente no invasor y su contrapartida histológica, en tumores que los exhiban.

Igualmente, la correlación de la variación en la expresión de los marcadores del estudio con las otras variables, como el estadio clínico y el estado nodal de la axila, no produjo resultados significativos.

CONCLUSIONES

La identificación de la expresión proteica en la glándula mamaria que sufre la transformación neoplásica, tiene gran peso por la información adicional para la clasificación actualmente dada a conocer, en éste estudio se muestra la variación del inmunomarcaje del RE, RP, p53, y Her-2/neu entre el carcinoma intraductal e infiltrante colindando en el mismo tumor y algunos cambios de la expresión del grado de malignidad.

El incremento en la expresión de receptores hormonales, la alteración de la proteína p53 y la expresión Her-2/neu, en el carcinoma de mama con estos componentes histológicos, permiten discriminar pasos implicados en el proceso de la carcinogénesis mamaria.

Indudablemente, existe otros los elementos implicados en mecanismos de la carcinogénesis que debemos determinar, y lo que impone el desarrollo de un diseño, que incluya una serie de mayor número, que permita comparar incluso otras variables morfológicas y otros biomarcadores con el fin de establecer el verdadero significado

de la expresión de los mismos en el camino completo de la progresión tumoral de esta neoplasia.

La importancia está por tanto, en la posibilidad de estratificar a las pacientes en distintos grupos de acuerdo a resultados más categóricos de los cambios en la expresión de dichos marcadores moleculares entre uno y otro componente en estos tumores.

Los alcances de estos hallazgos, o su utilidad en la toma de decisiones terapéuticas, son interrogantes que otras investigaciones y el tiempo probablemente puedan responder.

RESULTADOS

De los casos objetos de estudio, se observaron características generales. De acuerdo a la edad, en 205 casos donde ésta se conoció, el promedio de la misma fue 42,13 años y de ellos 48,14% eran menores de 50 años. Los marcadores moleculares más realizados fueron receptores hormonales, Her-2/neu y la proteína p53.

En relación al grado histológico de cada componente, en el intraductal más del 60% fue de bajo grado, mientras en el ductal infiltrante, más del 30% fue grado II del total de casos donde ésta característica se conoció. El tamaño tumoral en 44,02% de los casos, fue menor a 5 cm. De los 115 casos donde se conoció el estadio clínico y el estado nodal, 23,86% eran estadio II y 25,92% presentaron enfermedad metastásica nodal axilar. El tratamiento con quimioterapia adyuvante se llegó a precisar en solo 40,32% de los casos (Tabla 1).

Los marcadores moleculares RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu, se expresaron en ambos componentes (intraductal e infiltrante) del tumor en más del 70% de los casos. Sin embargo, la expresión de cada uno presentó diferencias, según el tipo histológico donde son valorados, observándose para el Bcl2, RE, RP y p53 que fueron más positivos en el componente infiltrante que en intraductal, incluso en mayor número de casos los dos últimos (RP y p53), siendo significativa la diferencia para el RP

($p=0,04$) y la proteína p53 ($p=0,00001$), (figura 3,4,5,6), mientras el Her-2/neu se observó más positivo en el componente intraductal que en el invasor (Tabla 2)

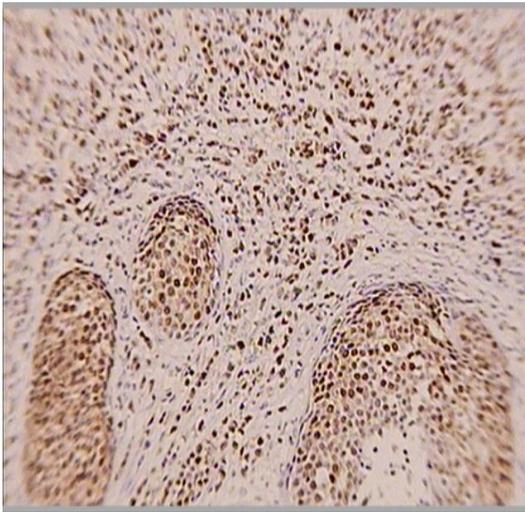


Figura 3. Carcinoma de mama. RP 100X.

RP marcando ambos en componentes del tumor (intraductal e infiltrante).

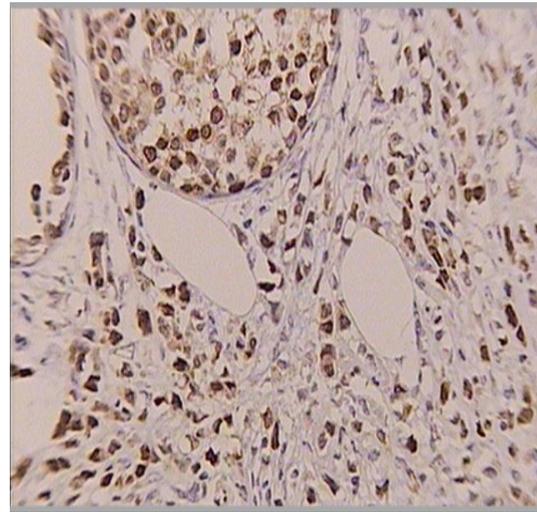


Figura 4. Carcinoma de mama. RP 200X.

