

Trabajo de Tesis de grado en la licenciatura en Bioquímica.

Caracterización de la Clasificación Molecular del cáncer de mama y su correlación con la expresión de COX-2 y BRCA1 en mujeres uruguayas.

Gabriel Sartorio

**Tutor: Profesora Agregada Dra. Ana Luisa Mariño
Cátedra de Anatomía Patológica
Hospital de clínicas, Facultad de Medicina, UdelaR**

Resumen

A) Introducción

A-1) Anatomía de la glándula mamaria

A-2) Cáncer de mama

A-3) Incidencia

A-4) Tipos de carcinomas mamarios

A-4-1) Carcinoma ductal “in situ”

A-4-2) Carcinoma ductal infiltrante

A-4-3) Carcinoma ductal infiltrante clásico

A-4-4) Carcinoma lobulillar “in situ”

A-4-5) Carcinoma lobulillar infiltrante

A-5) Marcadores moleculares

A-5-1) Receptor de estrógeno

A-5-2) Receptor de progesterona

A-5-3) Expresión de la proteína Her2/Neu

A-5-4) Terapéutica con trastuzumab

A-5-5) Ki-67

A-5-6) BRCA-1

A-6) Clasificación molecular

A-7) Diagnostico, terapéutica y pronostico

A-7-1) Diagnostico

A-7-2) Terapéutica

A-7-3) Pronostico

A-8) Familia de la ciclooxigenasa, vía de la COX y vía del ácido araquidonico

A-8-1) COX-2

A-8-2) Vía de la COX

A-8-3) Vía del ácido araquidónico

B) Objetivos

B-1) Objetivo general

B-2) Objetivo específico

C) Materiales y métodos

D) Resultados

E) Discusión

F) Conclusión

G) Bibliografía

H) Agradecimientos

I) Anexo (Imágenes, tablas y gráficas)

Resumen.

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres de nuestro país, y es objeto de investigación activa en todo el mundo. El diagnóstico actual del cáncer de mama es realizado por la morfología, diagnóstico histológico y por técnicas moleculares como la inmunohistoquímica y técnicas de hibridación de ADN tales como el FISH (hibridación in situ fluorescente) y CISH (hibridación in situ cromogénica). Es posible realizar una clasificación molecular del cáncer de mama con la Clasificación Molecular que incluye la sobreexpresión de las proteínas Her2/neu, RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona), Ki-67 y en algunos casos especiales la sobreexpresión de un ARN mensajero específico de Her2/neu. Estas técnicas permiten observar la expresión celular de dichas moléculas, y dependiendo de la misma se brinda un diagnóstico que se encuentra estandarizado en un protocolo universal denominado Clasificación Molecular. Este trabajo correlaciona la expresión otros marcadores como lo son Ciclooxygenasa (COX2) y BRCA 1 con la clasificación molecular analizando su expresión en 23 muestras de biopsias de mama de mujeres uruguayas portadoras de cáncer de mama invasor (CDI).

A) Introducción

A-1) Anatomía de la glándula mamaria

Como se muestra en la *Figura 1* la glándula mamaria normal consiste en 15 a 25 ductos lactíferos que comienzan en el pezón y terminan en la unidad ductal lobular. Los ductos terminales intralobulares se encuentran rodeados por tejido fibroconectivo. Donde los ductos extra lobulares están revestidos por epitelio columnar, los ductos intralobulares y los ductos lobulares se encuentran también revestidos por epitelio cuboidal. Los ductos extra lobulares presentan fibras elásticas prominentes. Los ductos lobulares también se denominan ductulares o acinares. La última designación es la más apropiada vinculada a la secreción gestacional. El mioepitelio se encuentra sustentado por una membrana basal y bordeada por fibras elásticas (1-3). La unidad ducto lobular presenta dos células especializadas, las células epiteliales con función absorbente y secretoria y la célula mioepitelial. Estas células tienen aspectos ultraestructurales e inmunohistoquímicos que las diferencian (1, 4, 5).

A-2) Cáncer de mama

El carcinoma de mama es la neoplasia maligna más común en la mama, y es la neoplasia maligna más común en mujeres. Una mujer que viva 90 años tiene una probabilidad entre ocho de presentar un cáncer de mama (6). En el periodo entre el año 1998 y el 2003 en Uruguay se diagnosticó un promedio de 1653 casos de cáncer de mama, donde se encontró un promedio de 628 muertes por año a causa de dicha patología (7).

A-3) Incidencia

A principios de la década de 1980 se introdujo el cribado con mamografía, y el número de mujeres de edad apropiada sometidas al cribado aumentó constantemente hasta las tasas actualmente descritas del 60 al 80% (7). El cribado aumenta la detección de carcinomas invasores pequeños y carcinomas in situ. Hasta hace algunas décadas el

número de mujeres fallecidas por cáncer de mama se mantuvo constante a pesar de que aumento significativamente la cantidad de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama. Eso es debido a que los estudios que esas pacientes se realizaban detectaban la patología en estados iniciales y estas son curables. Debido a esto se observo que hubo una tendencia a la baja de la mortalidad de mujeres, esto fue gracias a los controles y a las nuevas modalidades terapéuticas. Actualmente, se espera que mueran por la enfermedad solo el 20% de las mujeres con cáncer de mama. La frecuencia de esta enfermedad en las mujeres ha llevado a hacer un estudio intensivo de los factores de riesgo de desarrollar cáncer de mama para tener claves sobre su etiología (1).

A-4) Tipos de carcinomas mamarios

Clasificación del carcinoma mamario de la OMS (2008)(8)

Carcinoma Ductal mamario: a) Carcinoma ductal “in situ” (CDIS)
b) Carcinoma ductal infiltrante (CDI)

Carcinoma Lobulillar mamario:
a) Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)
b) Carcinoma lobulillar “in situ” (CLIS)

A-4-1) Carcinoma ductal “in situ”

Carcinoma ductal in “situ” *Figura 2*. En el diagnóstico de CDIS se requiere: por lo menos 2 espacios que estén completamente comprometidos por una población celular uniforme, como medida de extensión de la lesión. Es por esto que la presencia de un solo espacio de una población celular tipo CDIS se conoce con el nombre de hiperplasia ductal atípica (HDA), las lesiones de menos de 2 mm corresponden a una HDA y las que miden más a CDIS. Tiene similar distribución que el carcinoma in situ ductal. La falta de criterios exactos para la distinción entre una HDA y un CD in situ ha llevado a que la distinción entre ambas entidades sea muy compleja. Se ha desarrollado el concepto de neoplasia intraepitelial ductal (DIN) en donde se agrupa tanto las diferentes hiperplasias epiteliales como los CD in situ (9, 10-11).

A-4-2) Carcinoma ductal infiltrante.

Carcinoma hace referencia a todo cáncer que se origina en la piel o en otros tejidos que revisten órganos internos, como el tejido mamario. Ductal significa que el cáncer comenzó en los conductos lácteos, significa que el cáncer ha “invadido” o se ha propagado hacia los tejidos mamarios que lo rodean. En conjunto, “carcinoma ductal invasivo” hace referencia al cáncer que ha atravesado la pared del conducto lácteo y ha comenzado a invadir los tejidos de la mama. Con el tiempo, el carcinoma ductal invasivo puede propagarse hacia los ganglios linfáticos y posiblemente a otras áreas del cuerpo. El Carcinoma Ductal in Situ (DCIS) es un grupo de lesiones heterogéneas

caracterizado por la proliferación presumiblemente de células epiteliales malignas dentro del sistema ducto-lobulillar de la mama, sin evidencia microscópica a la vista de invasión del estroma circundante. Estas lesiones varían con respecto a su modo de presentación, su apariencia histológica y su significancia biológica (1, 12).

A-4-3) Carcinoma ductal infiltrante clásico.

Esta lesión representa el prototipo del carcinoma mamario y es el tipo tumoral implicado usualmente cuando se utiliza el término de “carcinoma de mama” sin otra calificación *Figura 4*. El tamaño, la forma, la consistencia y tipo de márgenes son altamente variables; algunos de estos factores dependen de la relativa cantidad de células tumorales y estroma. Destacamos la importancia del tamaño tumoral representado por el eje mayor del carcinoma ya que es una de las variables estadificadoras y pronósticas. En general el aspecto macro del tumor duplica la configuración visualizada por la mamografía. El típico caso es el de ser pobremente circunscripto y firme, al corte tiene una resistencia chirriante y muestra una superficie de corte amarillenta con trazos radiados que penetran en el parénquima que lo rodea como también hacia el tejido graso, resultando de una notoria configuración estrellada. A veces estos tractos se ven interconectados con otros nódulos tumorales localizados distales al tumor primario. Los tumores que son particularmente duros o pétreos, por la gran cantidad de estroma, son tradicionalmente llamados “carcinoma escirroso”. Es común para estos neoplasmas mostrar trazos blanquecinos con aspecto de tiza que son generalmente indicativos de necrosis, calcificaciones y elastosis. Otros tumores son más delineados, suaves, redondeados y lobulados; los cuales han sido descritos como carcinomas circunscriptos o multinodulares. El tumor puede crecer en áreas difusas, en nidos bien definidos, cordones o células individuales. La diferenciación glandular/tubular puede ser bien desarrollada, apenas desarrollada o aún ausente. Por lo cual, esta es la razón por la que el término adenocarcinoma no es aconsejable como sinónimo de CDI. La cantidad de estroma varía desde nulo a abundante y su apariencia es de densamente celular a colagénico (desmoplásico). En los casos con abundantes estroma puede ser difícil identificar las células tumorales. Por definición presenta células mayores y más pleomórficas que las del carcinoma lobulillar infiltrante; su núcleo y nucléolo son más prominentes y las figuras mitóticas son más numerosas (1).

A-4-4) Carcinoma lobulillar in “situ”.

Es una variante rara de carcinoma mamario, *Figura 5*, representando alrededor del 10% de todos los tumores malignos de la mama. Macroscópicamente no tienen características distintivas. Microscópicamente los lobulillos están distendidos y completamente llenos de células. Las células más frecuentes se denominan A y son relativamente uniformes, con escaso citoplasma pálido y redondeadas, de pequeño o mediano tamaño, con núcleo redondeado, sin nucléolo evidente, normocromático o levemente hipercromático. En general es mínimo o está ausente la atipia, el pleomorfismo, la actividad mitótica y la necrosis (13).

A-4-5) Carcinoma lobulillar infiltrante.

Es poco frecuente; siendo del 5 al 10% de todos los carcinomas de mama *Figura 6*. El 50% se asocia con carcinoma lobulillar in situ. Frecuentemente es multifocal o multicéntrico y bilateral. Es una masa pobremente circunscripta, cuyo tamaño es variable ya que también pueden presentarse con dimensiones microscópicas. Típicamente forma un tumor de consistencia firme a dura, con bordes irregulares. En general no presenta fenómenos acompañantes de tipo degenerativo. La mayoría de los tumores son grises o blanquecinos con apariencia fibrosa. Otra manifestación de este tipo tumoral es la formación de innumerables nódulos finos y duros que se sienten como gránulos de arena en el parénquima mamario. En su forma más característica se presenta con células uniformes, pequeñas, que crecen infiltrando: aisladamente en crecimiento lineal (“fila india”) o de manera concéntrica alrededor de lóbulos comprometidos por una neoplasia lobulillar in situ o de ductos dilatados formando anillos concéntricos (imagen en tiro al blanco de tiro). La formación glandular no es una característica del carcinoma lobulillar infiltrante (CLI). Las células pueden presentar lumina intracitoplasmática que contiene mucosustancias que son PAS (+) diastasa resistente, que no llegan a conformar la clásica célula en anillo de sello. (14)

A-5) Marcadores moleculares

A-5-1) Receptores de estrógeno

Los receptores de estrógeno son receptores hormonales nucleares (RE beta, RE alfa), pertenecen a la familia de receptores hormonales NR3, y están compuestos por 3 dominios, un dominio N-terminal de modulación, un dominio de unión al ADN y un dominio C-terminal de unión a esteroides. Estos activan la expresión de genes reporteros que contienen elementos de respuesta a estrógenos (ERE) cuando están unidos al ligando. El receptor es una proteína de 530 aminoácidos y posee un peso molecular de 60 KDa, este se une al ADN como homodímero aunque puede formar heterodímeros con ESR1 preferentemente. También inhibe la unión de ESR1 al ADN, interactúa con coactivadores dando lugar a un fuerte incremento de la transcripción de genes diana. Los receptores de estrógeno, contienen dominios de unión al ADN y de unión al ligando y están críticamente involucrados en la regulación de la función normal de los tejidos reproductivos. Están situados en el núcleo, aunque algunos receptores de estrógenos están asociados con la membrana de la superficie celular y pueden ser rápidamente activados por la exposición a los estrógenos celulares. Los RE alfa y RE beta han demostrado ser diferencialmente activados por ligandos diversos (15). Las interacciones ligando-receptor desencadenan una cascada de eventos, incluyendo la disociación de las proteínas de choque térmico, la dimerización del receptor, la fosforilación y la asociación de los receptores de la hormona activa con determinados elementos reguladores de genes diana. La evidencia sugiere que RE alfa y RE beta pueden ser regulados por mecanismos diferentes a pesar de que comparten muchas características funcionales. La isoforma beta-1 se expresa en el testículo y ovario, y en un nivel más bajo en el corazón, el cerebro, la placenta, hígado, músculo esquelético, bazo, timo, próstata, colon, médula ósea, glándula mamaria y en el útero. También es encontrado en el tejido mamario y en líneas de células tumorales de ovario, pero no en el colon y tumores hepáticos. La isoforma beta-2 se expresa en el bazo, timo, testículo y ovario, y en un nivel inferior en el músculo esquelético, próstata, colon, intestino delgado,

médula ósea, glándula mamaria y en el útero. La isoforma beta-3 se encuentra en los testículos. La Isoforma beta-4 se expresa en los testículos, y en un nivel inferior en el bazo, timo, glándula mamaria, ovario y en el útero. La isoforma beta-5 se expresa en los testículos, la placenta, músculo esquelético, bazo y los leucocitos, y en un nivel más bajo en el corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas, timo, próstata, colon, médula ósea, intestino delgado, glándula mamaria y el útero. No se expresa en el tejido nervioso. El receptor de estrógeno se determina en el cáncer de mama mediante la técnica de IHQ(16).

