EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES (ER/PR) Y SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER-2/neu EN CARCINOMA MAMARIO INFILTRANTE

OLGA TERESA ANTELIZ BELTRÁN

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2011

EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES (ER/PR) Y SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER-2/neu EN CARCINOMA MAMARIO INFILTRANTE

Autora

OLGA TERESA ANTELIZ BELTRÁN

Trabajo de Investigación

para optar por el título de Magíster en Ciencia Básicas Biomédicas

Director

JAIME OTONIEL AYALA PIMENTEL

Médico Morfólogo, MSc.

Codirectora

OLGA MERCEDES ÁLVAREZ OJEDA

Médica Patóloga

Especialista en Patología General

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

BUCARAMANGA

2011

DEDICATORIA

A Dios, por el regalo de cada día.
A mis padres, por su apoyo permanente y sus brazos siempre abiertos.
A José, por estar siempre presente cuando lo necesito y cuando no.
A Andrea y Andrés, que son la razón de mi permanente evolución.

Olga Teresa

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y al Comité de la Maestría de Ciencias Básicas Biomédicas por permitir la creación del programa y la oportunidad de participar en él.

Al doctor Jaime Otoniel Ayala Pimentel por su apoyo y respaldo en todo momento.

A la doctora Olga Mercedes Álvarez Ojeda por su incalculable apoyo y orientación.

Al doctor Carlos Alberto García por el tiempo dedicado y a la doctora Laura Valencia por su orientación.

Al Departamento de Patología de la UIS por el apoyo brindado en sus locaciones, al personal del Laboratorio de Patología, Mary Rojas Herrera, Edy Rojas, Dilma García e Isaías Delgado por sus buena voluntad al servir y al Dr. Julio César mantilla por su apoyo.

A Jaydi Acosta del Laboratorio de Patología del Hospital Universitario La Samaritana de Bogotá por su orientación en el montaje de la técnica.

A la Ingeniera Lina Rocío Montoya del área de Estadística del Hospital Universitario de Santander por su apoyo en el suministro de información de pacientes.

A los Enfermeros Jefes Mauricio Puerto y Álvaro Castañeda de la Unidad Oncológica del Hospital Universitario de Santander, Liliana Serrano Auxiliar de Laboratorio de Alianza Diagnóstica y al Laboratorio Pathos por el compromiso con el proyecto y al Laboratorio de la Universidad Autónoma de Bucaramanga por su apoyo y respaldo.

CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN 23

1. JUSTIFICACIÓN 25

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 26

3. PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN 29

4. OBJETIVOS 30

4.1 OBJETIVO GENERAL 30

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30

5. ESTADO DEL ARTE 31

5.1 GENERALIDADES DE LA GLÁNDULA MAMARIA 31

5.1.1 Embriogénesis y desarrollo de la glándula mamaria 31

5.1.2 Anatomía de la glándula mamaria 33

5.1.3 Fisiología de la glándula mamaria 34

5.2 CARCINOMA DE LA GLÁNDULA MAMARIA 34

5.2.1 Epidemiología del Cáncer de mama 35

5.2.2 Factores de riesgo 38

5.2.2.1 Factores de riesgo sociodemográficos 38

5.2.2.2 Factores de riesgo hereditarios y familiares 40

5.2.2.3 Factores de riesgo hormonales y endocrinos 41

5.2.2.4 Factores de riesgo ambientales 41

5.2.3 Clasificación del cáncer de mama 42

5.2.3.1 Clasificación histológica del cáncer de mama 42

5.2.3.2 Clasificación basada en los factores de riesgo mayores 47

5.2.3.3 Clasificación basada en la expresión de receptores estrogénicos 48

5.2.3.4 Definición de subtipos biológicos del cáncer de mamario 58

5.2.4 Factores pronósticos y predictivos 60

5.2.4.1 Estado de los ganglionar 61

5.2.4.2 Tamaño tumoral 61

5.2.4.3 Grado de diferenciación tumoral 61

5.2.4.4 Estado de los receptores hormonales 62

5.2.4.5 Sobreexpresión de la proteína HER-2/neu 63

5.3 INMUNOHISTOQUÍMICA 64

5.3.1 Generalidades 64

5.3.2 Fundamento de la técnica 65

5.3.3 Procesamiento de la muestra 66

5.3.3.1 Proceso de fijación 66

5.3.3.2 Procesamiento de tejidos, corte y extendido 68

5.3.3.3 Técnica de inmunohistoquímica 69

5.3.4 Protocolo de la técnica 71

5.3.4.1 Desparafinación del tejido 71

5.3.4.2 Recuperación antigénica 72

5.3.4.3 Bloqueo de peroxidasa endógena 73

5.3.4.4 Bloqueo de peroxidasa exógena 73

5.3.4.5 Adición del anticuerpo específico 73

5.3.4.6 Adición del anticuerpo enganchador 74

5.3.4.7 Adición del polímero 74

5.3.4.8 Revelado 75

5.3.4.9 Coloración de contraste 76

5.3.5 Interpretación de resultados 77

5.3.6 Variables del análisis 81

5.3.6.1 Variables pre analíticas 81

5.3.6.2 Variables analíticas 82

5.3.6.3 Variables post analíticas 83

6. METODOLOGÍA Y DESARROLLO DE LA INVESTIIGACIÓN 84

6.1 POBLACIÓN 84

6.2 VARIABLES DEL ESTUDIO 84

6.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN 85

6.3.1 Reclutamiento de la población 85

6.3.2 Procesamiento de las muestras 85

6.3.3 Análisis de datos 86

7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 87

7.1 Presentación de resultados 87

7.2 Discusión 92

8. CONCLUSIONES 102

9. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS 104

CITAS BIBLIOGRÁFÍCAS 107

BIBLIOGRAFÍA 115

ANEXOS 124

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Epidemiología del cáncer de mama 36

Tabla 2. Estadificación del cáncer de mama y determinación de las tasas de supervivencia a 5 años (AJCC) 37

Tabla 3. Perfil molecular del cáncer de mama determinado por tres biomarcadores (ER,PR,Her-2/neu) 59

Tabla 4. Perfil molecular del cáncer de mama determinado por cinco biomarcadores (ER, PR, Her-2/neu, EGFR, CK5-6) 60

Tabla 5. Clasificación histológica del grado de diferenciación tumoral para el carcinoma ductal convencional infiltrante de mama según método de Elston-Ellis 62

Tabla 6. Preparación del formol tamponado al 10% 67

Tabla 7. Preparación del buffer citrato 70

Tabla 8. Preparación del buffer de lavado PBS 72

Tabla 9. Preparación de la Diaminobenzidina (DAB) 75

Tabla 10. Preparación del agua amoniacal 76

Tabla 11. Escala de lectura e interpretación de la expresión de los receptores hormonales ER/PR determinados por inmunohistoquímica 78

Tabla 12. Escala de lectura e interpretación de la sobreexpresión de la proteína Her-2/neu determinada por inmunohistoquímica 80

LISTA DE CUADROS

pág.

Cuadro 1. Características generales de la población 87

Cuadro 2. Edad 93

Cuadro 3. Fenotipos vs Población 93

Cuadro 4. Evaluación de los clones para receptores de estrógenos y progesterona 95

Cuadro 5. Evaluación de los clones para HER-2/neu 96

Cuadro 6. Fenotipo HER2 positivo 97

Cuadro 7. Variedad histológica 98

Cuadro 8. Grado de diferenciación tumoral vs Fenotipo 100

LISTA DE GRÁFICOS

pág.

Gráfico 1. Representación esquemática del receptor de estrógenos 50

Gráfico 2. Mecanismo de acción del receptor de estrógeno 51

Gráfico 3. Expresión de formas funcionales del receptor de progesterona 52

Gráfico 4. Mecanismo de acción del receptor de progesterona 53

Gráfico 5. Estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico 54

Gráfico 6. Mecanismo de acción del HER-2/neu 55

Gráfico 7. Proteína kinasa mutante 56

Gráfico 8. Amplificación de la proteína HER-2/neu 57

Gráfico 9. Receptores de Estrógenos 79

Gráfico 10. Receptores de Progesterona 79

Gráfico 11. Sobreexpresión de la proteína HER-2/neu 80

Gráfico 12. Frecuencia de inmunofenotipos 88

Gráfico 13. Inmunofenotipos vs Edad promedio 89

Gráfico 14. Variedad histológica 89

Gráfico 15. Frecuencia del grado de diferenciación tumoral 90

Gráfico 16. Grado de diferenciación tumoral 1 vs Fenotipo 91

Gráfico 17. Grado de diferenciación tumoral 2 vs Fenotipo 91

Gráfico 18. Grado de diferenciación tumoral 3 vs Fenotipo 92

LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo A. Solución de formol tamponado neutro 124

Anexo B. *Citrate Buffer for Heat-Induced Epitope Retrieval* 125

Anexo C. *Hydrogen Peroxide Block* 127

Anexo D. *Ultra V-Block* 128

Anexo E. *Large Volume Ultraclean Diluent* 129

Anexo F. *Estrogen Receptor (Clone SP1)* 130

Anexo G. *Progesterone Receptor (Clone SP2)* 133

Anexo H. *c-erbB-2/HER-2/neu (Clone SP3)* 136

Anexo I. *Ultravision LPValue Large Volume Detection System HRP Polymer* 138

Anexo J. *DAB Plus Substrate System* 140

Anexo K. *Large Volume Phosphate Buffered Saline (25X)* 142

Anexo L. Instrumento de recolección de datos 143

Anexo M. Consentimiento informado 144

ABREVIATURAS

AJCC: *American Joint Committee on cancer*

CDI: carcinoma ductal infiltrante

CLI: carcinoma lobulillar infiltrante

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

ER: *estrogen receptor*

FBN: *formalin buffered neutral*

FGF: f*ibroblast growth factor*

FISH: *fluorescence in situ hybridization*

HER-2/neu: *human epidermal growth factor receptor 2*

HUS: Hospital Universitario de Santander

H/E: hematoxilina eosina

ICH: *immunohistochemistry*

PDGF: *platelet derived growth factor*

PR: *progesterone receptor*

RH: receptores hormonales

CISH: c*hromogenic in situ hybridization*

TNP: *triple-negative phenotype*

TI: tasa de incidencia

TM: tasa de mortalidad

TS: tasa de supervivencia

UIS: Universidad Industrial de Santander

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

RESUMEN

TÍTULO: EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES (ER/PR) Y SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER-2/neu EN CARCINOMA MAMARIO INFILTRANTE*

AUTOR: Olga Teresa Anteliz Beltrán**

PALABRAS CLAVES: Carcinoma mamario infiltrante, grado de diferenciación tumoral, receptores de estrógenos y progesterona, HER-2/neu.

CONTENIDO: El carcinoma mamario es una neoplasia con alto índice de morbimortalidad en Santander, heterogeneidad histológica y comportamiento clínico diverso. Para obtener una respuesta farmacológica adecuada se requiere además de realizar la evaluación patológica del tumor y su grado de diferenciación, conocer la expresión de los receptores hormonales y la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, biomarcadores útiles como factores pronósticos y predictivos en el manejo terapéutico de pacientes con carcinoma infiltrante.

A lo largo del tiempo se ha descrito la importancia que han adquirido estas biomoléculas en el proceso evolutivo del carcinoma mamario, lo que nos indujo a investigar el fenotipo biológico basado en la expresión de los receptores hormonales y el HER-2/neu y su relación con el grado de diferenciación tumoral, en mujeres de esta región.

La expresión de los biomarcadores fue analizada en tejido tumoral primario embebido en parafina mediante técnicas de inmunohistoquímica mientras que la clasificación histológica del tumor fue determinada mediante la evaluación de los cortes histopatológicos coloreados con hematoxilina-eosina, al igual que el grado de diferenciación tumoral definido por la formación de túbulos, polimorfismo nuclear y conteo mitótico.

Se incluyeron 62 casos de carcinoma mamario infiltrante analizados entre julio de 2009 y marzo de 2011 en el laboratorio de patología de la Universidad Industrial de Santander y Hospital Universitario de Santander. Del total de casos, el 88.7% corresponde a carcinoma ductal infiltrante, 8.1% a carcinoma lobulillar infiltrante, 1.6% a carcinoma metaplásico y 1.6% a carcinoma mucinoso. El fenotipo predominante en la población estudiada fue el Luminal A, seguido por el fenotipo triple negativo y el HER2+.

En este estudio, no se encontró asociación entre el grado de diferenciación tumoral y los inmunofenotipos, sin embargo es importante considerar que con esta población se inició y estandarizó la técnica de inmunohistoquímica que servirá de base para estudios posteriores.

---

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina Programa Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Dr. Jaime Otoniel Ayala Pimentel. Codirector Dra. Olga Mercedes Álvarez Ojeda

ABSTRACT

TITLE: EXPRESSION OF THE HORMONE RECEPTORS (ESTROGEN RECEPTORS AND PROGESTERONE RECEPTORS) AND HER-2/NEU PROTEIN OVEREXPRESSING IN INVASIVE BREAST CARCINOMA*

AUTHOR: Olga Teresa Anteliz Beltrán**

KEYWORDS: Invasive breast carcinoma, degree of tumor differentiation, estrogen and progesterone receptors, HER-2/neu

CONTENT: Breast cancer is a neoplasia with a high rate of mortality in Santander, which shows histologic heterogeneity and different clinical behavior. To get a suitable pharmacological response it is required, in addition to the pathologic evaluation of tumor and its degree of differentiation, to know the expression of hormone receptors and HER-2/neu protein overexpression, biomarkers that are useful as prognostic and predictive factors in the therapeutic management of patients with invasive breast carcinoma.

Along the time it has been described the importance of these biomolecules in the evolutionary process of breast cancer, which prompted us to investigate the biological phenotype based on the expression of hormone receptors and HER -2/neu protein overexpression and their relationship with the degree of differentiation, in women from this region.

The expression of biomarkers was analyzed in primary tumor tissue embedded in paraffin by immunohistochemistry techniques while the histologic classification of breast cancer was determined by evaluating the histopathology sections stained with hematoxylin-eosin, as well as the degree of tumor differentiation, which is defined by the formation of tubules, nuclear polymorphism and mitotic count.

In this study, it was included 62 cases of invasive breast carcinoma analyzed between July 2009 and March 2011 in the pathology laboratory of the Universidad Industrial de Santander and Hospital Universitario de Santander. From the total cases, 88.7% corresponds to infiltrating ductal carcinoma, 8.1% to invasive lobular carcinoma, 1.6% to metaplastic carcinoma and 1.6% to mucinous carcinoma. The predominant phenotype in the population studied was the Luminal A, followed by the triple-negative phenotype and HER2+.

In this study, it wasn't found any association between the degree of tumor differentiation and the immunophenotypes, however it is important to consider that the immunohistochemical technique, which will serve as a basis of further studies, was initiated and standardized with this sample.

---

* Research work

** Faculty of Health. Master's degree in Basic Biomedical Science, School of Medicine. Director: Dr. Jaime Otoniel Ayala Pimentel. Co-Director: Dra. Olga Mercedes Álvarez Ojeda

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una neoplasia con alto índice de morbimortalidad en la población santandereana, que presenta heterogeneidad histológica y comportamiento clínico diverso. Para obtener una respuesta farmacológica adecuada se requiere además de realizar la evaluación patológica del tipo de tumor y su grado de diferenciación, conocer la expresión de los receptores hormonales para estrógenos, progestágenos y la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, biomarcadores que son útiles como factores pronósticos y predictivos en el manejo de la conducta terapéutica de pacientes con carcinoma infiltrante.

A lo largo del tiempo se ha descrito en la literatura la importancia que día a día han adquirido estas biomoléculas en el proceso evolutivo del cáncer de mama, lo que nos indujo a investigar el fenotipo biológico basado en la expresión de los receptores hormonales y el HER-2/neu, además de la relación existente entre la expresión de estos marcadores biológicos y los criterios microscópicos que determinan el grado de diferenciación tumoral, en las mujeres de la región con carcinoma ductal infiltrante para luego contrastar estos resultados con la literatura existente.

La expresión de los biomarcadores fue analizada en tejido tumoral primario embebido en parafina mediante técnicas de inmunohistoquímica mientras que la clasificación histológica del tumor mamario fue determinada mediante la evaluación de los cortes histopatológicos coloreados con hematoxilina-eosina, al igual que el grado de diferenciación tumoral basado en el estudio de la formación de túbulos, polimorfismo nuclear y conteo mitótico.

La población de este estudio está conformada por 62 casos de carcinoma mamario infiltrante analizados durante el período comprendido entre julio de 2009

y marzo de 2011 en el laboratorio de patología de la Universidad Industrial de Santander y Hospital Universitario de Santander.

Del total de casos, el 88.7% corresponde a carcinoma ductal infiltrante, el 8.1% a carcinoma lobulillar infiltrante, el 1.6% a carcinoma metaplásico y el 1.6% a carcinoma mucinoso. El fenotipo predominante en la población estudiada fue el Luminal A seguido por el TNP y el HER2+.

De acuerdo con los resultados obtenidos no todos los carcinomas infiltrantes mal diferenciados están relacionados de manera exclusiva con la ausencia de expresión de los receptores hormonales o con la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu.

1. JUSTIFICACIÓN

Este estudio es de gran importancia porque actualmente en el medio, el factor pronóstico y predictivo más usado es el tamaño tumoral y la metástasis a ganglios axilares, los cuales deben ser complementados con el estudio directo de marcadores celulares mediante la técnica de inmunohistoquímica sobre los tejidos tumorales primarios con el fin de mejorar la evaluación pronóstica y predictiva de los pacientes y así poder decidir una mejor opción terapéutica.

Como objetivo principal se pretende determinar el perfil inmunofenotípico del carcinoma mamario infiltrante y establecer su relación con el grado de diferenciación tumoral.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el ejercicio de la evaluación y evolución del cáncer de mama se han utilizado como factores pronóstico las características macroscópicas que incluyen el tamaño tumoral y estado de los nódulos linfáticos y microscópicas que describen la formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y el conteo mitótico. Con estos datos se ha establecido que los cuadros clínicos con menor agresividad, y por ende con un mejor pronóstico para las pacientes, son aquellos en los que se evidencia un menor tamaño del tumor, ausencia de metástasis y una mejor diferenciación celular (1) (2) (3).

En la actualidad, el análisis de factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama han sido complementado con la evaluación de biomoléculas útiles en el estudio de la evolución del carcinoma y su orientación terapéutica. Las más estudiadas para este fin son los receptores hormonales para estrógenos (ER) y progestágenos (PR) y la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu en células tumorales. Existen otras moléculas (que se encuentran en etapa de estudio como factores pronóstico) que indican eventos específicos como son los marcadores de proliferación Ki67, la fracción S y la síntesis del DNA; los receptores para el factor del crecimiento epidérmico (EGFR–*Epidermal Growth Factor Receptor*); la proteína antiapoptótica Bcl2; los factores del microambiente y angiogénesis CD34, CD31 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF–*Vascular Endothelial Growth Factor);* las moléculas de adhesión y expresión de proteasas como la E-cadherina y la mucina; las proteínas inducidas por estrógenos como la Hsp27, la Catepsina D y la pS2 y la mutación de genes de supresión tumoral como la proteína p53 (4) (5) (6) (7).

El pronóstico desfavorable y la mala diferenciación tumoral en pacientes con cáncer de mama, por un lado, ha sido relacionada directamente con la

sobreexpresión de la proteína HER-2/neu asociada con recaídas y menor supervivencia, por lo que este marcador es un buen indicador del mal pronóstico del cáncer invasivo (8) (9) y por otro lado la ausencia de expresión de los receptores hormonales también se encuentra asociado al mal pronóstico (10). Sin embargo, algunos autores refieren la existencia de tumores con receptores hormonales negativos como el carcinoma adenoide quistico y el carcinoma secretor que presentan un excelente pronóstico con mínima recurrencia (11) (12).

Otros estudios refieren la existencia de un fenotipo de peor pronóstico, el fenotipo triple negativo (TNP), relacionado con pobre diferenciación, masa tumoral de mayor tamaño y menor sobrevida (13) (14) (15). Estudios más recientes han incluido dos nuevos biomarcadores (EGFR y CK5/6) para la evaluación del fenotipo de peor pronóstico hallado en mujeres con carcinoma mamario (13).

Kennerth C. Chu y colaboradores estudiaron la correlación existente entre los biomarcadores (ER/PR) y los diferentes grados histológicos de malignidad en mujeres de diversos grupos étnicos. Ellos encontraron asociación entre la biología del cáncer y su grado histológico pero sin ser afectados por el grupo étnico (16).

Roberto Jaramillo y colaboradores estudiaron la relación existente entre la expresión de los receptores hormonales, metástasis, tamaño tumoral y grado de diferenciación en 32 casos de Cali, Colombia. El resultado estableció una estrecha relación entre la expresión de los receptores hormonales y el grado de diferenciación tumoral. (17).

Esta serie de hallazgos y los datos estadísticos del Registro Poblacional de cáncer en Santander, el cual muestra que la tasa ajustada de incidencia (37.3) está por encima de la tasa nacional (30.3) y la tasa ajustada de mortalidad en Santander (8.1) se encuentra por debajo de las registradas en Colombia (12.5) (18) (19), sumado al hecho de que la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu en

Santander es del 17% (datos no publicados) mientras que la literatura refiere de un 20-30% (20) (21), podrían reflejar un comportamiento biológico distinto en esta población, lo que nos induce a investigar si esta diferencia obedece a un comportamiento menos agresivo de la neoplasia o a factores externos del tumor (variables del análisis).

Por lo anterior, consideramos necesario estudiar la expresión biológica de los ER, PR y sobreexpresión de la proteína HER-2/neu del carcinoma mamario infiltrante en la población de Santander y establecer si todos los carcinomas infiltrantes mal diferenciados están relacionados con la ausencia de expresión de los receptores hormonales o sobreexpresión la proteína HER-2/neu.

Los resultados obtenidos en este estudio podrán aportar conocimiento acerca del comportamiento biológico de esta neoplasia en la región; generar nuevos proyectos que correlacionen los hallazgos con el estado clínico de las pacientes evaluados, estudiar nuevos marcadores que complementen la evaluación pronóstica del cáncer mamario, correlacionar los biomarcadores estudiados con otros que también se expresan en este carcinoma, estudiar factores de riesgo asociados a la expresión biológica del carcinoma a la vez que promueve el desarrollo tecnológico del Laboratorio de Patología de la Universidad Industrial de Santander (UIS), centro de referencia del nororiente colombiano y le permitirá a la Institución ser pionera en este campo.

3. PREGUNTAS DE LA INVESTIGACIÓN

Para el desarrollo del presente proyecto se han planteado las siguientes preguntas:

¿Cuál es el fenotipo del carcinoma mamario infiltrante determinado por la expresión de los receptores hormonales y la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, presente en las mujeres de la población en estudio?

¿Cuál es la relación existente entre el grado de diferenciación tumoral del carcinoma ductal infiltrante y la expresión de los receptores hormonales (ER-PR) y la sobreexpresión de la proteína Her-2/neu?

¿Todos los carcinomas infiltrantes mal diferenciados están relacionados con la ausencia de expresión de los receptores hormonales o con la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu?

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil inmunofenotípico del carcinoma infiltrante de glándula mamaria y su relación con el grado de diferenciación tumoral en muestras de pacientes analizadas en el Laboratorio del Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander y el Hospital Universitario de Santander en el período comprendido entre julio del 2009 y marzo de 2011.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar la clasificación histológica de los carcinomas infiltrantes de glándula mamaria.

