

Subtipos moleculares de cáncer de mama basados en estudios de inmunofenotipo

Molecular subtypes of breast cancer based on immunophenotype studies

Enrique López-Loyo¹, Diana López-Jelenkovic²

RESUMEN

El cáncer de mama representa la primera causa de muerte oncológica en la mujer venezolana. El objetivo del presente trabajo fue establecer la clasificación molecular de cáncer de mama basados en los inmunofenotipos que incluyó 2 769 carcinomas de mama recibidos entre enero de 2005 y diciembre de 2019 en el Laboratorio de Patología del Urológico San Román de Caracas, Venezuela. Todas fueron pacientes femeninas con la mayor frecuencia de los tumores entre los 38 y 77 años. Se encontró expresión o marcaje positivo para los RE de 80,3 % y RP de 71,9 %, respectivamente. La sobreexpresión del oncogén HER2 se determinó con resultado positivo y score 3+ en el 26,3 % de los tumores; los negativos con score de 0 ó 1+ representaron el 64,3 %, para un total de 1 781 tumores y finalmente se diagnosticaron

259 casos con expresión dudosa y score de 2+, para el 9,4 % del total de los casos. Se evaluaron los subtipos moleculares en dos clasificaciones, una clásica basada en RE, RP y HER2 y otra con criterios de St. Gallen 2015 a partir de Ki67 mayor de 20 % que modificó la frecuencia de los Luminales. El subtipo Luminal A pasó de 55,9 % en la clásica a 22,6 % y el Luminal B de 20,2 % a 53,5 %, confirmándolo como el Luminal de peor pronóstico, donde a mayor expresión de Ki67 peor comportamiento clínico. Los HER2 positivos y los Tipo basales, de comportamiento agresivo, no variaron en ambas clasificaciones, con porcentajes de 13,7 y 10,1 respectivamente. El subtipo molecular no mostró relación estadísticamente significativa con los grupos etarios, ni en la clasificación clásica ($p = 0,092$), ni en la basada en el punto de corte de Ki67 mayor o igual de 20 % de expresión ($p=0656$); demostrando la misma conclusión al evaluar la sobreexpresión de HER2 y la edad de las pacientes ($p = 0,773$), por lo cual se deben considerar factores de valor pronóstico estables e independientes que puedan ayudar a la aplicación de protocolos terapéuticos efectivos. Los subtipos moleculares son claves para identificar los parámetros que requiere la medicina personalizada como la estrategia actual más exitosa para combatir el cáncer de mama en todo el mundo.

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2023.131.1.11>

ORCID: 0000-0002-3455-5894¹

ORCID: 0000-0002-5562-5388²

¹Médico Especialista en Anatomía Patológica. Doctor en Ciencias Médicas. Servicio de Patología del Urológico San Román, Caracas, Venezuela. Individuo de Número de la Academia Nacional de Medicina, Sillón XXXI.

²Médico Especialista en Oftalmología, Asistente de Investigación del Servicio de Patología del Urológico San Román. Caracas, Venezuela.

Autor de Correspondencia: Dr. Enrique López-Loyo
E-mail: lopezloyoe@gmail.com

Recibido: 17 de febrero 2023

Aceptado: 27 de febrero 2023

Palabras clave: *Cáncer de mama, Subtipos moleculares, Inmunohistoquímica.*

SUMMARY

Breast cancer represents the leading cause of oncological death in Venezuelan women. This study aimed to establish the molecular classification of

breast cancer based on immunophenotypes that included 2 769 breast carcinomas received between January 2005 and December 2019 at the San Roman Urological Pathology Laboratory in Caracas, Venezuela. Cases consisted of female patients 38-77 years of age, with a higher frequency of tumors. Positive expression of markers was found for ERs of 80.3 % and RPs of 71.9 %, respectively. The HER2 oncogene amplification and overexpression, with a positive result and score of 3+, were present in 26.3 % of the tumors; the negative ones with a score of 0 or 1+ represented 64.3 %, for a total of 1 781 tumors. A total of 259 cases with doubtful expression and a score of 2+ were detected, representing 9.4 %. Molecular subtypes were evaluated in two classifications, a classic one based on ER, RP, and HER2 and another with St. Gallen 2015 criteria from Ki67 greater than 20 % that modified the frequency of the Luminals. The percentages of patients with luminal A subtype were 55.9 % to 22.6 % in the classic, and Luminal B from 20.2 % to 53.5 %, confirming it as the Luminal with the worst prognosis, with the higher expression of Ki67, the worse clinical behavior. The positive HER2 and the basal types, with aggressive behavior, did not vary in both classifications, with percentages of 13.7 and 10.1, respectively. There was no significant relationship between the age groups, neither in the classic classification ($p = 0.092$) nor in that based on the Ki67 cut-off point greater than or equal to 20 % expression ($p = 0.656$), demonstrating the same conclusion when evaluating HER2 overexpression and the age of the patients ($p = 0.773$), for which factors of stable and independent prognostic value should be considered to help the application of effective therapeutic protocols. Molecular subtypes are key to identifying the parameters that require personalized medicine as the current most successful strategy to combat breast cancer worldwide.

Keywords: Breast cancer, molecular subtypes, immunohistochemistry.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa un problema sensible de salud pública en todo el mundo y es de gran impacto en la planificación de los programas epidemiológicos internacionales. Representa la primera causa de muerte oncológica en la mujer venezolana, con 2 499 muertes constatadas en el último registro anual de mortalidad disponible correspondiente al año 2016 publicado en mayo de 2022, siendo la mayoría de los casos diagnosticados en fase avanzada (1).

Según datos del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos hubo un aumento estadísticamente significativo en la incidencia de cáncer de mama con metástasis ganglionar al momento del diagnóstico entre 1976 y 2009, para las mujeres entre 25 y 39 años, lo que genera una notable preocupación en la adecuación de estrategias diagnósticas y terapéuticas que sean efectivas en la lucha por el logro de una mayor supervivencia (2).

La evaluación histopatológica convencional del cáncer resultó ser insuficiente para identificar el comportamiento biológico de estas neoplasias. Lesiones de patrón morfológico idéntico muestran evolución diferente en agresividad, recidivas y aparición de metástasis. Se planteó que el cáncer de mama no es una entidad única, sino que representa un grupo heterogéneo de lesiones que reproducen la misma variabilidad biológica que los pacientes portadores de la neoplasia, por lo tanto, se considera una enfermedad diversa genética y morfológicamente heterogénea que se expresa en varios subtipos morfológicos, es decir, representa un amplio espectro de enfermedades. Los subtipos de cáncer de mama se asocian a características morfológicas específicas y diferentes resultados clínicos en la terapéutica. El carcinoma ductal infiltrante es el subtipo morfológico más común, que representa el 80 % y más de los carcinomas invasivos de la mama, seguido por la variante lobulillar infiltrante con el 10 % de los casos aproximadamente. El carcinoma ductal además muestra formas especiales, tales como las variantes mucinoso, cribiforme, papilar infiltrante, tubular, medular, metaplásico y de tipo inflamatorio (3,4) (Figura 1).