A-5-2) Receptores de progesterona

El receptor de progesterona (RP) es un miembro de la súper familia de receptores de esteroides. Las hormonas esteroides y sus receptores están involucrados en la regulación de la expresión de genes eucariotas y afectan la proliferación y diferenciación celular en los tejidos. Esta proteína media los efectos fisiológicos de la progesterona, que desempeña un papel central en los eventos reproductivos relacionados con el establecimiento y el mantenimiento del embarazo (17). El gen que codifica esta proteína utiliza dos promotores en diferentes sitios y comienza la traducción de la isoforma A en el primer exón y comienza la traducción de la isoforma B en el segundo exón. Las dos isoformas son idénticas excepto por el adicional de 165 aminoácidos que se encuentran en la N-terminal de la isoforma A (18). El receptor posee 933 aminoácidos y pesa 99 KDa está compuesto por 3 dominios, un dominio N-terminal de modulación, un dominio de unión al ADN y un dominio C-terminal de unión a esteroides. Pertenece a la familia NR3. En el cáncer de mama la determinación de la progesterona se realiza mediante técnicas de IHQ(19-20).

A-5-3) Expresión de Proteína Her-2/Neu

El descubrimiento de oncogenes que codifican para tirosina quinasas y el posterior hallazgo de que sus mutaciones pueden causar la transformación celular, deriva en el descubrimiento del primer oncogén que codifica un receptor con actividad tirosina quinasa. El gen neu se identificó como un oncogén en el DNA de neuroblastoma en Ratas neonatales con células NIH. Su homólogo humano, HER-2 fue identificado posteriormente por diferentes investigadores y cuando se clonó y secuenció, se encontró que estaba relacionado al oncogén EGFR humano (HER 1), el homólogo humano fue llamado HER 2 o, cerb B2, en relación al gen que provoca la patogénesis del eritroblastoma en el pollo (21). El HER2 es un protooncogen ubicado en el cromosoma 17q21 y es una de los genes más intensamente estudiados en cáncer. Este gen codifica para una glicoproteína ++transmembrana de 1522 AA y cuyo peso molecular es de 185 KDa llamada p185 HER2 y que generalmente se la llama HER2 (22). Esta proteína ha sido caracterizada como un receptor de membrana tirosina-quinasa. El HER2 se expresa en bajos niveles en muchos tejidos normales, incluyendo el tejido mamario sano y se cree que regula el crecimiento, diferenciación y muerte celular. HER-2 esta amplificado

en un alto porcentaje en el cáncer de mama lo que directamente induce una sobreexpresión de su receptor. Esta sobreexpresión se creía que estaba relacionada con la enfermedad y luego fue confirmada esa hipótesis con un estudio en ratones transgénicos que encontraron una conexión directa entre la amplificación del gen y el desarrollo de adenocarcinoma mamario (23).

A-5-4) Terapéutica con Trastuzumab.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/neu-Human epidemial “growth factor”) es un protooncogen que codifica para una glicoproteína transmembrana caracterizada como un receptor tirosina-quinasa (24). El HER2/neu se expresa en bajos niveles en muchos tejidos normales, incluyendo el tejido mamario sano y se cree que regula el crecimiento, diferenciación y muerte celular. HER2/neu esta amplificado en un alto porcentaje en el cáncer de mama lo que directamente induce una sobreexpresión de su receptor (22). El interés en estudiar la proteína HER2/neu radica en que las pacientes que presentan una sobreexpresión de dicha proteína, presentan un peor *pronóstico*(25), a su vez estas pacientes poseen una ventaja en su tratamiento debido a que existe una droga blanco específica denominada trastuzumab que compite por el sitio del receptor tirosina-quinasa de la misma. El descubrimiento de los hechos mencionados anteriormente llevó a la producción y estudio de una serie de anticuerpos monoclonales murinos dirigidos especialmente contra el dominio extracelular de receptor Neu. Uno de ellos, fue seleccionado por su actividad preclínica y humanizado por ingeniería genética, recibiendo el nombre genérico de Trastuzumab. Ésta versión humanizada es una IgG1 que contiene regiones estructurales humanas dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) encargadas de reconocer al receptor HER2/neu. Trastuzumab (Herceptin) fue desarrollado con el fin de inhibir el crecimiento in vitro de las células de cáncer de mama humano que sobre expresan HER2/neu, pero no de las que no lo sobre expresan. Así mismo, es capaz de inhibir la formación de heterodímeros HER2/HER/3 y HER2/HER/4. Se ha sugerido también que la unión de trastuzumab al receptor induce citotoxicidad mediada por anticuerpos. También podría tener acción antiangiogénica. Por estos motivos uno de los principales usos del trastuzumab radica en la generación de tratamientos más selectivos para el cáncer de mama (26).

A-5-5) Ki-67.

La proteína Ki-67 se la considera necesario para el mantenimiento de la proliferación celular, es una proteína de 3256 aminoácidos y que tiene un peso molecular de 359 Kda. Esta proteína se encuentra en el núcleo, en la fase G1 del ciclo celular esta predominantemente en la región perinuclear, y en las fases más tardías se detecta en todo el interior nuclear, siendo mayormente localizada en la matriz nuclear, durante la mitosis está presente en todos los cromosomas (27). El anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 detecta un antígeno nuclear que se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis) pero no en G0, por lo tanto, el anticuerpo

monoclonal Ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido (28), el Ki-67 es útil para la creciente fracción celular en las neoplasias (inmunohistoquímica cuantificado mediante la determinación del número de células Ki-67 positivas entre el número total de células en reposo = índice de Ki-67). En los tejidos neoplásicos el valor pronóstico es comparable con el índice de timidina tritiada etiquetada. La correlación entre el bajo índice de Ki 67 y los tumores de bajo grado histológico es fuerte. El Ki-67 se utiliza habitualmente como indicador de la proliferación celular. Es una herramienta útil para la determinación de la fracción proliferativa en tumores como el linfoma no Hodgkin. De acuerdo al porcentaje de células de un tejido que expresen Ki-67 se puede determinar mediante inmunohistoquímica el índice de proliferación celular, lo cual es un determinante pronóstico (29).

A-5-6) BRCA 1

Esta fosfoproteína juega papel central en la reparación del ADN, facilitando la respuesta celular a la reparación del mismo. Es necesaria para adaptar el ciclo celular después de la exposición a radiaciones ionizantes, tanto en la fase S como en la fase G2 del ciclo celular. También la fosfoproteína está implicada en la regulación transcripcional de p21 en respuesta al daño del ADN. La proteína es necesaria para la ubicación de FANCD2 a los sitios de daño en el ADN. Funciona como un regulador transcripcional, media la ubiquitinación dependiente de E2 e inhibe la síntesis de lípidos mediante la unión a la secuencia ACACA fosforilada y no permite que se desfosforile. Esta proteína posee 1863 aminoácidos y tiene un peso molecular de 208 KDa, se encuentra en el núcleo celular. Esta proteína es fosforilada en respuesta a radiación IR, UV y diversos estímulos que provocan la activación de los “puestos de control”, tiene un dominio de dedos de zinc de tipo anillo e interactúa con BAP1. Defectos en el gen BRCA 1 son la causa de la susceptibilidad genética al cáncer de mama, las mutaciones en el gen BRCA 1 se cree que son las responsables del 45% del cáncer de mama hereditario. Por otra parte las portadoras de BRCA 1 tienen 4 veces más de probabilidades de riesgo de adquirir cáncer de colon, mientras que los portadores masculinos tienen 3 veces más riesgos de contraer cáncer de próstata. Las células que carecen de BRCA 1 muestran defectos en la reparación del ADN, y defectos en los genes BRCA 1 son la causa de la susceptibilidad genética al cáncer de mama y de ovario. La proteína contiene dos dominios BRCT y un dominio tipo dedo de zinc en anillo. Este gen codifica una fosfoproteína nuclear que desempeña un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica y actúa como un supresor tumoral. La proteína codificada se combina con otros supresores de tumores, el daño del ADN sensores y transductores de señales para formar una subunidad de proteína compleja de varios grandes conocidas como BASC para asociados genoma de vigilancia complejo BRCA1. Este producto genético asociados con la RNA polimerasa II, a través de la terminal C de dominio, también interactúa con el complejo histona deacetilasa. Esta proteína desempeña un papel en la transcripción, la reparación del ADN de doble cadena si es dañado, y la recombinación. Las mutaciones en este gen son responsables de aproximadamente el 40% de los cánceres de mama heredados y más del 80% de cáncer de mama y ovario hereditario. El

splicing alternativo desempeña un papel en la modulación de la localización subcelular y función fisiológica de este gen. Muchas variantes de la transcripción empalmados alternativamente se han descrito para este gen, pero sólo algunos han tenido su naturaleza de cuerpo entero identificados. Dos genes de susceptibilidad para el cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2, han sido identificados (30). Ambos genes son considerados como genes supresores de tumores. Las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 son responsables de la mayoría de los casos familiares de cáncer de mama. El análisis funcional de los productos de los genes BRCA1 y BRCA2 ha establecido la doble participación en la regulación de la transcripción y la reparación de daños en el ADN. BRCA1 afecta a la regulación del ciclo celular, y la pérdida de los genes BRCA1 debido a la disminución en la expresión conduce a la detención del ciclo celular, a través de los genes p53 y p21 (31).

A-6) Clasificación molecular:

El cáncer de mama no es una única entidad sino un grupo muy heterogéneo de enfermedades manifestadas por diferencias moleculares, histopatológicas y clínicas que pueden originarse de líneas celulares diferentes o “*stem cells*”. Los estudios genético moleculares tan útiles como FISH o Hibridización “in situ” cromogénica (CISH), no son de uso corriente en la rutina diagnóstica del cáncer de mama en todos los Centros hospitalarios. Es por ello que varios estudios han investigado el rol de paneles de inmunohistoquímica que puedan ser utilizados en la rutina diagnóstica para clasificar los cánceres de mama al igual que la expresión de análisis genético. Sin embargo ha sido difícil consensuar cual es el panel de inmunohistoquímica más apropiado (32).

Desde el punto de vista molecular y de acuerdo a la expresión de varias proteínas, se ha dividido al cáncer de mama en 4 subtipos (32):

1)-**Luminal A-** este subtipo expresa receptores de estrógeno, receptores de progesterona Positivos o negativos y her2/neu negativo, es el subtipo más frecuente de cáncer de mama(32), se asocia con un mejor pronóstico y es menos agresivo que el subtipo basal o el que sobre expresa Her2/neu.

2)-**Luminal B-** Los tumores del subtipo Luminal B, tiene receptores de estrógenos positivos, receptores de progesterona positivo, her2/neu positiva. Los pacientes con patrón Luminal B tienen una sobrevida libre de enfermedad muy corta al igual que la sobrevida global.

3)-**HER2/neu** (sobreexpresión)- El subtipo Her2/neu presenta receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos y Her2 positivo. Este grupo es habitualmente resistente a la terapia endocrina y se trata a menudo con trastuzumab. Esta variante debe siempre ser correlacionada con la hibridización “in situ” fluorescente (FISH) cuando el resultado de la expresión de la proteína Her-2Neu es 2+ de acuerdo a un protocolo de interpretación de la expresión preestablecido y estandarizado. (33)

4)-**Basal-like-**El subtipo Basal-like o basal mioepitelial presenta receptores de estrógeno negativo, receptores de progesterona negativos y Her2 negativo. Estudios sobre la expresión genética de citoqueratinas, caracterizaron la expresión de genes en el

grupo de cáncer de mama basal asociado con células mioepiteliales. El hallazgo clínico más significativo reveló que éste subtipo es el más agresivo y con menor tiempo libre de enfermedad. (34) Estos subtipos varían en términos de diferentes etnias, evolución clínica, sobrevida y respuesta terapéutica.