Establecer el grado de diferenciación tumoral en los carcinomas ductales infiltrantes.

Definir el inmunofenotipo en los carcinomas infiltrantes de glándula mamaria, de acuerdo con la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona y la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu.

5. ESTADO DEL ARTE

5.1 GENERALIDADES DE LA GLÁNDULA MAMARIA

5.1.1 Embriogénesis y desarrollo de la glándula mamaria. La formación de la glándula mamaria en el embrión se inicia en la séptima semana con la aparición de un engrosamiento en la epidermis que origina la línea láctea o cresta mamaria, la cual se extiende bilateralmente desde la base del miembro superior hasta el periné. La cresta mamaria prontamente desaparece dejando un pequeño segmento en la región torácica que se invagina en el mesénquima subyacente, originando entre 16 y 24 brotes que a su vez forma pequeños esbozos macizos, futuros alvéolos secretores.

Al cumplir el término de la vida intrauterina estos brotes epiteliales se canalizan para dar paso a la formación de los conductos galactóforos, los cuales desembocan en una depresión o fosa epitelial que poco después del parto, por proliferación del mesénquima epitelial, se convierten en el pezón y la areola, mientras que los esbozos macizos pasan a formar los conductos de menor calibre y alvéolos (22).

Estos conductos rudimentarios, que en el momento del nacimiento constituyen una almohadilla grasa, se diferencian hasta formar los elementos de la glándula mamaria puberal en ambos sexos, durante la infancia y el período prepuberal. Este proceso es modelado por acción de los estrógenos, la hormona de crecimiento (GH · *Growth Hormone*) y el Factor de Crecimiento 1 similar a la Insulina (IGF-1· *Insulin-Like Growth Factor-1*).

Las glándulas mamarias son iguales en ambos sexos hasta la pubertad; en este momento el crecimiento de la glándula en los niños finaliza mientras que en las niñas empieza el desarrollo de la glándula mamaria por influencia de las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona). Estas hormonas son las encargadas de gran parte de la morfogénesis ductal. Así, la GH estimula la producción del IGF-1 en el estroma mamario y a su vez este factor actúa en sinergia con los estrógenos.

Los estrógenos al estimular la proliferación de células epiteliales ductales, mioepiteliales y estromales del parénquima mamario conducen a la ramificación de conductos y formación de los alvéolos. También actúan en sinergia con la progesterona para formar los componentes acinares secretores en las partes más distales de los conductillos. De esta manera, el desarrollo ductal y formación de lóbulos está favorecida por estas dos hormonas en los ciclo menstruales, al igual que el crecimiento del tejido conectivo, el cual posteriormente es reemplazado por tejido adiposo para servirle de soporte a los conductos en desarrollo.
La glándula mamaria puberal que adquiere entre 200 y 300 gramos permanece quiescente hasta el momento de la gestación. En el embarazo puede alcanzar un peso de 500-600 gramos y en el período de la lactancia de 800 gramos al llegar a su plenitud funcional, adquiriendo así la característica de glándula secretora por acción de los estrógenos y del lactógeno placentario. Físicamente la glándula mamaria se desarrolla en forma cónica durante la adolescencia, esférica en la lactancia y pendular en la madurez (23) (24) (25).

Los eventos normales que ocurren en la formación de nuevas ramas ductales y lobulillos durante la pubertad y el embarazo, como son la desaparición de la membrana basal, el aumento de la proliferación celular y la angiogénesis estromal son también usados por las células estromales anormales para favorecer el proceso de la carcinogénesis (26) (27).

5.1.2 Anatomía de la glándula mamaria. En los hombres esta estructura se encuentra normalmente atrofiada (aunque algunos medicamentos y enfermedades pueden promover su desarrollo) y se caracteriza por la presencia de la tetilla, mientras que en las mujeres, la mama es una estructura esférica que se extiende verticalmente desde la segunda hasta la sexta costilla y horizontalmente desde el esternón hasta la línea media axilar, prolongándose en la parte superior externa hacia la axila para formar la cola de la mama o prolongación axilar.

Dos terceras partes de la glándula están sostenidas por el músculo pectoral mayor y la parte restante por el músculo serrato anterior (25). Estructuralmente, la mama madura está formada por tres componentes: la piel, el tejido subcutáneo y el tejido mamario.

La piel recubre en su totalidad la curvatura sinusoidal siendo idéntica en todo su recorrido excepto en la zona areolar y el pezón donde la piel es más delgada, pigmentada y descansa sobre tejido muscular liso a diferencia del resto que reposa sobre tejido adiposo.

El tejido subcutáneo es una estructura que rodea la glándula y está compuesto por tejido adiposo, tejido conectivo, vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y vías linfáticas. Entre el componente subcutáneo se intercalan tabiques que junto con el tejido conectivo le sirven de sostén a la glándula mamaria.

El tejido mamario está compuesto por estroma y parénquima. El parénquima está formado por pequeñas glándulas (entre 15 y 20) que dan origen a la unidad autónoma, el glóbulo mamario. Al realizar un corte sagital se puede observar sus componentes internos: los lóbulos que están formados por las unidades funcionales y los conductos galactóforos, los senos galactóforos y los poros del pezón (28).

5.1.3 Fisiología de la glándula mamaria. El alvéolo o acino es la unidad funcional de la glándula mamaria y está formado por dos tipos de células con funciones distintas.

La membrana basal está cubierta por una capa intermitente de células contráctiles que poseen miofilamentos (células mioepiteliales), elementos importantes en la estructura normal del lobulillo y el mantenimiento de la función eyectora de la leche durante la lactancia.

La luz de los conductos se encuentra revestida por células epiteliales luminales, cuya función en el conducto terminal y en el lobulillo es producir leche a diferencia de las que revisten el sistema de conductos principales (23).

El estroma mamario en su mayoría está formado por tejido fibroconectivo denso entrecruzado con tejido adiposo que forma el estroma interlobulillar. En estado normal la función de los lobulillos rodeados por estroma es responder ante el estímulo de hormonas específicas, o señales externas promotoras de la proliferación celular para atender necesidades de reemplazo celular, pérdidas o reparación de tejidos lesionados. Una vez cumplido el objetivo se activan señales que detienen el ciclo celular y por tanto la proliferación (26).

5.2 CARCINOMA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria compuesta por epitelio especializado y estroma, admite la formación de lesiones malignas y benignas en su estructura. De acuerdo con su anatomía, en la unidad lobulillar ductal terminal se pueden encontrar lesiones como quistes, adenosis esclerosante, papiloma del conducto pequeño, hiperplasia, hiperplasia atípica y carcinoma; en el estroma lobulillar se ubican los fibroadenomas y tumores filodes; en los conductos mayores y senos galactóforos se puede observar ectasia ductal, absceso subareolar recidivante, papiloma ductal solitario y la enfermedad de Paget. Finalmente en el estroma interlobulillar se

puede localizar la necrosis grasa, lipomas, tumores fibrosos, hiperplasia estromal seudo angiomatosa, fibromatosis y sarcomas.

Dentro de la diversidad de lesiones que se pueden desarrollar en la glándula mamaria, el carcinoma se define como la neoplasia maligna no cutánea de mayor incidencia en las mujeres, dejando en evidencia que una de cada ocho mujeres que alcance los 90 años presenta una probabilidad de desarrollar cáncer mamario (26) (25) (29).

5.2.1 Epidemiología del cáncer de mama. Esta neoplasia es una enfermedad con alta incidencia, variabilidad geográfica, etiología desconocida, factores de riesgo heterogéneos, características morfológicas y moleculares variadas, comportamiento clínico y diversidad de respuestas ante la conducta terapéutica, que hacen difícil su evaluación y manejo convirtiéndolo en un problema de salud pública (1).

A través de los años la incidencia del carcinoma mamario se mantuvo constante hasta 1974 cuando aumentó en forma temporal, probablemente como respuesta al efecto de las medidas prevención instauradas. A comienzos de los años 80 con el uso de la mamografía como instrumento de tamizaje, se observó un aumento constante de la incidencia en mujeres mayores, debido posiblemente a la fácil detección de zonas radiodensas y calcificaciones presentes en las regiones radiotransparentes propias del aumento de tejido adiposo en mujeres adultas, a diferencia del tejido fibroso que presentan las mujeres jóvenes, donde no es posible diferenciar las zonas densas o de calcificación si existiesen. Dadas las medidas de salud pública implementadas se pasó de 500.000 casos nuevos diagnosticados en 1975 a superar la cifra del millón de casos nuevos para el año 2000 en el mundo (26).

De acuerdo con las estadísticas registradas en Globocan se tiene que la tasa de incidencia (TI) ajustada por 100.000 habitantes del carcinoma mamario en el mundo es de 37.4, en países industrializados es de 67.8, en países sub desarrollados es de 23.8, en Suramérica es de 46.0, en Colombia es de 30.3 y en Santander es de 37.3, comportamiento epidemiológico semejante al descrito en el registro mundial, mientras que la tasa de mortalidad (TM) ajustada por 100.000 habitantes en el mundo es de 13.2, en países desarrollados de 18.1, en países en desarrollo de 10.3, en Suramérica de 15.1, en Colombia de 12.5 y en Santander de 8.1. Ver Tabla 1 (18) (19) (30).

Tabla 1. Epidemiología del cáncer de mama

Cáncer de mama	Incidencia	Mortalidad
Mundo	37.4	13.2
Países industrializados	67.8	18.1
Países sub desarrollados	23.8	10.3
Suramérica	46.0	15.1
Colombia	30.3	12.5
Santander	37.3	8.1

Fuente: Globocan (19) y Med UNAB (18) (30). Tasas ajustadas por 100.000 habitantes.

La tasa de supervivencia presenta gran variabilidad entre las diversas regiones del mundo, ya que ésta se encuentra sometida a factores externos como es el acceso de las pacientes a programas de tamizaje, diagnóstico precoz y tratamiento eficaz (31), además de los factores inherentes como son el tamaño tumoral y el estadio clínico de la paciente en el momento del diagnóstico, factores que influyen notablemente en la sobrevida de estas mujeres (32).

El *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* ha estadificado y determinado la tasa de supervivencia asociada al tamaño tumoral y el estadio ganglionar en

pacientes con cáncer de mama. Es así como pacientes en estadio 0 tienen una tasa de sobrevida a cinco años del 92%, las de estadio I del 87%, las del estadio II del 75%, las del estadio III del 46% y las del estadio IV un 13% (26). Ver tabla 2.

Tabla 2. Estadificación del cáncer de mama y determinación de la tasa de supervivencia a 5 años (AJCC)

Estadio	Carcinoma	Tamaño Tumoral	Estado ganglionar	Tasa de supervi-vencia a 5 años
0	CDIS o CLIS			92%
I	Carcinoma Invasor incluyendo el carcinoma *In Situ* con micro invasión	≤2 cm de diámetro	Sin afectación ganglionar o sólo metástasis <0.02 cm de diámetro	87%
II	Carcinoma invasor	≤5 cm de diámetro >5cm de diámetro	Afectación de hasta 3 ganglios axilares Sin afectación ganglionar	75%
III	Carcinoma Invasor	≤5 cm de diámetro >5cm de diámetro	Afectación de 4 a más ganglios axilares Con afectación ganglionar Con afectación de 10 o más ganglios axilares Afectación de ganglios mamarios internos ipsilaterales Con afectación cutánea (Edema, ulceración o nódulos cutáneos satélites) Fijación a la pared torácica o carcinoma inflamatorio clínico	46%
IV	Cualquier cáncer de mama con metástasis a distancia			13%

Fuente: Patología Estructural y Funcional Robbins & Cotran (26)

5.2.2 Factores de riesgo. Esta neoplasia presenta diversos factores de riesgo asociados, entre ellos sociodemográficos, hereditarios y hormonales, que han sido ampliamente estudiados y controvertidos. El estudio de los factores de riesgo en una población orienta la etiología de la neoplasia y la identificación de los factores modificables pueden conducir a estrategias preventivas que conlleven la disminución de la incidencia.

5.2.2.1 *Factores de riesgo sociodemográficos*. Los factores socio demográficos son aspectos importantes de la vida de las pacientes que pueden llegar a convertirse en factores de riesgo asociados con el desarrollo de la neoplasia. Basados en estudios epidemiológicos previos se ha determinado que la edad y el género son factores socio demográficos ampliamente relacionados con este carcinoma, aunque existes otros factores que también se encuentran relacionados.

a. Edad. Las probabilidades de desarrollar el cáncer de mama aumenta paralelamente con la edad, siendo poco frecuente esta neoplasia en mujeres premenopáusicas y esporádicas en mujeres menores de 25 años, salvo aquellos casos familiares.

Un 77% de casos se produce en mujeres mayores de 50 años con edad media de diagnóstico de 64 años. Este hallazgo puede estar favorecido al realizar diagnóstico por tamizaje con mamografía en mujeres mayores de 40 años (26).

b. Género. La literatura refiere que el carcinoma mamario es 100 veces más frecuente en mujeres que en hombres.

c. Influencia geográfica. Regiones industrializadas como Estados Unidos y Europa, presentan tasas de incidencia de cáncer de seno, más altas que en los países en desarrollo, esta diferencia puede ser fundamentada en los cambios

de patrones reproductivos como la paridad, la edad del primer parto y la lactancia (26) (19).

d. Primer nacimiento vivo. Acontecimientos reproductivos antes de los 20 años de edad reducen al 50% el riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con mujeres que tienen su primer hijo después de los 30-35 años o con nulíparas (26) (33).

e. Lactancia materna. Este suceso se convierte en un factor protector ya que a su frecuencia y duración se le atribuye la menor incidencia de cáncer de seno en países en desarrollo (26).

f. Dieta y ejercicio. Éstos son factores ampliamente estudiados y controvertidos, pues existen estudios que sugieren que la dieta rica en grasas aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama aunque también existe estudios donde no se encuentran una firme relación. La ingesta de b-carotenos ha sido relacionada con menor riesgo y el consumo moderado o alto de alcohol con el aumento del riesgo de desarrollar esta neoplasia (26).

g. Obesidad. El riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas obesas es atribuido a la síntesis de estrógenos a partir de depósitos grasos (26).

h. Raza. La incidencia global del cáncer de mama en mujeres de raza blanca es mayor y su tasa de mortalidad menor comparada con las mujeres de origen afroamericano en quienes el diagnóstico ocurre en etapas avanzadas, aumentando así la tasa de mortalidad en este grupo étnico, evento que puede ser explicado por el menor acceso a programas de salud (34).

i. Tabaquismo. El desarrollo de cáncer mamario no ha sido asociado con el tabaquismo, pero sí, con el desarrollo de mastitis periductal o absceso subareolar (26).

5.2.2.2 *Factores de riesgo hereditarios y familiares*.

a. Herencia. Aunque la carga genética es considerada como un factor de riesgo, ésta sólo es decisiva en un 5-10% de los casos de carcinoma mamario; esta influencia se puede incrementar hasta un 30% si la neoplasia se presenta en mujeres menores de 30 años. Con pocas excepciones, las alteraciones que predisponen al cáncer de manera mendeliana, son autosómicas dominantes y están causadas por genes de supresión tumoral (26).

Dentro de los genes implicados en el desarrollo de esta neoplasia se encuentran el **BRCA1 y BRCA2** que son susceptibles a mutaciones. Estudios realizados han permitido determinar que las mutaciones del gen BRCA1 se encuentran en el 45% y el BRCA2 en el 35% de los cánceres de mama femeninos. La presencia de estas mutaciones ha incrementado el riesgo de un 5% a un 35-85%, por lo que el estudio de estos genes está recomendado en pacientes con una historia familiar de cáncer de mama y de ovario (26).

b. Familiares de primer grado con cáncer de mama. El riesgo asociado a tener un familiar afectado por esta neoplasia, se encuentra relacionada con el grado de consanguinidad y a su vez está modulado por la edad al momento del diagnóstico y el número de familiares afectados. El 86% de mujeres que desarrollan cáncer de mama no presentan antecedentes familiares, siendo sólo el 13% de las mujeres que desarrollan esta neoplasia las que presentan un familiar afectado en primer grado (madre, hija o hermana) y un 1% las que tienen dos o más familiares afectados (26) (25) (35).

5.2.2.3 *Factores de riesgo hormonales y endocrinos*

a. Menarquia. La menarquia temprana (antes de los 11 años) ha sido asociada a un incremento del riesgo en un 10 a 20% en comparación con aquellas mujeres que llegan a la menarquia con más de 14 años (8) (26) (25).

b. Menopausia. La menopausia tardía (después de los 55 años) incrementa el riesgo de desarrollar carcinoma mamario, ya que al ampliarse el número de ciclos ovulatorios aumenta el efecto acumulativo de las dosis de estrógeno en el epitelio mamario (33).

c. Estrógenos endógenos. La acción ejercida por los estrógenos endógenos sobre la proliferación y división celular favorece la producción de diversos factores de crecimiento tumorales, lo que supone que las interacciones entre las hormonas circulantes, los receptores hormonales localizados en las células neoplásicas y los factores de crecimiento autocrinos inducidos por las células tumorales están implicados en la progresión del cáncer mamario (8).

d. Terapia hormonal sustitutiva. Esta terapia para la menopausia (ya sea sólo estrógenos o combinado con progesterona) por tiempo prolongado, mayor o igual a 5 años, parecen estar relacionados con el desarrollo del cáncer de seno, debido a que los estrógenos y la progesterona actúan sinérgicamente e intervienen en el proceso de proliferación de las células epiteliales mamarias, lo que las hace más susceptibles a errores genéticos durante la replicación del DNA ocasionando el desarrollo de un fenotipo maligno (26).

5.2.2.4 *Factores de riesgo ambientales.* La exposición a radiaciones posteriores a una explosión radiactiva, influyen positivamente en la incidencia del cáncer de

mama (26), al igual que las radiaciones ionizantes recibidas en la infancia o la adolescencia (25).

5.2.3 Clasificación del cáncer de mama. La clasificación de esta neoplasia se puede basar en diferentes criterios como el estudio histopatológico de la muestra, factores de riesgo, presencia de receptores estrogénicos y la definición de subtipos biológicos del cáncer de mama por determinación inmunohistoquímica.

5.2.3.1 Clasificación histológica del cáncer de mama. Más del 95% de los tumores malignos de la mama son adenocarcinomas, mientras que menos del 5% corresponden a carcinomas de células escamosas, tumores filodes, sarcomas y linfomas (26).

a. Carcinoma *In Situ*. La población celular tumoral se encuentra confinada en la estructura ducto-lobulillar. Está delimitada por la membrana basal sin evidencia de invasión a vasos sanguíneos ni a ganglios linfáticos. Dentro de los carcinomas *In Situ* tenemos (26) (29) (25):

i Carcinoma ductal *In Situ* · CDIS · Carcinoma intraductal · CID. Las células neoplásicas, producto de la proliferación maligna del epitelio celular, se encuentran limitadas por la membrana basal mientras que las células mioepiteliales se conservan, aunque pueden estar disminuidas en cantidad. En el CDIS las clonas normalmente afectan un único sistema ductal, sin embargo, pueden diseminarse por conductos y lobulillos hasta afectar toda una región de la mama. Cuando el CDIS afecta los lobulillos, los acinos se encuentran deformados tomando la apariencia de pequeños conductos (26) (25) (29).

El CDIS presenta los siguientes subtipos arquitecturales: comedocarcinoma, CDIS de tipo no comedón (cribiforme, sólido, papilar y micropapilar) y la enfermedad de Paget.

- **Comedocarcinoma.** Al microscopio se observan láminas sólidas pleomórficas con alto grado nuclear y necrosis central. Este carcinoma se asocia con alto índice proliferativo y con la mutación del gen c-erb B2 causando la amplificación del gen y la sobreexpresión de la proteína que se traduce en mayor agresividad clínica. En la mamografía se visualizan microcalcificaciones ramificadas o lineales correspondientes a las membranas calcificadas de las células necróticas. También se puede encontrar fibrosis concéntrica periductal e inflamación crónica (26) (25).

- **Carcinoma intraductal de tipo no comedón.** Las lesiones de este tipo presentan una evolución más benigna y se caracterizan por tener una población celular monomórfica con grado nuclear variable. Dentro de las lesiones de tipo no comedón se encuentran: ***CID cribiforme*****,** presenta una proliferación epitelial con formación de microluces, las cuales normalmente están ocupadas con material secretor calcificante; esta lesión se puede encontrar en cualquier nivel del ducto principal. ***CID sólido***, la población de estas células tumorales ocupa gran parte del conducto distorsionando los lobulillos, por lo que las microluces y estructuras papilares normalmente no se observan; esta lesión no se asocia a calcificaciones pero pueden estar presentes. ***CID papilar***, presenta una arquitectura fibrovascular y la capa de células mioepiteliales está ausente. ***CID micropapilar***, los conductos que están delimitados por células tumorales forman unas protrusiones bulbosas que van desde papilas y montículos hasta procesos delgados y alargados, puede presentar necrosis central y estar asociado a calcificaciones (26) (29).

- **Enfermedad de Paget.** Esta forma de CID se caracteriza en que las células tumorales (células de Paget) se extienden desde los conductos del pezón hasta la piel adyacente al pezón y la areola, sin que estas células atraviesen la membrana basal. Macroscópicamente se hace llamativa la presencia de fisuras, ulceraciones y exudado en esta zona. Normalmente este carcinoma está mal diferenciado y sobre expresa la proteína Her-2/neu (26) (29).

ii Carcinoma lobulillar *In Situ* · CLIS. Está caracterizado por la proliferación celular tumoral en uno o más conductos o conductillos terminales (acinos). Las células tumorales son monomórficas, ligeramente más grandes que las células normales con núcleos ovoides o redondeados y nucléolos pequeños. Su escasa cohesividad se debe a la ausencia de expresión de la E-cadherina. Sus células se asemejan a las presentes en el carcinoma lobulillar infiltrante y a la hiperplasia lobulillar atípica (HLA). Esta neoplasia no está asociada a la formación de zonas densas por calcificación o reacciones del estroma. En un 20-40% de los casos es bilateral y es más frecuente en mujeres jóvenes (26) (29).

El CLIS normalmente expresa receptores de estrógenos y progesterona y no se observa sobreexpresión de HER-2/neu.

b. Carcinoma invasor o infiltrante. En esta clase de tumores las células neoplásicas han logrado traspasar la barrera de la membrana basal hasta alcanzar el estroma favoreciendo la invasión a vasos sanguíneos y ganglios linfáticos tanto regionales como a distancia promoviendo la metástasis. Macroscópicamente se pueden observar cambios físicos en la textura de la piel y retracción del pezón (26).

i Carcinoma ductal infiltrante (CDI). A la palpación estos carcinomas presentan una estructura firme, dura y de bordes irregulares, debido al incremento del estroma. En general estas lesiones están formadas por células tumorales dispuestas en cordones, nidos, túbulos y masas anastomosadas que infiltran el estroma. El CDI puede estar bien, mal o moderadamente diferenciado. En los tumores bien diferenciados se observa túbulos bien formados, nidos celulares con núcleos monomórficos pequeños que invaden el estroma produciendo respuesta desmoplásica circundante y normalmente expresan los receptores hormonales ER y PR pero no sobre expresan la proteína Her-2/neu.