Al considerar los marcadores morfológicos pronósticos en la evaluación del cáncer de mama con importancia en la selección del tratamiento, se identifican los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP). Se conoce que los estrógenos influyen en el crecimiento, la diferenciación y la función de los tejidos reproductivos, como el ovario, la glándula mamaria, el útero, la vagina, los testículos, el epidídimo y la próstata. La mayoría de los efectos de los estrógenos están mediados por la vía genómica, que implica la unión de los estrógenos a un receptor intracelular. Los receptores de estrógeno α (ER α) y β (ER β) son glicoproteínas miembros de la superfamilia de

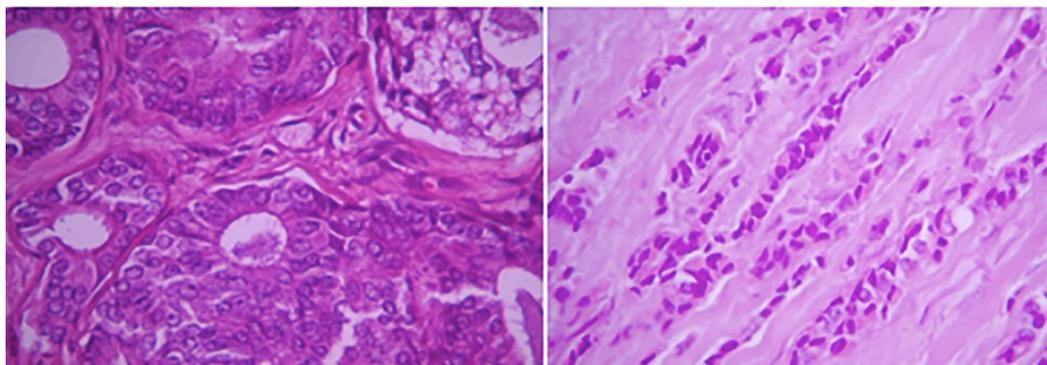


Figura 1. Las microfotografías muestran patrones, a la izquierda de carcinoma ductal Infiltrante y a la derecha de carcinoma lobulillar infiltrante. HE.40X

receptores nucleares de factores de transcripción. Los RE participan en la regulación de la proliferación y diferenciación del epitelio de la glándula mamaria. La unión RE con estrógeno actúan en los mecanismos de división celular, de manera que en la presencia de niveles estrogénicos circulantes bajos se produce en una disminución de la actividad en la proliferación celular (5-7).

En pacientes sin tratamiento adyuvante, los estudios demostraron que la positividad para RE mejora hasta en un 10 % el intervalo libre de enfermedad y la tasa general de supervivencia, por lo cual se le ha establecido como un factor de pronóstico favorable. Estos cánceres de mama con positividad para RE se pueden tratar con medicamentos de terapia hormonal que reducen los niveles de estrógeno circulante o bloquean los receptores de estrógeno (8).

La respuesta al tratamiento de bloqueo estrogénico alcanza el 60 % en pacientes con tumores RE positivos, en pacientes sin definición de su estado de receptores es del 25 % y en grupos estudiados conocidos como RE negativos es menor de 10 %. Se demostró una reducción media de 25 % en recurrencia y mortalidad en las pacientes con RE positivos que reciben tratamiento hormonal. Por su parte, los RP dependen de los RE y presentan implicaciones pronósticas similares a estos para el carcinoma de mama, por lo que se determinan conjuntamente porque son elementos que amplifican el valor predictivo del método. Se ha establecido en pacientes con cáncer avanzado que, evaluando

ambos receptores la respuesta a la terapia endocrina es favorable y alcanza el 77 % si ambos son positivos y sólo del 27 % si sólo son positivos los RE. Además, el fenotipo RE negativo/RP positivo, aunque poco frecuente, hasta un 3 % en numerosas series, presenta una tasa de respuesta significativamente superior, que llega al 46 %; pero cuando se determina que ambos son negativos, solo alcanza un 11 %. El estudio inmunohistoquímico ha demostrado su efectividad en la determinación del estado de los receptores hormonales con una mejoría progresiva en las técnicas y la disponibilidad de anticuerpos de alta calidad (9-13).

El proto-oncogén HER2, C-erbB-2 o HER2/ no, de acuerdo con sus diferentes denominaciones, es miembro de la familia de receptores tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) que está constituido por cuatro miembros a saber EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2, *neu* en roedores), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Estos receptores estructuralmente están relacionados son glicoproteínas transmembrana de cadena única que consisten en un ectodominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana, una sección corta de yuxtamembrana, un dominio de tirosina quinasa y una cola C-terminal que contiene tirosina. La unión del ligando soluble al ectodominio del receptor promueve la formación de homodímeros y heterodímeros entre los receptores. La dimerización del receptor es esencial para la activación del dominio tirosina

quinasa intracelular y la fosforilación de la cola C-terminal. Luego, los residuos de fosfotirosina activan, ya sea directamente o a través de proteínas adaptadoras, los componentes aguas abajo de las vías de señalización, incluidas Ras/MAPK, PLC γ 1/PKC, PI(3)quinasa/Akt y la vía STAT. Así, la conjugación más efectiva en la estimulación del crecimiento celular tumoral es la que forman la combinación dimérica HER2+HER3, que proporciona una potente capacidad de activar a sus efectores intracelulares (14,15).

El HER2 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17(Cr17q) y codifica para una glicoproteína de transmembrana con actividad de tirosina-quinasa intrínseca. La amplificación del oncogén HER2 se ha establecido en un rango amplio entre el 10 y el 34 % de los cánceres de la glándula mamaria, siendo entre 20 y 30 % la cifra más coincidente en la mayoría de los estudios en grandes series de tumores. La amplificación de la oncoproteína HER2 o gen HER2/neu fue realizada por primera vez con fines de investigación de tumores en el año 1987, por Slamon y col., en un subgrupo de un total de 103 casos de carcinoma de mama estudiados, demostrando que su positividad estaba asociada con un menor intervalo libre de enfermedad y una menor supervivencia. Este mismo grupo de estudio dan mayor fortaleza a la convicción clínica que la sobreexpresión del HER2 tiene un valor pronóstico intrínseco (16-19).

Una señalización inapropiada puede ocurrir como resultado de la sobreexpresión del receptor o la desregulación de la activación del receptor, lo que puede conducir al aumento de la proliferación incontrolada de la célula tumoral, a la disminución de la apoptosis o muerte celular programada, a un mejoramiento de los fenómenos de motilidad de la célula tumoral que garantizan su diseminación metastásica y a la activación del proceso de angiogénesis que provee los nutrientes para la inmortalización de la célula neoplásica (20-22).

La clasificación del cáncer de mama con bases moleculares se sustenta en la aplicación de múltiples procedimientos para determinar la expresión genética del tumor, en el cual destaca la utilización del método de microarray (microarreglos) de ADN complementario (ADNc) o matriz de ADN. En los estudios de *microarrays* se combinan las técnicas de

hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridación habrá fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia detectada será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio. La técnica se fundamenta en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) con el objeto de amplificar y purificar por hibridación moléculas de ADNc o sondas de ADN, obtenidas a partir de ARN que ha sido extraído del tejido tumoral, aplicadas sobre un panel de secuencias del genoma humano transcritas en un soporte de base sólida, fijadas en láminas de vidrio o con membranas proteicas de nitrocelulosa (23-25).

De esto se obtiene el ARN extraído de las muestras de estudio, indicativo de expresión génica, convertido en ADNc fluorescente por una transcriptasa inversa en presencia de fluoróforos, siendo esa señal de genes detectados por un rayo láser sensible, al emitir una longitud de onda cuya impresión es la que define el gen tumoral expresado. Luego, un programa informático integra los resultados en una imagen coloreada en función de los niveles de expresión de los distintos genes. Estos hallazgos condujeron a una nueva taxonomía de base molecular para el cáncer de la mama. La nueva taxonomía se estableció con la caracterización de un listado de genes agrupados de acuerdo con su frecuencia de aparición en grupos de tumores. De esta forma surgieron grupos de tumores con principios homogéneos de su expresión génica al compartir secuencias similares y comportamiento clínico similar en su evolución y su respuesta al tratamiento. A pesar de ello la respuesta terapéutica mostró variables significativas, lo cual ha motivado a que se promueva una investigación cada vez más aproximada a la obtención de dianas terapéuticas específicas (19,26).

Los perfiles de expresión de genes definen asociaciones predictivas valiosas que tienen que ver con las metástasis en los ganglios linfáticos y la recurrencia de la enfermedad para los pacientes individuales. Por lo tanto, datos de expresión de genes tienen el potencial de ayudar de forma precisa e individualizada al pronóstico de la neoplasia. Es importante destacar que estos datos se evalúan en términos de predicciones numéricas precisas, con rangos de probabilidades como resultado. Así la decisión

terapéutica se sustenta sobre una base científica que evalúa estadísticamente el riesgo específico para cada paciente. Esta taxonomía molecular se basó en la identificación de una lista de genes y la posterior agrupación jerárquica de éstos. Este procedimiento identifica subgrupos de tumores más homogéneos que presentan similar comportamiento clínico y sensibilidad a agentes terapéuticos. Sin embargo, hay variabilidad de respuesta terapéutica entre los tumores de un mismo grupo, por lo cual se ha planteado que diferentes tipos de cánceres mamarios están regulados por diferentes genes, lo cual ha dirigido la investigación hacia diversos oncogenes en busca de dianas terapéuticas específicas (27,28).