RP marcando 50% (2+) en el componente intraductal y el 90% (3+) en el componente infiltrante.

Se observó expresión de los marcadores moleculares del estudio, en más del 70% de los casos, en ambos componentes del tumor, con un patrón variable para cada uno al considerar la intensidad del inmunomarcaje o la tinción. Es así que la intensidad del marcate para el RP (figura 3 y 4) y p53 (figura 5 y 6) se presenta con un comportamiento de más ganancia que pérdida en la tinción en el componente infiltrante, contrario a lo observado con el Her-2/neu (figura 7 y 8), el cual tiene pérdida en la intensidad de marcate sobre el componente invasor y ganancia en el

intraductal, representando significancia la diferencia de su expresión (Her-2/neu, $p=0,02$).

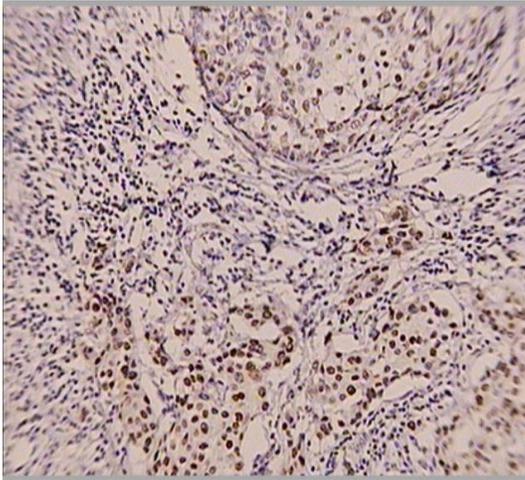


Figura 5. Carcinoma de mama. p53 100X.

Proteína p53 marcando en ambos componentes del tumor (intraductal e infiltrante).

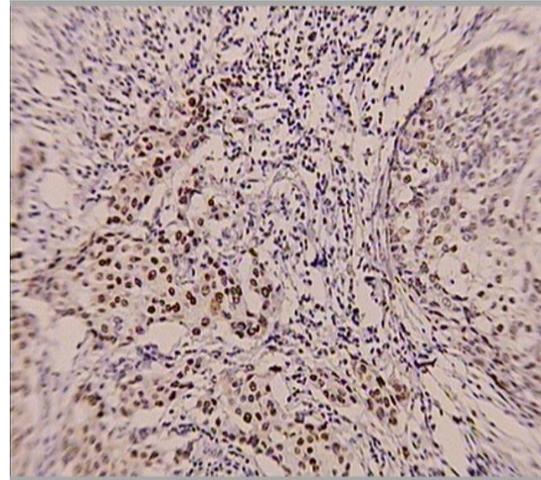


Figura 6. Carcinoma de mama. p53 200X.

Proteína p53 marcando 20% (2+) en el componente intraductal y el 90% (3+) en el componente infiltrante.

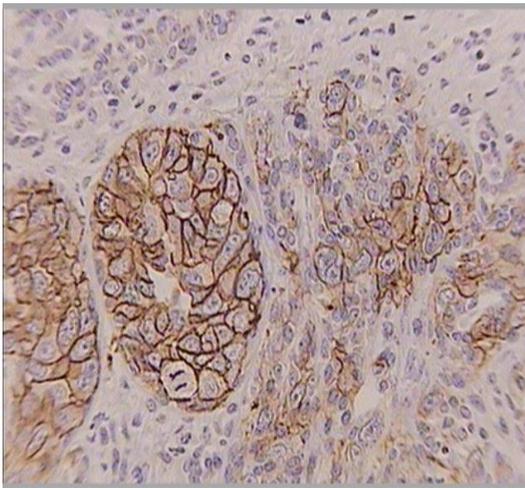


Figura 7. Carcinoma de mama. Her 2/neu 200X.

Her-2/neu positivo en ambos componentes (intraductal e infiltrante).

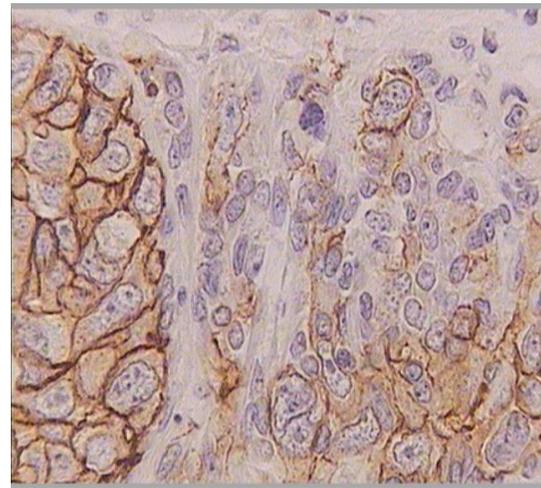


Figura 8. Her 2/neu 400X.