En los patrones de CDI pobremente diferenciados se aprecia estructuras irregulares de células pleomórficas sin formación de túbulos e infiltran el estroma adyacente; la probabilidades de expresar receptores hormonales es menor mientras que la de sobre expresar HER-2/neu es mayor. Los carcinomas infiltrantes convencionales constituyen del 70-80% de todos los carcinomas infiltrantes (26) (25).

ii Carcinoma lobulillar invasor - CLI. Macroscópicamente el tumor es elástico, mal delimitado y a la palpación son estructuras firmes de bordes irregulares. Al igual que en el carcinoma lobulillar *in situ* las células infiltrantes se encuentran sueltas formando hileras o grupos poco cohesivos, no hay formación de túbulos ni papilas y la respuesta desmoplásica puede estar ausente o ser mínima.

La presencia o ausencia de receptores hormonales varía con el grado histológico del tumor, por lo que los CLI bien o moderadamente diferenciados frecuentemente expresan los ER y PR pero no la proteína HER-2/neu mientras que los mal diferenciados carecen de receptores hormonales y pueden sobre

expresar HER-2/neu. Estos carcinomas representan del 5-10% del total de los carcinomas mamarios (26) (29).

iii Carcinoma medular. Macroscópicamente es una masa bien delimitada, blanda y carnosa a la palpación debida a la ausencia o disminución marcada de respuesta desmoplásica.

Microscópicamente se observan láminas sólidas de tipo sincitial que ocupan más del 75% del tumor, presentan células grandes con núcleos vesiculados pleomórficos, sus nucléolos son de gran tamaño y normalmente se encuentran en mitosis, se observa de moderado a intenso infiltrado linfocítico y de células plasmáticas alrededor y dentro del tumor, el borde es de crecimiento expansivo no infiltrante.

Todos los carcinomas medulares se encuentran mal diferenciados y la mayoría presentan factores de mal pronóstico, aneuploidía, grado nuclear y tasas de proliferación elevadas, expresión del gen p53 y ausencia de expresión de los receptores hormonales y del HER-2/neu (26) (29).

iv Carcinoma mucinoso o coloide. Este carcinoma representa del 1-5% de los carcinomas mamarios y es más frecuente en mujeres jóvenes. Las células tumorales forman pequeñas islas ubicadas en grandes extensiones de mucina, formando una masa blanda y circunscrita. Son de crecimiento lento y la mayoría de ellos expresa los receptores hormonales (26) (29).

v Carcinoma tubular. Esta variante representa del 1-6% de todos los carcinomas mamarios y es más frecuente en mujeres de edad avanzada. Histológicamente presenta túbulos bien formados angulados con ausencia de células mioepiteliales, dejando las células tumorales directamente expuestas en el estroma. Puede existir espacios cribiformes, haber protrusiones apocrinas y

existir calcificaciones intraluminales. En la mamografía se observa zonas densas e irregulares (26) (29).

vi Carcinoma papilar invasor. Estos carcinomas son infrecuentes y representan el 1% o menos de los carcinomas invasores, su arquitectura papilar puede estar presente en el carcinoma ductal *in situ*. La presentación clínica es similar a la de los carcinomas ductales convencionales pero de mejor pronóstico (26) (29).

vii Carcinoma metaplásico. Representa menos del 1% de todos los carcinomas mamarios, esta clasificación reúne un conjunto de tipos raros de cáncer mamario, como adenocarcinomas convencionales con estroma condroide, carcinomas de células escamosas y carcinomas con células fusiformes que dificultan la diferenciación de los sarcomas. Como grupo son de mal pronóstico (26) (29).

5.2.3.2 *Clasificación basada en los factores de riesgos mayores.*

a. Cáncer de mama hereditario. Esta neoplasia se encuentra asociada a antecedentes familiares o mutación de genes de la línea germinal, viéndose influida la probabilidad por la existencia de familiares en primer grado afectados, por el desarrollo del cáncer en períodos premenopáusico, por la presencia de múltiples cánceres, por la presencia de casos de cáncer de mama masculino o por el desarrollo de cáncer ovárico.

Los genes BRCA1 y BRCA2, normalmente actúan como supresores tumorales, función que se ve afectada cuando ocurre una mutación en ellos aumentando el riesgo de desarrollar cáncer. La frecuencia de mutación es de 0.1-2% en la población general.

Al comparar el cáncer de mama esporádico con el asociado a BRCA1 se concluye que éste presenta un patrón de crecimiento sincitial con bordes de crecimiento expansivo, respuesta linfocítica y no expresan los receptores hormonales ni sobre expresan la proteína Her-2/neu. Mientras que el cáncer de seno asociado al BRCA2 no presenta aspecto morfológico particular (26).

b. Cáncer de mama esporádico. Este tipo de cáncer se asocia a factores de riesgos relacionados con la producción hormonal como el sexo, la edad de menarquía y menopausia y la expresión de receptores estrogénicos. La mayoría de cánceres esporádicos se presentan en mujeres posmenopáusicas que expresan receptores de estrógenos (26).

5.2.3.3 ***Clasificación basada en la expresión de receptores estrogénicos.*** Los receptores son proteínas especializadas capaces de identificar sustancias como neurotransmisores, factores de crecimiento u hormonas. Se ubican en la membrana citoplasmática, citosol, membrana de los orgánulos o en el núcleo y son los encargados de establecer la comunicación entre el medio extra e intracelular mediante la unión específica de ligandos, suceso que genera cambios en el metabolismo celular, como la regulación de proteínas intracelulares causado por los factores de crecimiento y hormonas (36).

a. Receptor de Estrógeno. Es un receptor nuclear que presenta dos formas α y β con peso moleculares diferentes. Estas formas son codificadas por genes distintos, el gen ESR1 codifica el receptor de estrógeno α (ERα) y el gen ESR2 codifica el receptor de estrógeno β (ERβ). El ERα es conocido con el nombre NR3A1 (*Nuclear Receptor subfamily 3 group A member 1*) y el ERβ con el nombre de NR3A2 (*Nuclear Receptor subfamily 3 group A member 2*) (37).

Su expresión depende del tipo de tejido, los ERα se expresan principalmente en los órganos reproductivos (ovario, útero y glándula mamaria) pero también lo hace en hígado y sistema nervioso central y los ERβ se expresan principalmente en hueso, pulmón, endotelio, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata.

Este factor de transcripción nuclear es el encargado de regular la expresión génica dependiente de su unión al ligando y en respuesta específica ante señales fisiológicas y patológicas.

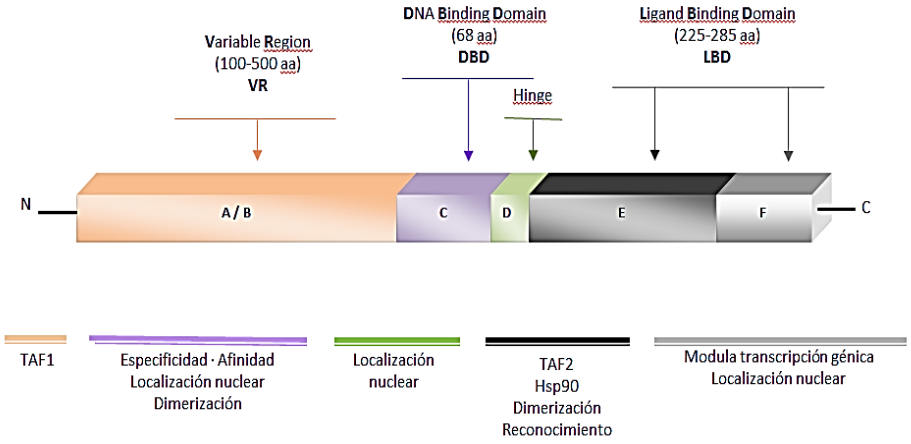
El receptor de estrógeno es una proteína conformada por seis dominios denominados A, B, C, D, E y F, cada uno con una función específica (38). Gráfico 1.

Región A/B o dominio regulatorio es una región variable tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos y tiene la función de activación de transcripción 1 (TAF-1) independiente del ligando. Esta región amino terminal contiene diferentes sitios de fosforilación regulados por las proteínas cinasas. Aunque el papel de la fosforilación aún no está bien definido se cree que interviene en la modulación de la actividad TAF-1, en la interacción con los correguladores y en la intercomunicación con otras vías de señalización (39) (40) (41).

Región C o dominio de unión al DNA (*DNA binding domain*-DBD), es una región muy conservada, mediante sus dos dedos de Zinc interactúa con el DNA lo que la hace responsable de la especificidad y afinidad de unión al DNA (40).

Región D, *Hinge* o bisagra, es una región que contiene secuencias de localización nuclear importantes en la permanencia del receptor dentro del núcleo en ausencia del ligando (Estrógeno) (39).

Gráfico 1. Representación esquemática del receptor de estrógenos



Región E/F, corresponden a la región carboxilo terminal y las dos conforman el dominio de unión al ligando (*Ligand Binding Domain - LBD*). La región E es la responsable de la unión del receptor a la hormona, de la dimerización y de la activación de la función de transcripción 2 (TAF-2) dependiente del ligando. También es el sitio de unión a la proteína de choque caliente 90 (*Heat shock proteins* - Hsp90) y la región F modula la transcripción del gen por acción de los estrógenos y antiestrógenos, afectando las actividades TAF-1 y TAF-2 (39).

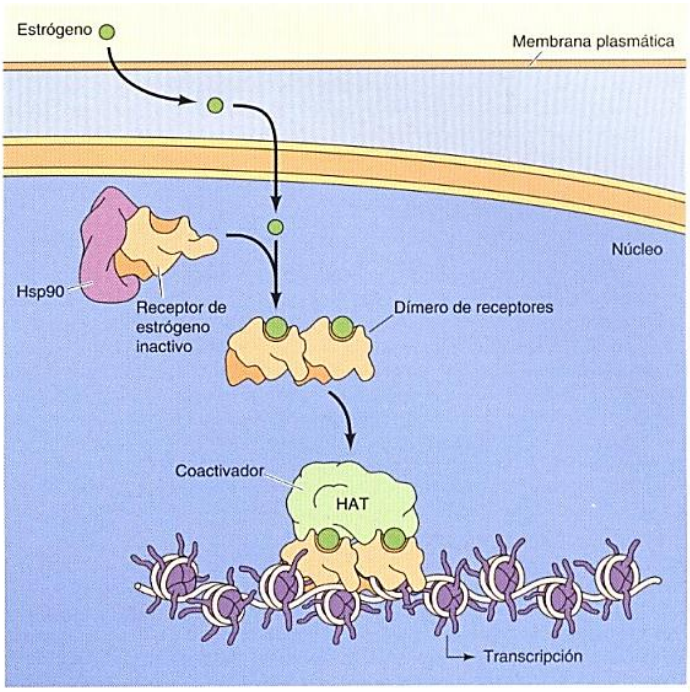
La transferencia de información desde el exterior hasta el interior de la célula ocurre cuando la hormona interactúa con la célula, permitiendo la difusión a través de la membrana celular hasta encontrar su respectivo receptor nuclear y así regular la síntesis del DNA (41) (36).

El receptor de estrógeno antes de unirse al ligando (estrógeno) se encuentra inactivo por la acción de la Hsp90, quien, cuando ocurre la interacción ER-ligando se disocia para dar paso a la dimerización de los receptores, los cuales por acción de un coactivador (*Histone acetiltransferase* - HAT) estabilizan su unión con los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA,

estimulando así la transcripción mediada por la activación de las funciones TAF-1 y TAF-2 (39) (36). Gráfico 2.

b. Receptores de Progesterona. Es un receptor nuclear conocido con el nombre NR3C3 (Nuclear Receptor subfamily 3, group C, member 3) (37), presenta dos isoformas codificadas por un mismo gen (PGR) y diferenciadas por su peso molecular. Estas isoformas son PR-A con el extremo N-terminal trucando (94kDa) y PR-B de longitud completa (116 kDa) (42). Estas isoformas están implicadas en el desarrollo normal de la glándula mamaria donde es esencial la isoforma PR-B mientras que la isoforma PR-A es fundamental para el buen funcionamiento uterino y reproductivo (43)

Gráfico 2. Mecanismo de acción del receptor de estrógeno



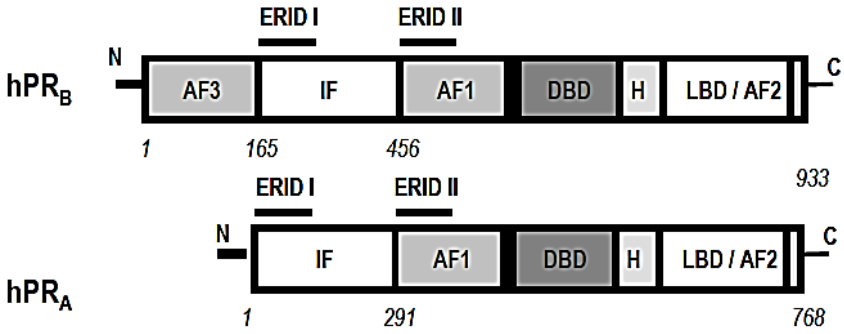
Fuente: La célula. Geoffrey M. Cooper (45)

Estos receptores son factores de transcripción activados por su ligando, la progesterona, que es el único progestágeno natural o por las progestinas que son progestágenos sintéticos.

La estructura del receptor de progesterona es similar a la del receptor de estrógenos, con la diferencia de que en la isoforma PR-B se encuentra una tercera función de activación (AF3), la cual sólo se activa cuando el dominio DBD ha entrado en contacto con el DNA. La isoforma PR-A no posee la función AF3 (44). Gráfico 3.

El mecanismo de acción de los receptores de progesterona es muy similar al de los receptores de estrógeno descrito anteriormente. Gráfico 4.

Gráfico 3. Expresión de formas funcionales del receptor de progesterona

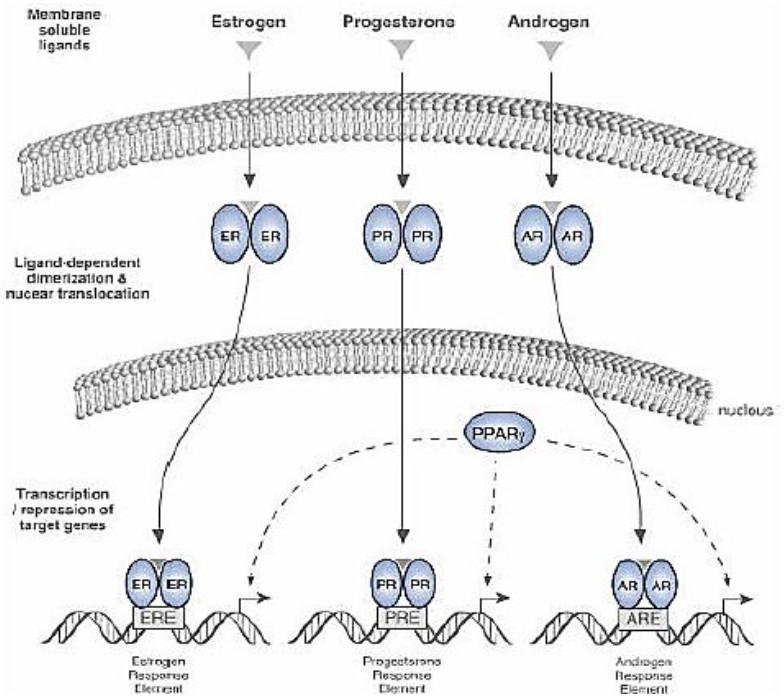


AF, Activation Function; IF, Inhibitory Function; DBD, DNA Binding Domain; H, Hinge region; LBD, Ligand Binding Domain; ERID, ER Interaction Domain. Fuente: Análisis de los dominios funcionales del receptor de progesterona en líneas celulares estables del cáncer de mama (44)

c. HER-2/neu. El ERBB2 es el nombre oficial determinado por el comité *HUGO Gene Nomenclature Committee* para designar el *v-erb-b2 erithroblastic leukemia viral oncogen homolog 2*, gen que codifica un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico *(*HER - *epidermal growth factor*

receptor family). En la literatura, este gen ha recibido diversos nombres: NGL, NEU, HER2, TRR1, HER-2, c-erbB2, Her-2/neu (9).

Gráfico 4. Mecanismo de acción del receptor de progesterona

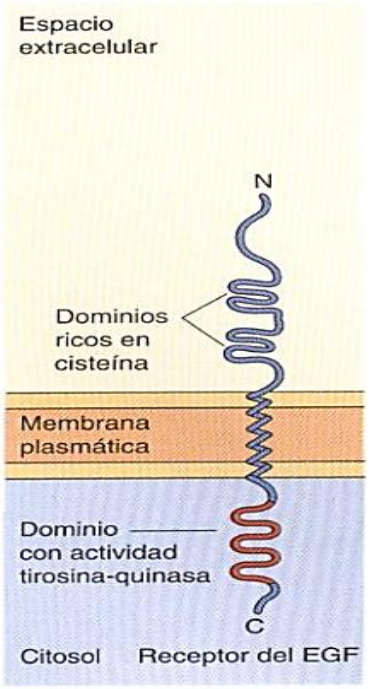


Fuente: Análisis de los dominios funcionales del receptor de progesterona en líneas celulares estables del cáncer de mama (44)

El c-erbB2 es un protooncogén que codifica la proteína transmembranal p185 formada por tres dominios, extracelular, intramembranoso e intracelular con actividad tirosina quinasa estimulada por los factores de crecimiento que poseen la capacidad de fosforilar proteínas en los residuos tirosina. Esta proteína interviene en el control del crecimiento celular y actúa como receptor de múltiples factores de crecimiento, lo cual sugiere no tener un ligando específico. Gráfico 5.

El receptor HER-2/neu pertenece a la familia de receptores erb-B o HER 1-4. El ErbB-1 presenta afinidad por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el ErbB-3 y ErbB-4 por el factor de diferenciación neu (NDF- *Neu differentiation factor*), mientras que el ErbB-2 cuyo ligando es aún desconocido puede dimerizar con el ErbB-1, el ErbB-3 y el ErbB-4 aumentando su afinidad por estos dos factores de crecimiento (EGF y NDF) (45).

Gráfico 5. Estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

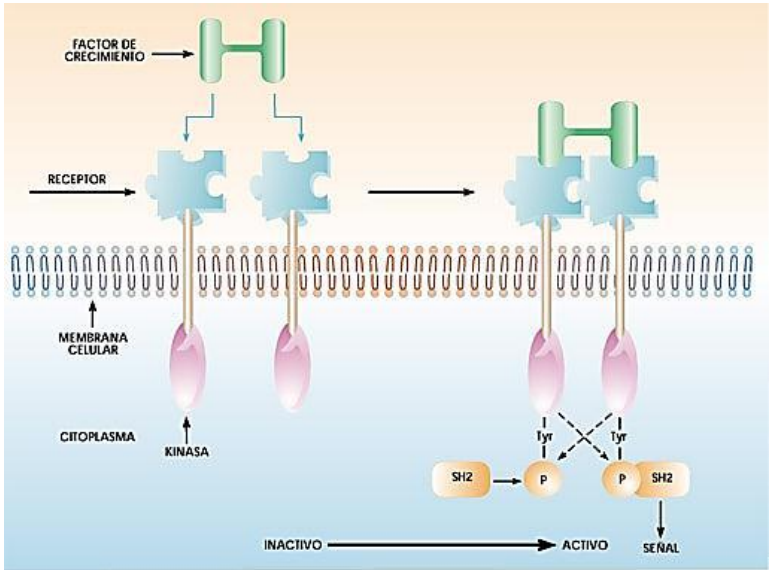


Fuente: La célula. Geoffrey M. Cooper (36)

El paso de información desde el exterior al interior de la célula ocurre a través de la vía de transducción de señales. Aquí el ligando (factor de crecimiento) interactúa con el receptor de membrana lo que produce cambios conformacionales del dominio extracelular del receptor para dar paso a la dimerización que permite la difusión del estímulo cuando dos dominios

adyacentes se transfosforilan. Esta señal altera moléculas intracelulares hasta activarlas o desactivarlas en forma secuencial, produciendo una respuesta celular ante una alteración en la expresión del DNA. Esta vía gatillada por los factores de crecimiento regula la división, el crecimiento, el ciclo y la reparación celular, al igual que la apoptosis y la respuesta a estímulos de estrés (36). Gráfico 6.

Gráfico 6. Mecanismo de acción del HER-2/neu

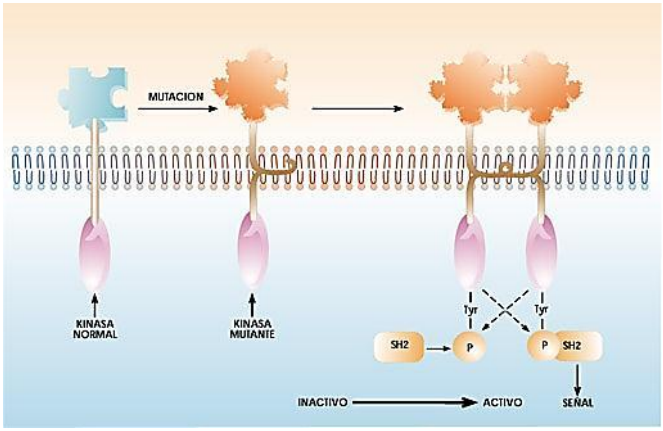


Fuente: Nuevas terapias en cáncer: acción sobre la vía de transducción de señales, de una promesa a una realidad que se inicia (41)

Uno de los mecanismos usados por las células tumorales para mantener constantemente la proliferación anormal de sus células es la producción autocrina de algunos factores de crecimiento (PDGF-*Platelet derived growth factor*, VEGF, FGF- *Fibroblast growth factor*) que favorecen su desarrollo y otro es la presencia de receptores de tirosina kinasa anormales, los cuales se pueden dimerizar en ausencia del ligando lo que permite una señalización

inapropiada y continua del proceso, amplificando el gen, hecho que se traduce en la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu (Gráfico 7 y 8). Perou y colaboradores refieren que esta sobreexpresión se encuentra en un 20-30% de las mujeres con cáncer mamario (21) mientras que Owens y colaboradores la relacionan con un 20% (46).

Gráfico 7. Proteína kinasa mutante



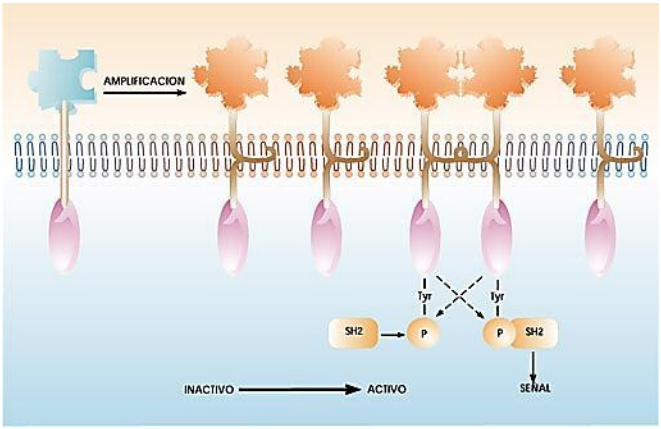
Fuente: Nuevas terapias en cáncer: acción sobre la vía de transducción de señales, de una promesa a una realidad que se inicia (41)

La siguiente es la clasificación basada en la expresión de los receptores hormonales estrogénicos.

d. Carcinomas con receptores estrogénicos positivos. Se considera que del 70-80% de los carcinomas ductales son receptores de estrógenos positivos, histológicamente están bien o moderadamente diferenciados con formación de túbulos. La expresión de los genes y queratinas luminales relacionados con ellos se encuentran normales o aumentados, dentro de estos genes tenemos: HNF3, AR, GATA-3, LIV-1, TFF3, Ciclina D1, Ker 8, Ker 18, Ker 19. Inmunohistoquímicamente se observa positividad de los receptores de

estrógenos y de la E-cadherina en la membrana celular, mientras que el Her-2/neu y las queratinas basales son indetectables.