Haciendo un balance sobre los aportes de la aplicación de *microarray* de ADNc en cáncer de mama, hay que destacar su contribución para identificar la complejidad de sus tipos histológicos convencionales y que su variabilidad genética es el producto de una progenie celular de stirpe única. En sus primeros estudios Perou y col., basados en series de tumores sometidos a análisis de microarreglos, establecieron cuatro subtipos genéticos principales, a saber, de luminal, símil del basal, símil del normal y HER2 positivo (23,25).

Las propuestas que siguieron como las de Van't Veer y col., fueron dirigidas a que estos perfiles o firmas genéticas para grupos de tumores heterogéneos constituyeran puntos de corte para la selección de los tratamientos por quimioterapia (26). Posteriormente, Sorlie y col. (19) modificaron la clasificación original. Así, de acuerdo con la relación entre el patrón genético de los tumores y el pronóstico y riesgo potencial de metástasis se estableció una división general del cáncer de mama en dos grandes grupos, descritos como los positivos para receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), consideradas neoplasias de bajo grado y los que no expresan estos receptores hormonales, pero que muestran sobreexpresión y/o amplificación del proto-oncogén HER2, se calificaron como neoplasias de alto grado (27-29).

Tumores RE positivos

Los tumores RE positivos comprende los tumores luminales, que reproducen el patrón

de inmunofenotipo del componente epitelial de la glándula mamaria normal y expresan citoqueratinas de bajo peso molecular, entre ellas las citoqueratinas 7 y 8, además genes de activación identificados como LIV1 y CCND1. Este grupo comúnmente es de bajo grado histológico y comprende tres subtipos. Los subtipos son Luminal A, más frecuente (67 %) seguidos de Luminal B con baja expresión de RE y sobreexpresión de marcadores de proliferación; y el Luminal C con HER2 positivo, que se asocia a las citoqueratinas 9 y 10 (30).

Cheang y col. (22), desarrollaron un ensayo de inmunohistoquímica clínicamente práctico para distinguir los tumores luminales B de los luminales A e investigaron su capacidad para separar los tumores de acuerdo con la supervivencia libre de recurrencia del cáncer de mama y específica de la enfermedad. Esto con el fin de aproximar los hallazgos a los logrados en patología molecular, como una manera de simplificar los estudios en los laboratorios de Anatomía Patológica convencionales; esto fue un valioso aporte al análisis de los tumores luminales. Se utilizó un panel de cuatro marcadores que incluían RE, RP, HER2 y Ki67 como factor de proliferación celular para determinar la actividad del ciclo celular. Fue considerado el punto de corte del 14 % o menos para catalogar su baja expresión para los Luminales A y con una expresión alta mayor de 14 % para los Luminales B. El estudio incluyó 357 tumores de mama y se discriminaron los grupos Luminal A y Luminal B, así como el tipo HER2+ con negatividad para los receptores hormonales (Cuadro 1).

Cuadro 1

Clasificación de los tumores con receptor de estrógeno positivo *

Subtipo	RE	RP	HER2	Ki67
Luminal A	+	y/o +	-	Bajo (-14%)
Luminal B	+	y/o +	-	Alto (+14%)
Luminal HER2 +	-	-	+	Alto

*Cheang, et al. (22).

Los tumores luminales A y B muestran mejor pronóstico, sin embargo, el Luminal B muestra

peor evolución en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad; la expresión de estrógenos en general tiene muy poca respuesta a la quimioterapia en comparación con los considerados basales o triples negativos. Se ha tipificado el subtipo Luminal C, sin embargo, tiene un perfil similar al Luminal B y muestra un patrón genómico de tendencia inestable, por lo cual se ha descartado por ahora su individualización (31,32).

Tumores RE negativos

En cuanto a los tumores del grupo RE negativos, se subdividen en el subtipo basal/mioepitelial y el subtipo que sobre expresa HER2 o HER2+. Son un grupo de tumores con mal pronóstico y menos estrategias de prevención y tratamiento del cáncer en comparación con los tumores con RE positivos. El primer subtipo de este grupo se describió de acuerdo con su expresión en células mioepiteliales de citoqueratinas (CK) de alto peso molecular, a saber, de CK5 y CK7; este grupo también muestra positividad a la tirosina quinasa del epitelio mamario (C-Kit o CD117), a la laminina, caveolina, calponina 1, insulina y factor de crecimiento del hepatocito. En cuanto a su definición de expresión génica inicial, al momento de categorizar a este grupo se estableció como triple negativo por su patrón RE/RP/HER2neu negativos, identificándolos además por ser un grupo con alteraciones intrínsecas en los genes de reparación del ADN. En ellos el promotor BRCA1 se encuentra metilado, lo cual le supone una inactivación transcripcional. De tal manera que, la mayoría de las mujeres que nacen con la mutación del BRACA1 y desarrollan el tumor, presentan un patrón triple negativo o subtipo basal. Se considera que la frecuencia de los tumores triple negativos varía entre el 2 y el 18 %, y se definen como el subtipo que muestra un curso clínico más agresivo y que tiene una baja supervivencia global, tomando en cuenta que las terapias hormonales y biológicas con Trastuzumab® son de baja eficacia en este grupo de tumores (33).

El otro subtipo de tumores RE negativos está constituido por aquellos que solo muestran sobreexpresión del proto-oncogén HER2 y representan entre el 10 % y el 15 % de la frecuencia general. La sobreexpresión de este gen que

estimula la reproducción de las células tumorales tiene implicaciones pronósticas indiscutibles al conferir un comportamiento clínico agresivo y una respuesta pobre a las terapias convencionales. La aparición y consolidación de tratamientos biológicos con anticuerpos monoclonales ha convertido en una buena noticia considerar a un tumor con positividad para HER2 (20,34).

El índice de proliferación Ki67 ha sido utilizado en correlación con los grados histológicos y el estado de receptores hormonales para evaluar tanto el comportamiento tumoral como la efectividad del tratamiento. Es considerado como un elemento con valor dual pronóstico y predictivo. Dentro de la clasificación molecular, la determinación del porcentaje de Ki67 es un punto que define a los tumores luminales B en cuanto al pronóstico, considerando el punto de corte de porcentaje de positividad nuclear del 13,25 % (≈ 14 %) para determinar la expresión baja o alta del marcador. La unificación de los criterios definitorios de la clasificación molecular del cáncer de mama, a partir de la aplicación de paneles de inmunohistoquímica, con valor en la práctica clínica, ha sido la preocupación de los profesionales que trabajan en la evaluación de los factores pronósticos de la neoplasia en los últimos años. Estos procedimientos con bajo costo relativo individualizan el estado de cada paciente y orientan una terapia específica (35).

La modificación de la clasificación molecular, tomando en cuenta la expresión genética, el comportamiento clínico y su utilidad en la correlación del inmunofenotipo fue presentada por Schnitt (36) (Cuadro 2).