Her 2/neu positivo fuerte (3+) en el componente intraductal y positivo débil (2+) en el infiltrante.

TABLA 1

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PACIENTES CON CARCINOMA DE MAMA CON AMBOS COMPONENTES, INTRADUCTAL - DUCTAL INFILTRANTE

Características	Indicador	n	%
Edad	≤ 50 años	117	48,14
	> 50 años	88	36,21
	No conocida	38	15,63
Marcadores ¹	RE	233	95,88
	RP	234	96,29
	p53	143	58,84
	Bcl2	79	32,51
	Her-2/neu	222	91,35
Grado histológico del intraductal	BGSN	75	30,86
	BGCN	92	37,86
	AGSN	14	5,76
	AGCN	62	25,51
Grado histológico del ductal infiltrante	I	11	4,52
	II	85	34,97
	III	20	8,23
	No conocido ²	127	52,26
Tamaño tumoral	< 2 cm	35	14,4
	2 – 5 cm	72	29,62
	> 5 cm	8	3,29
	No conocido ²	128	52,67
Estado nodal	Con metástasis	63	25,92
	Sin metástasis	52	21,39
	No conocido ²	128	52,67
Estadio clínico	I	26	10,69
	II	58	23,86
	III	40	16,46
	IV	4	1,64
	Sin estadio ²	115	47,32
Neoadyuvancia	Si	71	29,21
	No	27	11,11
	No conocida ²	145	59,67

¹% de casos a los que se les realizó el estudio del marcador, basado en n = 243

²Casos en los cuales el dato no venía indicado en la hoja de solicitud y provenían de centros de salud extrahospitalarios.

Fuente: Resultados de la investigación.

TABLA 2
EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu) SEGÚN EL COMPONENTE INTRADUCTAL - DUCTAL INFILTRANTE EN EL CARCINOMA DE MAMA

Componente intraductal/ductal infiltrante	RE		RP		p53		Bcl2		Her-2/neu	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Negativos/Positivos	12	5,15	17	7,26	26	18,18	4	5,06	14	6,30
Positivos/Negativos	5	2,14	7	3,33	3	2,09	1	1,26	20	9,00
Iguales	216	92,70	210	89,74	114	79,72	74	93,67	188	84,68
Total	233	100	234	100	143	100	79	100	222	100

Fuente: Resultados de la investigación.

TABLA 3
VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu) SEGÚN EL COMPONENTE INTRADUCTAL - DUCTAL INFILTRANTE EN EL CARCINOMA DE MAMA

Componente intraductal/ductal infiltrante	RE		RP		p53		Bcl2		Her-2/neu	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ganancia	18	7,72	33	14,10	46	32,1	8	10,12	19	8,55
Pérdida	26	11,15	27	11,53	6	4,19	6	7,59	35	15,76
Iguales	189	81,11	174	74,35	91	63,6	64	81,01	168	75,67
Total	233	100	234	100	143	100	79	100	222	100

Fuente: Resultados de la investigación.

TABLA 4

RELACIÓN ENTRE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu) SEGÚN EL COMPONENTE INTRADUCTAL - DUCTAL INFILTRANTE Y EL TAMAÑO TUMORAL EN EL CARCINOMA DE MAMA

Marcador molecular	Componente intraductal/ductal infiltrante	Tamaño tumoral					
		< 2cm		2 - 5 cm		> 5 cm	
		n	%	n	%	n	%
RE	Ganancia	1	3,33	5	7,04	-	-
	Perdida	2	6,66	10	7,04	-	-
	Iguales	27	90,00	56	78,87	8	100
	Total	30	100	71	100	8	100
RP	Ganancia	4	11,11	11	15,49	1	12,50
	Perdida	3	8,33	8	11,26	-	-
	Iguales	29	80,55	52	73,23	7	87,50
	Total	36	100	71	100	8	100
p53	Ganancia	8	40,00	17	43,58	3	75,00
	Perdida	1	5,00	-	-	-	-
	Iguales	11	55,00	22	56,41	1	25,00
	Total	20	100	39	100	4	100
Bcl2	Ganancia	3	15,00	3	10,34	-	-
	Perdida	5	25	2	6,89	-	-
	Iguales	12	60,00	24	82,75	1	100
	Total	20	100	29	100	1	100
Her-2/neu	Ganancia	1	3,84	9	18,75	-	-
	Perdida	4	15,38	9	18,75	-	-
	Iguales	21	80,76	30	62,50	3	100
	Total	26	100	48	100	3	100

Fuente: Resultados de la investigación.