Gráfico 8. Amplificación de la proteína HER-2/neu



Fuente: Nuevas terapias en cáncer: acción sobre la vía de transducción de señales, de una promesa a una realidad que se inicia (41)

El cáncer lobulillar infiltrante, tubular, mucinoso y papilar infiltrante son ER positivos. El carcinoma lobulillar presenta un patrón morfológico característico con escasa adherencia intercelular asociado con la pérdida de la molécula de adhesión celular, E-cadherina, conservada en la mayoría de los carcinomas ER positivos (26).

e. Carcinomas con receptores estrogénicos negativos. Estos carcinomas pueden aparecer por pérdida de expresión o por células que normalmente no expresan los ER. Dentro de este grupo se encuentran dos tipos, Her-2/neu positivos y los carcinomas basales (26).

i Carcinomas Her-2/neu positivos. En estos carcinomas el mecanismo de sobreexpresión ocurre por amplificación del gen con aumento de transcripción

de RNAm y traducción de proteínas. Paralelamente expresa otros genes como la E-cadherina, PPARBP, GRB-7 y MLN 64, mientras que las queratinas basales y los ER no son expresados en este grupo. Estos carcinomas normalmente están mal diferenciados (26).

ii Carcinomas tipo basal. En este grupo prevalece la expresión de queratinas basales típicas de las células mioepiteliales que se ubican en la región basal de los lobulillos y conductos, condición que sugiere el nombre de basal. Estos carcinomas expresan otros genes como P-Cadherina, CDK2, Ciclina A2, Ciclina E1, Myc, HDGF, AC 133, Ciclina B1, PCNA, p53, Ker 5, Ker 16 y Ker 17. Este grupo no expresa los receptores de estrógenos ni sobre expresa la proteína Her-2/neu (TNP).

Aquellas mujeres que presentan mutación en el BRCA1 se ubican dentro de este grupo por estar poco diferenciadas, no expresar ER ni Her-2/neu pero si expresan queratinas basales. Aunque existe muchos casos de tipo basal que no presentan mutaciones de la línea germinal BRCA1 (26).

5.2.3.4 Definición de los subtipos biológicos del cáncer mamario. En la glándula mamaria se han encontrado dos tipos de células epiteliales: las células basales o mioepiteliales y las células luminales. Estas células pueden ser identificadas mediante coloraciones inmunohistoquímicas, las células epiteliales basales pueden ser coloreadas usando anticuerpos contra la keratina 5/6 mientras que las epiteliales luminales con anticuerpos contra la keratina 8/18. La identificación de estas células por inmunohistoquímica, ha sido parte de la base para la clasificación molecular del carcinoma mamario (21).

Para definir los subtipos biológicos del cáncer mamario, Cheang y colaboradores utilizaron dos esquemas: el primero es el método del fenotipo triple negativo cuya

base son los receptores de estrógenos, los receptores de progesterona y la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu y el segundo método es el de los cinco biomarcadores, donde además de las tres biomoléculas ya mencionados se encuentra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la Citokeratina 5/6 (CK5/6) (13). Este perfil molecular fue previamente definido por Nielsen (47) y Carey (48).

Teniendo en cuenta los tres biomarcadores inicialmente señalados, los perfiles moleculares establecidos son el fenotipo triple negativo, el fenotipo HER2+, el fenotipo luminal' y el fenotipo luminal/HER2+, cuya caracterización se presenta en la Tabla 3. El fenotipo luminal' es equivalente al luminal A, mientras que el fenotipo luminal/HER2+ no es equivalente al luminal B, ya que sólo el 30-50% del luminal B expresa HER-2/neu (13).

Tabla 3. Perfil molecular del cáncer de mama determinado por tres biomarcadores (ER/PR/HER-2/neu)

Fenotipo	ER		PR		Her2/neu
TNP (Basal Like)	Negativo	y	Negativo	y	Negativo
HER2+	Negativo	y	Negativo	y	Positivo
Luminal'- luminal A	Positivo	y/o	Positivo	y	Negativo
Luminal/HER2+	Positivo	y/o	Positivo	y	Positivo

Fuente: *Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype* (13)

La tipificación del cáncer mamario basada en los cinco biomarcadores subdivide el fenotipo TNP en dos grupos, Core Basal y 5NP, ver tabla 4, aquí se establece que el grupo *core basal* tiene peor significado clínico pronóstico que el TNP (13)

Otros autores como William F. y colaboradores (10), Kenneth Chu y colaboradores (16) y Gerson y colaboradores (49), de acuerdo con sus hallazgos introducen una combinación de la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona (ER negativo, PR positivo) con HER-2/neu negativo que no fue contemplada en la clasificación realizada por Cheang y colaboradores.

Tabla 4. Perfil molecular del cáncer de mama determinado por cinco biomarcadores (ER, PR, Her-2/neu, EGFR, CK5-6)

Fenotipo	ER		PR		Her2/neu		EGFR		CK5/6
Core basal	Negativo	Y	Negativo	y	Negativo	y/o	Positivo	y/o	Positivo
5NP	Negativo	Y	Negativo	y	Negativo	y	Negativo	y	Negativo
HER2+	Negativo	Y	Negativo	y	Positivo				
Luminal'	Positivo	y/o	Positivo	y	Negativo				
Luminal/HER2	Positivo	y/o	Positivo	y	Positivo				

Fuente: *Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype* (13)

5.2.4 Factores pronósticos y predictivos. Un factor pronóstico es una característica clínica o biológica cuantificable asociado con el curso (período de supervivencia libre o total) de una enfermedad en ausencia de terapia adyuvante y el factor predictivo hace referencia a una característica cuantificable asociada a una respuesta o a su ausencia de ella, ante un tratamiento específico (50) (51).

El Índice Pronóstico de Nottigham relaciona las principales y más importantes características evaluadas en un tumor para determinar el pronóstico de un paciente en el momento del diagnóstico. Estos indicadores de pronóstico son el estado de los nódulos linfáticos, el tamaño tumoral y el grado de diferenciación tumoral (1).

5.2.4.1 Estado ganglionar. Cuando no hay metástasis a distancia el estado ganglionar axilar se convierte en el factor pronóstico más importante del carcinoma infiltrante. La valoración clínica de las adenopatías es inexacta, por lo que se hace imprescindible el estudio del ganglio centinela mediante biopsia, siendo éste un indicador del estado de los ganglios restantes (26).

5.2.4.2 Tamaño Tumoral. Éste es el segundo factor pronóstico más importante. Aun cuando el tamaño del tumor es independiente del estado de los ganglios, el riesgo de adenopatías aumenta con el tamaño del tumor y es así como mujeres que tienen tumores inferiores a 1cm de diámetro presentan un mejor pronóstico, mientras que aquellas cuyos tumores superan los 2cm presentan mayor posibilidad de hacer metástasis ganglionar (26).

5.2.4.3 Grado de diferenciación tumoral. El grado de diferenciación tumoral es el mejor factor pronóstico en el carcinoma mamario, su evaluación permita observar morfológicamente las características biológicas del tumor que determinan el comportamiento clínico del carcinoma. Para la valoración de este criterio se utiliza el NGS (*Nottingham Grading System)* que corresponde a la modificación del *Scarff Bloom&Richardson* realizada por Elston- Ellis (52). El NGS está conformado por la evaluación de la formación de glándulas o túbulos, el pleomorfismo nuclear y el conteo mitótico, ver tabla 5.

La sobrevida a 10 años en mujeres con grado de diferenciación I (bien diferenciados) es del 85%, las de grado de diferenciación II (moderadamente diferenciados) es del 60% y las de grado de diferenciación III (mal diferenciados) es del 15% (26).

5.2.4.4 Estado de los receptores hormonales. El estrógeno y la progesterona son hormonas esteroides ováricas que regulan los procesos normales de formación, crecimiento y diferenciación celular en los órganos reproductivos (mama, ovario y útero) principalmente. También regulan otros procesos en tejidos como hueso, cerebro, hígado y sistema cardiovascular.

En las mujeres premenopáusicas la mayor cantidad de estrógenos (estradiol 17B y estrona) es producida por los ovarios en respuesta al estímulo ejercido por las hormonas FSH y LH.

Tabla 5. Clasificación histológica del grado de diferenciación tumoral para el carcinoma ductal convencional infiltrante de mama según método de Elston- Ellis

Características Histológicas	Puntaje
Formación de Túbulos (Dentro del tumor)	
>75%	1
10-75%	2
<10%	3
Pleomorfismo nuclear	
Pequeños, regulares y uniformes	1
Moderada variación de forma y tamaño	2
Marcada variación de forma y tamaño	3
Conteo mitótico en 10 campos de alto poder (Depende del área del campo del microscopio)	
Diámetro del campo de 0.44 mm / área del campo 0.152 mm^2	
0 – 5	1
6 – 10	2
> 11	3
Diámetro del campo de 0.59mm / área del campo 0.274 mm^2	
0 – 9	1
10 - 19	2
> 20	3
Score Total	
3 - 5: Grado I, Bien diferenciado	
6 – 7: Grado II, Moderadamente diferenciado	
8 – 9: Grado III, Mal diferenciado	

Fuente: *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up* (52) (17)

En las mujeres posmenopáusicas el ovario produce poco o no produce componentes estrogénicos, en su lugar la glándula adrenal es la encargada de producir la testosterona y la androstenediona, precursores estrogénicos, que luego son convertidos en los tejidos periféricos, en estradiol y estrona. Las células tumorales utilizan estas hormonas y su mecanismo de acción para favorecer el desarrollo neoplásico cuando interactúan con sus respectivos receptores (factores de transcripción) con el fin de regular la actividad de los genes blanco para ellas (53).

De los receptores hormonales el más importante, en cuanto a valor pronóstico independiente se refiere, es el receptor de estrógenos, el cual pertenece a la superfamilia de receptores nucleares cuya principal función es regular la expresión génica dependiente de su unión al ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas.

El valor pronóstico del hallazgo de los receptores de estrógenos positivos en mujeres con cáncer de mama es bueno, dado que en su tratamiento se utilizan fármacos que actúan como moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs – *Selective estrogen receptor modulators*) (39). Del 50-85% de los carcinomas mamarios expresan ER y son más frecuentes en mujeres postmenopáusicas. El 80% de los tumores que expresan ER y PR responden a la terapia hormonal mientras que sólo el 40% responde cuando sólo se expresa un tipo de receptor y en aquellos tumores que no expresan ER ni PR la probabilidad de respuesta al tratamiento hormonal es inferior al 10% (26).

5.2.4.5 Sobreexpresión de la proteína Her-2/neu (*Human epidermal growth factor receptor 2*). Esta condición está asociada con un comportamiento biológico agresivo. Aumenta la capacidad de recurrencias y la mortalidad en pacientes con cáncer mamario que no reciben ninguna terapia sistémica, ofrece

resistencia relativa pero no absoluta a ciertas terapias endocrinas como el tamoxifen (SERM) pero no con los inhibidores de aromatasa, incrementa la tumorogenicidad relacionada con el VEGF, la angiogénesis y el potencial metastásico (8) y predice la resistencia o sensibilidad de los diferentes agentes utilizados en la quimioterapia como la nonanthracycline o el paclitaxel (9).

Por lo anterior la evaluación de la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu presenta un valor tanto pronóstico como predictivo del carcinoma de la glándula mamaria.

5.3 INMUNOHISTOQUIMICA

5.3.1 Generalidades. El estudio de antígenos celulares en cortes de tejido ha sido un proceso que se viene realizando desde 1941 cuando Coons describió una técnica de inmunofluorescencia para tal fin. Décadas después Nakane, Pierce y Avrameus mejoraron esta técnica hasta llegar a lo que es hoy la inmunohistoquímica, una técnica práctica de gran utilidad y aplicabilidad científica y clínica.

Los métodos de inmunohistoquímica progresivamente se han ido consolidando como una tecnología esencial en el diagnóstico clínico patológico que le permiten al médico patólogo contar con un conjunto de técnicas que precisen la identificación de antígenos expresados por algunas células o tejidos biológicos en situaciones puntuales.

Hoy en día se cuenta con un amplio espectro de biomarcadores moleculares que contribuyen con la identificación de agentes infecciosos, esclarecimiento de

estirpes celulares, detección de receptores hormonales, antígenos de proliferación celular y productos de oncogenes en una neoplasia.

El término de IHC agrupa un conjunto de técnicas basadas en el uso de anticuerpos específicos marcados para identificar y visualizar microscópicamente elementos tisulares y celulares que se asocian con el hallazgo de moléculas concretas en la muestra examinada.

La gran ventaja que esta técnica ofrece es poder determinar la biomolécula en estudio, directamente sobre el tejido neoplásico, hecho que le confiere precisión a la evaluación de marcadores celulares y tisulares. Sin embargo, esta precisión está respaldada por la implementación de anticuerpos monoclonales (en lugar de los policlonales) y del adecuado manejo del tejido, que optimizan la especificidad y sensibilidad de la IHC.

Otra ventaja que ofrece la técnica es la tinción permanente y estable del tejido a tal punto que puede archivarse por años sin perder la intensidad de la reacción.

Como desventaja se puede mencionar la inespecificidad de la reacción cuando se usan anticuerpos policlonales y el uso de reactivos potencialmente carcinogénicos como la diaminobenzidina, por lo que se deben extremar las medidas de protección (54) (55).

5.3.2 Fundamento de la técnica. La IHC es un grupo de técnicas de inmunolocalización utilizadas para demostrar la presencia de antígenos en células o tejidos, mediante una reacción antígeno-anticuerpo.

El anticuerpo específico (anti-ER, anti-PR, anti-HER-2/neu) se une al antígeno (ER, PR, y HER-2/neu) respectivo para formar un primer complejo de

reconocimiento antígeno-anticuerpo, cuya unión es reforzada por un segundo anticuerpo (*Value* primary *antibody enhancer*) marcado con peroxidasa (trazador de marcaje). Este nuevo complejo es localizado por un polímero (*Value HRP polymer)* que estabiliza la reacción. Para visualizar la reacción final se adiciona el sustrato de la enzima más el cromógeno DAB de tal manera que el producto de esta reacción da origen a un precipitado insoluble y coloreado, en el momento en que la enzima actúa sobre el sustrato y éste a su vez sobre el cromógeno.

El trazador es una enzima que posee la autonomía para cambiar de color a un sustrato incoloro y de no afectar la capacidad del anticuerpo para formar el complejo con el antígeno encontrado en el tejido tumoral correctamente fijado y embebido en parafina. El más utilizado es la peroxidasa.

5.3.3 Procesamiento de la muestra. El proceso en el laboratorio inicia con la recepción de la pieza quirúrgica o biopsia, la cual atraviesa por las siguientes etapas: proceso de fijación, procesamiento de tejidos, corte y extendido del tejido, corrida de la técnica de IHC, montaje e interpretación de resultados.

5.3.3.1 Proceso de fijación. El proceso de fijación empieza en la sala de cirugía, con el depósito de la muestra en un recipiente adecuado que contiene formol tamponado (FBN- *buffered neutral Formalin*) al 10%. El volumen del FBN debe ser entre 15 y 20 veces el valor del volumen de la muestra.

Mediante este proceso se fijan física y químicamente los tejidos con la finalidad de conservar la estructura morfológica celular y detener la actividad de las enzimas y proteínas contenidas en el tejido, de manera tal, que posteriormente puedan resistir el tratamiento que se le da a la muestra con diferentes reactivos sin alterar su estructura.

El fijador ideal debe ser capaz de bloquear inmediatamente la autolisis y debe tener efecto microbicida que impida la putrefacción producida por la acción microbiana, sin que llegue a afectar la integridad de las estructuras en estudio (53) (9).

Para estudios de IHC el fijador ideal es el formol tamponado al 10% pH de 7.2 – 7.4, ver tabla 6.

Tabla 6. Preparación del formol tamponado al 10%

Reactivos	Cantidades
Formaldehido comercial (35-40%)	100 ml
Agua destilada	900 ml
Fosfato de sodio monobásico	4.0 g
Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	6.5 g
pH final	7.2 – 7.4
Volumen total	1000 ml

Fuente: Instructivo suministrado por la casa comercial Roche (Anexo A)

El tiempo de fijación oscila entre 6 y 72 horas teniendo en cuenta que no debe ser inferior a 6 horas por pequeña que sea la muestra ni superior a 72 horas si es grande. Cuando la muestra es grande se debe realizar cortes de 0,5mm y ubicar entre ellos compresas o toallas de papel impregnadas con formol para optimizar el proceso de fijación. La velocidad de penetración del formol en los tejidos es de 1mm/hora por lo que es necesario acatar la indicación anterior.

La fijación es un proceso químico que requiere tiempo y no es directamente proporcional a la velocidad de penetración por lo que es imprescindible que la

muestra permanezca mínimo 6 horas en fijación para que se produzcan las reacciones químicas pertinentes (9) (53).

5.3.3.2 Procesamiento de tejidos, corte y extendido. Posterior a la fijación los tejidos son sometidos a un proceso de preparación para el estudio respectivo. Este proceso incluye cuatro etapas bien definidas (54) (55).

a. Deshidratación. En este paso busca eliminar el agua que contengan las estructuras tanto intra como extracelulares de los tejidos. En este proceso se utiliza el alcohol porque al ser una sustancia miscible con el agua facilita su penetración al tejido.

b. Aclaramiento. La sustancia usada en este paso es el xilol, el cual reemplaza rápidamente los espacios deshidratados que están ocupados con el alcohol preparando así el tejido para la imbibición en parafina. El xilol es una sustancia que disuelve la parafina.

c. Impregnación e inclusión. Es el proceso mediante el cual los espacios intra y extracelulares son infiltrados completamente con parafina cuya temperatura de fusión ideal es inferior a 56ºC. El espécimen debe incluirse de tal manera que quede perfectamente plano para asegurar que se obtenga una sección completa. El proceso de inclusión en parafina le proporciona al tejido homogeneidad y dureza para lograr cortes lo suficientemente delgados sin ocasionar alteración del mismo.

d. Corte y extendido. Con el uso del micrótomo se realizan tantos cortes como marcadores antigénicos se vayan a determinar. Los cortes deben ser de 2 a 3 micras de espesor y se ubican sobre láminas portaobjetos cargadas.

5.3.3.3 Técnica de inmunohistoquímica

a. Desparafinación. Como su nombre lo indica, la finalidad de este paso es retirar la totalidad de la parafina impregnada en el tejido, para ello, se llevan las láminas a horno seco por un tiempo y temperatura determinada.

Después las láminas se llevan a los xiloles para terminar de disolver los residuos de parafina que puedan quedar y luego se pasan por los alcoholes para extraer el xilol que reposa en los espacios intra y extracelulares.

b. Recuperación antigénica. En el proceso de fijación el FBN reacciona con los aminoácidos y polipéptidos para formar puentes de metilo, los cuales a su vez crean una red protectora que impide el acceso de cualquier molécula que pueda reaccionar con los epítopes antigénicos.

Esta situación debe ser corregida mediante un proceso antagonista que rompa los enlaces formados y permita la recuperación del antígeno. Para el cumplimiento de este objetivo la recuperación antigénica se realiza en *steamer*, bajo condiciones de calor y buffer citrato. La preparación del buffer citrato se describe en la tabla 7. Se debe preparar únicamente la cantidad necesaria para el montaje (54) (55).

c. Bloqueo de peróxidasas. En este paso se busca bloquear tanto la actividad enzimática de la peróxidasa endógena (intracelulares causantes del background) como exógena (extracelulares propias de la inflamación), causantes de background. Este bloqueo evita reacciones inespecíficas y falsos positivos. El bloqueo de la peroxidasa endógena se lleva a cabo con el *Hydrogen peroxide block* (Anexo C) y el de la peroxidasa exógena con el *Ultra V-Block* (Anexo D).

Tabla 7. Preparación del buffer citrato

Reactivos	Cantidades
Buffer citrato 10X	100 ml
Agua destilada	900 ml
pH final	6.0
Volumen total	1000 ml

Fuente: Instructivo suministrado por la casa comercial Thermo Scientific (Anexo B)

d. Reacción con anticuerpos primarios. En este paso ocurre la reacción específica antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos pueden estar listos para usar o ser diluidos de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial (Anexos E, F, G, H), éstos se adicionan al tejido y se dejan reaccionar durante el tiempo que indique el protocolo suministrado.

La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo se basa en la complementariedad espacial absoluta entre ellas y la sensibilidad del anticuerpo está relacionada con la facilidad que éste tiene para unirse a su antígeno específico (54) (55).

e. Adición del anticuerpo enganchador y del polímero. En este paso se lleva a cabo la inmunolocalización del complejo antígeno anticuerpo por parte del *enhancer y HRP polymer.* El polímero aumenta la sensibilidad y simplicidad de la determinación. (Anexo I)

f. Revelado. El proceso de revelado ocurre mediante la adición de la DAB previamente diluida de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La DAB es un cromógeno ampliamente usado en coloraciones de IHC, la cual en presencia de la peroxidasa produce un precipitado de color marrón insoluble en alcohol y puede ser observado en microscopio de luz (Anexo J).

g. Coloración de contraste. Esta coloración es necesaria para visualizar adecuadamente los marcadores en estudio. Se puede utilizar hematoxilina o verde brillante.

5.3.4 Protocolo de la técnica.

5.3.4.1 Desparafinación del tejido

a. Métodos de desparafinación

i Método largo: las láminas ubicadas en una canastilla metálica son llevadas al horno a 37°C durante 24 horas; si pasado este tiempo las muestras no se han desparafinado completamente, se sube la temperatura del horno hasta 60°C y se dejan allí durante 15-30 minutos, luego se sube la temperatura a 80ºC y se dejan las láminas por 15-20 minutos más, para lograr el proceso de desparafinación en calor.

ii Método corto: los cortes son llevados al horno durante 30 minutos a 60°C, luego se incrementa la temperatura a 80°C para dejar la muestra durante 15-20 minutos más.

b. Pases por xilol: pasar las muestras por los 3 xiloles durante 3 minutos cada uno, con el fin de retirar los residuos de parafina que puedan quedar del proceso anterior.

c. Pases por alcohol: pasar las láminas por cada uno de los tres alcoholes (Etanol 95°) durante 10 segundos para retirar los residuos de xilol.

Finalizado el proceso las láminas se lavan con agua corriente.

5.3.4.2 Recuperación antigénica. Se realiza en *steamer*.

a. Precalentar el steamer durante 30 minutos.

b. Servir el buffer citrato en el coplin indicado para alta temperatura, ubicar las láminas desparafinadas en la respectiva canastilla e introducirlas en el buffer citrato. El buffer citrato no se debe precalentar ni reutilizar.

c. Llevar el coplin al steamer durante 20 minutos.

d. Dejar enfriar las láminas a temperatura ambiente.

e. Descartar el Buffer citrato una vez esté atemperado y en su lugar se sirve buffer de lavado, donde se lavan las láminas. Ver preparación de PBS en tabla 8.