Importancia de la Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica acercó la proteómica molecular a las respuestas del comportamiento biológico, el cual se centró inicialmente en el valor de la determinación de la presencia de receptores hormonales de estrógeno y progesterona. En el Consenso Internacional de St. Gallen en 2013, donde participaron 48 expertos en cáncer de mama procedentes de 21 países, se validó la aplicación de inmunofenotipos como confiables para reproducir las características genotípicas de los tumores, considerando los paneles básicos de valor pronóstico, siempre

SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA

Cuadro 2

Clasificación molecular del cáncer de mama basada en inmunofenotipo
Modificada por Schnitt, 2009*

Subtipo	Receptores hormonales	HER2	Ki67 ≤ 14% ≥	Otros
Luminal A	RE y/o RP +	-	Bajo	
Luminal B	RE y/o RP +	±	Alto (Bajo)-Alto	
HER2 +	RE/RP -	+	(Bajo)-Alto	
Basal	RE/RP -	-	(Bajo)-Alto	CK 5/6 - EGFR

*Schnitt (36). Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy.

y cuando se cumplan principios elementales de calidad en los laboratorios. Aplicar estas conclusiones del consenso, produjo una mayor aproximación de la clasificación molecular en la práctica clínica, abriendo la posibilidad de considerar los casos individuales, favoreciendo la decisión terapéutica basada en sus observaciones, lo cual genera sorprendentes resultados favorables en la supervivencia de las pacientes (35).

El presente estudio tiene como objetivo establecer la frecuencia de los subtipos moleculares de cáncer de mama a partir de la identificación de los patrones de inmunofenotipo evaluados en una numerosa serie de carcinomas infiltrantes de mujeres venezolanas, siguiendo los criterios de evaluación vigentes de acuerdo con los protocolos establecidos por el consenso de la Asociación Americana de Oncología y el Colegio Americano de Patólogos (ASCO/CAP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las muestras y diseño de la investigación

Se seleccionaron los casos entre los evaluados y diagnosticados como carcinomas de patrón infiltrante que forman parte de los tumores malignos epiteliales de la glándula mamaria de acuerdo a la clasificación general de tumores de la Organización Mundial de la Salud (37), recibidos para realización de factores pronósticos inmunohistoquímicos en el Laboratorio de Patología del Urológico San Román en la ciudad de Caracas, Venezuela, en el período

comprendido entre el día 1 de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2019. Forma parte de una línea de investigación, con un primer corte en mayo de 2014 analizando 2 320 casos a los cuales se sumaron 449 nuevos casos, para un total de 2 769 tumores evaluados en esta serie. El diseño del estudio es de tipo retrospectivo y de carácter descriptivo. Se calcularon las frecuencias y porcentajes de las variables cualitativas. Los resultados fueron dispuestos en tablas de una y de dos entradas. Las relaciones entre variables fueron realizadas con la prueba Chi-cuadrado de Pearson. Se consideró un valor estadísticamente significativo si $p < 0,05$. Los datos fueron tabulados y analizados con STATA 17 (38).

Las muestras de tumor fueron obtenidas a través de varios procedimientos que incluyeron biopsias percutáneas por aguja gruesa, biopsias excisionales o incisionales y resecciones parciales o totales; la mayoría, en forma de bloques de tejido incluidos en parafina. Se procedió a la escogencia de aquel más representativo en caso de referir varios bloques de parafina, previa evaluación del estudio histológico de las secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Las muestras en fresco fueron debidamente fijadas con formalina buffer al 10 %, con un tiempo máximo de fijación no mayor de 48 horas. Todos los estudios fueron evaluados por el mismo observador, médico especialista en Anatomía Patológica.

Procesamiento inmunohistoquímico

Seleccionados los bloques para el estudio inmunohistoquímico se realizaron cortes de

dos micras de espesor, en láminas previamente tratadas con Poli-L-Lisina (Sigma®), los cuales fueron secados en la estufa a 56 °C por 30 minutos y seguidamente desparafinados en tres baños de xileno por un tiempo de 5 minutos cada uno y luego por tres baños de alcoholes decrecientes (90 %, 80 %, 70 %) hasta hidratar en agua. Posteriormente se hizo recuperación antigénica con Dako Target Retrieval Solution Low, pH 6.0 (Dakocytomation cat K8005®) en una Decloaking Chamber TX Nx Gen (Biocare cat. DC2012®) con un protocolo de 110 °C, por treinta minutos. Al finalizar la recuperación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena por diez minutos con peróxido de hidrógeno al 2 %.

Los anticuerpos usados para detectar los antígenos fueron Ki67 clon SP6 (Biocare cat. CRM 325 A®) dilución 1:150, Receptores de Estrógeno clon (ER 1D5) (Biocare cat. ACA 054®) dilución 1:150, Receptores de Progesterona clon 1 A6 (Biocare cat. CM055A®) dilución 1:100 y C-erB-2 (Her2) onco-proteína (Dako cytomation cat: A0485®) dilución 1:300, que fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente. El sistema de detección usado fue de streptavidina –HRP, Starr Trekk Universal HRP system (Biocare cat STUHRP700®), se hizo el revelado con diaminobencidina (DAB) y contrastado con Hematoxilina de Meyer.

Crterios de diagnóstico

La interpretación de los receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RP) se realizó de acuerdo a las directrices de Allred y col., quienes ampliaron en 1998 la definición de positividad nuclear a un número producto de la sumatoria de cuantificación de núcleos positivos con rango de 0 a 5, más la cuantificación de intensidad de la expresión del cromógeno, cada una con un rango de 0 a 3 (baja, moderada y alta), por lo cual la sumatoria para los casos positivos tiene un intervalo de 2 a 8, expresada en números absolutos. Esta guía permite considerar cualquier rango posible de positividad, por lo cual facilita al patólogo el establecimiento de parámetros referenciales precisos para el trabajo rutinario (39).

La evaluación de los RE y RP por inmunohistoquímica fue reforzada por la

aparición desde 2010 de la Guía de la Sociedad de Oncología Clínica Americana en conjunto con el Colegio Americano de Patólogos (ASCO/CAP), donde se establecen los parámetros básicos en los componentes pre-analíticos, analíticos y post-analíticos para la evaluación óptima de estos anticuerpos. Esta guía complementa las recomendaciones anteriores y ratifica la importancia de reportar adecuadamente cualquier grado de positividad, considerando las implicaciones pronósticas y terapéuticas de este correcto análisis (40).

Una adecuada determinación del factor de proliferación Ki67 ha sido validado en numerosos ensayos, basados primordialmente en el punto de corte de los cánceres de mama luminales tipo B, convencionalmente de 14 %, considerados de alta expresión y en menos del 14 % para su expresión baja; además se considera un punto de inflexión del 40 % para los tumores con progresión de alta probabilidad a comportamiento agresivo, recidivas y baja supervivencia. Tales aspectos fueron considerados en la interpretación para este estudio. Entre estos ensayos destaca la determinación del índice pronóstico KiGE que combina el porcentaje de Ki67 con el grado histológico y el estado de los RE/RP (41-43).

El tipo Luminal B se ha considerado además en las conclusiones de St. Gallen en 2015, con la posibilidad de establecer un punto de corte a partir del 20 % de positividad en expresión, lo que ha hecho cambiar en algunas poblaciones la mayor expresión de Luminal B sobre Luminal A (44).

La interpretación inmunohistoquímica para el oncogén HER2 se hizo siguiendo las recomendaciones del grupo ASCO/CAP, con sus principios generales de los años precedentes a partir del año 2007 y las publicadas en 2013, las cuales consideran también los aspectos pre-analíticos, analíticos y post-analíticos, tomando en cuenta la calidad y manejo de la muestra, la certificación de las prácticas en el laboratorio de patología y la mejor escogencia adecuada de los reactivos (45).

Una nueva actualización enfocada de 2018 aborda escenarios clínicos poco comunes y mejora la claridad, particularmente para resultados de pruebas de HER2 poco frecuentes que tienen un significado biológico o clínico incierto. Se revisa la definición del HER2 de

dos cruces (2+) o dudosa a los criterios originales aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA). Se establece el estudio directo de Hibridación *in situ* (ISH). Por otra parte, ya no es obligatorio repetir la prueba de HER2 en una muestra quirúrgica si la biopsia central analizada inicialmente es negativa. Ya no es imperante solicitar una nueva prueba de HER2 en la muestra de escisión en función de algunos criterios, tales como el grado 3 del tumor. Se recomienda un criterio de interpretación más riguroso de los patrones menos comunes que se pueden observar en aproximadamente el 5 % de todos los casos cuando se evalúa el estado de HER2 en el cáncer de mama mediante una prueba de ISH de sonda doble. Estos casos, descritos como grupos ISH 2 a 4, ahora deben evaluarse mediante un enfoque de diagnóstico que incluya una revisión concomitante de la prueba inmunohistoquímica (IHC), que ayudará al patólogo a tomar una determinación final de la muestra del tumor como HER2 positivo o negativo. El panel de expertos también recomienda preferentemente el uso de ensayos ISH de sonda doble en lugar de ensayos ISH de sonda única, pero reconoce que varios ensayos ISH de sonda única cuentan

con la aprobación normativa en muchas partes del mundo (46).