TABLA 5

RELACIÓN ENTRE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu) SEGÚN EL GRADO DEL COMPONENTE HISTOLÓGICO EN EL CARCINOMA DE MAMA

Marcador molecular	Componente intraductal/ductal infiltrante	Grado histológico					
		I		II		III	
		n	%	n	%	n	%
RE	Ganancia	1	9,09	3	3,65	1	5,00
	Perdida	4	36,36	9	10,97	1	5,00
	Iguales	6	54,54	70	85,36	18	90,00
	Total	11	100	88	100	20	100
RP	Ganancia	2	20,00	8	9,63	4	21,05
	Perdida	3	30,00	7	8,43	2	10,52
	Iguales	5	50,00	68	81,92	13	68,42
	Total	10	100	83	100	19	100
p53	Ganancia	6	50,00	17	35,41	4	36,36
	Perdida	-	-	2	4,16	-	-
	Iguales	6	50,00	29	60,41	7	63,63
	Total	12	100	48	100	11	100
Bcl2	Ganancia	2	28,57	4	11,11	1	14,28
	Perdida	-	-	6	16,66	1	14,28
	Iguales	5	71,42	26	72,22	5	71,42
	Total	7	100	36	100	7	100
Her-2/neu	Ganancia	1	3,48	8	10,25	3	15,78
	Perdida	3	27,27	14	17,94	2	10,52
	Iguales	7	63,63	56	71,79	14	73,68
	Total	11	100	78	100	19	100

Fuente: Resultados de la investigación.

TABLA 6

RELACIÓN ENTRE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu) SEGÚN EL COMPONENTE INTRADUCTAL - DUCTAL INFILTRANTE Y EL ESTADIO CLÍNICO EN EL CARCINOMA DE MAMA

Marcador molecular	Componente intraductal/ductal infiltrante	Estadio clínico							
		I		II		III		IV	
		n	%	n	%	n	%	n	%
RE	Ganancia	-	-	5	8,92	1	2,77	-	-
	Perdida	1	3,84	9	16,07	3	8,33	1	25,00
	Iguales	25	96,15	42	75,00	32	88,88	3	75,00
	Total	26	100	56	100	36	100	4	100
RP	Ganancia	1	3,84	8	14,81	6	16,21	-	-
	Perdida	3	11,53	2	3,70	5	13,51	1	25,00
	Iguales	22	84,61	44	81,48	26	70,27	3	75,00
	Total	26	100	54	100	37	100	4	100
p53	Ganancia	9	60,00	11	31,42	11	42,30	-	-
	Perdida	-	-	1	2,85	2	7,69	-	-
	Iguales	6	40,00	23	65,71	13	50,00	1	100
	Total	15	100	35	100	26	100	1	100
Bcl2	Ganancia	1	8,33	3	16,66	3	15,78	-	-
	Perdida	2	16,66	2	11,11	4	21,05	-	-
	Iguales	9	56,25	13	72,22	12	63,15	1	100
	Total	12	100	18	100	19	100	1	100
Her-2/neu	Ganancia	2	8,00	2	3,63	6	17,64	-	-
	Perdida	6	24,00	9	16,36	5	14,70	-	-
	Iguales	17	68,00	44	80,00	23	67,64	1	100
	Total	25	100	55	100	34	100	1	100

Fuente: Resultados de la investigación.

TABLA 7

RELACIÓN ENTRE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu) SEGÚN EL COMPONENTE INTRADUCTAL - DUCTAL INFILTRANTE EN EL CARCINOMA DE MAMA Y EL ESTADO DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS AXILARES

Marcador molecular	Componente intraductal/ductal infiltrante	Ganglios linfáticos			
		Sin metástasis		Con metástasis	
		n	%	n	%
RE	Ganancia	2	3,77	4	8,51
	Perdida	7	13,20	7	14,89
	Iguales	44	83,01	36	76,59
	Total	53	100	47	100
RP	Ganancia	4	7,27	11	18,03
	Perdida	4	7,27	9	14,75
	Iguales	47	85,45	41	67,21
	Total	55	100	61	100
p53	Ganancia	10	29,41	17	41,46
	Perdida	-	-	3	7,31
	Iguales	24	70,58	21	51,21
	Total	34	100	41	100
Bcl2	Ganancia	3	12,50	4	17,39
	Perdida	5	20,83	3	13,04
	Iguales	16	66,66	16	60,56
	Total	24	100	23	100
Her-2/neu	Ganancia	5	10,20	8	12,90
	Perdida	9	18,36	9	14,51
	Iguales	35	71,42	45	72,58
	Total	49	100	62	100

Fuente: Resultados de la investigación.