Otro instrumento usado en la recuperación antigénica es el horno microondas. Se ubica el horno en la opción de alta potencia, *power high*, se introducen las muestras ubicada en el buffer citrato durante cuatro minutos, luego se destapa el coplin para dejar salir el vapor y en la opción *power*-30 se deja la muestra durante 15 minutos más. Dejar atemperar y continuar con el lavado.

Tabla 8. Preparación del buffer de lavado PBS

Reactivos	Cantidades
PBS (*phosphate buffered saline*) concentrado	40 ml
Agua destilada	960 ml
pH final	7.5 – 8.0
Volumen total	1000 ml

Fuente: Instructivo suministrado por la casa comercial Thermo Scientific (Anexo K)

5.3.4.3 Bloqueo de la peroxidasa endógena (R1). *Hydrogen peroxide block.*

a. Sacar las láminas del buffer de lavado y retirar el exceso de buffer.

b. Agregar 3 gotas (150 ul) de *Hydrogen peroxide block* sobre cada muestra. Verificar que el reactivo cubra la totalidad de la muestra.

c. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 15 minutos.

d. Realizar dos lavados con *PBS* por 5 minutos cada uno.

5.3.4.4 Bloqueo de la peroxidasa exógena (R2). *Ultra V-Block.*

a. Sacar las láminas del buffer de lavado y retirar el exceso de buffer.

b. Agregar 3 gotas de (150 ul) de *Ultra V-Block* sobre cada muestra. Verificar que el reactivo cubra la totalidad de la muestra.

c. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 5 minutos.

d. Realizar dos lavados con *PBS* por 5 minutos cada uno.

5.3.4.5 Adición del anticuerpo específico (R3 diluciones). *(Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2/neu)*

a. Sacar las láminas del buffer de lavado y retirar el exceso de buffer.

b. Agregar 3 gotas de (150ul) del anticuerpo específico correspondiente sobre cada muestra. Verificar que el reactivo cubra la totalidad de la muestra.

c. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos (tiempo indicado en el inserto del kit).

d. Realizar dos lavados con *PBS* por 5 minutos cada uno.

5.3.4.6 Adición del anticuerpo enganchador (R4). *Antibody enhancer.*

a. Sacar las láminas del buffer de lavado y retirar el exceso de buffer.

b. Agregar 3 gotas de (150 ul) del *Antibody enhancer* sobre cada muestra. Verificar que el reactivo cubra la totalidad de la muestra.

c. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 20 minutos.

d. Realizar dos lavados con *PBS* por 5 minutos cada uno.

5.3.4.7 Adición del polímero (R5). *HRP polymer.*

a. Sacar las láminas del buffer de lavado y retirar el exceso de buffer.

b. Agregar 3 gotas de (150 ul) del *HRP polymer* sobre cada muestra. Verificar que el reactivo cubra la totalidad de la muestra.

c. Incubar las muestras en cámara húmeda, cubierta con tapa oscura, a temperatura ambiente durante 30 minutos.

d. Realizar dos lavados con *PBS* por 5 minutos cada uno.

5.3.4.8 Revelado. *Diaminobenzidina - DAB.*

a. Sacar las láminas del buffer de lavado y retirar el exceso de buffer.

b. Agregar 3 gotas de (150 ul) de *DAB* sobre cada muestra. Verificar que el reactivo cubra la totalidad de la muestra. Ver preparación en tabla 9.

c. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 4-15 minutos.

d. Lavar con agua destilada.

Tabla 9. Preparación de la Diaminobenzidina (DAB)

Reactivos	Cantidades
DAB sustrato	2 ml
DAB cromógeno	1 gota
Volumen total	2 ml

Fuente: Instructivo suministrado por la casa comercial *Thermo Scientific* (Anexo J)

5.3.4.9 Coloración de contraste. Se puede utilizar Hematoxilina o verde brillante.

a. Coloración hematoxilina (para ER, PR y HER-2/neu)

i Las láminas ubicadas en canastilla metálica se sumergen en hematoxilina durante 10-30 segundos.

ii Lavar con abundante agua corriente.

iii Pasar las muestras por agua amoniacal. Ver preparación en tabla 10.

iv Lavar con abundante agua corriente.

v Se deshidratan las muestras realizando pases por 3 alcoholes (etanol 95°).

vi Pasar las láminas por xilol para aclararlas. Este paso es opcional. Si no se usa xilol se llevan las láminas al horno para secarlas.

vii Realizar el montaje de las láminas con citorresina y leer.

Tabla 10. Preparación del agua amoniacal

Reactivos	Cantidades
Amoniaco	1 ml
Agua destilada	400 ml
Volumen total	401 ml

Fuente: Manual de técnicas en histología y anatomía patológica (55)

b. Coloración con verde brillante (ER/PR)

i Agregar a cada muestra 3 gotas de verde brillante por 2 minutos.

ii Lavar con abundante agua corriente.

iii Deshidratar las muestras, pasándolas por 3 alcoholes (etanol 95°).

iv Pasar las láminas por xilol para aclararlas. Este paso es opcional. Si no se usa xilol se llevan las láminas al horno para secarlas.

v Realizar el montaje de las láminas con citorresina y leer.

5.3.5 Interpretación de resultados. Como en toda prueba de laboratorio esta técnica requiere de controles de calidad internos y externos tanto positivos como negativos con el fin de evaluar la calidad de la técnica empleada y el montaje realizado.

Para la evaluación de calidad de la técnica en receptores hormonales se utiliza como control interno positivo, la inmunotinción de los elementos epiteliales normales presentes en la muestra analizada y en caso de no existir inmunotinción en los elementos epiteliales normales de la glándula mamaria se interpretarán como negativo y en la evaluación del control externo para los receptores hormonales se puede utilizar tejido endometrial o muestras de inmunorreactividad conocida.

Cuando se cuenta con tejido mamario normal de la paciente, en la preparación del tejido se debe incluir un fragmento de éste para garantizar existencia del control interno.

En el caso del HER-2/neu, el control de calidad interno se evalúa mediante la ausencia de inmunotinción en los elementos del tejido mamario normal (53) y como control externo se puede utilizar tejidos de inmunorreactividad conocida..

El propósito del estudio de los receptores hormonales es ayudar a determinar la posible respuesta en pacientes con terapia endocrina, la cual se ha encontrado ser beneficiosa para los pacientes a partir del 1% de positividad (56).

Para la valoración de los receptores hormonales (ER/PR) se busca el campo con mayor número de células reactivas y con base en el porcentaje de células malignas, se cuenta 500 células tumorales en campo seco de alto poder (40X). De ellas se establece el porcentaje de las que presentan inmunorreactividad.

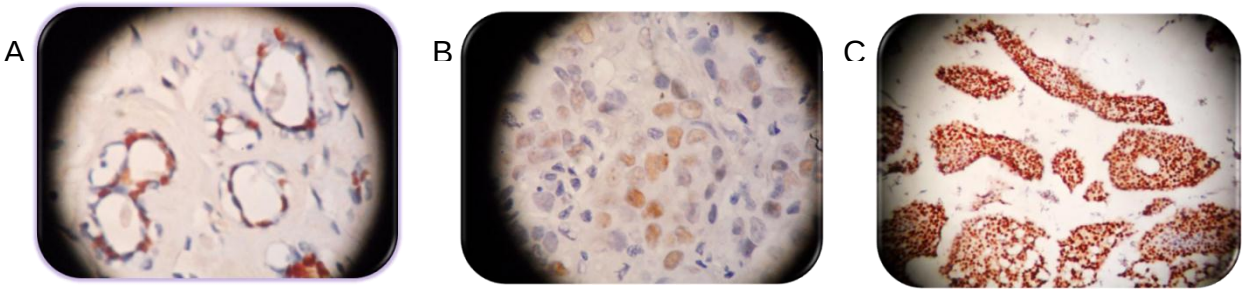
La intensidad de la tinción se puede clasificar como débil, intermedia o fuerte y para la interpretación se tiene en cuenta los criterios referidos en la tabla 11 (53). Gráfico 9 y 10.

Tabla 11. Escala de lectura e interpretación de la expresión de los receptores hormonales ER/PR determinados por inmunohistoquímica

Resultado		Interpretación
Negativo	<1%	Núcleos inmunorreactivos en células tumorales y control interno positivo
Positivo	≥1%	Núcleos inmunorreactivos en células tumorales
No interpretable		No se observan núcleos inmunorreactivos en células tumorales y control interno negativo

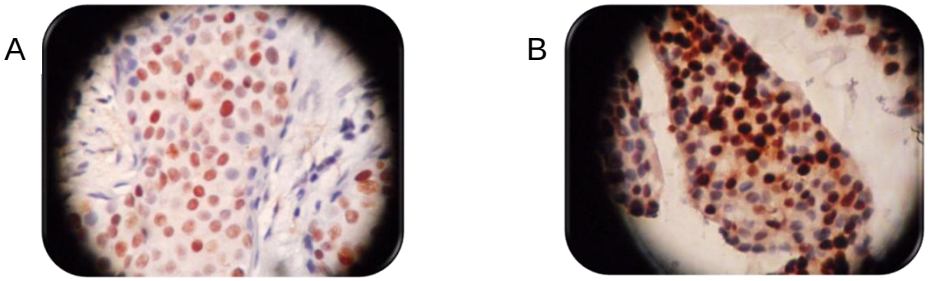
Fuente: *ASCO/CAP Recomendation for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer* (53)

Gráfico 9. Receptores de estrógenos



A. Control interno positivo. **B**. Receptores de estrógenos débiles. **C**. Receptores de estrógenos fuertes.

Gráfico 10. Receptores de progesterona



A. Receptores de progesterona débiles y moderados. **B**. Receptores de progesterona fuertes.

Para la valoración de la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu por IHC se tienen en cuenta los criterios relacionados en la tabla 12, los resultados son evaluados mediante una escala semicuantitativa que va desde cero hasta tres cruces e involucra la inmunorreactividad circunferencial de la membrana celular, la intensidad de la inmunorreacción y el porcentaje de la población neoplásica que la presenta. Gráfico 11.

En caso de obtener grado 2+ (equívoco) la muestra se debe evaluar mediante la técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) con el fin de confirmar o descartar la amplificación del gen c-erbB-2.

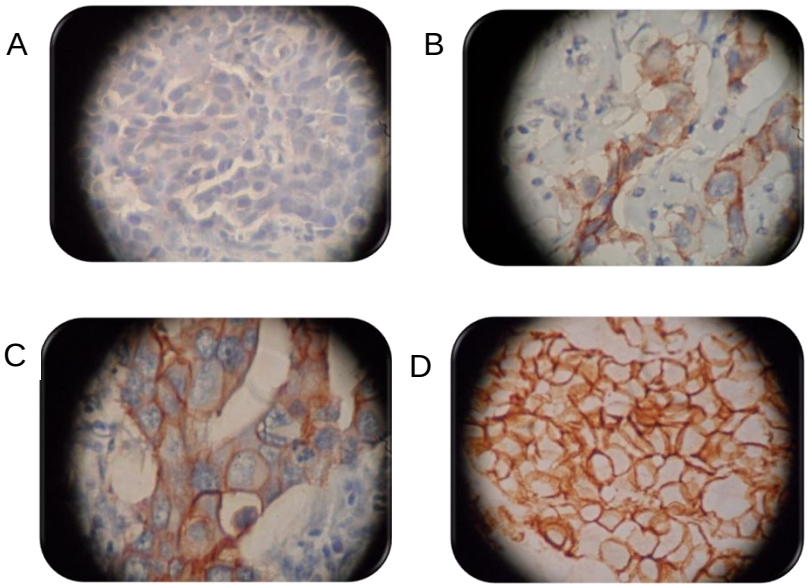
La interpretación de los resultados debe ser analizada a la luz de los demás hallazgos clínicos-patológicos que presenta la paciente.

Tabla 12. Escala de lectura e interpretación de la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu determinada por inmunohistoquímica

Resultado		Interpretación
Negativo	0	Membrana celular no coloreada
	1+	Coloración incompleta de membrana celular en cualquier proporción de células tumorales
Equívoco	2+	Membrana con coloración completa no uniforme o débil en intensidad con distribución circunferencial en al menos 10% de células tumorales
Positivo	3+	Membrana con coloración intensa y uniforme en mayor 30% de células tumorales invasivas

Fuente: *ASCO/CAP Recomendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer* (9); *ASCO/CAP Recomendation for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer* (53)

Gráfico 11. Sobreexpresión de la proteína HER-2/neu



A. HER-2/neu negativo Grado 0. **B**. HER-2/neu negativo Grado 1+. **C.** HER-2/neu equivoco Grado 2+. **D.** HER-2/neu positivo Grado 3+.

5.3.6 Variables del análisis.

5.3.6.1 Variables preanalíticas

a. Manipulación del tejido en la sala de cirugía. El tiempo de isquemia cliente y frío debe ser inferior a una hora. El tiempo de isquemia caliente se define como el tiempo ocurrido desde la interrupción del flujo sanguíneo al tumor y la escisión del tejido y el tiempo de isquemia frio corresponde al tiempo ocurrido desde la escisión hasta el inicio de la fijación.

Si el tiempo de isquemia es prolongado ocurre una pérdida progresiva de la actividad molecular dando lugar a acidosis, isquemia tisular y degradación enzimática, hecho que afecta irreversiblemente las moléculas en estudio (9) (53).

b. Manejo de la muestra en el laboratorio. La muestra debe ser orientada, las márgenes marcadas con tinta y el tejido se debe seccionar si es necesario, en láminas de 0.5 mm de espesor.

En el cassette se ubica tejido tumoral y tejido normal de mama para ser procesado en las mismas condiciones y así garantizar la positividad del control interno (9) (53).

c. Tipo de fijador. Se debe usar sólo formol tamponado al 10% (9) (53).

d. Tiempo de fijación. El tiempo estimado para la fijación adecuada es de 6 a 72 horas. La velocidad de penetración del formol es de 1mm/h por lo que las muestras, si son grandes, se deben seccionar; la fijación es un proceso

químico que no es directamente proporcional a la velocidad de penetración y requiere un tiempo mínimo de 6 horas para su desarrollo.

Tiempos de fijación inferiores a 6 horas o superiores a 72 horas pueden generar falsos negativos. El proceso de recuperación antigénica usualmente está optimizada para 24 horas de fijación (9) (53).

5.3.6.2 Variables analíticas

a. Selección de anticuerpos. En el consenso realizado en el año 2010 por la *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP)* recomendó los clones 1D5, 6F11, SP1 y 1D5+ER.2.123 para la determinación de los ER y los clones 1A6, 1294 y 312 para la determinación de los PR.

Para la evaluación de la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, la *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP)* en las recomendaciones establecidas en el 2007 refiere el uso de los clones A085 y CB11en pruebas inmunohistoquímica.

b. Control interno. Son utilizados para monitorear el desarrollo de la prueba, el exceso del tiempo de fijación, detectar pérdida de sensibilidad y monitorear las variables dependientes del análisis.

El control interno debe mostrar un patrón de coloración heterogénea en las células luminales con una intensidad que puede ser débil, moderada e intensa.

Si no existe elementos de control interno para evaluar la muestra analizada, el médico patólogo puede emitir un juicio teniendo en cuenta el nivel de positividad

de los ER/PR en células tumorales, el tipo histológico del tumor, el estado de fijación del tumor y el estado de los controles externos (53).

c. Control externo. Comercialmente existen diferentes niveles de positividad alto, intermedio y negativo, también se puede utilizar tejido endometrial con inmunorreactividad conocida (53).

5.3.6.3 Variables post analíticas

a. Interpretación de la prueba. Se debe basar en los criterios relacionados en la tabla 11 y 12.

El porcentaje de positividad de núcleos en células tumorales se determina por score de Allred (56) (57). El porcentaje se puede establecer por estimación o por cuantificación mediante análisis de imágenes y de la intensidad se informa el promedio referida como débil, moderada o fuerte.

b. Informe. El informe entregado al paciente debe estar conformado por los datos del paciente, los datos de la muestra, los datos del tiempo de fijación y el resultado de la evaluación de los biomarcadores.

6. METODOLOGÍA Y DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 POBLACIÓN

El universo de este proyecto está conformado por mujeres con diagnóstico de carcinoma infiltrante de la glándula mamaria cuyos bloques de parafina se revisaron y procesaron en el Laboratorio de Inmunohistoquímica del Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander, durante el periodo comprendido desde el 1 de julio de 2009 hasta el 20 de marzo del 2011.

6.2 VARIABLES DEL ESTUDIO

En este estudio se manejaron 4 variables de naturaleza nominal, 3 de ellos (ER, PR, Her-2/neu) fueron analizadas por IHC, utilizando anticuerpos monoclonales de conejo (Neo markers) SP1 para ER, SP2 para PR y SP3 para Her-2/neu.

La interpretación de resultado de las variables ER, PR y sobreexpresión de la proteína HER-2/neu se realizó a la luz de los criterios relacionados en las tablas 11 y 12, siendo su valor de salida “negativo o positivo” para este estudio. Las muestra cuyo resultado de la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu fue equivoco, fueron procesadas nuevamente mediante la técnica de *fluorescence in situ hybridization* para esclarecer el su resultado y obtener el valor de salida indicado.

La cuarta variable, grado de diferenciación tumoral, fue valorada en tejido coloreado con H/E, donde se evaluaron los criterios indicados en la tabla 5. Su valor de salida es el concepto de bien, moderado o mal diferenciado.

6.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Este es un estudio de corte transversal realizado en pacientes con carcinoma mamario infiltrante, donde el tamaño de la muestra fue calculado en el subprograma STATCALC de Epiinfo 6.04d con los siguientes criterios: nivel de confianza del 90%, prevalencia esperada del fenotipo triple negativo del 30%, los intervalos de confianza se encuentran entre 20% y 40% generando como resultado un n de 57.

Este estudio fue diseñado para realizarse en tres fases, reclutamiento de la población, procesamiento de muestras y análisis de datos durante 18 meses.

6.3.1 Reclutamiento de la población. Las mujeres que formaron el universo del estudio fueron incorporadas mediante dos vías: la primera a través del proceso de diagnóstico en la Unidad Oncológica del HUS y la segunda vía derivó de otras IPS de la ciudad que se unieron al proyecto en esta primera fase.
En el Laboratorio de Patología de la UIS se recibieron las muestras de los casos en estudio, las cuales consisten en biopsias de tejido mamario embebidas en parafina con diagnóstico previo de carcinoma mamario infiltrante.

Las pacientes fueron informadas acerca de la invesstigación en curso y a aquellas que decidieron hacer parte del estudio se les diligenció la encuesta diseñada para recolectar la información (Anexo L) y el consentimiento informado (Anexo M).

6.3.2 Procesamiento de la muestra. Una vez obtenidos los reactivos para el estudio, se procedió a la estandarización de la técnica, para la cual se contó con la orientación de la casa comercial y con la experiencia del personal del Laboratorio de Patología del Hospital La Samarita (Bogotá D.C.) quienes han trabajado ampliamente estos reactivos.

La estandarización de la técnica se describe en el ítem 7.3.4, protocolo de la técnica.

La lectura e interpretación de los resultados estuvo a cargo de médicos patólogos adscritos al Departamento de Patología de la UIS.

6.3.3 Análisis de datos. Con los datos obtenidos se realizó un estudio descriptivo y un análisis comparativo con la literatura existente.

7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

En el cuadro 1 Se pueden observar todos los resultados

Cuadro 1. Características generales de la población

		Total		Fenotipo									
				TNP		HER2+		Luminal/ HER2+		Luminal A		ER-/PR+/HER2-	
Cantidad	**Total de pacientes**	**62**	**100,0%**	**20**	**32,3%**	**10**	**16,1%**	**1**	**1,6%**	**28**	**45,2%**	**3**	**4,8%**
Edad	Promedio general	55		54		54		57		57		51	
	Edad mínima	29		37		29				31		41	
	Edad máxima	81		76		73				81		58	
Variedad	CDI	55	88,7%	17	30,9%	9	16,4%	1	1,8%	25	45,5%	3	5,5%
Histológica	CLI	5	8,1%	2	40,0%	1	20,0%	0	0,0%	2	40,0%	0	0,0%
	Mucinoso	1	1,6%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%
	Metaplásico	1	1,6%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Total	**62**	**100,0%**	**20**	**32,3%**	**10**	**16,1%**	**1**	**1,6%**	**28**	**45,2%**	**3**	**4,8%**
Grado de	Grado I	9	16,4%	2	22,2%	1	11,1%	0	0,0%	6	66,7%	0	0,0%
diferenciación	Grado II	35	63,6%	11	31,4%	4	11,4%	1	2,9%	16	45,7%	3	8,6%
tumoral	Grado III	11	20,0%	4	36,4%	4	36,4%	0	0,0%	3	27,3%	0	0,0%
	Total	**55**	**100,0%**	**17**	**30,9%**	**9**	**16,4%**	**1**	**1,8%**	**25**	**45,5%**	**3**	**5,5%**

La población de estudio está conformada por 62 mujeres cuyas edades oscilan entre 29 y 81 años con promedio de 55 años.

La caracterización inmunofenotípica de la población de acuerdo con los fenotipos preestablecidos es de 32,3% para fenotipo triple negativo; 17,7% fenotipo HER2+; 1,6% fenotipo luminal/HER2+, 45,2% fenotipo luminal A y 4,8% el fenotipo ER negativo, PR positivo HER-/neu negativo (ER- PR+ HER2-). Gráfico 12.

El promedio de edad encontrado en las pacientes clasificadas por fenotipo es 54 años con rango de 37 a 76 años para fenotipo triple negativo; 54 años con rango de 29 a 73 para el fenotipo HER2+; 57 años para el fenotipo luminal/HER2+; 57 años con rango de 31 a 81 para el fenotipo luminal A y 51 años con rango de 41 a 58 años para el fenotipo (ER- PR+ HER2-). Gráfico 13.

La variedad histológica más frecuente en la población es el carcinoma ductal infiltrante (88,7%) seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante (8,1%), carcinoma mucinoso (1,6%) y carcinoma metaplásico (1,6%). Gráfico 14.