A-7) Diagnóstico, terapéutica y pronóstico.

A-7-1) Diagnóstico

El diagnóstico de Cáncer de Mama es clínico – radiológico y anátomo patológico , el médico debe examinar las mamas y las regiones axilares en busca de alteraciones que orienten al diagnóstico. Se debe instruir a la mujer como realizar el auto examen el aumento del empleo del “*screening*” mamográfico desde los inicios de 1980 ha resultado en un aumento dramático del número de casos de DCIS. El 30 - 40% del cáncer de mama es detectado por mamografía. El patrón mamográfico más frecuente de presentación son las microcalcificaciones. Más del 30% de las lesiones de DCIS pueden presentarse con otros hallazgos mamográficos tal como alteración de la densidad con o sin microcalcificaciones, con áreas de distorsión de la arquitectura(35, 36, 37).

A-7-2) Terapéutica

El tratamiento óptimo del cáncer de mama debería ser abordado por un equipo inter disciplinario integrado por: cirujanos, oncólogos médicos, oncólogos radioterapeutas, cirujanos plásticos, fisioterapeutas y psicólogos médicos. Existen varias alternativas para el tratamiento, estas son cirugía, quimioterapia (QT), radioterapia (RT), terapia hormonal y nuevos blancos moleculares. En general se utilizan más de una. En la mayoría de los casos, el factor más importante en la selección del tratamiento es la etapa de la enfermedad. También es necesario que el anátomo patólogo realice la determinación de receptores hormonales en el tumor, ya que son importantes como factor pronóstico y para definir el tratamiento. Además debe determinarse la presencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER2) o el HER2/neu gen. La presencia del receptor de HER2 empobrece el pronóstico y tiene implicancias en la selección de los tratamientos sistémicos. En general luego de la cirugía la mayoría de las pacientes reciben algún tratamiento sistémico (37).

A-7-3) Pronóstico

El 60% de las pacientes afectadas por carcinoma invasivo de mama de mama localizado tienen un 60% de probabilidades de sobrevivir 5 años, mientras que las pacientes que presentan al carcinoma diseminado presentan un 34 % de probabilidades de sobrevivir 5 años aunque esto depende mucho de otras variables como la edad de las pacientes, diagnósticos prematuros, tamaño del tumor primario, tipo de tumor y la biología molecular del mismo así como de otros factores (1).

A-8) Familia de las ciclooxigenasas, vía de la COX, y vía del ácido araquidónico.

Los avances de la medicina tienden a buscar nuevos marcadores moleculares para la determinación de nuevos y mas personalizados diagnósticos y tratamientos. Uno de los marcadores que se ha intentado relacionar al cáncer en general es la proteína COX.

A-8-1) COX-2

La COX cataliza la unión de dos moléculas de oxígeno y la formación de endoperoxidos cíclicos, es la enzima limitante en la biosíntesis de prostaglandinas y eicosanoides. La actividad de las enzimas COX-1 y COX-2 se ha demostrado que modulan el crecimiento de tumores al influir en la expresión de moléculas angiogénicas. La COX-2 es sobreexpresada en varios tumores malignos como por ejemplo el cáncer de mama (38). El metabolismo de la prostaglandina juega un papel fundamental en los procesos inflamatorios y también se ha demostrado que tiene un papel en la diferenciación de la *carcinogénesis, tumoración y su crecimiento en el cáncer de mama*. La ciclooxigenasa-2 es la enzima clave implicada, ya que dispara la síntesis de prostaglandinas y tienen impacto en el *cáncer de mama*, delinear posibles estrategias futuras de prevención y terapéuticas (39-40).

A-8-2) Vía de la ciclooxigenasas:

Tres formas de las enzimas COX están expresadas en los tejidos de mamíferos que son COX-1, COX-2 y COX-3. La COX-1 está implicado en diversos procesos fisiológicos y por lo tanto se llama enzima del "hogar". Mediadores inflamatorios como las citoquinas, factores de crecimiento y endotoxinas bacterianas rápidamente pueden inducir la síntesis de la COX-2, que normalmente es indetectable en los tejidos normales. Sin embargo, la COX-2 se expresa constitutivamente en los riñones, el estómago y el cerebro COX-1 y COX-2 tienen alrededor del 60% de homología. Las longitudes respectivas de los genes de la COX-1 y COX-2 son de 22 Kb y 8.3kb. El ARN m de la COX-1 tiene una longitud de unos 2,8 Kb, que de la COX-2 aproximadamente 4,0 Kb. La ciclooxigenasa (COX) o también conocida como prostaglandina H sintasa (PGHS), pertenece a la familia de las oxigenasas que son enzimas que catalizan la transferencia y la incorporación directa del oxígeno en una molécula de sustrato. Las COX son glicoproteínas diméricas con un grupo hemo, es una proteína integral de membrana del retículo. La COX cataliza la unión de dos moléculas de oxígeno y la formación de endoperoxidos cíclicos como el PGH que se convierte en las prostaglandinas D, E y F así como el tromboxano (TXA2) y la prostaciclina (PGI), la COX es la enzima limitante en la biosíntesis de prostaglandinas y eicosanoides. La PGSH posee dos actividades enzimáticas, una actividad ciclo-oxigenasas y una actividad peroxidasa, la COX-3 es una nueva isoforma acetaminofeno-sensibles de la familia de las COX con diferentes propiedades farmacológicas que se han descrito para la COX-3 en comparación con el COX-1 y COX-2, muchos investigadores creen que es una variante de empalme (splicing) de la COX-1 (41). Así, la COX-3 es un producto del gen COX-1, pero conserva un intrón en su ARNm. La COX-3 es una glicoproteína. Estudios realizados en

animales, comparando la actividad de COX-3 con la de la COX-1 y COX-2 indican que los analgésicos como el paracetamol, inhiben selectivamente COX-3, y algunos medicamentos anti-inflamatorios son potentes inhibidores de COX-3. Por lo tanto, la inhibición de la COX-3 podría representar un mecanismo por el cual posiblemente estos medicamentos reduzcan el dolor y la fiebre (42).

A-8-3) Vía del Ácido Araquidónico.

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso Ω 6-poliinsaturados (AGPI). Se libera por hidrólisis de los lípidos de la membrana por las diferentes isoformas de la fosfolipasa A2. El AA es metabolizado a compuestos biológicamente activos llamados eicosanoides (Figura 7). Los eicosanoides son una familia de mediadores lipídicos biológicamente activos, principalmente generada por dos tipos de enzimas: las ciclooxigenasas y lipoxigenasas. Los eicosanoides son usados para modular ciertos procesos Fisiológicos y patológicos. Juegan un papel importante en la carcinogénesis, la proliferación, la adhesión y la angiogénesis celular, la permeabilidad vascular y la inflamación (43, 44).

B) Objetivos

B-1) Objetivo general:

Caracterización de la expresión de diferentes marcadores moleculares diferentes a los comúnmente evaluados presentes en el cáncer de mama en mujeres uruguayas.

B-2) Objetivos específicos:

- Estudiar la expresión de RP, RE, Her2/neu, Ki-67 en las biopsias de mujeres uruguayas portadoras de cáncer de mama
- Clasificar las biopsias de cáncer de mama de mujeres uruguayas según la clasificación molecular
- Determinar la sobreexpresión de COX-2 y BRCA-1 en biopsias de mama de pacientes uruguayas portadoras de cáncer de mama.
- Correlacionar COX-2 y BRCA-1 con la clasificación molecular.

C) Materiales y Métodos

Se realizó un trabajo retrospectivo sobre un total de 23 muestras de biopsias de mama diagnosticadas como cáncer de mama del tipo ductal infiltrante durante el periodo de los años 2008 al 2010 en la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina del Hospital de Clínicas, Universidad de la República. Cuando agrupamos según sexo, raza, edad y topografía tumoral observamos que la totalidad de los casos son de CDI, de

raza blanca y de sexo femenino. En cuanto a la topografía tumoral observamos 13 casos con el cuadrante superior externo de mama derecha (CSEMD) afectado y 10 casos con el cuadrante superior de la mama izquierda (CSEMI) afectada. Solamente 3 casos resultaron tener ganglios linfáticos positivos, dos de pacientes con CSEMD (66 y 76 años) y 1 de CSEMI(65 años), la media de edad fue de 61 años y cuyas edades estaban comprendidas entre 37 y 77 años(*Tabla 1*). Las biopsias analizadas estaban incluidas en parafina y se les cortó secciones de 4 micras para realizar el estudio histológico. A estos cortes se les realizaron técnicas de inmunohistoquímica para RE (Receptor de estrógeno), RP (Receptor de progesterona), Proteína Her2/Neu, Ki 67, COX2, BRCA-1, . Los anticuerpos empleados COX2 (isotipo IgG1, clona SP2, conejo monoclonal) y BRCA1 (isotipo IgM kappa, clona GLK-2, ratón monoclonal) son fabricados por BIOCARE (*Biocare Medical, Concord, Calif*), mientras que RE (isotipo IgG1 Kappa, clona 1D5, ratón monoclonal), RP (isotipo IgG1, clonas PgR636, ratón monoclonal), Her2/neu (Herceptest), Ki67 (isotipo IgG1 Kappa, clona MIB-1(8) y ratón monoclonal FLEX), fabricados por DAKO (*DAKO, Carpinteria, CA, USA*). Todas las técnicas fueron visualizadas con el Kit “DAKO-ENVISION+SYSTEM- HRP (DAB)”.

Inmunohistoquímica y su procedimiento: Para conservar el material biológico se utiliza formol tamponado. Se realizó la técnica sobre cortes de 4 micras de tejido mamario obtenido de pacientes con cáncer de mama. Esta técnica fue diagnosticada por un único patólogo y se emplea para ver la distribución de proteínas celulares y tejidos. Ella consiste en varios pasos. Primero se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena, mediante la incubación del tejido con una solución de peróxido de hidrógeno de concentración 1 Molar por 15 minutos. Para evitar una tinción de fondo inespecífica de la técnica (*Background*) se incubó por 15 minutos los cortes de tejido con *Background snipper* (*Biocare Medical, Concord, Calif*), perteneciente a un Kit de BIOCARE; esta tinción de fondo es causada por la unión no inmunológica del anticuerpo primario a ciertos componentes de los tejidos, sobre todo a colágeno y reticulina debido a fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas. La coloración de fondo puede reducirse bloqueando los lugares con afinidad no inmune por las inmunoglobulinas.

Luego se incuban los anticuerpos primarios, que se utilizan según protocolo del fabricante. Después para revelar la presencia de inmunocomplejos se incuban con el anticuerpo secundario por un periodo de 30 minutos, el mismo está conjugado a peroxidasa. Luego se incuban los cortes con un sustrato cromogénico. Se empleó DAB (3-3 diaminobenzidina) en buffer perteneciente al kit de BIOCARE al igual que el DAB. Finalmente, el tejido es puesto en contacto con hematoxilina, de forma de generar una contratinción o un fondo que permita distinguir las regiones positivas con mayor claridad. Posteriormente se deshidrató el tejido mediante su incubación con soluciones de concentración creciente de etanol hasta una solución final de Xilól, y se montan los cortes. Se realizan controles positivos con cortes de tejidos previamente diagnosticados como positivos para cada anticuerpo en las mismas condiciones que las muestras. Al igual que para COX2 se realizó el estudio para el marcador BRCA1 en los tejidos de las biopsias de cáncer de mama por IHQ y se usaron los mismos criterios de consideración para el conteo de los casos como positivo o negativo con el grado de intensidad de tinción, los del grado de positividad 0 fueron negativos y los de grados 1, 2 o 3 fueron considerados positivos.

Análisis: Se realizó un estudio estadístico descriptivo de los datos obtenidos mediante IHQ, donde se consideró como casos positivos los que presentaban un grado de intensidad de tinción 1, 2 o 3 y aquellos con un grado de intensidad 0 como negativo a la IHQ.

D) Resultados

Los 23 pacientes estudiados fueron seleccionados por ser casos diagnosticados de carcinoma ductal infiltrante. A las biopsias de mama se les realizó estudios de IHQ para receptores de estrógeno, receptores de progesterona, expresión Her2/neu, Ki-67, (Figuras 10, 11, 12, 13 respectivamente).

De los 23 pacientes estudiados portadores de carcinoma ductal infiltrante, 13 fueron positivos para receptor de estrógeno y 10 negativos para el mismo. Del estudio de la expresión de receptores de progesterona en las muestras analizadas se encontró que 12 fueron positivos siendo los restantes 11 negativos. Con respecto a la expresión de la proteína Her2/neu se encontró que 7 casos fueron positivos y 16 negativos, mientras que para la expresión de la proteína Ki-67 se encontraron 6 muestras positivas y 17 negativas (Tabla 2).

En el análisis de la expresión de receptores hormonales (Progesterona y Estrógenos, n=11) junto con la expresión de Ki-67 la misma encontró que 3 casos fueron positivos para los tres marcadores siendo los restantes negativos. Con respecto a la coexpresión de receptores hormonales (n=11) y sobreexpresión de Her2/neu, se evidenció que solo un caso fue positivo siendo los restantes negativos.