TABLA 8

RELACIÓN ENTRE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RE, RP, p53, Bcl2, Her-2/neu) SEGÚN EL COMPONENTE INTRADUCTAL - DUCTAL INFILTRANTE EN EL CARCINOMA DE MAMA Y LA EDAD

Marcador molecular	Componente intraductal/ductal infiltrante	Edad			
		≤ 50 años		> 50 años	
		n	%	n	%

RE	Ganancia	9	7,96	9	8,57
	Perdida	17	15,04	5	4,76
	Iguals	87	76,99	91	88,66
	Total	113	100	105	100
RP	Ganancia	15	13,63	17	17
	Perdida	17	15,45	8	8
	Iguals	78	70,9	75	75
	Total	110	100	100	100
p53	Ganancia	21	33,33	24	41,37
	Perdida	1	1,58	4	6,82
	Iguals	41	65,07	30	51,72
	Total	63	100	58	100
Bcl2	Ganancia	3	8,57	4	11,11
	Perdida	3	8,57	3	8,33
	Iguals	29	82,85	29	80,55
	Total	35	100	36	100
Her-2/neu	Ganancia	11	9,09	7	7,36
	Perdida	18	18,18	14	14,73
	Iguals	77	72,64	74	77,89
	Total	106	100	95	100

Fuente: Resultados de la investigación.

El Bcl2 a diferencia del RP, P53 y Her-2/neu se mantiene con muy poca variación de la tinción entre uno y otro tipo histológico con leve ganancia en el tejido infiltrante (Tabla 3). Al correlacionar la variación de la expresión de los marcadores moleculares según el componente (intraductal e infiltrante) y el tamaño del tumor, se observó que los receptores hormonales, Bcl2 y Her-2/neu en más del 60% de los

casos mantienen una intensidad de marcaje igual en los dos componentes histológicos, con un tamaño tumoral variable, mientras la proteína p53, se comporta de igual forma en menor número de casos. Sin embargo, por la intensidad de la expresión, se observó que la ganancia en el inmunomarcaje es mayor para la proteína p53 con el aumento lineal del volumen o tamaño tumoral en el componente infiltrante (40% a 75% de los casos), que para el Her-2/neu, sin representación significativa estadística (p53, $p=0,36$ y Her-2/neu, $p=0,15$), (Tabla 4).

En la correlación entre la variación de la expresión de los marcadores moleculares según el componente (intraductal e infiltrante) y el grado histológico del tumor, se observó que el RE, RP, Bcl2, p53 y Her2/neu, mantienen igual su expresión en más del 50% de los casos, a mayor grado histológico (grado II-III) en el componente infiltrante. Por otra parte, para los receptores hormonales y el Her-2/neu la pérdida de inmunomarcaje es menos intensa a mayor grado histológico en el tipo infiltrante, resultando sin significancia la relación entre ambas variables ($p>0,05$), (Tabla 5).

Al correlacionar la variación de la expresión del RE, RP, p53, Bcl2 y Her 2/neu entre los componentes histológicos del tumor y el estadio clínico se observó que la expresión, se mantiene igual en ambos componentes del tumor sin afectación aparente por el estadio, aunque con diferencias en el porcentaje de casos para cada uno. Entretanto en el componente infiltrante, la ganancia en marcaje es menor que la pérdida a mayor estadio clínico para el RE y Bcl2 que para el RP, contrario a lo que

ocurre para el p53 que gana más en marcaje que lo que pierde a menor estadio clínico. Respecto al Her-2/neu, la pérdida de intensidad de expresión, se aprecia que tiende a ser sutilmente mayor a menor estadio (II y I), en relación al comportamiento de la ganancia a mayor estadio. La correlación entre ambas variables patológicas no mostró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabla 6).

Cuando se correlacionó la variación de la expresión de los marcadores moleculares entre los componentes histológicos del tumor y el estado de los ganglios linfáticos axilares, se evidenció que entre 51% a 85% de los casos, la intensidad del marcaje permanece igual en ambos componentes histológicos del tumor, siendo ésta más marcada para los receptores hormonales, p53y Bcl2 en tumores que no presentaron ganglios linfáticos metastásicos en la axila, mientras la ganancia en inmunomarcaje se observó en aquellos con la ganglios linfáticos metastásicos, lo que es mayor para el RP, p53 Bcl2. Sin embargo, también se observa que existe perdida de expresión mayor para el Bcl2 que para Her-2/neu, en tumores sin enfermedad nodal metastásica en la axila. Demostrándose solamente tendencia para RP ($p=0,07$), (Tabla 7).