Una vez obtenidas las láminas para su valoración, estas fueron analizadas con un microscopio de luz marca ZEISS®, complementado con un sistema anexo de microfotografía con cámara digital CANON® y software de captura de imágenes. Los datos fueron recolectados a partir de las aplicaciones del programa Excel®, los cuales sirvieron para su procesamiento estadístico.

RESULTADOS

Datos generales

En el estudio se evaluaron 2 769 casos de carcinomas infiltrantes de mama. Todos los casos de pacientes del sexo femenino, en la distribución por edad, las edades oscilaron entre 25 y 97 años, estableciendo la mayor frecuencia en los grupos etarios ubicados entre 38 y 77 años, para el 86,5 % de los casos. La edad promedio fue de 55 años con una desviación estándar de 13 años (Figura 2).

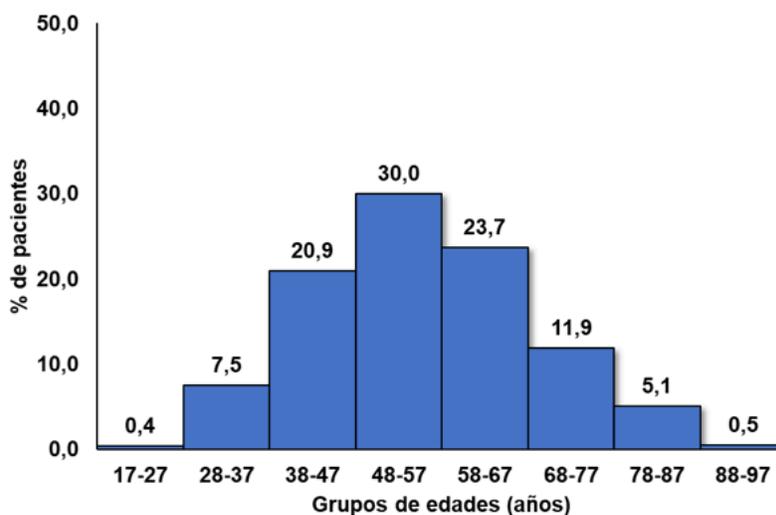


Figura 2. Distribución por grupos etarios.

La mayoría se localizaron en el lado derecho con un total de 1 502 tumores para el 54,2 %,

1 267 del lado izquierdo que representan el 45,9 % de los casos.

Diagnóstico histológico

Con el estudio histológico convencional evaluando las coloraciones de hematoxilina-eosina, se estableció que 2 391 tumores (86,4 %) fueron diagnosticados como carcinomas ductales infiltrantes tipo no especial, anteriormente conocidos como no especificados, seguidos de 201 tumores (7,3 %) de tipo Carcinomas ductales de tipo especial, a saber, mucinoso, papilar infiltrante, medular, neuroendocrino, metaplásico y tubulares. Los restantes 177 para el 6,3 % de la frecuencia se correspondieron con carcinomas lobulillares infiltrantes (Cuadro 3).

Cuadro 3

Distribución de pacientes según tipo morfológico de carcinoma de mama

Diagnósticos	n	%
Carcinoma ductal infiltrante de tipo no especial	2 391	86,3
Carcinoma infiltrante tipo especial	201	7,3
Carcinoma lobulillar infiltrante	177	6,4
Total	2 769	100,0

Dentro de los especiales se sumaron los carcinomas ductales con mayoritaria infiltración pagetoide, que fueron catalogados como Enfermedad de Paget. El Carcinoma papilar infiltrante fue la variante especial más frecuente con el 35,8 % de estos tumores (Cuadro 4).

Cuadro 4

Distribución de carcinoma ductal de mama de tipo especial

Diagnósticos	n	%
Carcinoma papilar infiltrante	72	35,8
Carcinoma mucinoso	41	20,4
Carcinoma metaplásico	22	10,9
Carcinoma neuroendocrino	21	10,4
Carcinoma medular	18	9,0
Carcinoma tubular	15	7,5
Carcinoma papilar intraquístico	3	1,5
Enfermedad de Paget	3	1,5
Carcinoma inflamatorio	3	1,5
Carcinoma de células claras	3	1,5
Total	201	100,0

Inmunohistoquímica

a) Evaluación de los receptores de estrógeno y progesterona

En la evaluación de los tumores considerando el panel de 4 anticuerpos, de 2 769 casos en los

que se investigaron los RE y RP, se encontró una frecuencia de expresión o marcaje positivo en 80,2 % y 72,9 %, respectivamente, para cada receptor hormonal. En el 2,5 % de los casos se encontró un patrón RP positivo con RE negativo (Figura 3, Figura 4).

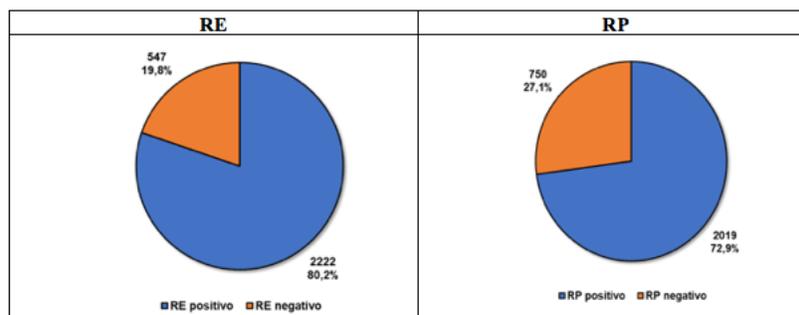


Figura 3. Expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP).

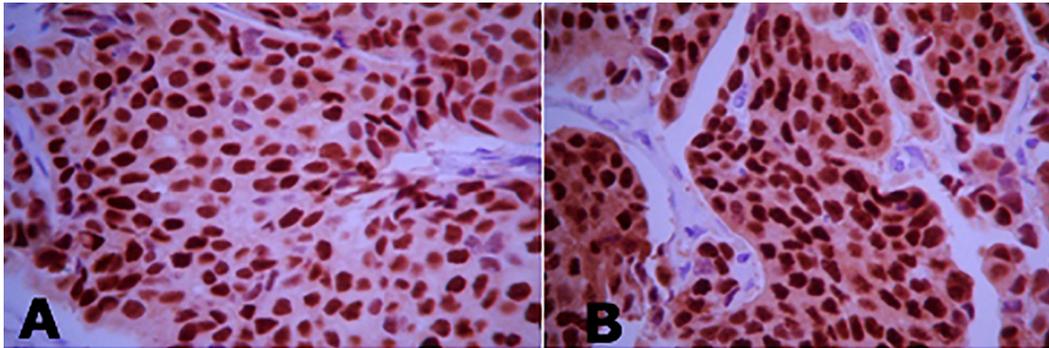


Figura 4. Estudios inmunohistoquímicos que muestran la positividad de (A) Receptor de estrógeno y (B) progesterona, ambos con puntuación máxima de 8 del Índice de Allred. IHQ. 40X.

b) Evaluación del oncogén HER2

La sobreexpresión del oncogén HER2 fue evaluada en todos los tumores examinados, con resultado positivo de score 3+, 729 neoplasias para el 26,3 % de la frecuencia; los negativos con score de 0 ó 1+ representaron el 64,3 % para un total de 1 781 tumores y finalmente se diagnosticaron 189 casos con expresión dudosa y score de 2+, para el 9,4 % de la frecuencia. (Figura 5, Figura 6).