El análisis de la coexpresión de Ki-67 junto con Her2/neu encontró 3 muestras positivas para ambos receptores, siendo las restantes negativas para ambos receptores coexpresados.

Cuando la expresión de los receptores hormonales fue negativa para ambas proteínas (n=9), al observar la expresión de Ki-67 resultó ser que tres de esos casos fueron positivos y seis no expresaron proteína Ki-67. Al observar la sobreexpresión de los receptores hormonales con la sobreexpresión de Her2/neu resultó que también tres casos fueron positivos y seis casos no sobreexpresaron Her2/neu.

Cuando observamos los casos en que solo se vio positividad de la muestra para uno de los receptores hormonales, el receptor de progesterona (n=1), se observó que este presentó negatividad para la proteína Ki-67 y sobreexpresión de Her2/neu. Se encontraron dos casos donde fue positivo para el receptor de estrógeno y negativo para el de progesterona. Al observar la expresión de Ki-67 en ambos casos se vio ausencia de la misma, mientras que la sobreexpresión de Her2/neu fue positiva en uno de ellas y negativa en el restante.

Para llevar a cabo la Clasificación Molecular se correlacionó la expresión de los receptores hormonales (estrógeno y progesterona) con la sobreexpresión de la proteína Her2/neu y con Ki-67.

Es así que encontramos que once pacientes fueron catalogados como pertenecientes al subtipo Luminal A, tres del Luminal B, cinco resultaron ser del subtipo Her2/neu y casos catalogados pertenecientes al subtipo “*Basal like*” (Tabla 2,3).

Para la búsqueda de los nuevos marcadores COX-2 y BRCA-1 se realizó la técnica de IHQ para dichas proteínas (Figura 8 y 10 respectivamente). Se realizó la correlación de la clasificación molecular con la expresión de estas proteínas COX-2 y BRCA-1.

Al relacionar la expresión de COX-2 con la clasificación molecular (*Tabla 2*) se encontró que de once casos del subtipo molecular Luminal A diez fueron positivos para la IHQ, la sobreexpresión de la enzima COX-2 fue variada y presenta un caso negativo, un caso positivo (+), tres casos positivos (++) y seis casos positivos (+++).

Para el subtipo molecular Luminal B todos los casos fueron positivos con una cruz (+) (n=3) para COX-2.

El subtipo molecular Her2/neu tres casos fueron positivos con una cruz (+) y dos casos fueron positivos para tres cruces (+++), presentó COX-2 positiva para todos los casos (n=5).

Por último para el subtipo molecular “*Basal like*” también todos los casos fueron positivos para COX-2 (n=4), dos de los casos fueron positivos para dos cruces (+ +), y los dos casos restantes fueron positivos para tres cruces (+++).

Cuando relacionamos la clasificación molecular con la sobreexpresión de la proteína BRCA-1 observamos que para el subtipo molecular Luminal A de los 11 casos solamente uno fue positivo para la misma y los restantes diez no sobreexpresaron la proteína. Cuando observamos el subtipo Luminal B resulta que solamente uno de tres casos si sobreexpresó BRCA-1 siendo negativos los restantes dos casos. Al observar el subtipo molecular Her2/neu resulta que dos casos de los cinco totales sobreexpresan la proteína Her2/neu y los otros tres casos no lo hacen. Por último para el subtipo molecular “*Basal like*” dos de los cuatro casos sobreexpresan BRCA-1 y los dos restantes no lo hacen.

E) Discusión

Cuando se diagnostica el cáncer de mama es fundamental establecer sus características clínicas, histomorfológicas, inmunohistoquímicas y moleculares para poder determinar el estadio patológico de la enfermedad, establecer su terapéutica y evaluar su pronóstico. Es así que nos planteamos evaluar la expresión de los RP, RE, Her2 y Ki-67 en las muestras de las biopsias de cáncer de mama de las 23 mujeres uruguayas estudiadas portadoras de CDI.

Estos resultados permitieron llevar adelante la clasificación molecular de cada una de las muestras analizadas, los cuales nos han brindado una aproximación a la realidad de nuestro medio. Es así que los resultados obtenidos para las biopsias de las pacientes uruguayas diagnosticadas de cáncer de mama CDI empleadas en este trabajo indican que el subtipo molecular Luminal A es el subtipo más frecuente (11/23), esto concuerda con lo descrito en la literatura (32). El patrón molecular de tipo luminal A, caracterizado por sobreexpresar receptores de estrógeno, receptor de progesterona, negatividad para la proteína Her2/neu y negatividad para Ki-67. Los restantes subtipos por frecuencia fueron los subtipo HER2 (5/23) seguidos de los subtipos Basal Like (4/23) y por último el Luminal B (3/23).

Con respecto a la expresión de COX-2 se piensa que la misma favorecería al fenotipo maligno a través de la promoción de la angiogénesis. La expresión de COX-2 en tumores se ha correlacionado con una mayor microdensidad vascular en cánceres de colon, pulmón y estómago; se cree que la COX2 produce factores angiogénicos aumentando la proliferación celular de la célula neoplásica, aumentando el potencial metastático. La inhibición selectiva de COX-2, suprime la tumorigénesis en modelos de cánceres de mama en ratones. En los pacientes con cáncer de mama la expresión de ARNm de COX-2 y de la enzima COX-2 misma se encuentra elevada.

En nuestra serie hemos observado una alta expresión de la misma (22/23), lo cual puede estar relacionado con el hecho de que el mismo juega un rol importante en la diferenciación de la carcinogénesis, tumoración y el crecimiento en el cáncer de mama (39, 40). Numerosos estudios indican que la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es altamente expresada en una variedad de cánceres humanos, incluidos los de colon, mama y próstata. En el cáncer de mama, la expresión de la COX-2 gen está asociado con un alto grado tumoral(45).

En la muestra estudiada se observa que los carcinomas COX-2 positivos se asocian a un alto grado histológico y negatividad para los receptores hormonales. El mecanismo por el cual la COX-2 esta supra regulada en el cáncer de mama es desconocida, pero una posibilidad es que las células cancerosas sean intrínsecamente más activas en la expresión de COX-2 que en las no neoplásicas. Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de COX-2, al igual que los reportados en la literatura internacional, muestran que la casi totalidad de la muestras examinadas expresaron COX-2.

La incorporación de la búsqueda de COX-2 como biomarcador pronóstico sería muy importante ya que el mismo predomina en los fenotipos de patrón histomolecular de mayor agresividad, es decir aquellos con promotores de angiogénesis elevados y mayor potencial de diseminación neoplásica. Su identificación quizá pudiera ser relevante para emplear inhibidores selectivos de COX-2 en los carcinomas mamarios con expresión intensa de este marcador.

La mayoría de los casos de cáncer de mama no tienen causa identificable, pero aproximadamente del 5 al 10% son causados por mutaciones genéticas. Los genes de alta susceptibilidad a cáncer de mama (BRCA-1 y BRCA-2) se transfieren de forma autosómica dominante con penetrancia variable. BRCA-1 es un supresor de tumores y se piensa que está relacionado con la apoptosis celular además de muchas otras funciones celulares regulatorias. La pérdida de la expresión de BRCA-1 es relacionada con una escasa diferenciación tumoral y ganglios linfáticos metastáticos (30). BRCA-1 en el tejido mamario normal se encuentra altamente regulado (46).

En la evaluación de la expresión del BRCA-1 en las muestras estudiadas de cáncer CDI, se encontró que solamente 6 muestras fueron positivas (6/23). Esto nos hace pensar que la pobre relación existente entre la expresión de BRCA1 en la muestra estudiada pueda ser debida al tipo histológico de cáncer de mama (CDI). Otra posible explicación puede ser que nuestras pacientes no presentaban alta incidencia de cáncer de mama hereditario. Esto último no lo podemos afirmar ya que carecemos de los datos sobre

antecedentes familiares de los pacientes. Cabe recordar que las mutaciones en el gen BRCA1 son responsables del 45% del cáncer de mama hereditario (30).

Se observó que en los subtipo moleculares Luminal A, Luminal B, Basal Like presentaban una elevada sobreexpresión de COX2 (10/11, 3/3, 4/4). Es posible pensar que dicha sobreexpresión colabore en la diferenciación de la carcinogénesis (40) de estos subtipos moleculares de cáncer. Por otro lado el subtipo Her 2 fue el que presentó una menor sobreexpresión del mismo (2/5). A pesar de que nuestra muestra fue escasa (n=23) es llamativo el hecho de que el subtipo molecular Her2 fuera el que mostrara la menor correlación con la expresión de COX2. Sin embargo Subbaramaiah y col. (47) encontraron evidencia de la sobreexpresión de COX2 en cáncer de mama HER2 positivo. Estos datos pueden quizá estar en relación con el subtipo de cáncer de mama estudiado ya que nuestro trabajo se realizó con muestras de tumores CDI y el del autor con líneas celulares 184B5/HER. Este subtipo molecular es bastante agresivo y es dado por la sobreexpresión abundante de la proteína Her2/neu. Los resultados obtenidos nos plantean que sería interesante estudiar en una muestra mayor si estas relaciones se mantienen o difieren. Por otro lado sería de interés relacionarlas con la sobrevida de los pacientes, lo cual podría aportar información pronóstica sobre los mismos.

Con respecto a la expresión de BRCA1 en relación con los subtipos moleculares, se encontró una expresión leve-moderada de la misma para todos ellos (luminal A 1/11, luminal B 1/3, basal like 2/4, Her2 2/5). Nuevamente cabe destacar que nuestra muestra es pequeña, pero sin embargo podemos destacar la baja correlación entre el subtipo Luminal A y BRCA1. Siendo el subtipo luminal A el más frecuente (32) cabe plantearse el rol de las alteraciones BRCA1 en este subtipo. Una posible explicación de los datos obtenidos puede ser que para este subtipo el componente hereditario de los tumores no sea el predominante. Por otro lado se sabe que los cánceres HER2 positivos no son comunes en pacientes con cánceres asociados a mutaciones BRCA (48), esto podría explicar la baja expresión de BRCA1 en el subtipo HER2 (2/5). Con respecto a la expresión de BRCA1 en el subtipo basal like se ha descrito que existiría una conexión entre la vía del BRCA1 y el subtipo basal like (49). A pesar de lo pequeña de nuestra muestra, encontramos que una expresión del 50% de la misma, lo que apoyaría los resultados descritos. La expresión del subtipo luminal B fue baja (1/3), lo cual puede estar en relación con el cáncer de mama esporádico.

F) Conclusión

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en Uruguay, presentando nuestro país una de las tasas más altas de mortalidad de la región. El estudio de marcadores moleculares capaces de clasificar mejor esta patología permite hacer posibles tratamientos más individualizados. El presente estudio llevo adelante la clasificación

molecular de las muestras de 23 biopsias de mama de mujeres uruguayas portadoras de CDI y las correlacionó con la expresión de COX-2 y BRCA-1. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en la literatura internacional. Sería de interés lograr trasladar esta experiencia a un mayor número de pacientes, para que de esta forma puedan beneficiarse de la información pronóstica y de una terapia mas individualizada.

G) Bibliografía

- 1-Robbins., Cotran., Kumar V., Abbas AK., Fausto N.:** Patología estructural y funcional. 2005; 7a edición. 1124-1128 .
- 2-Shackleton M., Vaillant F., Simpson KJ., et al:** Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*. 2006; 439:84–88.
- 3-Stingl J., Eirew P., Ricketson I., et al:** Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*. 2006;439:993–997.
- 4-Rosen PP., Harold AO.:** Tumors of the Mammary Gland. 3ª edición, fascículo 7; editorial AFIP, 1992; 11-13
- 5-Rosai J.:** *Surgical Patholog.* 8ª edición volume 2, Editoria Mosby, 1995 ; 1565-1568.
- 6-Burstein HJ, Harris JR, Morrow M.** Malignant tumors of the breast. *Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1606–1654.
- 7-Muse I. , Masetti D. , Sosa M. A. , Hinojosa L. S. y Terradas M. L.** *Manual De Oncología Para El Primer Nivel De Atención* ; 2004:10-12.
- 8-Clasificación del carcinoma mamario de la OMS (2008)**
- 9-Mark S Talamonti.:** Management of ductal carcinoma in situ. *Seminars Surg Oncol* 1996; 12:300-313.
- 10-Michael D. Lagios.:** Carcinoma Ductal in Situ: clasificación, inferencias biológicas y resultados clínicos. *Focus* 2000; 10: 33-46
- 11-Mark S Talamonti.:** Management of ductal carcinoma in situ. *Seminars Surg Oncol* 1996; 12:300-313.
- 12-De Vita Vincent T.:** *Cancer Principles and Practice of Oncology* 5ª Edición. Lippincott-Raven, 1997.
- 13-Foote FW J., Stewart FW.:** Lobular carcinoma in situ: A rare form of mammary carcinoma. *Am JPathol* 1992; 17: 491-99
- 14-López Valle M. A., Uriban Aguilar Gallegos, Dulce María Albertina Camarena**

Cabrera. Carcinoma lobulillar infiltrante de mama: etapa clínica, características radiológicas e histológicas. *Ginecol Obstet Mex* 2005;73:629-36.