En cuanto a la correlación de la expresión de los marcadores moleculares entre ambos componentes histológicos y la edad de la paciente, se aprecia que el inmunomarcaje para todos ellos se mantiene igual en ambos componentes del tumor, entre 50% a 88% de los casos, sin afectación aparente por la edad. Sin embargo al

discriminar en la intensidad, se observó en el componente invasor del tumor que la ganancia en inmunomarcaje aumenta en paciente mayores de 50 años, para el RE, RP, Bcl2 y p53, incluso en mayor porcentaje de casos para éste último, a diferencia de lo observado en menores de 50 años, donde los mismos receptores hormonales y el Her-2/neu se expresan con mayor pérdida. Resultando la asociación entre ambas variables significativa para el RE ($p=0.04$), (Tabla 8).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. White E, Lee CY, Kristal AR. An evaluation of increase in breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(19):1546-1552.
2. Marra V, Frigerio A, Di Virgilio MR, Menna S, Burke P. *Breast carcinoma diagnosed in mammographic screening incidentally. Research on the radiologic signs in prior mammograms. Radiol Med* 1999; 98(5):342-346.
3. Blanks RG, Wallis MG, Given-Wilson RM. Observer variability in cancer detection during routine repeat (incident) mammographic screening in a study of two versus one view mammography. *J Med Screen* 1999; 6(3):152-158.
4. Rodríguez QA, Domínguez MM, Ayala HV. Cáncer de mama femenina en el Hospital Universitario Dr. Luis Razetti de Barcelona Aspectos Epidemiológicos. *Rev Venez de Oncol* 2000; 12(4):171-178.
5. Kaufman C. Quimioprevención en cáncer de mama. 2000. [Artículo en línea].<http://www.tocogineconet.com.ar/revisiones/quimioprevencion1.htm#intro>. [Consulta: 2006, Abril 19].
6. Aubard Y, Genet D, Eyraud JL, Clavere P, Tubiana-Mathieu N, Philippe HJ. *Impact of screening on breast cancer detection. Retrospective comparative study of two periods ten years apart. Eur J Gynaecol Oncol* 2002; 23(1):37-41.
7. Erba S B, Amos A, Fletcher A, Kavanagh AM, Gertig DM. *Incidence of invasive breast cancer and ductal carcinoma in situ in a screening program by age: should older women continue screening? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(10):1569-1573.
8. Luke C, Priest K, Roder D. Changes in incidence of in situ and invasive breast cancer by histology type following mammography screening. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7(1):69-74.

9. Ravelo Celis JA. Avances en el diagnóstico del cáncer de la mama. Importancia de la pesquisa y diagnóstico precoz. Reflexiones sobre el problema en Venezuela. *Gac Méd Caracas* 2001; 109(3):389-417.
10. Gómez Rodríguez A. Cáncer de mama. 2002. [Artículo en línea]. Disponible: <http://www.ovepem.org.ve/paginas/infalmédico/html>. [Consulta: 2006, Abril 19].
11. Clark GM. Prognostic and predictive factors. *Breast Cancer* 1995; 2(2):79-89.
12. Clark GM, McGuire WL. New biologic prognostic factors in breast cancer. *Oncology* 1989; 3(5):49-54.
13. Van De Vijver, M.J. Modelo multi-etapa de las alteraciones genéticas que conducen al carcinoma de mama. *Rev Esp Patol* 1999; 32(3):301. [Artículo en línea]. Disponible <http://www.conganant.org/seap/revista/v32-n3/28.pdf>. [Consulta 2006, Abril 19].
14. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(7):966-978.
15. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; 205(2):248-254.
16. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 327(7):390-398.
17. Pinder SE, Ellis IO, Elston CW. Prognostic factors in primary breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1995; 48(11):981-983.
18. Bettelheim R, Penman HG, Thornton-Jones H, Neville AM. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *Br J Cancer* 1984; 50(6):771-777.
19. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991; 15(4):334-349.

20. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63(1):181-187.
21. Warnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumor markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br. J Cancer* 2001; 85(6):869-874.
22. Hernández MG. La nueva clasificación TNM para el cáncer de mama. *Rev Venez Oncol* 2003; 15(1):59-61.
23. Colozza M, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Bringing molecular prognosis and prediction to the clinic. *Clin Breast Cancer* 2005; 6(1):61-76.
24. Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6(2):147-59
25. Bloom HJ Prognosis in carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1950; 4(3):259-288.
26. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11(3):359-377.
27. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19(5):403-410.
28. Helpap B. Nucleolar grading of breast cancer. Comparative studies on frequency and localization of nucleoli and histology, stage, hormonal receptor status and lectin histochemistry. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1989; 415(6):501-508.
29. Maynard PV, Davis CJ, Blamey RW. Relationship between estrogen-receptor content and histological grade in human primary breast tumors. *Br J Cancer* 1978; 38(6):745-748.
30. McGuire WL, Clark GM. The role of progesterone receptors in breast cancer. *Cancer J Clin* 1986; 36(5):302-309.