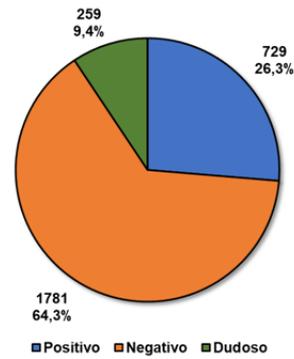


Figura 5. Sobreexpresión del Oncogén Her2.

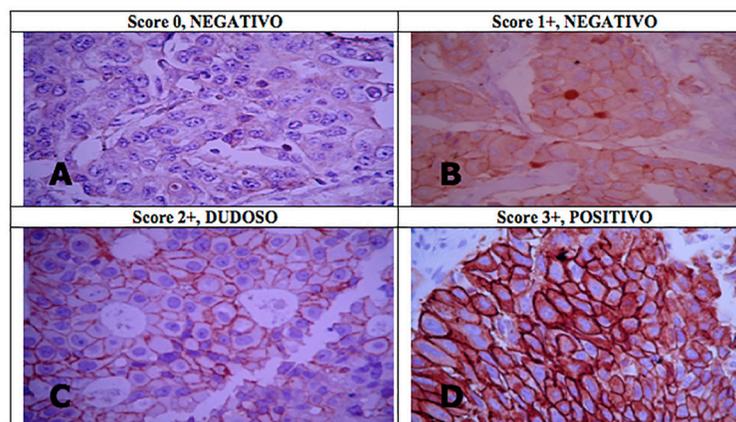


Figura 6. Patrones de interpretación de la onco-proteína HER2 de acuerdo con el algoritmo original ASCO/CAP 2013. (A) Sin evidencias de marcaje, Score 0; (B) Tinción tenue e incompleta de las membranas de las células tumorales, Score 1+; (C) tinción moderada e incompleta de la membrana, Score dudoso 2+ y (D) Tinción completa e intensa con patrón en “malla de gallinero”, Score 3+. IHQ. 40X.

c) Evaluación inmunohistoquímica simultánea con 4 los anticuerpos: RE, RP, Ki67 y HER2

Para la determinación de los subtipos moleculares o clasificación molecular, se combinaron los datos de la evaluación simultánea al total de 2 769 casos del panel de 4 anticuerpos que incluyeron RE, RP, Ki67 y HER2. De esta forma se estableció el inmunofenotipo.

Los resultados se tabularon con la aplicación de dos sistemas de clasificación, uno basado en los parámetros originales que toma en cuenta los resultados de la expresión de la oncoproteína HER2 y los receptores hormonales, y por otra parte una segunda clasificación que incluye las consideraciones de la reunión de Saint Gallen en el año 2015 a partir de un punto de corte para el Factor de Proliferación Ki67 mayor o igual de 20 % (Figura 7).

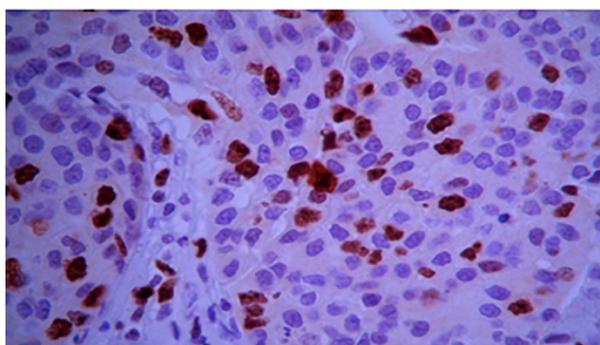


Figura 7. Expresión nuclear del Factor de proliferación celular Ki67. IHQ. 40X.

Se determinó en la primera clasificación que el tipo Luminal A presentó el 55,9 % de la frecuencia, correspondiendo al Luminal B el 20,2 %, los catalogados como HER2 positivos representaron el 13,7 % y el tipo basal representó el 10,1 % de la frecuencia total. Considerando la segunda clasificación, el grupo de tumores de patrón HER2 Positivos y Tipo Basal no modificaron su frecuencia, sin embargo, se produjo casi una inversión de los Luminales, mostrando ahora 53,5 % el B y 22,6 % el subtipo Luminal A (Cuadro 5).

Al estudiar la distribución de los subtipos moleculares en relación a los grupos etarios de las pacientes evaluadas por carcinoma de mama, se identifica que la frecuencia de tales subtipos en grupos de edades se distribuye proporcionalmente, en la Clasificación 1 clásica ($p = 0,092$) y en la Clasificación 2 propuesta en 2015 ($p=0,656$) (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 5

Subtipos Moleculares por Inmunofenotipo con el panel RE, RP, HER2 y Ki67

Inmunofenotipo	Clasificación 1		Clasificación 2	
	n	%	n	%
Luminal A	1 548	55,9	627	22,6
Luminal B	560	20,2	1 481	53,5
HER2 positivo	380	13,7	380	13,7
Tipo basal	281	10,1	281	10,1

Dada la importancia de la sobreexpresión o positividad del oncogén HER2 en el pronóstico y tratamiento, evaluamos su relación entre este y la edad de las pacientes, excluyendo los casos diagnosticados como dudosos, determinando que no existe asociación estadísticamente significativa entre estas variables ($p = 0,773$) (Cuadro 8).

SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA

Cuadro 6

Distribución del número de pacientes por clasificación 1 y edades

Edades	Clasificación 1				Total
	Luminal A	Luminal B	HER2 (+)	Basal	
< 40 años	168	61	38	32	299
41-50 años	349	132	94	61	636
51-60 años	428	193	114	84	819
> 61 años	603	174	134	104	1015
Total	1 548	560	380	281	2 769

Cuadro 7

Distribución del número de pacientes por clasificación 2 y edades

Edades	Clasificación 2			Basal	Total
	Luminal A	Luminal B	HER2 (+)		
< 40 años	73	156	38	32	299
41-50 años	137	344	94	61	636
51-60 años	167	454	114	84	819
> 61 años	250	527	134	104	1 015
Total	627	1 481	380	281	2 7696

Cuadro 8

Distribución de pacientes por edades y sobreexpresión del HER2

Edades (años)	Her-2-neu		Total
	Positivo	Negativo	
< 40	82	189	271
41-50	170	410	580
51-60	220	516	736
> 60	257	666	923
Total	729	1 781	2 510

p = 0,773

DISCUSIÓN

Las consideraciones para la determinación diagnóstica del cáncer de mama parten de la conjugación de aspectos clínicos, morfológicos y de la aplicación de técnicas proteómicas de inmunohistoquímica de patología molecular, estudios que están al alcance de grandes grupos de población. Se requieren factores pronósticos más precisos que ayuden a la aplicación de las

decisiones terapéuticas, conociendo que es una patología de comportamiento clínico diverso, lo cual justifica la realización de estudios de amplificación que evidencien la variabilidad biológica inherente a cada paciente (43).

Todos los casos considerados en el estudio se corresponden con tumores en mujeres, pero es fundamental recordar que esta patología se presenta con una frecuencia aproximada al 1 % en el sexo masculino. Tal como lo muestran las diferentes series de estudio internacionales la mayoría de los tumores se localizaron en la mama derecha y la variante histológica predominante fue la ductal infiltrante o tipo no especial, seguido muy de lejos de la forma lobulillar. La variante especial más frecuente la constituyó el patrón papilar infiltrante, seguido del mucinoso y el metaplásico. Aunque se identifica una tendencia en el grupo estudiado de mostrar el inicio de estas neoplasias a edades tempranas a diferencia en los llamados países del primer mundo, también demostramos la coincidencia con estudios internacionales de que estas variantes de cáncer, en cuanto a su distribución por grupos de edad, presentan una mayor frecuencia en pacientes postmenopáusicas.

El análisis inmunohistoquímico de los tumores se realizó sin mayores problemas técnicos, no observándose diferencias entre los casos procesados en nuestro laboratorio y los referidos de múltiples centros del país, lo que demuestra un buen cumplimiento de los parámetros pre-analíticos que garantizan la calidad de la muestra de acuerdo con la normativa del protocolo ASCO/CAP. El otro aspecto por considerar es que todos los casos fueron evaluados por un solo especialista de la patología como observador, lo cual elimina el sesgo inherente a las variaciones inter observadores.