15-Jensen E., Cheng G., Palmieri C., Saji S., Makela S., Van Noorden S., Wahlstrom V., Warner W., Coombes RC., Gustafsson JA.: Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *PNAS*. 2001; vol. 98. no. 26. 15197– 15202.

16-Sommer S, Fuqua SA.: Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2001 Oct;11(5):339-52.

17-Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, To TV, Qian Z, Love RR, Allred DC.: Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol*. 2004 Dec;17(12):1545-54.

18-Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7:1244–1255.

19-Xiuhua Gao and Zafar Nawaz.: 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, 4:182-186.

20-Syed K Mohsin, Heidi Weiss, Thomas Havighurst, Gary M Clark, Melora Berardo, Le D Roanh, Ta V To , Qian Zho, Richard R Love and D Craig Allred.: Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Modern Pathology*(2004) 17,1545–1554.

21-Kaptain S, Tan LK, Chen B. HER-2/neu and breast cancer. *Diagnostic Molecular Pathol*. 2001;139-152.

22-Akiyama T., Sudo C., Ogawara H., Toyoshima K., Yamamoto T.: The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 1986; 232(4758):1644-6.

23-Jeffrey S. Rossa,b, Jonathan A. Fletcherc, Gerald P. Linetteb,d,James Stecb,EdwardClarkb,Mark Ayersb,W. Fraser Symmanse,Lajos Pusztai e and Kenneth J. Bloom.: The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. August 2003vol. 8no. 4 307-325 the oncologist.

24- Stern DF, Hefferman PA, Weinberg RA. p185, a product of the neu proto-oncogen, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol*. 1986;6:1729-40.

25-Montse Verdú Artufel: Protocolo de estudio molecular del oncogénHER2/neu en el carcinoma de mama. *Clinical and Translational Oncology*. December 2005, Volume 7, Issue 11, pp 504-511.

26-Smith IE. Efficacy and safety of Herceptin® in women with metastatic breast cancer: results from pivotal clinical studies. *Anticancer Drugs*. 2001;12 Supl 4:S3-10.

27-Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA.: Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010 Feb;11(2):174-83.

28-Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M: The cell cycle-associated change of the Ki67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987; 133: 579-584.

29-Gerdes J: Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistochemical diagnostic and pronostic evaluations in human malignancies. *Seminars in Cancer Biology* 1990; Vol 1: 199-206.

30-Scully R & Livingston D.: In search of the tumour-supressor functions of BRCA-1

and BRCA-2 Nature 2000, 408: 429-432.

31-Ouchi T, Monteiro A, August A, Aaronson S & Ha-nafusa H. BRCA-1 regulates p53-dependent gene ex-pression. Proc. Natl.Acad. Sci. 1998, 95: 2302-2306.

32-M.A. Arrechea Irigoyen, et al.: Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. An. Sist. Sanit. Navar. 2011; 34 (2): 219-233.

33-Gerson R1, Serrano A. Prognosis in early breast cancer according HER2 and hormone receptors expression Gamo Vol. 7 Núm. 2, Mar-Abr 2008.

34-Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF.: Molecular classification of breast cancer: Limitations and potential. Oncologist. 2006; 11:868-877.

35-Cady Blake. How to Prevent Invasive Breast Cancer: Detect and Excise Duct Carcinoma in Situ. J. of Surg Oncol 1998; 69:60-62.

36-Osteen RT. Limits of Resection for Ductal carcinoma in Situ. J of Surg. Oncol 1998; 69:63-65.

37-Muse I, Masetti D., Sosa M. A., Hinojosa L. S. y Terradas M. L. Manual De Oncología Para El Primer Nivel De Atención; 2004: 82-83.

38-Singh-Ranger G, Salhab M, Mokbel K.: The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. Breast Cancer Res Treat. 2008 May;109(2):189-98.

39-Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S.: Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. Cancer 2003; 97: 2978 – 2987.

40-Denkert C, Winzer KJ, Hauptmann S.: Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. 2004 Clin Breast Cancer 4: 428 – 433.

41-Kis B, Snipes JA, Busija DW.: Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. J Pharmacol Exp Ther. 2005 Oct;315(1):1-7.

42-Timothy D. Warner and Jane A.: Mitchell Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum?. PNAS, 2002 vol. 99 no. 21, 13371–13373.

43-Alan R. Brash.: Arachidonic acid as a bioactive molecule. J Clin Invest. 2001;107(11):1339–1345.

44-Sigal E: The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. Am J Physiol 1991, 260(2 Pt 1):L13-28.

45-Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. Int J Oncol. 1997;10:503–507.

46-Mueller CR. and Roskelley CD.: Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. Breast Cancer Res. 2003; 5(1): 45–52.

47-Subbaramaiah K,Norton L,Gerald W,Dannenberg AJ.: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. J Biol Chem.2002 May 24;277(21):18649-57. Epub 2002 Mar 18.

48-D. L. Maynes, K. S. Hunt, B. A. Pockaj, R. J. Gray, W. P. Tong, M. R. Bothe, A. C. Dueck, D. W. Northfelt; Mayo Clinic Arizona, Scottsdale, AZ; Mayo Clinic Arizona, Phoenix, AZ.: Are HER2-positive breast cancer and BRCA mutation-associated breast cancer mutually exclusive diseases? Evidence from the Mayo Clinic Arizona cohort. 2010 Breast Cancer Symposium.

49-Turner N.Reis-Filho J.: Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype Oncogene (2006) 25, 5846–5853.

H) Agradecimientos:

A mi tutora de tesis la Profesora Agregada Dra. Ana Luisa Mariño, a la Cátedra de Anatomía Patológica, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdelaR, A la unidad de Inmunobiopatología Molecular (UNIBIM), lugar donde se me permitió aprender los fundamentos teóricos y poner a punto las técnicas empleadas en este trabajo bajo la supervisión de la Históloga Alicia Gonzalez. A mis familiares, mis amigos y todos los que me ayudaron y acompañaron en esta etapa de mi vida.

I) Anexo (Imágenes, tablas y gráficas):

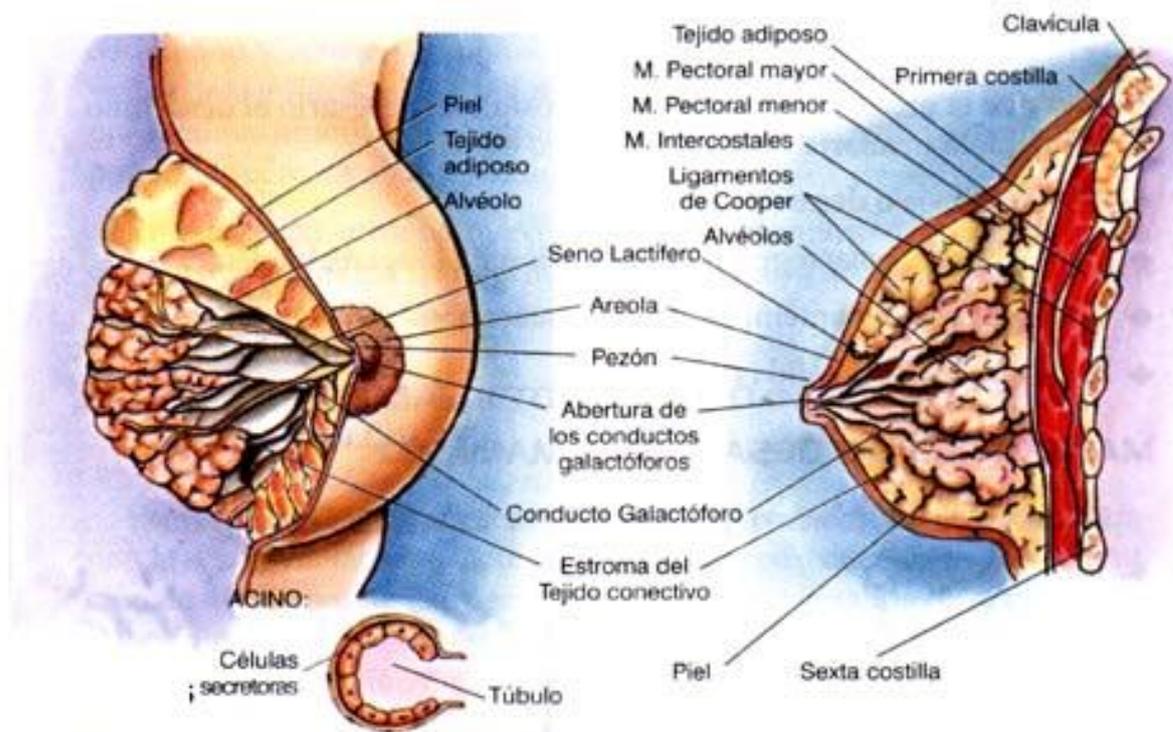
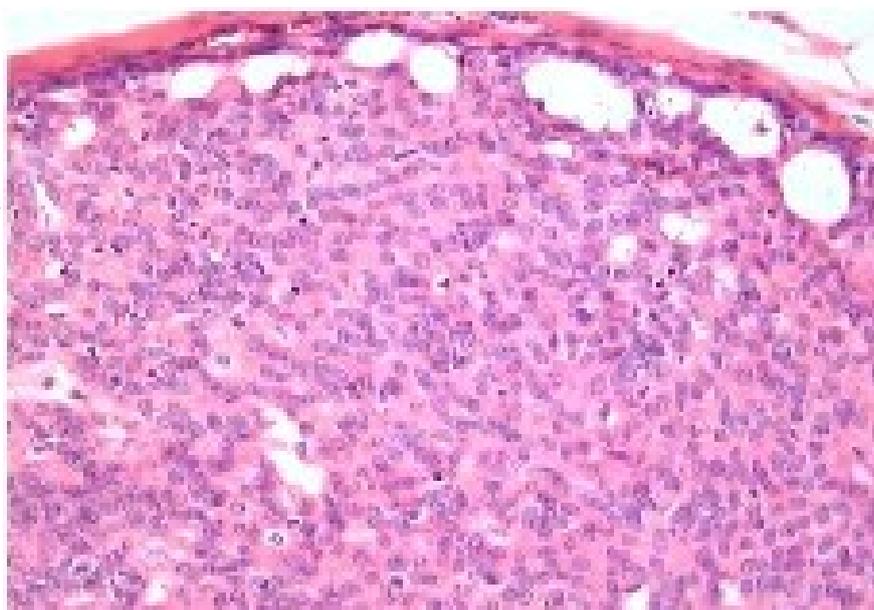


Figura 1: Anatomía de la glándula mamaria

Figura 2:
Carcinoma
ductal “in
situ”