31. Ruder AM, Lubin F, Wax Y, Geier A, Alfundary E, Chetrit A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. Epidemiologic characteristics and survival differences *Cancer* 1989; 64(1):196-202.
32. Greene G, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231(4742):1150-1154.
33. Helin HJ, Helle MJ, Kallioniemi OP, Isola JJ. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. Correlation with histopathology and DNA flow cytometry. *Cancer Res* 1989; 63(9): 1761-1767.
34. Menasce P, White R, Harrison J, Boyle M. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH technique. *Genomics* 1993; 17(1):263-265.
35. Maiorana A, Cavallari V, Bagni A, Ussia F, Maiorana MC, Fano RA. Nuclear areas in breast cancer: relationship with estrogen and progesterone receptor expression. *Anal Cell Pathol* 1996; 11(3):199-209.
36. Enmark E, Pello-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M. Human estrogen receptor b gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12):4258-4265.
37. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors- an overview. *J Intern Med* 1999; 246(2):133-138.
38. Iwase H, Omoto Y, Iwata H, Hra Y, Ando Y, Kobayash S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human reast cancer. *Oncology* 1998; 55 Supp 1:11-16.
39. Ratajczak T. Protein coregulators that mediate estrogen receptor function. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13(4):221-229.
40. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 2003; 3(5):281-292.

41. Gao X, Nawaz Z. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4(5):182-186.
42. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol* 2004; 33(2):387-410.
43. Aupperlee M, Smith KT, Kariagina A, Haslam S. *Progesterone receptor isoforms and proliferation in the rat mammary gland during development. Endocrinology* 2005; 146(8):3577-3588.
44. Wiebe JP. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(3):717-738.
45. Leslie KK, Stein MP, Kumar NS, Dai D, Stephens J, Wandinger-Ness A, Glueck DH. Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96(1):32-41.
46. Skildum A, Faivre E, Lange CA. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 2005; 19(2):327-339.
47. Krietsch T, Fernandes MS, Kero J, Losel R, Heyens M, Lam EW, Huhtaniemi I, Brosens JJ, Gellersen B. Human homologs of the putative G protein-coupled membrane progestin receptors (mPRalpha, beta, and gamma) localize to the endoplasmic reticulum and are not activated by progesterone. *Mol Endocrinol* 2006; 20(12):3146-3164.
48. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 72(2):163-172.
49. Reiner A, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemper M, Jakesz R. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and

- prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50(21):7057-7061.
50. Mauri FA, Maisonneuve P, Caffo O. Prognostic value of estrogen receptor status can be improved by combined evaluation of p53, Bcl2 and PgR expression: an immunohistochemical study on breast carcinoma with long-term follow-up. *Int J Oncol* 1999; 15(6):1137-1147.
 51. Nakopoulou L, Lazaris AC, Panayotopoulou EG, Giannopoulou I, Givalos N, Markaki S, Keramopoulos A. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57(5):523-528.
 52. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41(2):178-183.
 53. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Leviston DA, Millis RR. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993; 24(5):469-476.
 54. Silvestrini R, Daidone MG, Benini E. Validation of p53 accumulation as a predictor of distant metastasis at 10 years of follow-up in 1400 node-negative breast cancers. *Clin Cancer Res* 1996; 2(12):2007-2010.
 55. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998; 16(9):3158-68.
 56. Megha T, Ferrari F, Lalinga AV, Lazzi S, Cardone C, Cevenini G, Leoncini L, Tosi P. Cellular kinetics and expression of bcl-2 and p53 in ductal carcinoma of the breast. *Oncol Rep* 2000; 7(3):473-478.
 57. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin W, Ullrich A, Mcguire WC. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 1987; 235(4785):177-182.

58. Slamon DJ, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905):707-712.
59. Slamon DJ. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Cancer Invest* 1990; 8(2):253.
60. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, MC Guire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7(8):1120-1128.
61. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. *Cancer* 1990; 65(8):1794-1800.
62. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H. ERBB2 amplification in breast cancer with high rate of proliferation. *Oncogene* 1991; 6(1):137-143.
63. Seshadri R, Firgaria FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11(10):1936-1942.
64. Molland JG, Barraclough BH, Gebiski V, Milliken J, Bilous M. Prognostic significance of c-erbB-2 oncogene in axillary node-negative breast cancer. *Aust N Z J Surg* 1996; 66(2):64-70.
65. Zhang GJ, Tsuda H, Adachi I, Fukutomi T, Yamamoto H, Hirohashi S. Prognostic indicators for breast cancer patients with one to three regional lymph node metastases, with special reference to alteration in expression levels of bcl-2, p53 and c-erbB-2 proteins. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27(6):371-377.
66. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwege D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, Tzontcheva AT, Sidlofsky S, Hanna WM, Qizilbash AH, Tweeddate ME, Fine S, Mccready DR, Andrulis IL. The combination of p53

mutation and neu/erbB-2 amplification associated with poor survival in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(1):86-96.