Gráfico 12. Frecuencia de inmunofenotipos

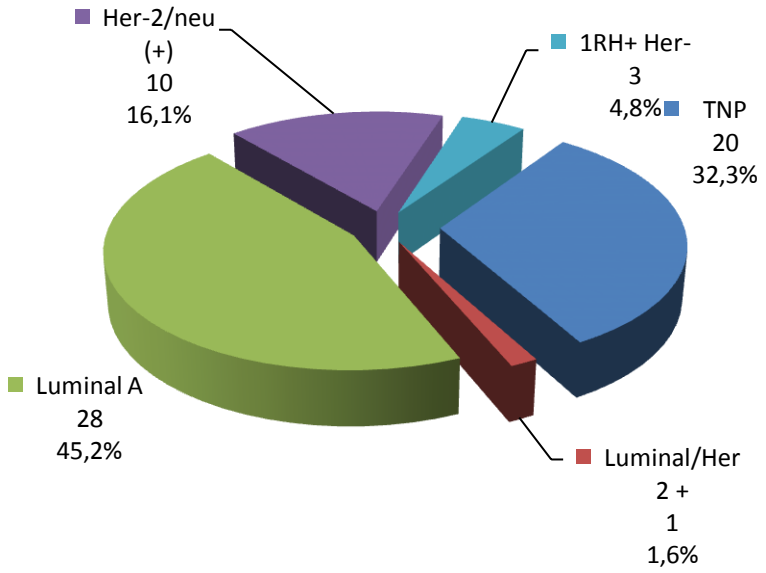


Gráfico 13. Inmunofenotipos vs Edad promedio

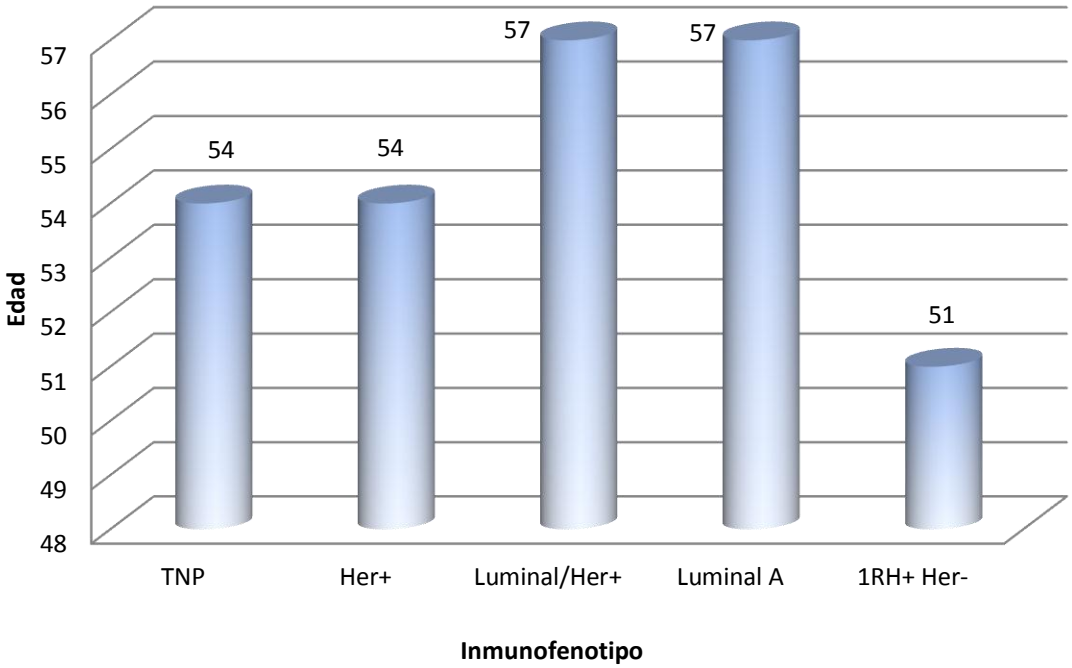
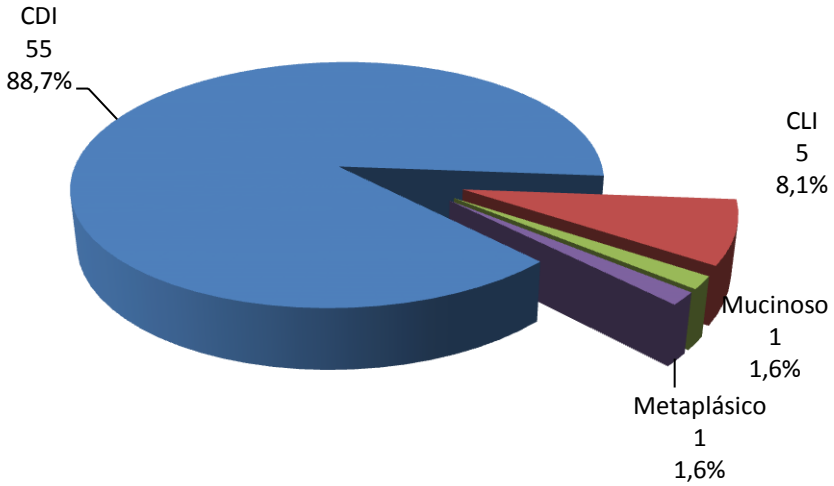


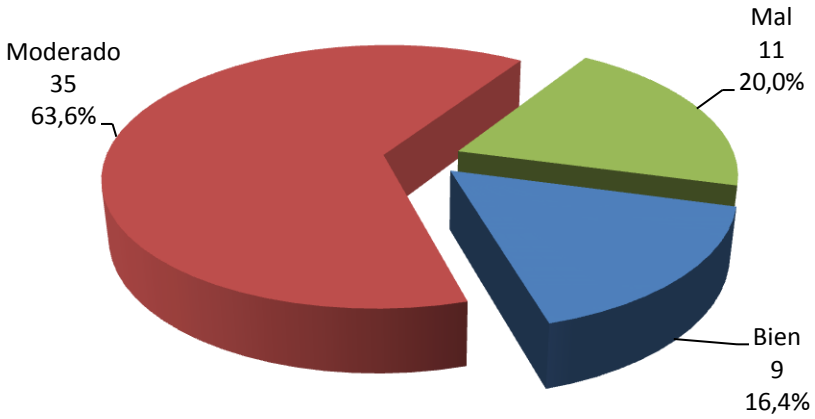
Gráfico 14. Variedad histológica



De las 55 pacientes con carcinoma ductal infiltrante se tiene que el 30,9% son fenotipo triple negativo; 16,4% son fenotipo HER2+; 1,8% es fenotipo luminal/HER2+; 45,4% son fenotipo luminal A y 5,4% son fenotipo ER- PR+ HER2- . De los 5 carcinomas lobulillares infiltrantes el 40% son fenotipo triple negativo; el 20% fenotipo HER2+ y el 40% fenotipo luminal A. El carcinoma mucinoso expresó el fenotipo luminal A y el carcinoma metaplásico el fenotipo triple negativo.

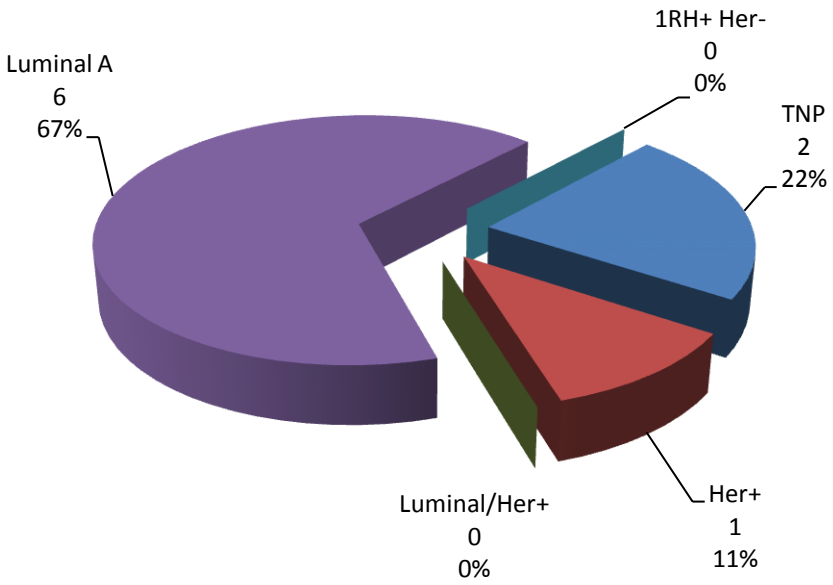
De las 55 pacientes con carcinoma ductal infiltrante se obtuvo que el 16,4% están bien diferenciados; el 63,6% moderadamente diferenciados y el 20% mal diferenciados. Gráfico 15.

Gráfico 15. Frecuencia del grado de diferenciación tumoral



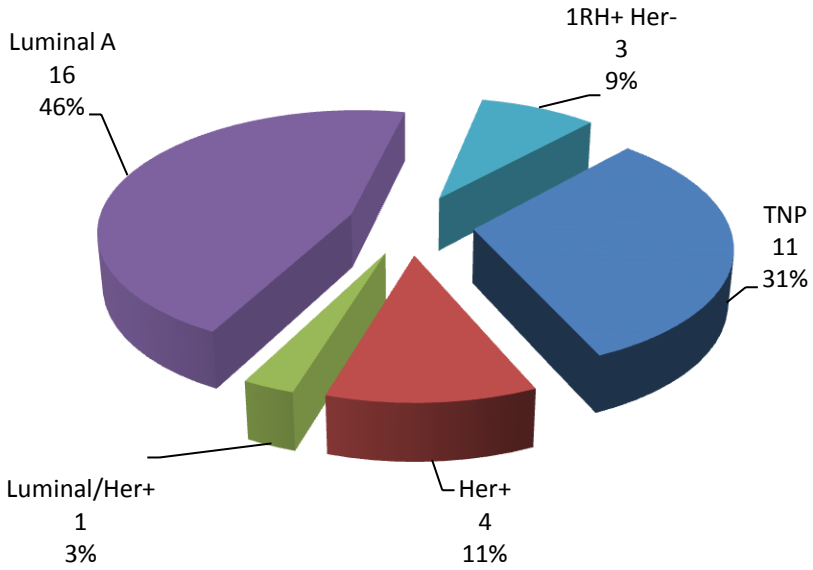
De las nueve pacientes con grado de diferenciación tumoral 1 se tiene que el 22,2% son fenotipo triple negativo; 11,1% es fenotipo HER2+ y el 66,7% son fenotipo luminal A. Gráfico 16.

Gráfico 16. Grado de diferenciación tumoral 1 vs Fenotipos



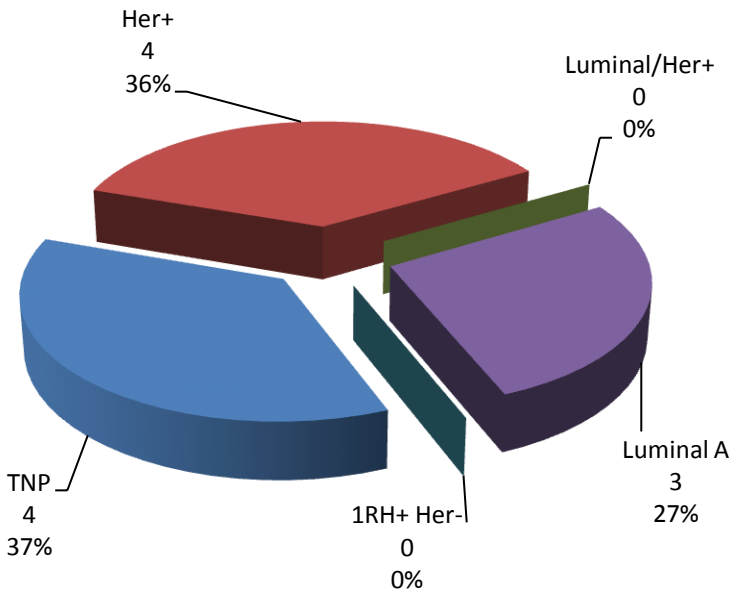
De las 35 pacientes que presentaron grado de diferenciación tumoral 2, el 31,4% es fenotipo triple negativo; 11,4% es fenotipo HER2+; 2,8% es fenotipo luminal/HER2+; el 45,7% es fenotipo luminal A y el 8,6% es fenotipo ER- PR+ HER2-. Gráfico 17.

Gráfico 17. Grado de diferenciación tumoral 2 vs Fenotipos



De las 11 pacientes que presentaron grado de diferenciación tumoral 3 se tiene que el 36,4% es fenotipo triple negativo; el 36,4% es fenotipo HER2+ y el 27,2% es fenotipo luminal A. Gráfico 18.

Gráfico 18. Grado de diferenciación tumoral 3 vs Fenotipos



7.2 DISCUSIÓN

La edad promedio (55 años) registrada en la población de estudio se relaciona con los hallazgos obtenidos en el estudio registrado por Jaramillo y colaboradores en Cali-Colombia (17) cuya edad promedio fue de 55,3 años y con el Registro Poblacional de Cáncer del año 2007 realizado en la población del Área Metropolitana de Bucaramanga-Colombia (18). La edad promedio de la población evaluada se encuentra por debajo de la registrada (64 años) en la literatura de referencia (26) y por encima de la edad promedio (49.9 años) de un estudio realizado en el Reino Unido por Rakha y colaboradores (15). Cuadro 2.

Cuadro 2. Edad

Autor:	Anteliz et al						Robbins (26)	Jaramillo (17)	Rakha (15)	Registro Poblacional del cancer (18)
	Total	TNP	Her+	Luminal/ Her+	Luminal A	1RH+ Her-	General		TNP	General
Promedio general	55	54	54	57	57	51	64	55.3	49.9	52
Edad mínima	29	37	29		31	41		32	25	
Edad máxima	81	76	73		81	58		76	70	
Año Lugar País	2011 UIS Colombia							2002/ Colombia (Cali)	2007/ Reino Unido (Nottingha	2007/ Colombia (B/ga)
Población n	CI / CDI 62							32	1726	848

El fenotipo de mayor frecuencia es el luminal A con una presentación de 45,2% seguido por el fenotipo triple negativo con 32,3%, el fenotipo HER2+ con 16,1%, el fenotipo ER- PR+ HER2- con un 4,8% y el fenotipo luminal/HER con 1,6%. Cuadro 3.

Cuadro 3. Fenotipos vs Población

Autor:		Anteliz et al		Barghava / Dabbs (58)		TNP (14)	Gerson R. (49)		Díaz J. (65)
TNP	ER- PR- Her-	20 / 62	32,3%	32 / 205	15,6%	12-17%	17 / 110	15,5%	28,6%
Her2+	ER- PR- Her+	10 / 62	16,1%	8 / 205	3,9%		11 / 110	10,0%	
Luminal/Her2+	ER+ PR+ Her+	1 / 62	1,6%	10 / 205	4,9%		14 / 110	12,7%	
Luminal A	ER+ PR+ Her-	28 / 62	45,2%	113 / 205	55,1%		52 / 110	47,3%	
1RH+ Her-	ER- PR+ Her-	3 / 62	4,8%				16 / 110	14,5%	
Luminal B	RH+$^{d-m}$ Her-			34 / 205	16,6%				
Luminal B híbrido	RH+$^{d-m}$ Her+			8 / 205	3,9%				
	Her+		**17,7%**		**12,7%**			**22,7%**	
Año		2011		2010			2008		2008
País		Colombia		USA			México		Colombia
n/Población		62		205		Revisión	110		49

El hallazgo obtenido para el fenotipo triple negativo (32,3%) dobla en cantidad los datos registrados en los estudios de Bhargava y colaboradores (58) quienes registran un 15,6%, con el estudio de Gerson y colaboradores (49) quienes registran un 15,4% y con una revisión del fenotipo triple negativo (14) que determina la presencia del TNP entre el 12 y el 17%.

Dentro de las posibles causas que generan tal diferencia están: que el fenotipo triple negativo obedezca a una característica propia de esta población; que la preservación del tejido haya sido subóptima. De las pacientes con fenotipo triple negativo se tiene que en 3/20 muestras el control interno fue negativo, en 5/20 fue positivo y en 12/20 no se pudo evaluar el control interno por ausencia del tejido epitelial no tumoral en la muestra. En todos los casos el control externo fue positivo tanto para los receptores hormonales (ER/PR) como para el HER-2/neu. Basados en estos hallazgos no es posible descartar la probabilidad de la existencia de deficiencias en el proceso de fijación tisular.

Este hallazgo también podría estar afectado por la sensibilidad y la especificidad de los clones usados. Los clones recomendados por la ASCO/CAP en el consenso del 2010 (53) para la determinación del ER son el 6F11, 1D5, ER.2.123+1D5 y SP1, siendo este último el usado en este estudio. Para la determinación de los receptores de progesterona recomendaron los clones 1294, 1A6 y 312, pero no el SP2 que fue el utilizado en este estudio, sin embargo existen estudios como los Zhida et al (59) y Cano G. et al (60) que demuestran la alta especificidad y sensibilidad del clone SP2 comparable en su totalidad con el clone 1A6 recomendado por la ASCO/CAP. Cuadro 4.

Cuadro 4. Evaluación de los clones para receptores de estrógenos y progesterona

Autor	**Recomendados por la ASCO/CAP**	**Anteliz et al**	**Zhida Huang et al. (59)**		**Cano G. et al (60)**	
Biomarcador	Clone	Clone	Clone	Hallazgo	Clone	Hallazgo
ER	SP1 / 6F11 / 1D5 ER.2.123+1D5 (41)	RmAb SP1				
PR	1294 / 1A6 / 312 (41)	RmAb SP2	1A6 vs SP2	Ventajas del SP2 * Buena reactividad * Predominancia de la inmunotinción nuclear * La afinidad del Ac SP2 es 12 veces más alta que la del 1A6	mAb 1A6 vs RmAb SP2	Ventajas del SP2 * Alta sensibilidad y especificidad de reacción * Fuerte inmunocoloración * Tiempos de procedimiento más cortos Los resultados completamente similares
Año/País			2006		2003/ Portugal	
n / Población			107	Carcinoma mamario infiltrante	40	Carcinoma mamario infiltrante

Para la determinación del HER-2/neu la FDA ha aprobado dos clones el A085 (anticuerpo policlonal – Hercep test – Dako) y el clone CB11 (anticuerpo monoclonal). En este estudio se utilizó el clone SP3 que ha demostrado en diferentes estudios alta concordancia con el FISH, 94.6% (61), 93.8% (62), 94.1% (63); alta especificidad 97% (61) y alta sensibilidad (64). Todos estos estudios demuestran la alta sensibilidad y especificidad de los clones usados en la evaluación de los biomarcadores, ER, PR y HER-2/neu. Cuadro 5.

Otra posible causa puede obedecer a las variables técnicas del procedimiento, sin embargo para monitorear el buen ejercicio de cada montaje se corrieron controles externos de inmunoreactividad conocida y se evaluó el tejido mamario no tumoral como control interno en los casos que fue posible.

A pesar de lo anteriormente expuesto, existe un estudio realizado por Diaz y colaboradores (65) en el Hospital Universitario de Santander donde se evidencia que el fenotipo triple negativo es de 28,57%. De descartarse un manejo subóptimo

en la fijación del tejido tisular, la cercanía de estos datos a los nuestros (32,3%) sugiere que en esta zona, la presencia del fenotipo triple negativo es más alta que lo registrado en la literatura relacionada con anterioridad en el cuadro 3.

El hallazgo del fenotipo HER2+ en la población de estudio es del 16,1%, dato inferior comparado con los hallazgos registrados por Perou y colaboradores (21) 20-30%, Owens y colaboradores (46) 20% y Gerson y colaboradores (49) 22,7%, pero superior al registrado por Bhargava y colaboradores (58) 13%. Cuadro 6.

Cuadro 5. Evaluación de los clones para HER-2/neu

Autor	**Recomendados por la ASCO/CAP**	**Anteliz et al**	**Wludarski - Bacchi (61)**		**Nassar Aziza (62)**		**Nunes C.B. (64)**		**Hanley (63)**	
Biomarcador	Clone	Clone	Clone	Hallazgo	Clone	Hallazgo	Clone	Hallazgo	Clone	Hallazgo
HER2	A085 polyclonal ab Hercep test - Dako CB11 monoclonal ab (9)	RmAb SP3	SP3 vs. Hercep test SP3 vs. FISH	Concordancia entre SP3 : FISH 94.6% Hercep test : FISH 95.1% Hercep test es más sensible (100% vs. 89%) SP3 es más específico (97% vs. 89%) Ventaja del SP3/Hercep test: alto poder discriinatorio (72.1% vs. 34.1)	SP3 vs. Hercep test SP3 vs. FISH	Concordancia entre SP3 : FISH 93.8% Hercep test : FISH 46.9%	Comparo RmAb SP3 A0485 - Dako Hercep test - Dako NCL-CB11 (novocastra) CM-CB11 (Cell marque) Mouse mAb 4D5 (Genentech)	SP3 es más sensible que los anticuerpo monoclonales de ratón para determinar HER2 CB11 y 4D5 fueron más específicos que el SP3	RMab SP3 vs. FISH Hercep test - HER FDA	Concondarcia entre Rmab SP3: FISH 94.1% HER FDA:FISH 35.3%
Año/País			2008/ Brazil		2009		2008/ Brazil		2009/ USA	
n / Población			179		52		84		52	

El fenotipo luminal/HER+ se manifestó en la población estudiada en 1.6% (1/62) mientras que en otros fue del 5% (58) y del 12.7% (49) diferencia que puede ser atribuida al tamaño de la muestra.

Cuadro 6. Fenotipo HER2 positivo

Autor:	**Anteliz et al**	**Bhargava/Dabbs (58)**	**Perou et al. (21)**	**Owens et al. (46)**	**Gerson et al. (49)**
HER2+	17.7%	13,0%	20-30%	20%	22,70%
Año	2011	2010	2000	2004	2000-06
País	Colombia (B/ga)	USA	USA	USA	México
n/Población	62	205	42	116.736	110

El fenotipo luminal A es el más frecuente tanto en los estudios de Bhargava (58) y Gerson et al (49) como en el nuestro, aunque nuestro hallazgo (45,2%) es inferior al de Gerson (47,3%) y al de Bhargava (55%). Cuadro 3.

El último fenotipo (definido como ER- PR+ y HER2-) tuvo en nuestro estudio una presentación del 4,8%, dato inferior al compararlo con el 14,5% referido en el estudio de Gerson (49). Cuadro 3.

Los resultados mostraron que la variedad histológica más frecuente en la población estudiada es el carcinoma ductal infiltrante (88,7%) seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante (8,1%), el carcinoma mucinoso (1,6%) y el carcinoma metaplásico (1,6%). Cuadro 1.

La literatura de referencia (26) registra que el 70-80% de los carcinomas mamarios son ductales infiltrantes, el 5-10% son lobulillares infiltrantes, el 1-5% son mucinosos y menos o igual al 1% son metaplásicos. Frkovic (2) en una población de 270 pacientes determinó que el 78,5% desarrollaron carcinoma ductal infiltrante, el 11,1% carcinoma lobulillar infiltrante y restante 10,4% desarrollaron otros carcinomas infiltrantes no convencionales. Jaramillo (17) quien estudio una población de mujeres con cáncer de mama en Cali (Colombia) encontró que el

96% desarrolló carcinoma ductal infiltrante y el 9,4% carcinoma lobulillar infiltrante. Cuadro 7.

El grado de diferenciación tumoral describe las diferencias microscópicas que presentan las células tumorales respecto de las células normales de un mismo tejido en apariencia y función. Su determinación es importante porque establece el pronóstico del paciente y orienta la conducta terapéutica, al igual que lo hace la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona y la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, biomarcadores que determina el inmunofenotipo

Cuadro 7. Variedad histológica

Autor:	**Anteliz et al**	**Robbins (26)**	**Jaramillo (17)**		**Frkovic (2)**
CDI	88.7%	70-80%	29 / 32	90,6%	78,5%
CLI	8.1%	5-10%	3 / 32	9,4%	11,1%
C. Mucinoso	1.6%	1-5%			
C. Metaplásico	1.6%	<= 1%			
CI no convencional					10,4%
Año			2002		2002
País			Colombia (Cali)		Slovenia
n/Población			32		270

En la literatura se ha relacionado la buena diferenciación tumoral con la expresión casi invariable de los receptores de estrógenos y la pobre diferenciación con desarrollo de metástasis, evento que empeora el pronóstico (1).

En nuestro estudio se encontró que en todos los fenotipos (TNP, HER2+, luminal/HER2+, luminal A y ER+/PR-/HER2-) el grado de diferenciación tumoral más frecuente es el moderado.