DESCRIBIR CADA UNA DE LAS IMAGENES

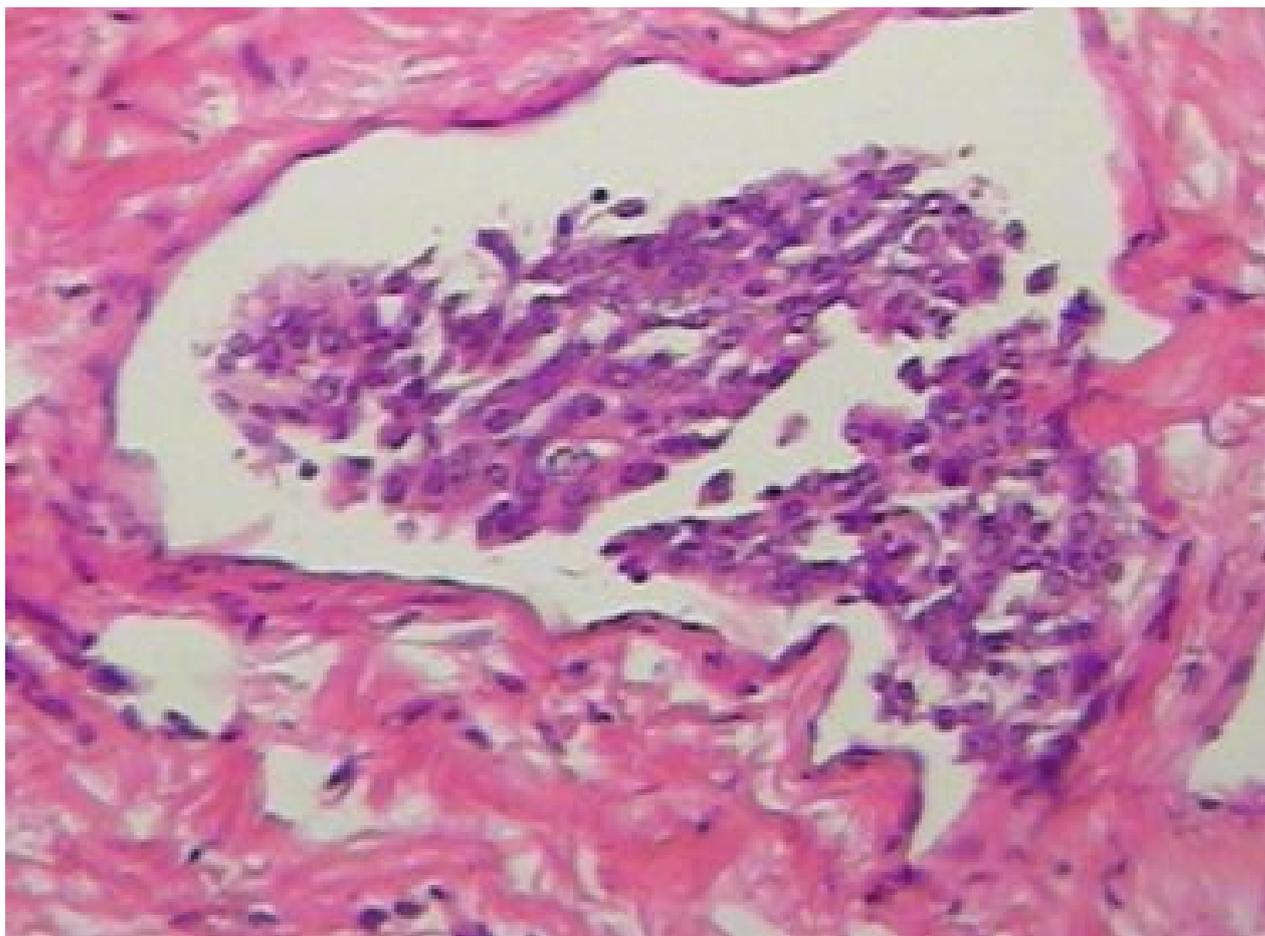


Figura 3: Carcinoma ductal infiltrante

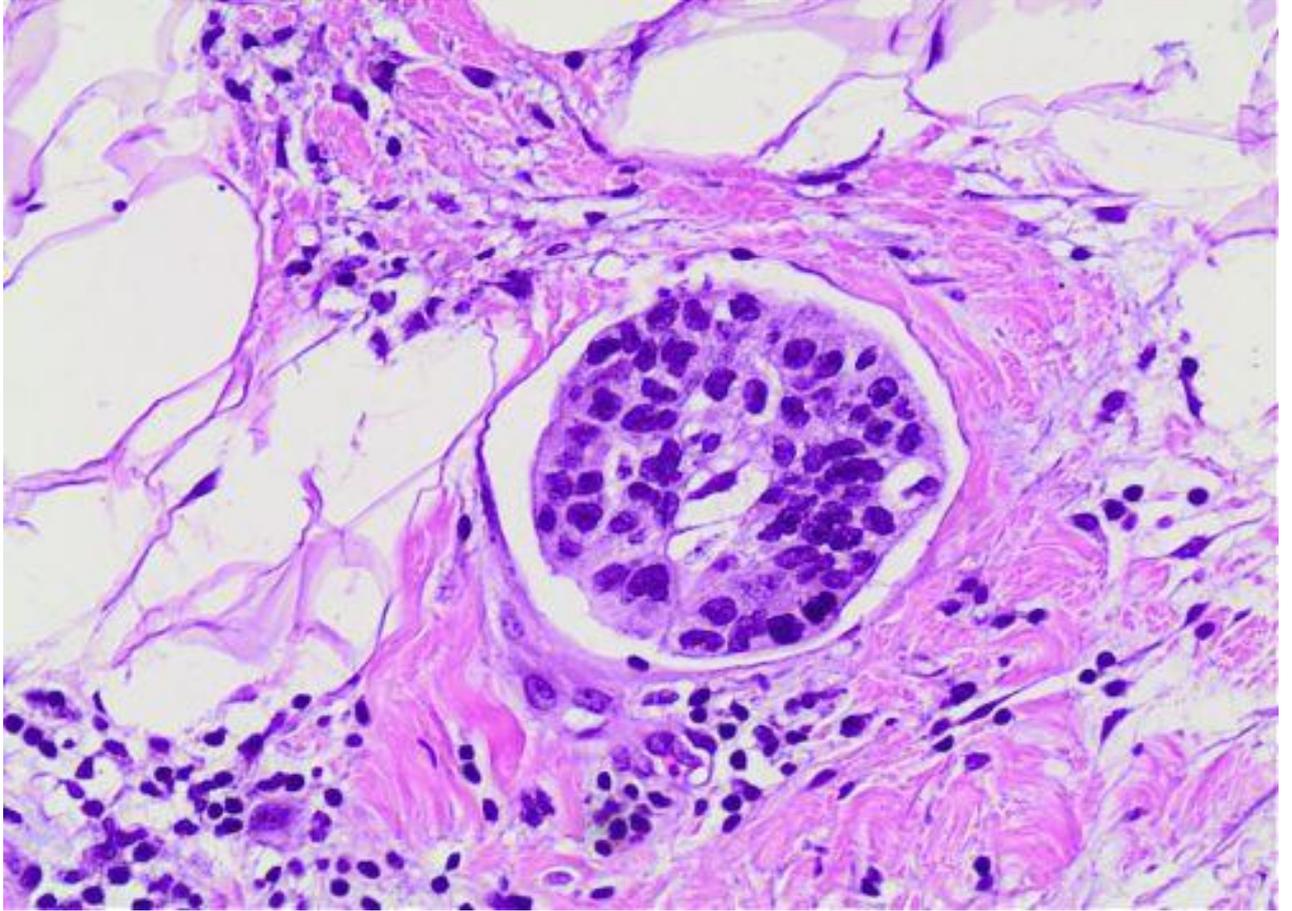


Figura 4: Carcinoma ductal infiltrante clásico

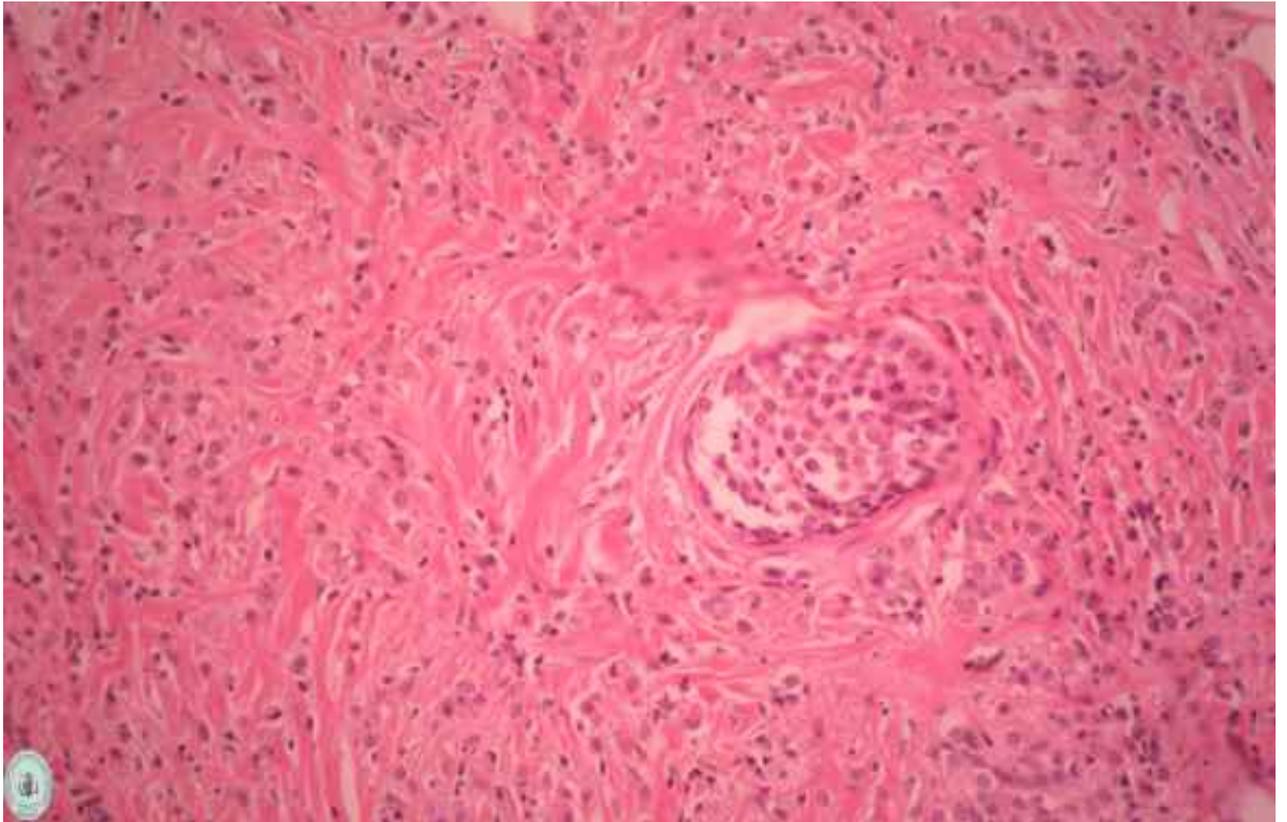


Figura 5: Carcinoma lobulillar infiltrante

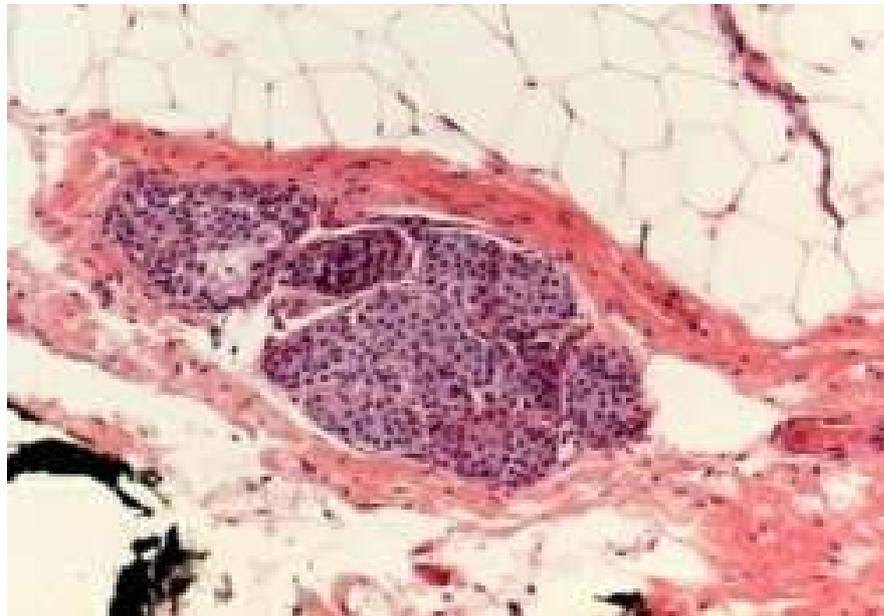


Figura 6: Carcinoma ductal “in situ”

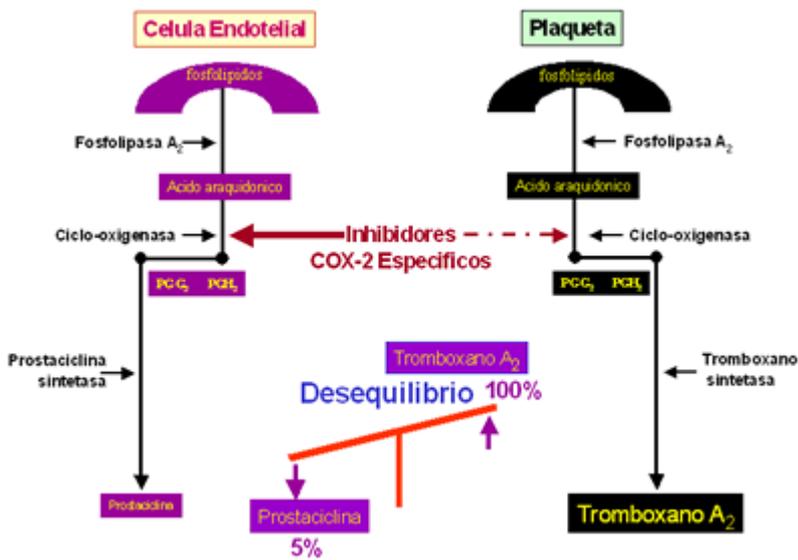
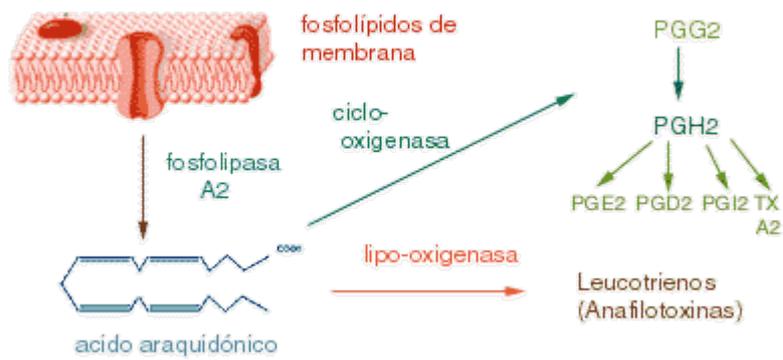