67. González Müller C. Características patológicas asociadas al carcinoma de mama HER-2 positivo. *An Fac Med Lima* 2005; 66(2):89-99.
68. Perou CM, Jeffrey SS, Van De Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikoy A, Wuilliams C, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botatein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(16):9212-9217.
69. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen La,Fluge O, Pergamenschikoy A, Wuilliams C, Zhu SX, Lonning PC, Borresen-Dale Al, Brown Po, Botatein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797):747-752.
70. Sørliie Y, Perou CM, Tibshirani R, AAS T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, C, Brown Po, Botstein D, Eystein Lønning PC, Børresen-Dale Al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl. Acad Sci USA* 2001; 98(19):10869-10874.
71. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415(6871):530-536.
72. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14):8418-8423.

73. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, Caldas C. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol* 2003; 12(1):27-34.
74. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(16):5367-5374.
75. Carey L, Perou C, Livasy C, Dressler L, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* 2006; 295(21):2492-2502.
76. Eden P, Ritz C, Rose C, Fernon M, Peterson C. “Good old” clinical markers have similar power in breast cancer prognosis as microarray gene expression profilers. *Eur J Cancer* 2004; 40(12):1837-1841.
77. Leal CB, Schmitt FC, Bento MJ, Maia NC, Lopes CS. Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 1995; 75(8):2123-2131.
78. Poller DN, Roberts EC, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. *Hum Pathol* 1993; 24(5):463-468.
79. Suárez CM, Maisi S, Parada D, Briñez AM, Navas H, Gómez A, Liuzzi F, Tejada A. Inmunohistoquímica y carcinoma mamario in situ. *Rev Venez Oncol* 2002; 14(2):76-86.
80. Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, Symmans WF, Hortobagyi GN, Pusztai L. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3(5): 73-585.

81. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, Mcguire Wl. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1992; 23(9):974-979.
82. Iwase H, Ando Y, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Karamatsu S, Ito Y, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Fujii Y, Mitsuyama S, Kobayashi S. Immunohistochemical analysis on biological markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer* 2001; 8(2):98-104.
83. Megha T, Ferrari F, Benvenuto A, Bellan C, Lalinga A, Lazzi S, Bartolommei S, Cevenini G, Leoncini L, Tosi P. p53 mutation in breast cancer. Correlation with cell kinetics and cell of origin. *J Clinical Pathol* 2002; 55(6):461-466.
84. Wärnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumour markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br J Cancer* 2001; 14;85(6):869-874.
85. Mylonas I, Makovitzky J, Jeschke U, Briese V, Friese K, Gerber B. Expression of Her2/neu, steroid receptors (ER and PR), Ki67 and p53 in invasive mammary ductal carcinoma associated with ductal carcinoma in situ (DCIS) versus invasive breast cancer alone. *Anticancer Res* 2005; 25(3):1719-1723.
86. Quinn CM, Ostrowski JL, Harkins L, Rice AJ, Loney DP. Loss of bcl-2 expression in ductal carcinoma in situ of the breast relates to poor histological differentiation and to expression of p53 and c-erbB-2 proteins. *Histopathology* 1998; 33(6):531-536.
87. Park SH, Kim H, Song BJ. Down Regulation of Bcl2 Expression in Invasive Ductal Carcinomas Is Both Estrogen- and Progesterone-Receptor Dependent and Associated with Poor Prognostic Factors. *Patho Oncol Res* 2002; 8(1):26-30.

88. Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Welzl, Hofler H, Werner M. Extensive ductal carcinoma In situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. *Int J Cancer* 2000; 85(1): 82-86.
89. Hwang ES, Devries S, Chew KL, Moore DH, 2nd Kerlikowske K, Thor A, Ljung BM, Waldman FM. Patterns of chromosomal alterations in breast ductal carcinoma in situ. *Clin Cancer Res* 2004; 10(15):5160-5167.
90. Bertheau P, Turpin E, Rickman DS, Espié M, de Reyniès A, Feugeas JP, Plassa LF, Soliman H, Varna M, de Roquancourt A, Lehmann-Che J, Beuzard Y Marty M Misset JL Janin A de Thé H. Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen. *PLoS Med* 2007; 4(3):90.
91. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stores paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(15):1054-1059.
92. Leal CB, Schmitt FC, Bento MJ, Maia NC, Lopez CS. Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 1995; 75(8):2123-2131.
93. Parada D David. Biología molecular en el cáncer de mama. *Rev Venez Oncol* 2004; 16(2):30-34.
94. Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer* 2004; 91(12):2012-2017.
95. Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994; 145(5):1191-1197.
96. Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A. Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer. *Cancer Lett* 2007; 247(1):48-55.

97. Planas-Silva MD, Bruggeman RD, Grenko RT, Smith JS. Overexpression of c-Myc and Bcl-2 during progression and distant metastasis of hormone-treated breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2007; 82(1):85-90.