Desmedt y colaboradores (66) en un metaanálisis realizado refiere que la mayoría de los fenotipos TNP y HER2+ son de alto grado de diferenciación tumoral por lo que se hacen más agresivos. Gerson y colaboradores (49) determinaron que el TNP se asocia con peor pronóstico tanto en recurrencia como en sobrevida y el HER2+ presenta un comportamiento agresivo con alta incidencia y mayor mortalidad. Cuadro 8. En nuestro estudio la mayoría de los fenotipos TNP y HER2+ presentaron un moderado grado de diferenciación tumoral con tendencia a la pobre diferenciación, sin embargo dos pacientes con fenotipo triple negativo y una paciente con fenotipo HER2+ presentaron buen grado de diferenciación tumoral.

Los fenotipos relacionados con buen pronóstico son los que expresan los receptores hormonales y su grado de diferenciación tumoral va de bueno a moderado. En este estudio, los fenotipos luminal/HER2+, luminal A y ER-/PR+/HER2- presentaron en su mayoría moderado grado de diferenciación tumoral con tendencia a bueno, sin embargo hubo tres pacientes del fenotipo luminal A que presentaron pobre grado de diferenciación.

Cuadro 8. Grado de diferenciación tumoral vs Fenotipos

Autor		Anteliz et al										Rakha (1)	Desmedt (66)	Gerson (48)
		TNP		Her+		Luminal/Her+		Luminal A		1RH+ Her-				
Grado de Diferenciación Tumoral	1	2 / 9	22,2%	1 / 9	11,1%	0 / 9	0,0%	6 / 9	66,7%	0 / 9	0,0%	* El GDT 3 tiende a hacer metastásis empeorando el pronóstico * El GDT 2 presenta un pronóstico intermedio en los años subsiguientes * GDT 1 tiende a presentar excelentes resultados y normalmente son ER+	* La mayoría de los Ca. Con fenotipos TNP y HER2+ son de alto grado * El TNP es más agresivo * El HER2+ asociado con mal pronóstico	* El TNP se asocia a peor pronóstico (recurrencia y sobrevida) * HER+ presenta un comportamiento agresivo (incidencia y mmortalidad)
	2	11 / 35	31,4%	4 / 35	11,4%	1 / 35	2,9%	16 / 35	45,7%	3 / 35	8,6%			
	3	4 / 11	36,4%	4 / 11	36,4%	0 / 11	0,0%	3 / 11	27,3%	0 / 11	0,0%			
Año		2011										2010	2008	2008
País		Colombia (B/ga)										Reino Unido		México
n/Población		62										Revisión	Meta análisis	110

Referente al carcinoma lobulillar infiltrante la literatura de referencia registra que se presenta en un 5-10% de los carcinomas mamarios, Frkovic (2) en su estudio encontró que estaba presente en un 11%, Jaramillo (17) en una población Colombiana determinó el 9.4%. El grado de diferenciación tumoral de estos carcinomas puede ser variable (26); Rakha en un estudio de 517 carcinomas lobulillares infiltrantes (67) encontró que 76% de las muestras estaba moderadamente diferenciado, 12% tenía buena diferenciación y 12% pobre diferenciación.

Los cinco carcinomas lobulillares infiltrantes hallados en este estudio son un ejemplo de la distribución variable que presenta este clase de tumores. Dos de ellos son luminal A con buen y moderado grado de diferenciación, dos son fenotipos triples negativos con moderada y pobre diferenciación tumoral y el otro HER+ con grado buen grado de diferenciación tumoral.

EL carcinoma mucinoso es considerado de buen pronóstico, ya que en su mayoría expresa los receptores hormonales (26), no sobre expresa la proteína HER-2/neu y el grado de diferenciación tumoral es bueno (68) hecho que se evidenció en el único caso obtenido.

El carcinoma metaplásico encontrado en el estudio es un TNP mal diferenciado, hallazgo que concuerda con la literatura (26).

8. CONCLUSIONES

La edad promedio de presentación del carcinoma mamario infiltrante en la población estudiada es de 55 años, dato concordante con el estudio realizado en Cali-Colombia y el Registro Poblacional de Cáncer del área Metropolitana de Bucaramanga.

El inmunofenotipo de mayor frecuencia en la población estudiada es el Luminal A, seguido en su orden por los fenotipos triple negativo, HER2+, fenotipo ER- PR+ HER2- y fenotipo luminal/HER2+, siendo los promedios de edades muy similares en los tres fenotipos de mayor frecuencia, luminal A con promedio de 57 años, TNP y HER2+ con promedio de 54 años.

Todos los fenotipos determinados en los carcinomas ductales infiltrantes, en su mayoría están relacionados con moderado grado de diferenciación tumoral y no se establece una relación franca entre los fenotipos de mal pronóstico (TNP y HER2+) y la pobre diferenciación tumoral.

En la población de pacientes con carcinoma ductal infiltrante el 48,4% de las pacientes presentaron fenotipos de peor pronóstico (TNP y HER2+) frente al 51,6% de pacientes que exhibieron fenotipos de mejor pronóstico, hecho que podría estar relacionado con menor agresividad del tumor y por ende con la baja mortalidad encontrada en Santander respecto a las estadísticas nacionales y globales.

Los hallazgos obtenidos del fenotipo triple negativo en la misma población, tanto en nuestro estudio como en el de Diaz y colaboradores (65) ratifican que en esta región la frecuencia del fenotipo triple negativo es superior a la registrada en la literatura.

Frente a la diferencia encontrada en la fenotipificación del TNP con respecto estudios referidos, se hace necesario seguir las siguientes recomendaciones: ejercer mayor control sobre los tiempos de isquemia frio y caliente y el tiempo de fijación; garantizar la adecuada preservación tumoral especialmente en los procesos de lumpectomía, cuadrantectomía y mastectomía.

A las pacientes cuyas muestras no tenían tejido mamario no tumoral para evaluar el control interno, se sugiere hacerles seguimiento en el tiempo para evaluarlo en el momento de la mastectomía, si es el caso.

A los fenotipos fenotipos triples negativos hallados se les podría realizar los otros dos biomarcadores, EGFR y CK 5/6 para establecer a cual fenotipo, core basal o 5NP, corresponden.

9. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Desde el punto de vista bioético, el presente trabajo de investigación se fundamenta en los principios establecidos en la Declaración de Helsinki proclamada por la Asociación Médica Mundial (69), donde se identifican los principios éticos a tener en cuenta tanto por los médicos como por aquellas personas que realizan investigación médica en seres humanos, incluyendo la investigación de material humano o de información identificable, investigaciones que se realizan con el propósito de mejorar los procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos, al igual que comprender la etiología y patogenia de las enfermedades sin dejar de velar por la protección de la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del ser humano.

Los individuos que conforman el proyecto de investigación deben estar por voluntad propia y debidamente informados. A ellos se les debe respetar el derecho de proteger su estado, intimidad, confidencialidad y reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y personalidad.

Adicional a esta Declaración se tiene en cuenta la normatividad vigente del país donde se realiza la investigación, por lo que cada individuo debe recibir información completa acerca del estudio, los objetivos, metodología, financiamiento, posibles conflictos de intereses, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas. La persona debe quedar informada de su posibilidad de retirarse de la investigación sin generarle conflictos futuros. Una vez el participante ha entendido la situación se debe proceder a la firma voluntaria del consentimiento informado.

El ministerio de Salud de Colombia ha expedido la Resolución 8430 de 1993 (70) donde se establece la normatividad científica, técnica y administrativa para la investigación en salud. El Artículo 5º afirma que en toda investigación en la que el ser humano es sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respecto a su dignidad, la protección de sus derechos y su bienestar. El Artículo 11º clasifica las investigaciones en diferentes categorías: Investigación sin riesgo, investigación con riesgo mínimo e investigación con riesgo mayor que el mínimo y el Artículo 14º aclara que por consentimiento informado se entiende el acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna, ver anexo 1, normatividad que también se tiene en cuenta para el desarrollo de este proyecto.

Como conclusión y teniendo en cuenta las características del proyecto, se establece que ésta es una ***Investigación de Riesgo Mayor que el Mínimo***, por lo que será sometida a consideración del Comité de Ética de la Dirección de Investigaciones de la Facultad de Salud (DIF) de la Universidad Industrial de Santander para la respectiva autorización de ejecución, previo diligenciamiento del consentimiento informado.

Conociendo que este proyecto se encuentra anidado en el proyecto titulado **"*Relación entre el grado de angiogénesis, presencia de Receptores Hormonales y sobreexpresión del receptor Her-2 neu, en el carcinoma infiltrante de glándula mamaria de biopsias analizadas en el Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander y el Hospital Universitario de Santander"*** aprobado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la UIS, cuyo investigador principal es la Doctora Olga Mercedes Alvarez, quien también es Codirectora de mi propuesta de trabajo y teniendo en cuenta que las muestras de las pacientes a evaluar y los biomarcadores a

determinar (Receptores Hormonales (Estrógenos y Progesterona) y HER-2/neu), son los mismos, se toma la decisión en común acuerdo de aplicar el instrumento de recolección de la información y el consentimiento informado y (Anexos L y M) del proyecto madre a las pacientes reclutadas para mi proyecto, reemplazando así el consentimiento informado y la encuesta de recolección de datos inicialmente pasada en este proyecto.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. **RAKHA, Emad A. et al.** *Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade.* En: Breast Cancer Research. 2010, vol. 12, p. 1-12.

2. **FRKOVIC-GRAZIO, S and BRACKO M.** *Long term prognostic value of Notingham hitological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma.* En: Journal of Clinical Pathology. 2002, vol. 55, p. 88-92.

3. **RAKHA, Emad A. et al.** *Prognostic significance of Nottingham histological grade in invasive breast cancer.* En: Journal of Clinical Pathology. 2008, vol. 26, p. 3153-3158.

4. **ROSS, Jeffrey S. et al.** *The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy.* En: The oncologist. February, 2003, vol. 8, p. 307-325.

5. **ADAMS, J. et al.** *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum an tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen.* En: Cancer Research. June, 2000, vol. 60, p. 2898-2905.

6. **PÉREZ-REQUENA, José et al.** Valor pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el Cáncer de Mama. En: Revista Española Patológica. 2002, vol. 35 no. 3, p. 315-324.

7. **CORONATO, Silvia y colaboradores.** Marcadores tumorales en cáncer de mama. En: Medicina. 2002, vol. 62, p. 73-82.

8. **GONZÁLEZ-MERLO, J., GONZÁLEZ-BOSQUET, J. y GONZÁLEZ-BOSQUET, E.** Ginecología. 8 ed. Barcelona : Masson, 2003. 668-705 p. vol. 8. ISBN 84-458-1279-3.

9. **WOLFF, Antonio C.** *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer.* En: Journal of Clinical Oncology. January, 2007, vol. 25, p. 118-145.

10. **WILLIAM F., Anderson et al.** *Tumor Variants by Hormone Receptor Expression in White Patients With Node-Negative Breast Cancer From the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database.* En: Journal of Clinical Oncolog. 2001, vol. 19, p. 18-27.

11. **TRENDELL-SMITH, N.J., PESTON, D. y SHOUSHA, S.***Adenoid cystic carcinoma of the breast: a tumour commonly devoid of oestrogen receptors and related proteins.* En: Histopathology. 1999, vol. 35 no. 3, p. 241-248.

12. **YILMAZ, Kerim Bora et al.** *Histopathological and clinical characteristics of secretory carcinoma of the breast.* En: Turkish Journal of Medical Sciences. 2009, vol. 39 no. 1, p. 155-159.

13. **CHEANG, Maggie et al.***Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype.* En: Clinical Cancer Research, vol. 14 no. 5, p. 1368-1376.

14. **CANCER GENETICS, THE RESEARCH INSTITUTE OF THE McGILL UNIVERSITY HEALTH CENTRE, AND THE LADY DAVIS INSTITUTE OF THE JEWISH GENERAL HOSPITAL.***Triple-Negative Breast Cancer. Current concepts.* En: New England Journal of Medicine. 2010, vol. 363, p. 1938-1948.

15. **RAKHA, Emad et al.** *Prognostic markers in triple - negative breast cancer.* En: Cancer. January, 2007, vol. 109 no. 1, p. 25-32.

16. **CHU, Kenneth C. et al.***Frequency Distributions of Breast Cancer Characteristics Classified by Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status for Eight Racial/Ethnic Groups.* En: Cancer. July, 2001, vol. 92 no.1, p. 37-45.

17. **JARAMILLO, Roberto et al.** Expresión de receptores hormonales frente a indicadores pronósticos en carcinoma de mama. En: Revista Colombiana Médica. 2002, vol. 33 no. 4, p. 156-161.

18. **URIBE-PÉREZ, Claudia Janeth y MEZA-DURÁN, Erika Eliana.** Incidencia de cáncer en el área metropolitana de Bucaramanga, 2000-2004. En: Med UNAB. 2007, vol. 10 no. 3, p. 147-172.

19. **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.** *World Health Organization.* [Online]. *Globocan 2008 Database.* update 6 March 2011. [Cited: Marzo 6, 2011.] http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900.

20. **PRESS, Michael F., et al.** *Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: An assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials.* En: Clinical Cancer Research. 2005, Vol. 11 no. 18, p. 6598-6607.

21. **PEROU, Charles et al.** *Molecular portraits of human breast tumors.* California (USA). En: Nature. August, 2000, vol. 406, p. 747-752.

22. **LANGMAN, Sadler.** Embriología Médica. 8 ed. Buenos Aires : Panamericana, 2008. 350 p. ISBN 978-950-06-0077-4.

23. **AGUILAR-CORDERO, María José.** Lactancia Materna. Madrid : Elsevier, 2005. p. 38-52. ISBN 84-8174-768-8.

24. **KRONENBERG, Henry et al.** Williams Tratado de Endocrinología. 11 ed. Barcelona : Elsevier, 2009. 187-192 p. ISBN 978-84-8086-377-3.

25. **ARRAZTOA ELUSTONDO, Juan.** *La mama diagnóstico y tratamiento.* 2. Santiago : Mediterraneo, 2004. pp. 1-24, 153-167. ISBN 956-220-234-8.

26. **LESTER, Susan C.** La mama. En: Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 7 ed. Madrid : Elsevier, 2005, p. 1123-1158.

27. **RUBIN, Philip.** Oncología Clínica. 8 ed. España : Elsevier, 2003. 847 p. Disponible en Internet: www.books.google.com. ISBN 84-8174-627-4.

28. **RUIZ-VARGAS, José C.** Anatomía topográfica. 5 ed. Juárez : Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez, 2002. p. 31-32. ISBN 968-7845-37-6.

29. **ROSEN, Paul Peter.** Patología Mamaria de Rosen. 2 ed. s.l. : Amolca, 2005. 249-364 p. Tomo. 1.

30. **HORMIGA SÁNCHEZ, Claudia Milena y RODRÍGUEZ VILLAMIZAR, Laura Andrea.** Mortalidad por tumores en Santander. Bucaramanga. En: Med UNAB, vol. 11, p. 83-94.

31. **ALTHUIS, M.D. et al** *Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973–1997.* En: International Journal of Epidemiology. 2005, vol. 34, p. 405-412.

32. **ELKIN, E.B. et al.***The effect of changes in tumor size on breast carcinoma survival in the U.S.: 1975-1999.* En: Cancer. September, 2005, vol. 104, p. 1149-1157.

33. **TOWNSEND, Coutney M. Sabiston.** Tratado de cirugía. 17 ed. Madrid : Elsevier, 2005. p. 868-944. Tomo 1. ISBN 978-84-8174-848-7.

34. **NEWMAN, L.A. et al.** *African-American Ethnicity, socioeconomics status and breast cancer survival.* En: Cancer. 2002, vol. 94 no. 11, p. 2844-2854.

35. **COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL IN BREAST CANCER.** *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease.* En: Lancet. October, 2001, vol. 358, p. 1389-1399.

36. **COOPER, Geoffrey M.** La Célula. 2 ed. s.l. : Marbán, 2002. p. 543-545,550-556,653-660.

37. **NCBI.** PUBMED. *NCBI.* [Online] [Cited: Marzo 1, 2011.] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P03372.2.

38. **NILSSON, Stefan et al.** *Mechanisms of estrogen action*. En: Physiological review. October, 2001, vol. 81 no. 4, p. 1535-1565.

39. **NORIEGA-REYES, María Yamilet y LANGLEY McC., Elizabeth.** Correguladores del Receptor de Estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. En: Cancerología. 2008, vol. 3, p. 29-40.

40. **KLINGE, C.M.** *Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.* En: Nucleic Acids Research. 2001, vol. 29 no. 14, p. 2905-2919.

41. **GUTIÉRREZ, Jorge.** Nuevas terapias en cáncer: Acción sobre la vía de transducción de señales, de una promesa a una realidad que se inicia. En: Revista Médica. 2001, vol. 12 no. 1, p. 4-12.

42. **JACOBSEN, Britta M. et al.** *New Human Breast Cancer Cells to Study Progesterone Receptor Isoform Ratio Effects and ligand.independet Gene*

Regulation. En: The Journal of Biological Chemistry. August, 2002, vol. 277 no. 31, p. 27793-27800.

43. **LANGE, Carol A. y YEE, Douglas.** Progesterona y cáncer de mama. En: Revista del climaterio. 2009, vol. 12, p. 153-165.

44. **QUILES Lara, Ignacio.** http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UPF/AVAILABLE/TDX-1102109-134522//tiql.pdf. [Online] 2007. [Cited: Marzo 5, 2011.] http://www.tesisenxarxa.net/.

45. **KARUNAGARAN, D. et al.** *Erb-B2 is a common auxiliary subunit of NDF an EGF receptors: implications for breast cancer.* En: The EMBO Journal. 1996, vol. 15 no. 2, p. 254-264.

46. **OWENS, M.A., HORTEN B.C.y DA SILVA, M.M.** *Her amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation whit immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues.* En: Clinical Breast Cancer. April, 2004, vol. 5, p. 63-69.

47. **NIELSEN, Torsten et al.** *Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-like subtype of invasive breast carcinoma.* En: Clinical Cancer Research. 2004, vol. 10, p. 5367-5374.

48. **CAREY, Lisa et al.** *Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina breast cancer study.* En: JAMA. 2006, vol. 295 no. 21, p. 2492-2502.

49. **GERSON, Raquel et al.** *Recurrencia y supervivencia en cáncer mamario temprano con inmunofenotipo triple negativo.* En: Gaceta Médica de México. 2008, vol. 144, p. 27-34.

50. **DECKER, T., HUNGERMANN, D. y BÖCKER, W.** *Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer.* En: Pubmed. 2009, vol. 30 no. 1, p. 49-55.

51. **GONZALEZ-ANGULO, A.M., MORALES-VASQUEZ, F. y HORTOBAGYI, G.N.** *Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. Advances in experimental medicine and biology.* En: Advances in experimental in medicine and biology, 2007, vol. 608, p. 1-22.

52. **ELSTON, C.W. y ELLIS, I.O.** *Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.* En: Histopathology. 1991, vol. 19, p. 403-410.

53. **HAMMOND, M. Elizabeth et al.** *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer.* En: Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2010, vol. 134, p. e48-e72.

54. **GÓMEZ MORALES, M. y otros.** Fundamentos biológicos de la inmunohistoquímica. Inmunohistoquímica (I): técnicas de inmunofluorescencia. Técnicas de inmunohistoquímica. Laboratorio de anatomía patológica, s.l. : Mc Graw Hill, 1993, p. 321-368.

55. **TORRES SECO, Fernando.** Manual de técnicas en histología y anatomía patológica. España : Health & Fitness, 2002. p. 63. Disponible en Internet: www.books.google.com.co.. ISBN 84-344-3704-X.

56. **HARVEY, Jennet M. et al.***Estrogen Receptor status by Immunohistochemistry is superior to the Ligand Binding Assay for predicting response to adjuvant endocryne therapy in Breast Cancer.*En: Journal of Clinical Oncology. 1999, vol. 17 no. 5, p. 1474-1481.

57. **QURESHI, Asim and PERVEZ, SHAhid.** *Allred scoring for ER reporting and it's impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancer.* En: Journal of Pakistan Medical Association, vol. 60 no. 5, pp. 350-353.

58. **BHARGAVA R., et al.** *Breast cancer molecular class ERBB2: preponderance of tumors with apocrine differentiation and expresion of basal phenotype markers CK5, CK5/6, and EGFR.* 2, Pittsburgh (USA) : En: Applied Immunohistochemistry & Moecular Morphology. March, 2010, vol. 18, p. 113-118.

59. **HUANG, Zhida et al.** *Development of new rabbit monoclonal antibody to progesterone receptors (clone SP2): No heat pretreatment but effective for paraffin section immunohistpochemistry.* 2, June 2006, Applied immunohistochemistry & molecular morphology. June, 2006, vol. 14 no. 2, p. 229-233.

60. **CANO, G., et al.** *Estimation of hormone receptor status in fine-needle aspirates and paraffin-embedded section from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies SP1 and SP2.* Almada (Portugal) : En: Diagnostic Cytopathology. October, 2003, vol. 29 no. 4, p. 207-211.

61. **WLUDARSKI, S.C., BACCHI C.E.** *High concordance of SP3 rabbit monoclonal antibody with FISH to evaluate HER2 in breast carcinoma.* Sao Paulo (Brazil) : En: Applied immunohistochemistry & molecular morphology. October, 2008, vol. 16 no. 5, p. 466-470.

62. **NASSAR, Aziza, COHEN, Cynthia and SIDDIQUI, Momin.** *Estimation of hormone receptor status and HER2 in cytology cell blocks from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies (SP1, SP2, SP3).* En: Diagnostic cytopathology. December, 2009, vol. 32 no. 12, p. 865-870.

63. **HANLEY, K.Z. et al.** *Evaluation of new monoclonal antibodies in detection of estrogen receptor, progesterone receptor and HER2 protein expression in reast carcinoma cell block section using conventional microscopy and quantitative image analysis.* Georgia (USA). En: Diagnostic citopathology. April, 2009, vol. 37 no. 4, p. 251-257.

64. **NUNES, C.B. et al.** *Comparative analysis of six different antibodies against HER2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridization in breast carcinoma.* Belo Horizonte (Brazil) : En: Journal of clinical pathology. August, 2008, vol. 61 no. 8, p. 934-938.

65. **DIAZ, Julio A. y colaboradores.** Característica clínicas y patológicas asociadaas a los carcinomas de mama con perfil inmunofenotípico triple negativo en el Hospital Universitario de Santander, Colombia. Bucaramanga. En: Revista colombiana de cirugía. 2008, vol. 23 (Sup), p. 38.

66. **DESMEDT, Christine et al.** *Biological processes associated wuth breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes.* En: Clinical cancer research. August, 2008, vol. 14, p. 5158-5165.

67. **RAKHA, E.A. et al.** *Histologic grading is an independend prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast.* Nottingham (UK). En: Breast cancer research and treatment, september, 2008, vol. 111 no. 1, pp. 121-127.

68. **PARK, S. et al.** *Clinico pathological characteristics of mucinous carcinoma of the breast in Korea: comparison with invasive ducta carcinoma-not otherwise specified.* Seoul (Korea) En: Journal of korean medical science. March, 2010, vol. 25 no. 3, p. 361-368.

69. **ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL.** ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL. [Online] Junio 1964. [Cited: 03 1, 2011.] http://www.wma.net/s/policy/17-c s.html.