La positividad para los RE y RP se identificó con porcentajes aproximados a la frecuencia reportada en la literatura, demostrando que los parámetros de valoración son reproducibles. La evidencia indica que la sobreexpresión de la oncoproteína HER2 se observa en un rango entre el 20 % y el 30 % de los cánceres de mama primarios (47-50).

La frecuencia de positividad para HER2 fue de 26,3 % para esta serie de estudio numéricamente importante, no solamente confirma la tendencia internacional, sino que se comprueba que la sobreexpresión de HER2 es un parámetro independiente que se presenta proporcionalmente en todos los grupos etarios porque no existe asociación estadísticamente significativa entre estas variables ($p = 0,773$), lo cual le confirma como un marcador pronóstico tumoral estable que puede ayudar a la aplicación de protocolos terapéuticos efectivos. Esta frecuencia determina que alrededor de 1 de cada 4 pacientes venezolanas con carcinoma de mama puede presentar sobreexpresión de HER2 y por lo tanto es candidata para recibir una terapia que ha demostrado su efectividad basada en la supervivencia libre de enfermedad.

En este estudio se identificaron los subtipos moleculares por inmunofenotipo aplicando el panel de los 4 anticuerpos, RE, RP, HER2 y Ki67. En una primera clasificación basada en los parámetros tradicionales de HER2 y receptores hormonales la frecuencia de inmunofenotipos fue en orden decreciente Luminal A (55,9 %), Luminal B (20,2 %), HER2 positivo (13,7 %) y tipo basal o triple negativo (10,1 %). Esto reproduce casi exactamente las conclusiones de la primera publicación de clasificación molecular

de cáncer de mama de Schnitt en 2009 con frecuencias de 55 % para Luminal A, 20 % para el inmunofenotipo Luminal B, 15 % para HER2 positivo y 10 % para el tipo basal (36,51).

En la segunda clasificación basada en St. Gallen 2015, el inmunofenotipo Luminal B pasa al primer lugar con el 53,5 % de frecuencia, seguido del Luminal A con el 22,6 % de los casos, lo cual tiene implicaciones en el pronóstico y tratamiento de los tumores con este rango, porque dependen del punto de corte mayor del 20 % del Ki67, los cuales tienen comportamiento más agresivo y se evidencia su valor predictivo en la evolución poco favorable de estos tumores.

En Venezuela se han realizado otros estudios para investigación de la expresión del HER2. Así, Reigosa y col., 2021 (52,53) determinaron la distribución de los subtipos moleculares en mujeres venezolanas del centro del país con un estudio retrospectivo en 4388 pacientes con carcinoma infiltrante de mama y estudio inmunohistoquímico de receptores de estrógeno y progesterona, HER2 y Ki-67. También evaluaron los cuatro factores pronósticos con las dos clasificaciones e identificaron las variaciones de los inmunofenotipos Luminal A y B, que intercambian frecuencias entre ambas clasificaciones. Aunque la frecuencia para el inmunofenotipo de tipo basal o triple negativo en el estudio citado alcanza el 24,9 % 25,2 %, respectivamente en ambas clasificaciones, habría que considerar en este aspecto la posibilidad de la variación inter observador de los casos estudiados. En forma general los aspectos coincidentes con el presente estudio, demuestra que la aplicación del protocolo ASCO/CAP para la evaluación de factores pronósticos inmunohistoquímicos en cáncer de mama, son absolutamente reproducibles.

Al analizar el comportamiento de los grupos etarios en la definición del inmunofenotipo, se concluye que tales subtipos moleculares no dependen de la edad de quienes presentan el tumor, no encontrando relación estadísticamente significativa ni en la clasificación 1 clásica ($p=0,092$), ni en la clasificación 2 basada en el punto de corte de Ki67 mayor o igual de 20 % de expresión ($p=0656$). Esto también confirma que el subtipo molecular es un parámetro aplicable a todas las edades con pertinencia al tratamiento.

A pesar del progreso significativo en la terapia del cáncer de mama, es globalmente el cáncer más comúnmente diagnosticado y conduce a la muerte de más de 650 000 mujeres al año. El receptor de andrógenos (AR) está emergiendo como un nuevo potencial objetivo terapéutico en esta neoplasia. Si bien el papel de AR está bien establecido en el cáncer de próstata, su función en el cáncer de mama sigue siendo incompleta. Los datos emergentes muestran que el papel de AR en cáncer de mama depende de varios factores que incluyen, entre otros el subtipo de enfermedad, así como el microambiente tumoral y los niveles de estrógenos y andrógenos circulantes. Mientras el bloqueo del AR en cáncer prostático se está volviendo cada vez más efectivo, estos avances aún no han tenido un impacto significativo en el cuidado de pacientes con cáncer de mama, sin embargo, se está claro que al aumentar la comprensión del papel de AR en esta neoplasia, también aumentará la probabilidad de éxito de las terapias dirigidas a AR (54).

Un estudio prospectivo de neoadyuvancia en cáncer de mama denominado Symphony, comparó el estudio molecular de firma por subtípificación de 80 genes con evaluación clínica por inmunohistoquímica y/o hibridación *in situ* fluorescente para predecir la respuesta patológica completa y los resultados a 5 años en pacientes con cáncer de mama en estadio temprano. Se utilizó quimioterapia estándar neoadyuvante combinada con trastuzumab o trastuzumab más pertuzumab, que se administró a pacientes con tumores positivos para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (n = 295). La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) fue el criterio de valoración principal, con otros criterios de valoración secundarios de supervivencia libre de metástasis a distancia y supervivencia global a los 5 años.

Entre los tumores positivos para HER2 clínicamente definidos (cHER2), el ensayo de 80 genes identificó el 29,5 % (87 de 295) como tipo luminal (cHER2/gLuminal), 14,9 % (44 de 295) como tipo basal (cHER2/gBasal) y 55,6 % (164 de 295) como tipo HER2 (cHER2/clasificado genómicamente como HER2 [gHER2]). Las pacientes con tumores cHER2/gHER2 tenían una tasa de PCR más alta (61,6 %) en comparación con los tumores no gHER2

(26,7 %). Los tumores gHER2 produjeron una tasa de respuesta patológica completa más alta (75 %) en comparación con los tratados con una sola terapia dirigida a HER2 (54 %). Para los tumores cHER2/gBasal, la tasa de PCR del 42,9 % observada con la orientación dual no fue diferente de eso con trastuzumab solo (46,4 %).

En este ensayo de 80 genes se identificó una diversidad genómica significativa en pacientes con enfermedad cHER2. Los pacientes con tumores cHER2/gHER2, que se beneficiaron más de la terapia dual dirigida contra HER2, representaron aproximadamente la mitad de la cohorte cHER2. Genómicamente, los tumores luminales tenían tasas bajas de PCR, pero buenas tasas de supervivencia a los 5 años. Los tumores basales no se beneficiaron de la terapia dual y mostraron una evolución significativamente peor a los 5 años, por lo cual estos pacientes merecen una consideración especial en ensayos futuros (55).

Una conclusión clara de este estudio es que la inmunotipificación debe realizarse en cualquier muestra de mama referida, independientemente del procedimiento de obtención de la misma y de la localización del tumor, es decir dentro de la glándula, ganglionar axilar o metastásico a distancia y esa muestra debe ser sometida a los procedimientos que los laboratorios de patología utilizan para una recuperación antigénica efectiva que garantice la amplificación de la presencia del receptor, con el objetivo de acercar los recursos técnicos para ayudar a que las pacientes finalmente se beneficien de un diagnóstico correcto y de tratamientos efectivos que incluyan la terapia biológica.

En investigaciones posteriores es necesario complementar los hallazgos morfológicos que nos ofrece la inmunohistoquímica, con los datos asociados a las terapias que reciben los grupos de pacientes analizados, así como la proyección de supervivencia relacionada con los diferentes esquemas aplicados, a fin de lograr una verdadera valoración clínico patológica integral, asimismo se debería aplicar el estudio de los receptores de andrógenos dentro del panel ya conocido de inmunohistoquímica, tomando en cuenta lo prometedor del efecto terapéutico positivo del bloqueo de estas proteínas de la membrana celular tumoral, cuando se expresan.