Figura 7: Vía del ácido araquidónico

Tipo Histológico	Sexo	Raza	Edad	Topografía Tumoral
------------------	------	------	------	--------------------

1	CDI	F	Blanca	59	CSEMD
2	CDI	F	Blanca	69	CSEMD
3	CDI	F	Blanca	65	CSEMI
4	CDI	F	Blanca	47	CSEMI
5	CDI	F	Blanca	69	CSEMD
6	CDI	F	Blanca	60	CSEMI
7	CDI	F	Blanca	57	CSDMD
8	CDI	F	Blanca	73	CSEMD
9	CDI	F	Blanca	60	CSEMD
10	CDI	F	Blanca	62	CSEMI
11	CDI	F	Blanca	45	CSEMI
12	CDI	F	Blanca	60	CSEMD
13	CDI	F	Blanca	34	CSEMD
14	CDI	F	Blanca	51	CSEMI
15	CDI	F	Blanca	66	CSEMD
16	CDI	F	Blanca	67	CSEMD
17	CDI	F	Blanca	58	CSEMI
18	CDI	F	Blanca	65	CSEMI
19	CDI	F	Blanca	56	CSEMI
20	CDI	F	Blanca	76	CSEMD
21	CDI	F	Blanca	63	CSEMD
22	CDI	F	Blanca	77	CSEMD
23	CDI	F	Blanca	66	CSEMI

Tabla 1 Agrupación según sexo, raza, edad y topografía tumoral

CDI: Carcinoma ductal infiltrante

CSEMI: Cuadrante superior externo de mama izquierda

CSEMD: Cuadrante superior externo de mama derecha

GL+/-: ganglios linfáticos positivos o negativos

	Tipo Histológico	Receptor Estrógeno	Receptor Progesterona	Expresión Her2/neu	Ki-67	Tipo Molecular	COX2	BRCA1
1	CDI	(+) en el 40% de	(+) en el 20% de las	(1+)(Negativo)	Positivo	A	(-) (Negativo)	Negativo

		las células tumorales, H score 80	células tumorales, H score 40					
2	CDI	(+) En el 90% de las células tumorales. H score 270	(+) en el 90% de las células tumorales, H score 270	(1+)(Negativo)	Negativo	A	(+++) ^{sup} al 30%	Negativo
3	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(-) en células tumorales, H score 0	(3+)(Positivo)	Negativo	HER2	(+)en el 10%	Positivo
4	CDI	(+) en el 90% de las células tumorales, H score 180	(+)en el 90% de las células tumorales, H score 180	(3+)(Positivo)	Positivo	B	(+) 10%	Negativo
5	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(-) en células tumorales, H score 0	(0)(Negativo)	Negativo	BL	(+++) ^{más} del 30%	Positivo
6	CDI	(+) en el 80% de las células tumorales, H score 240	(+) en el 70% de las células tumorales, H score 210	(1+)(Negativo)	Positivo	A	(+++) ^{mayor} a 50%	Negativo
7	CDI	(-) en células tumorales. H score 0	(-) en células tumorales. H score 0	(1+)(Negativo)	Negativo	HER2	(++) ^{Expresión} superior al 20%	Negativo
8	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(-) en células tumorales, H score 0	(0)(Negativo)	Negativo	BL	(++) ^{superior} al 20%	Negativo
9	CDI	(+) en el 70% de las células tumorales. H score 210	(+) En el 30% de las células tumorales. H score 90	(1+)(Negativo)	Negativo	A	(+++) ^{superior} 40%	Negativo
10	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(-) en células tumorales, H score 0	(3+)(Positivo)	Positivo	HER2	(+++) ^{sup} al 30%	Positivo
11	CDI	(+) En el 30% de las células tumorales. H score 30	(+) En el 60% de las células tumorales. H score 180	(0)(Negativo)	Negativo	A	(+++) ^{mayor} al 30%	Negativo
12	CDI	(+) en el 95% de las células tumorales, H score 190	(+) en el 90% de las células tumorales, H score 180	(1+)(Negativo)	Negativo	A	(+++) ^{sup} al 90%	Negativo
13	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(-) en células tumorales, H score 0	(1+)(Negativo)	Negativo	BL	(+++) ^{Exp} intensa de un 30%	Negativo
14	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(-) en células tumorales, H score 0	(3+)(Positivo)	Negativo	HER2	(+) menos del 10%	Negativo
15	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(+) en el 20% de las células tumorales, H score 40	(3+)(Positivo)	Negativo	B	(+) menos del 10%	Negativo
16	CDI	(+)en el 30% de las células tumorales, H score 90	(-) en células tumorales, H score 0	(3+)(Positivo)	Negativo	B	(+) menos del 5%	Positivo
17	CDI	(-) en células tumorales, H score 0	(-) en células tumorales, H score 0	(1+)(Negativo)	Positivo	BL	(+) 10%	Positivo
18	CDI	(+) en el 80% de las células tumorales, H score 240	(-) en células tumorales, H score 0	(1+)(Negativo)	Negativo	A	(++) ^{mayor} al 10%	Negativo
19	CDI	(+) en el 20% de las células tumorales, H score 90	(+) en el 10% de las células tumorales, H score 30	(0)(Negativo)	Negativo	A	(++) ^{mayor} al 10%	Negativo
20	CDI	(-) en células	(-) en células	(3+)(Positivo)	Positivo	HER2	(+++) ^{mayor} al	Negativo

		tumorales	tumorales, H score 0				20%	
21	CDI	(+) en el 90% de las células tumorales, H score 180	(+) en el 90% de las células tumorales, H score 180	(1+)(Negativo)	Negativo	A	(++) 10%	Negativo
22	CDI	(+) en el 90% de las células tumorales, H score 180	(+) en el 90% de las células tumorales, H score 180	(0) (Negativo)	Negativo	A	(+) menor al 5 %	Positivo
23	CDI	(+) en el 95% de las células tumorales, H score 190	(+) en el 100% de las células tumorales, H score 300	(0) (Negativo)	Negativo	A	(+++ sup al 40%	Negativo

Tabla 2: Descripción del tipo histológico, Inmunohistoquímica (COX2, receptores de estrógeno, receptores de progesterona, expresión Her2/neu, Ki-67, BRCA1) y clasificación del tipo molecular para los 23 pacientes estudiados.

A: Subtipo luminal A

B: Subtipo luminal B

HER2: Subtipo Her2/neu

BL: Subtipo *Basal like*

CDI : Carcinoma ductal infiltrante

Subtipo	n° de casos	RE	RP	HER2/neu	Ki 67	COX-2	BRCA-1
Luminal A	11	11	10	0	2	10	1
Luminal B	3	2	2	3	1	3	1
Basal	4	0	0	0	1	4	2
HER2	5	0	0	3	2	2	2

Tabla 3. Diferentes subtipos moleculares clasificados según la expresión de sus diferentes marcadores moleculares en los 23 pacientes estudiados.

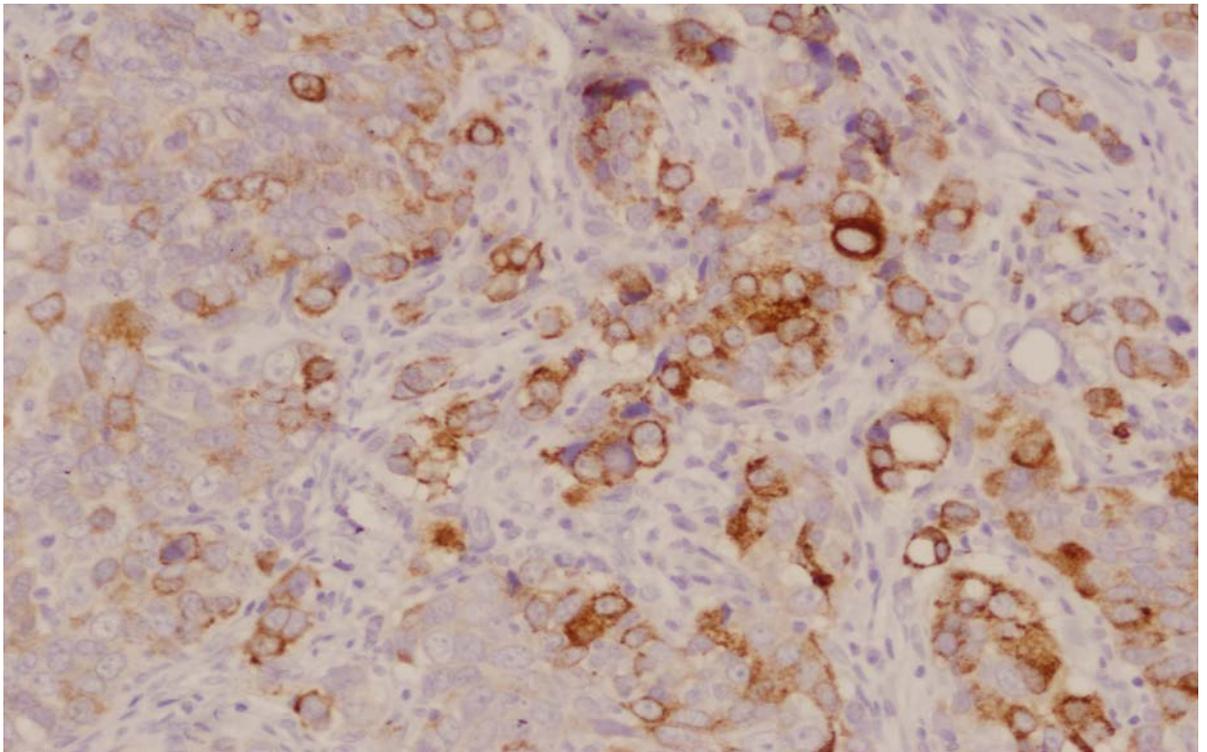


Figura n°8 IHQ(COX2).40X

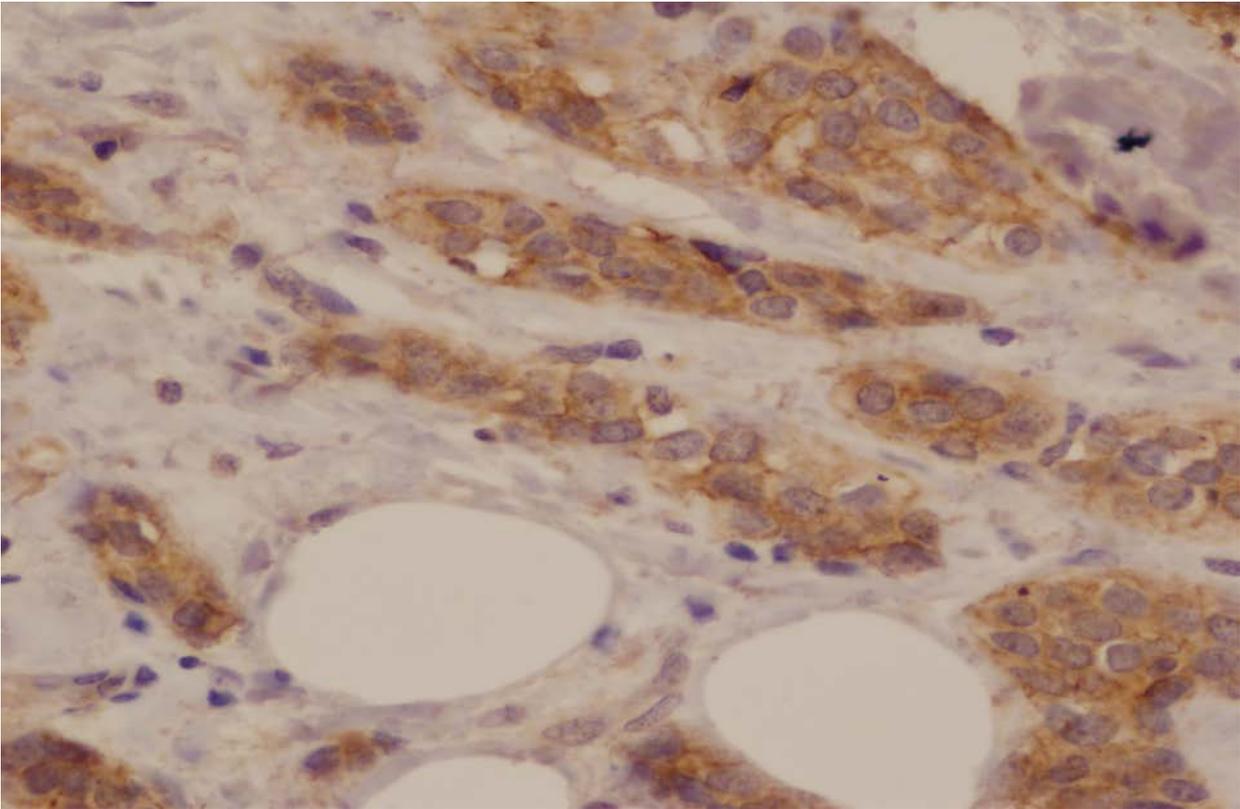


Figura n°9 IHQ(BRCA-1).40X

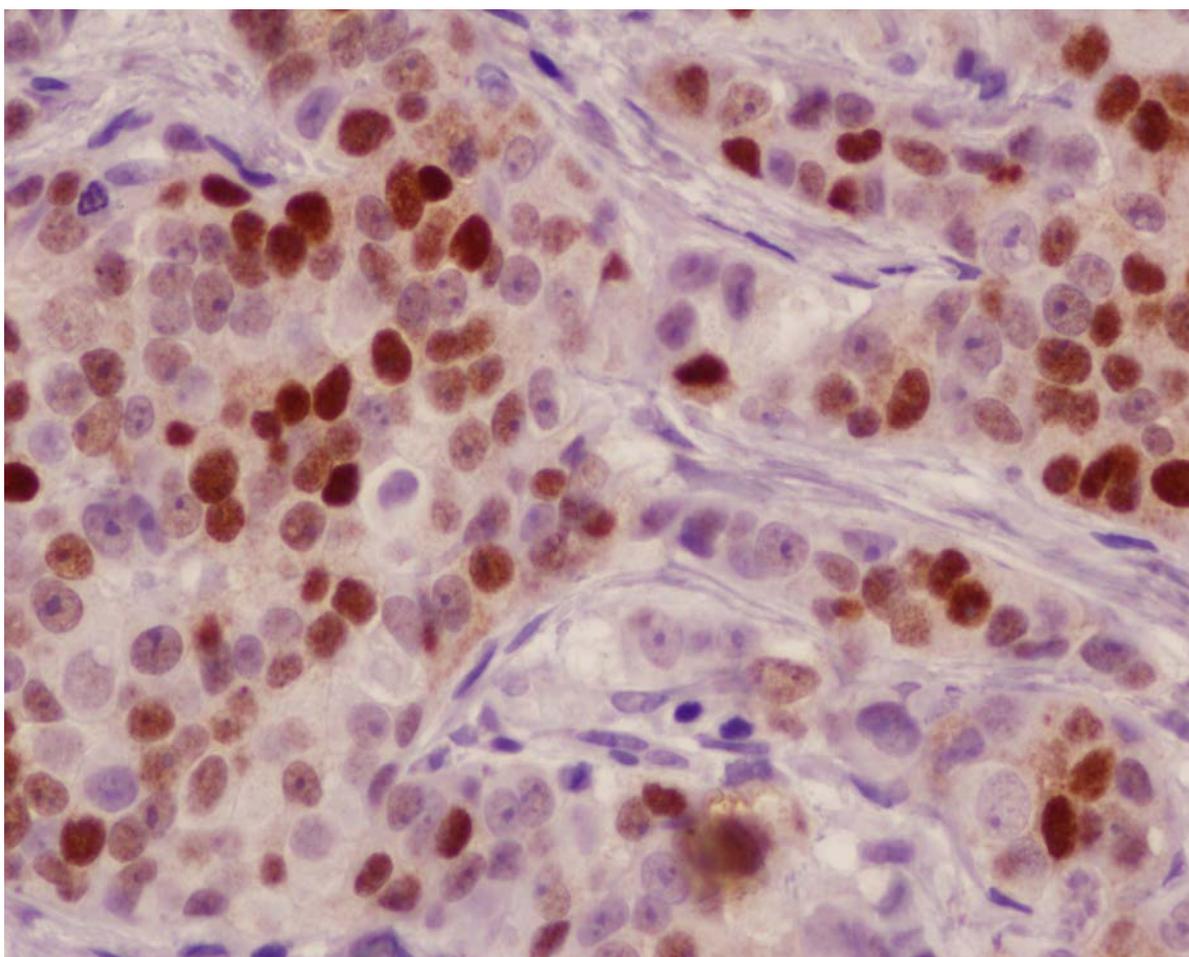
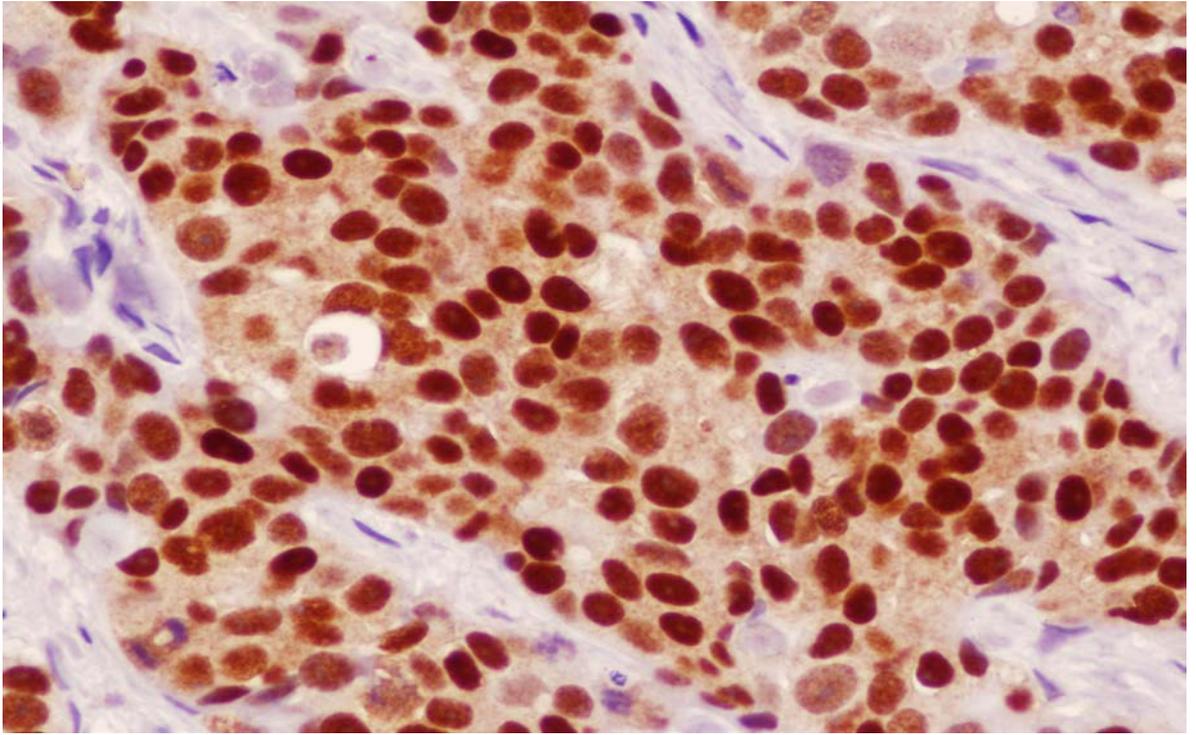


Figura n°10 IHQ(RP).40X

*Figura n°11
IHQ(
RP).4
0X*



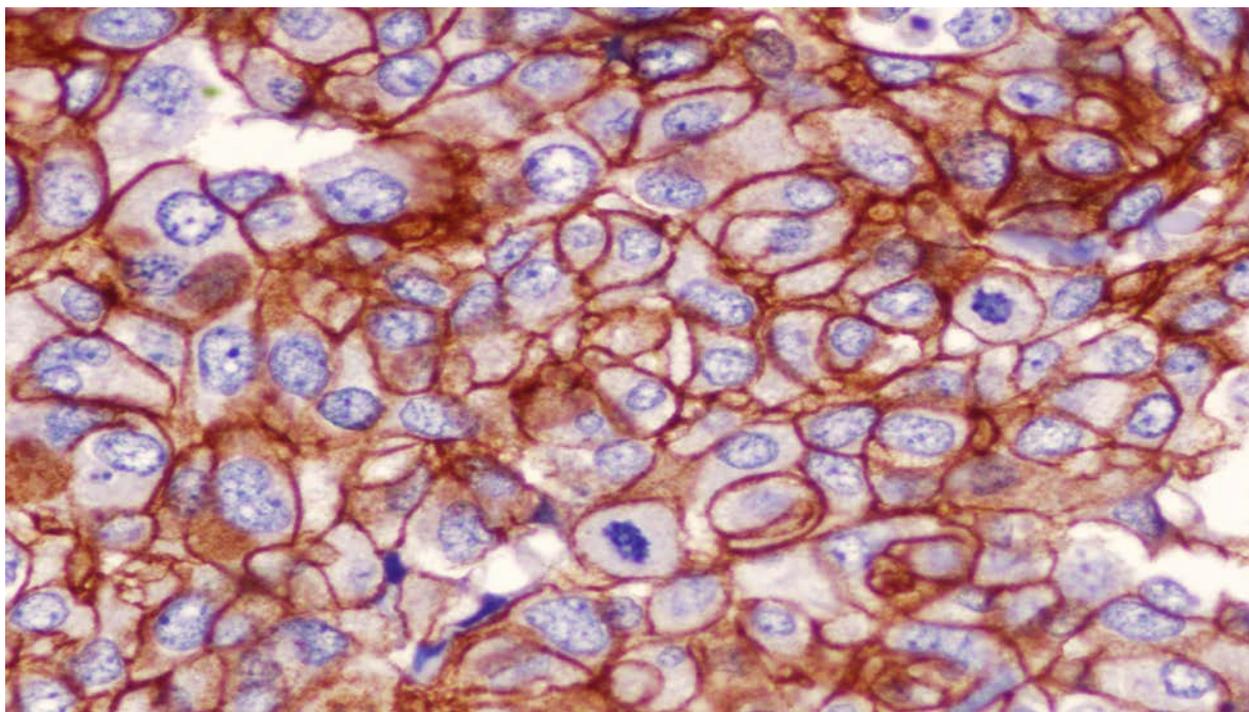


Figura n°12 IHQ(Her2/neu).40X

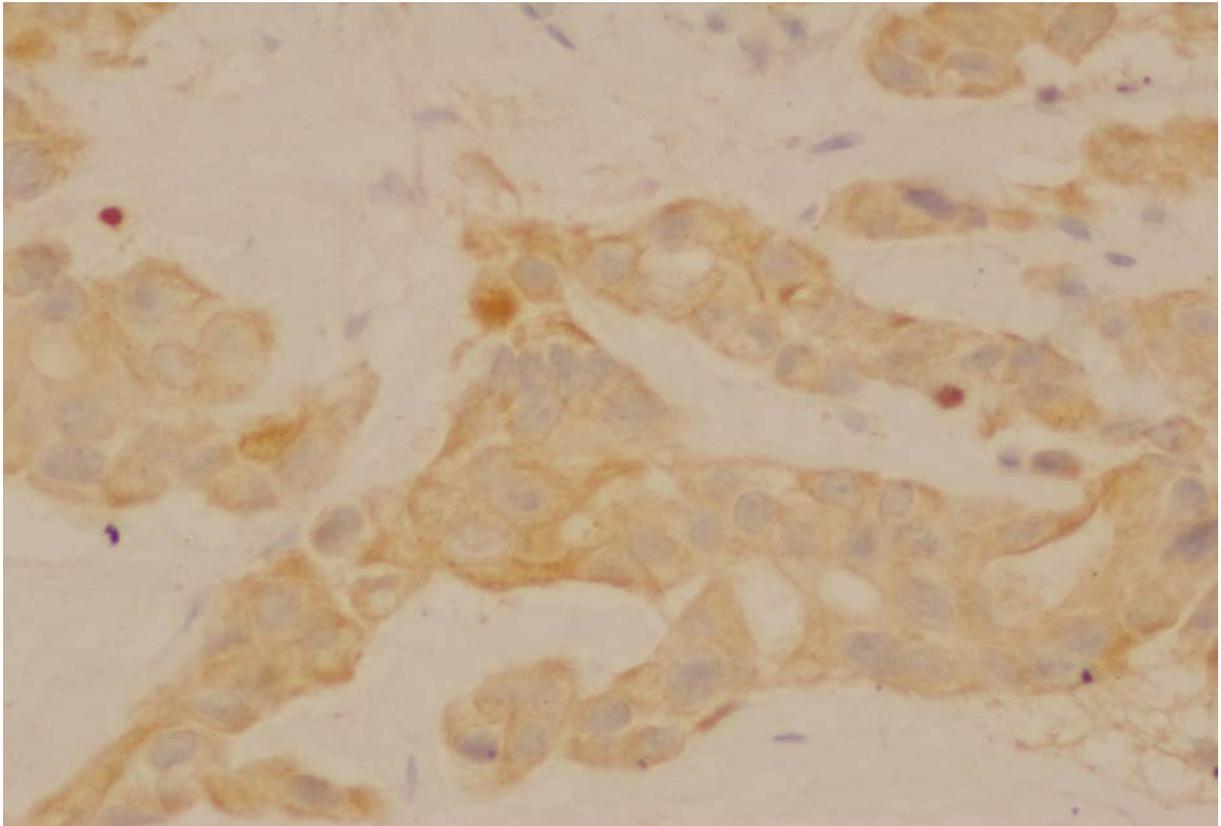


Figura n°13 IHQ(KI-67).40X