La conformación de equipos de trabajo multidisciplinarios en el área de la mastología oncológica, que incluyan a las asociaciones de pacientes, será exitosa en la medida que se logre la aplicación de buenas prácticas clínicas y paraclínicas que lleven a estas neoplasias a considerarse patologías con tendencia a ser crónicas y no necesariamente llevar a la muerte de los pacientes.

La determinación de los subtipos moleculares son claves para identificar los parámetros que requiere la medicina personalizada como la estrategia actual más exitosa para fundamentar la terapia del cáncer de mama en todo el mundo.

Financiamiento

Este estudio no contó con financiamiento por parte de personas distintas a sus autores o entidades públicas o privadas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses que comprometa la veracidad o independencia de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Anuario de Mortalidad 2016. Dirección de Información y Estadísticas en Salud. Dirección General de Epidemiología (DGE). Ministerio del Poder Popular para la Salud. Venezuela. Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/1bLSLxbJr9YnCVo5gudgr6IaHVIjPWCx6/view>
2. Johnson RH, Chien FL, Bleyer A. Incidence of breast cancer with distant involvement among women in the United States, 1976 to 2009. *JAMA*. 2013;309:8800-5.
3. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295:2492-2502.
4. Parl FF, Possey YF. Discrepancies of the biochemical and immunohistochemical estrogen receptor assays in breast cancer. *Hum Pathol*. 1988;19:960-966.
5. Ruder AM, Lubin F, Wax Y, Geier A, Alfundary E, Chetrit A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Cancer*. 1989;64:196-202.
6. Pertschuk LP, Feldman JG, Eisenberg KB, Carter AC, Thelmo WL, Cruz W, et al. Immunocytochemical detection of progesterone receptor in breast cancer with monoclonal antibody. Relation to biochemical assay, disease-free survival and clinical endocrine response. *Cancer*. 1988;62:342-349.
7. Helin HJ, Helle MJ, Kallionemi OP, Isola JJ. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. Correlation with histopathology and DNA flow cytometry. *Cancer*. 1989;63:1761-1767.
8. Parl FF, Possey YF. Discrepancies of the biochemical and immunohistochemical estrogen receptor assays in breast cancer. *Hum Pathol*. 1988;19:960-966.
9. Ruder AM, Lubin F, Wax Y, Geier A, Alfundary E, Chetrit A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Cancer*. 1989;64:196-202.
10. Pascal R, Santeusano G, Sarrell D. Immunohistologic detection of estrogen receptors in paraffin-embedded breast cancers: Correlation with cytosol measurements. *Hum Pathol*. 1986;17:370-375.
11. Hiort O, Kwan PWL, DeLellis RA. Immunohistochemistry of estrogen receptor protein in paraffin sections. *Am J Clin Pathol*. 1988;90:559-563.
12. Masood S. Use of monoclonal antibody for assessment of estrogen receptor content in fine-needle aspiration biopsy specimen from patients with breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:26-30.
13. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75 000 women. *Lancet*. 1992;339:1-15, 71-85.
14. King CR, Kraus MH, Aaronson SC. Amplification of a novel v-erbB related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229:974-976.
15. Ross JS, Fletcher JA. Her-2/neu (C-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(Suppl):S53-S67.
16. Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, et al. Correlation of C-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res*. 1988;48:1248-1243.
17. Slamon DJ, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-712.
18. Slamon DJ, Press MF, Godolphin W, Ramos L, Haran P, Shek L, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Cancer Cells*. 1989;7:371-384.
19. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8418-8423.

20. Huang E1, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet*. 2003;361(9369):1590-1596.
21. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*. 2006;354:2463-2472.
22. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:736-750.
23. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-752.
24. Poblete MT. Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuad Cir*. 2001;15:74-79.
25. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10869-10874.
26. Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, Yudong DH, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530-536.
27. Imigo F, Mansilla E, Delama I, Poblete MT, Fonfach C. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuad Cir*. 2011;25:67-74.
28. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, et al. Definition of Clinically Distinct Molecular Subtypes in Estrogen Receptor-Positive Breast Carcinomas Through Genomic Grade. *J Clin Oncol*. 2007;25:1239-1246.
29. Soutirou C, Pusztai L. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:790-800.
30. McCafferty M, Healy N, Kerin M. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diag Hist*. 2009;15:485-489.
31. Strand C, Bak M, Borgquist S, Chebil G, Falck AK, Fjällskog AK, et al. The combination of Ki67, histological grade and estrogen receptor status identifies a low-risk group among 1 854 chemo-naïve women with N0/N1 primary breast cancer. *Springerplus*. 2013;2(1):111.
32. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *J Clin Oncol: Official J Amer Soc Clin Oncol*. 2005;7350-7360.
33. Putti TC, Abd El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AHS, Pinder SE, et al. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: A review of morphology and immunophenotypical analysis *Mod Pathol*. 2005;18(1):26-35.
34. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1938-1948.
35. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackfish C, Marschner N, Volker Möbus V, et al. 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: Primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus-opinion of a german team of experts (Zurich 2013). *Breast Care*. 2013;8:221-229.
36. Schnitt S. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy, *Breast Long Course*. USCAP 2009;261.
37. Hanby AM, Walker C, Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and Genetics: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. WHO Classification of Tumours series - volume IV. Lyon, France: IARC Press. *Breast Cancer Res* 6, 133 (2004). <https://doi.org/10.1186/bcr788>
38. Blair C, Taylor R. Bioestadística. 5^ª edición. México: Pearson Educación de México, SA de CV; 2015.
39. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998;11:155-168.
40. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7):e48-72.
41. Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. Molecular classification of breast cancer. *Cir Ciruj*. 2008;76:87-93.
42. Krijgsman O, Roepman P, Zwart W, Carroll JS, Tian S, de Snoo FA, et al. A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(1):37-47.
43. Strand C, Bak M, Borgquist S, Chebil G, Falck A-K, Fjällskog ML, et al. The Prognostic Index, KiGE, Combining Proliferation, Histological Grade and Estrogen Receptor Status Challenges Gene Profiling – A Study in 1,854 Chemo-Naïve Women with N0/N1 Primary Breast Cancer. *Cancer Res*. 2012;72 (24 Suppl):2-10-28.
44. Focke CM, van Diest PJ, Decker T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: Impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;159:257-263.
45. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal

- Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:118-145.
46. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clinical Oncol.* 2013;31:3997-4013.
 47. Wolff AC, Hammond EH, Allison KH, Brittany E, Harvey BE, McShane LM, and Dowsett M. HER2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary. *J Oncol Pract.* 2018;14(7):437-441.
 48. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7 016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J Clin Pathol.* 2000;53(9):688-696.
 49. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of Estrogen and Progesterone Receptors Reconsidered: Experience With 5,993 Breast Cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(1):21-27.
 50. Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem.* 2003;49:1579-1598.
 51. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003;8:307-325.
 52. Morales L, Reigosa A, Caleiras E, Mora R, Marrero N, Payares E, et al. Expresión del HER2/neu en pacientes venezolanas con cáncer de mama localmente avanzado. *Invest Clin.* 2008;49(1):69-78.
 53. Reigosa A, Caleiras E, Castro J, Saldivia F, Reimer R, Dominguez Y, et al. Subtipos moleculares del carcinoma de mama en región central de Venezuela. *Rev Venez Oncol.* 2021;33(3):176-186.
 54. Kolyvas EA, Caldas C, Kelly K, Ahmad SS. Androgen receptor function and targeted therapeutics across breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res.* 2022;24:79.
 55. Whitworth P, Beitsch P, Murray M, Richards P, Mislowsky A, Dul CL, et al. Genomic Classification of HER2-Positive Patients With 80-Gene and 70-Gene Signatures Identifies Diversity in Clinical Outcomes with HER2-Targeted Neoadjuvant Therapy. *JCO Precis Oncol.* 2022;6:e2200197.