70. **REPUBLICA DE COLOMBIA MINISTERIO DE SALUD.** Resolución 008430 de 1993. *Ministerio de Protección Social de Colombia.* [Online] Octubre 4, 1993. [Cited: Julio 30, 2009.] http://www.minproteccionsocial.gov.co/Normatividad/RESOLUCION%208430%20DE%201993.pdf.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, J. et al. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum an tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen.* En: Cancer Research. June, 2000, vol. 60, p. 2898-2905.

AGUILAR-CORDERO, María José. Lactancia Materna. Madrid : Elsevier, 2005. 38-52 p. ISBN 84-8174-768-8.

ALTHUIS, M.D. et al. *Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973–1997.* **En**: International Journal of Epidemiology. 2005, vol. 34, p. 405-412.

ARRAZTOA ELUSTONDO, Juan. La mama diagnóstico y tratamiento. 2 ed. Santiago : Mediterraneo, 2004. 1-24 p, 153-167 p. ISBN 956-220-234-8.

ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL. ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL. [Online] Junio 1964. [Cited: 03 1, 2011.] http://www.wma.net/s/policy/17-c s.html.

BHARGAVA R., et al. *Breast cancer molecular class ERBB2: preponderance of tumors with apocrine differentiation and expresion of basal phenotype markers CK5, CK5/6, and EGFR.* 2, Pittsburgh (USA) : En: Applied Immunohistochemistry & Moeculal Morphology. March, 2010, vol. 18, p. 113-118.

CANCER GENETICS, THE RESEARCH INSTITUTE OF THE McGILL UNIVERSITY HEALTH CENTRE, AND THE LADY DAVIS INSTITUTE OF THE JEWISH GENERAL HOSPITAL. *Triple-Negative Breast Cancer. Current concepts.* En: New England Journal of Medicine. 2010, vol. 363, p. 1938-1948.

CANO, G., et al. *Estimation of hormone receptor status in fine-needle aspirates and paraffin-embedded section from breast cancer using the novel rabbit*

monoclonal antibodies SP1 and SP2. En: Diagnostic Cytopathology. October, 2003, vol. 29 no. 4, p. 207-211.

CAREY, Lisa et al. *Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina breast cancer study.* En: JAMA, 2006, vol. 295 no. 21, p. 2492-2502.

CHEANG, Maggie et al. *Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype.* En: Clinical Cancer Research. March, 2008, vol. 14 no. 5, p. 1368-1376.

CHU, Kenneth C. et al. *Frequency Distributions of Breast Cancer Characteristics Classified by Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status for Eight Racial/Ethnic Groups.* En: Cancer. July, 2001, vol. 92 no.1, p. 37-45.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL IN BREAST CANCER. *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease.* En: Lancet. October, 2001. vol. 358 (9291), p. 1389-1399.

COOPER, Geoffrey M. La Célula. 2 ed. s.l. : Marbán, 2002. 543-545,550-556,653-660 p.

CORONATO, Silvia y otros. Marcadores tumorales en cáncer de mama. En: Medicina. Buenos Aires. 2002, vol. 62, p. 73-82.

DECKER, T., HUNGERMANN, D. y BÖCKER, W. *Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer.* En: Pubmed. February, 2009, vol. 30 no. 1, p. 49-55.

DESMEDT, Christine et al. *Biological processes associated wuth breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes.* En: Clinical cancer research. August, 2008, vol. 14, p. 5158-5165.

DIAZ, Julio A. y colaboradores. Característica clínicas y patológicas asociadaas a los carcinomas de mama con perfil inmunofenotípico triple negativo en el Hospital Universitario de Santander, Colombia. En: Revista colombiana de cirugía. 2008, vol. 23 (Sup), p. 38.

ELKIN, E.B. et al. *The effect of changes in tumor size on breast carcinoma survival in the U.S.: 1975-1999.* En: Cancer. September, 2005, vol. 104, p. 1149-1157.

ELSTON, C.W. y ELLIS, I.O. *Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.* En: Histopathology. 1991, vol. 19, p. 403-410.

FRKOVIC-GRAZIO, S and BRACKO M. *Long term prognostic value of Notingham hitological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma.* En: Journal of Clinical Pathology. 2002, vol. 55, p. 88-92.

GERSON, Raquel et al. Recurrencia y supervivencia en cáncer mamario temprano con inmunofenotipo triple negativo. En: Gaceta Médica de México. 2008, vol. 144 no. 1, p. 27-34.

GÓMEZ MORALES, M. et al. Fundamentos biológicos de la inmunohistoquímica. Inmunohistoquímica (I): técnicas de inmunofluorescencia. Técnicas de inmunohistoquímica. Laboratorio de anatomía patológica. s.l. : Mc Graw Hill, 1993. p. 321-368.

GONZALEZ-ANGULO, A.M., MORALES-VASQUEZ, F. y HORTOBAGYI, G.N. *Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. 2007, Advances in experimental medicine and biology.* En: Advances in experimental in medicine and biology. 2007, vol. 608, p. 1-22.

GONZÁLEZ-MERLO, J., GONZÁLEZ-BOSQUET, J. y GONZÁLEZ-BOSQUET, E. Ginecología. 8 ed. Barcelona: Masson, 2003. 668-705 p. ISBN 84-458-1279-3.

GUTIÉRREZ, Jorge. *Nuevas terapias en cáncer: Acción sobre la vía de transducción de señales, de una promesa a una realidad que se inicia.* En: Revista Médica. 2001, vol. 12 no. 1, p. 4-12.

HAMMOND, M. Elizabeth et al. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer.* En: Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2010, vol. 134, p. e48-e72.

HANLEY, K.Z. et al. *Evaluation of new monoclonal antibodies in detection of estrogen receptor, progesterone receptor and HER2 protein expression in reast carcinoma cell block section using conventional microscopy and quantitative image analysis.* En: Diagnostic citopathology. April, 2009, vol. 37 no. 4, p. 251-257.

HARVEY, Jennet M. et al. *Estrogen Receptor status by Immunohistochemistry is superior to the Ligand Binding Assay for predicting response to adjuvant endocryne therapy in Breast Cancer.* En: Journal of Clinical Oncology. 1999, vol. 17 no. 5, p. 1474-1481.

HORMIGA SÁNCHEZ, Claudia Milena y RODRÍGUEZ VILLAMIZAR, Laura Andrea. Mortalidad por tumores en Santander. En: Med UNAB. Julio, 2008, vol. 11, p. 83-94.

HUANG, Zhida et al. *Development of new rabbit monoclonal antibody to progesterone receptors (clone SP2): No heat pretreatment but effective for paraffin section immunohistpochemistry.* En: Applied immunohistochemistry & molecular morphology. June, 2006, vol. 14 no. 2, p. 229-233.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *World Health Organization.* [Online]. *Globocan 2008 Database,* update 6 march 2011. [Cited: 6 march 2011.] http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900.

JACOBSEN, Britta M. et al. *New Human Breast Cancer Cells to Study Progesterone Receptor Isoform Ratio Effects and ligand.independet Gene Regulation.* En: The Journal of Biological Chemistry. August, 2002, vol. 277 no. 31, p. 27793-27800.

JARAMILLO, Roberto y otros. Expresión de receptores hormonales frente a indicadores pronósticos en carcinoma de mama. En: Revista Colombiana Médica. 2002, vol. 33 no. 4, p. 156-161.

KARUNAGARAN, D. et al. *Erb-B2 is a common auxiliary subunit of NDF an EGF receptors: implications for breast cancer.* En: The EMBO Journal. 1996, vol. 15 no. 2, p. 254-264.

KLINGE, C.M. *Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.* En: Nucleic Acids Research. April, 2001, Vol. 29 no. 14, p. 2905-2919.

KRONENBERG, Henry et al. Williams Tratado de Endocrinología. 11 ed. Barcelona : Elsevier, 2009. 187-192 p. ISBN 978-84-8086-377-3.

LANGE, Carol A. y YEE, Douglas. *Progesterona y cáncer de mama.* En: Revista del climaterio. 2009, vol. 12, p. 153-165.

LANGMAN, Sadler. Embriología Médica. 8 ed. Buenos Aires : Panamericana, 2008. 350 p. ISBN 978-950-06-0077-4.

LESTER, Susan C. La mama. En: **ROBBINS Y COTRAN**. *Patología estructural y funcional.* 7 ed. Madrid : Elsevier, 2005, 1123-1158 p.

NASSAR, Aziza, COHEN, Cynthia and SIDDIQUI, Momin. *Estimation of hormone receptor status and HER2 in cytology cell blocks from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies (SP1, SP2, SP3).* En: Diagnostic cytopathology. December, 2009, vol. 32 no.12, p. 865-870.

NCBI. PUBMED. *NCBI.* [Online] [Cited: Marzo 1, 2011.] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P03372.2.

NEWMAN, L.A. et al. *African-American Ethnicity, socioeconomics status and breast cancer survival.* En: Cancer. June, 2002. vol. 94 no. 11, p. 2844-2854.

NIELSEN, Torsten et al. *Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-like subtype of invasive breast carcinoma.* En: Clinical Cancer Research. 2004, vol. 10, p. 5367-5374.

NILSSON, Stefan et al. *Mechanisms of estrogen action*. En: Physiological review, October, 2001. vol. 81 no. 4, p. 1535-1565.

NORIEGA-REYES, María Yamilet y LANGLEY McC., Elizabeth. *Correguladores del Receptor de Estrógenos y su implicación en el cáncer mamario.* En: Cancerología. 2008, vol. 3, p. 29-40.

NUNES, C.B. et al. *Comparative analysis of six different antibodies against HER2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridization in breast carcinoma.* En: Journal of clinical pathology. August, 2008, vol. 61 no. 8, p. 934-938.

OWENS, M.A., HORTEN B.C.y DA SILVA, M.M. *Her amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation whit immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues*1. En: Clinical Breast Cancer. April, 2004, vol. 5, p. 63-69.

PARK, S. et al. *Clinico pathological characteristics of mucinous carcinoma of the breast in Korea: comparison with invasive ducta carcinoma-not otherwise specified.* En: Journal of korean medical science. March, 2010, vol. 25 no. 3, p. 361-368.

PÉREZ-REQUENA, José y otros. Valor pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el Cáncer de Mama. En: Revista Española Patológica. 2002, vol. 35 no.3, p. 315-324.

PEROU, Charles et al. *Molecular portraits of human breast tumors.* California (USA). En: Nature. August, 2000, vol. 406, p. 747-752.

PRESS, Michael F., et al. *Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: An assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials.* En: Clinical Cancer Research. September, 2005, vol. 11 no. 18, p. 6598-6607.

QUILES Lara, Ignacio.http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UPF/AVAILABLE/TDX-1102109-134522//tiql.pdf. [Online] 2007. [Cited: Marzo 5, 2011.] http://www.tesisenxarxa.net/.

QURESHI, Asim and PERVEZ, SHAhid. *Allred scoring for ER reporting and it's impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancer.* En: Journal of Pakistan Medical Association. 2010, vol. 60 no. 5, p. 350-353.

RAKHA, Emad A. et al. *Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade.* En: Breast Cancer Research. 2010,vol. 12, p. 1-12.

RAKHA, E.A. et al. *Histologic grading is an independend prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast.* En: Breast cancer research and treatment. September, 2008, vol. 111 no. 1, p. 121-127.

RAKHA, Emad et al. *Prognostic markers in triple - negative breast cancer.* En: Cancer. January, 2007, vol. 109 no. 1, p. 25-32.

RAKHA, Emad A. et al. *Prognostic significance of Nottingham histological grade in invasive breast cancer.* En: Journal of Clinical Pathology. 2008, vol. 26, p. 3153-3158.

REPUBLICA DE COLOMBIA MINISTERIO DE SALUD. Resolución 008430 de 1993. *Ministerio de Protección Social de Colombia.* [Online] Octubre 4, 1993. [Cited: Julio 30, 2009.] http://www.minproteccionsocial.gov.co/Normatividad/RESOLUCION%208430%20DE%201993.pdf.

ROSEN, Paul Peter. Patología Mamaria de Rosen. 2 ed. s.l. : Amolca, 2005. 249-364 p. Tomo 1.

ROSS, Jeffrey S. et al. *The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy.* En: The oncologist. February, 2003, vol. 8, p. 307-325.

RUBIN, Philip. Oncología Clínica. 8ed. España : Elsevier, 2003. 847 p. Disponible en Internet: www.books.google.com. ISBN 84-8174-627-4.

RUIZ-VARGAS, José C. Anatomía topográfica. 5 ed. Juárez : Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez, 2002. 31-32 p. ISBN 968-7845-37-6.

TORRES SECO, Fernando. *Manual de técnicas en histología y anatomía patológica.* España : Health & Fitness. 2002, p. 63. Disponible en Internet: www.books.google.com.co.. ISBN 84-344-3704-X.

TOWNSEND, Coutney M. Sabiston. Tratado de cirugía. 17 ed. Madrid : Elsevier, 2005. p. 868-944. Tomo 1. ISBN 978-84-8174-848-7.

TRENDELL-SMITH, N.J., PESTON, D. y SHOUSHA, S. *Adenoid cystic carcinoma of the breast: a tumour commonly devoid of oestrogen receptors and related proteins.* En: Histopathology. September, 1999, vol. 35 no. 3, p. 241-248.

URIBE-PÉREZ, Claudia Janeth y MEZA-DURÁN, Erika Eliana. Incidencia de cáncer en el área metropolitana de Bucaramanga, 2000-2004. En: Med UNAB. 2007, vol. 10 no. 3, p. 147-172.

WILLIAM F., Anderson et al. *Tumor Variants by Hormone Receptor Expression in White Patients With Node-Negative Breast Cancer From the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database.* En: Journal of Clinical Oncology. January, 2001, vol. 19 no. 1, p. 18-27.

WLUDARSKI, S.C., BACCHI C.E. *High concordance of SP3 rabbit monoclonal antibody with FISH to evaluate HER2 in breast carcinoma.* En: Applied immunohistochemistry & molecular morphology. October, 2008, vol. 16 no. 5, p. 466-470.

WOLFF, Antonio C et al. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer.* En: Journal of Clinical Oncology. January, 2007, vol. 25 no. 1, p. 118-145.

YILMAZ, Kerim Bora et al. *Histopathological and clinical characteristics of secretory carcinoma of the breast.* En: Turkish Journal of Medical Sciences. 2009, vol. 39 no. 1, p. 155-159.

Roche

Anexo A

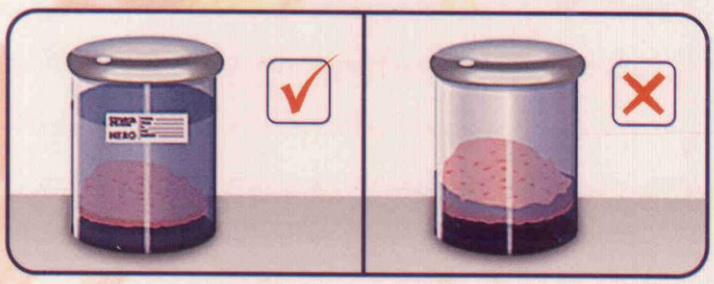
HER2

Solución de Formol Bufferado

Formaldehido, 35% - 40%	100 ml
Agua destilada	900 ml
Fosfato de Sodio monobásico	4.0 g
Fosfato de Sodio dibásico (anhidro)	6.5 g
Volumen total	1000 ml

- El tejido debe estar completamente sumergido en un volúmen de formol bufferado que sea de 15 - 20 veces su propio volúmen.
- Tejidos de mayor grosor deben cortarse para que el formol penetre adecuadamente.
- Si el tejido requiere el estudio HER2 no debe permanecer en formol bufferado por más de 24 horas.

Almacene en un recipiente rotulado claramente.



Herceptin® trastuzumab

Enfocado al incremento de la vida

Thermo SCIENTIFIC

Anexo B

Citrate Buffer For Heat-Induced Epitope Retrieval

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

AVAILABILITY:

Catalog #	Volume
AP-9003-125	125 ml (10X)
AP-9003-500	500 ml (10X)

SPECIFICITY: N/A
ENZYME: N/A
CHROMOGEN/SUBSTRATE: N/A

DESCRIPTION

Formaldehyde fixation impairs or totally destroys the immunoreactivity of many antigens and epitopes. The negative effect of formaldehyde fixation can be reversed successfully with enzymatic digestion for some markers while not for others. Non-enzymatic epitope unmasking techniques have been recently introduced to improve the immunoreactivity of many antigens in formaldehyde fixed tissues. Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) in citrate buffer has been reported to improve the reactivity of many antibodies in formal-fixed tissues.

WARNINGS & PRECAUTIONS

Refer to MSDS.

STORAGE & SHELF LIFE

Store at room temperature. Each component is stable for 18 months. This buffer contains no preservative. Store product at 2-8°C for storage longer than 3 months.

MICROBIOLOGICAL STATE

Product(s) not sterile.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

N/A

SPECIMEN & REAGENT PREPARATION

Refer to Procedure.

PROCEDURE

Supplied As:
Citrate buffer, pH 6.0. This is a 10X stock solution and should be diluted 10-fold with distilled water before use.

1. Place five-micron thick tissue sections on glass slides coated with poly L-lysine or APTES.
2. Deparaffinize and re-hydrate sections as usual.
3. Place slides in a Coplin jar containing 10mM sodium citrate buffer, pH 6.0; cover with a vented plastic wrap and place the jar in a steamer (Black & Decker) for 20 minutes.
4. Take out the jar and let the sections cool in the jar for 20 minutes at room temperature. ***THIS STEP IS VERY CRITICAL AND SHOULD NOT BE AVOIDED.***
5. Wash sections in buffer for 2x5 minutes.
6. Block endogenous peroxidase as usual.
7. Wash sections in buffer for 2x5 minutes.
8. Block non-specific sites with normal serum as usual.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

CE IVD

Manufactured by:
LabVision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

9. Place optimally diluted primary antibody on the sections (incubation time and temperature for a given set of experimental conditions should be determined by the investigator).
10. Wash sections in buffer for 2x5 minutes.
11. Rest of the procedure is same as routinely performed in your laboratory.

Suggested Working Dilution:
Immunohistology: 1:10 with distilled water.

Suggested Test Size:
It is recommended that at least 75 ml of Citrate buffer should be used for 12 slides.

REFERENCES

N/A

TROUBLESHOOTING

Please contact Thermo Fisher Scientific Technical Support by phone (1-510-991-2800 or 1-800-828-1628) or by email (lab.reagents@thermofisher.com).

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

Anexo C

Hydrogen Peroxide Block

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

AVAILABILITY:

Catalog #	Volume
TA-060-HP	60 ml
TA-125-HP	125 ml

SPECIFICITY: N/A
ENZYME: N/A
CHROMOGEN/SUBSTRATE: N/A

DESCRIPTION

Hydrogen Peroxide Block has been formulated for use with immunohistochemical techniques. It is designed to quench endogenous peroxidase that can cause nonspecific background staining in enzyme labeling methods. Peroxidase within red blood cells may be difficult to quench entirely.

WARNINGS & PRECAUTIONS

Refer to MSDS.

STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. Product is stable for 18 months from date of manufacture.

MICROBIOLOGICAL STATE

Product(s) not sterile.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

N/A

SPECIMEN & REAGENT PREPARATION

Refer to Procedure.

PROCEDURE

Hydrogen Peroxide Block may be applied after the sections have been deparaffinized and rehydrated. The application must occur prior to the primary antibody incubation. Incubate tissue section for 10-15 minutes at room temperature or 37°C. After incubation, rinse twice in buffer.

For bulk staining, pour Hydrogen Peroxide Block in a covered staining tray and dip slides for 5-10 minutes. Replace with fresh Hydrogen Peroxide Block after 5-10 uses. This step can be performed at the time of deparaffinization.

REFERENCES

N/A

TROUBLESHOOTING

Please contact Thermo Fisher Scientific Technical Support by phone (1-510-991-2800 or 1-800-828-1628) or by email (lab.reagents@thermofisher.com).

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826
http://www.thermo.com/labvision

CE IVD

Manufactured by:
LabVision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Anexo D

Thermo SCIENTIFIC

1. PRODUCT INFORMATION

Product: Ultra V Block

Catalog #: TA-XXX-UB

Included in the following kits: All UltraVision, UltraVision Plus, UltraVision LP/LPValue, and UltraVision One kits

2. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Component	CAS No.	Percent
Sodium Azide	26628-2-8	0.1%

Remainder of composition consists of non-hazardous ingredients.

3. HAZARDS IDENTIFICATION

Sodium Azide is highly toxic. Direct contact of solution with skin may cause local dermatitis. Sodium Azide in solution is readily absorbed through breaks in the skin and may cause systemic effects, the most common being hypotension and tachycardia. Sodium Azide is not carcinogenic.

4. FIRST AID MEASURES

Seek medical attention immediately.
Eye Contact: Flush eyes with copious amounts of water for at least 15 minutes. Assure adequate flushing by separating eyelids with fingers.
Skin Contact: Remove contaminated clothing and shoes. Flush skin with copious amounts of water for at least 15 minutes. Wash contaminated clothing before reuse.
Ingestion: Wash out mouth with water provided person is conscious. Do not give anything by mouth if victim is unconscious. Contact local poison control center.
Inhalation: Remove victim to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen.

5. FIREFIGHTING MEASURES

Extinguishing Media: Extinguish using suitable agents appropriate for surrounding areas as per user's firefighting prevention plan.
Fire and Explosion Hazards: N/A
Firefighting Procedures: Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing. Move container from fire area if possible. Do not scatter spilled material with more water than needed for fire control. Avoid breathing hazardous vapors.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Wear personal protective equipment, such as rubber gloves and boots, respirators, and goggles to prevent contact with self and others. Use paper towels or absorbent materials to absorb spills.

7. HANDLING AND STORAGE

Handling: See Section 8.
Storage: See Instructions For Use.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

Eye Protection: Wear goggles or safety glasses. Use eyewash if necessary.
Skin Protection: Wear latex or vinyl gloves. Wash hands thoroughly after handling.
Respiratory Protection: Wear respirator and avoid inhalation.
Ventilation: Use in well-ventilated laboratory.
Other Protective Equipment: Use lab coat to prevent contact with skin and clothing.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Appearance: Clear
Odor: No odor
pH: 7.4
Boiling point: 400® C
Flash point: N/A

10. STABILITY AND REACTIVITY

Stability: See Instructions For Use.
Conditions/Materials to avoid: Steel, Iron; Avoid elevated temperatures, sparks, open flame, all ignition sources, and incompatible materials.
Hazardous decomposition: N/A

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated.

12. ECOLOGICAL INFORMATION

No information available at this time.

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Dispose in accordance with all applicable federal, state, and local environmental regulations.

14. TRANSPORT INFORMATION

Please see product label to ensure proper transportation parameters such as temperature.

15. REGULATORY INFORMATION

No information available at this time.

16. OTHER INFORMATION

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties, or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. Lab Vision is not liable for any property damage, personal injury, time or effort, or economic loss caused by our products.

N/A = Not Available

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627

Thermo SCIENTIFIC

Anexo E

Large Volume UltraClean Diluent

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

AVAILABILITY:	Catalog #	Volume
	TA-125-UC	125 ml
SPECIFICITY:	N/A	
ENZYME:	N/A	
CHROMOGEN/SUBSTRATE:	N/A	

DESCRIPTION

UltraClean Diluent is prepared for use in immunochemical procedures. Most antibodies can be diluted directly in this reagent and can be stored for 18 months when refrigerated in most instances. This unique formula inhibits background staining on most tissue and with most antibodies. It should not, however replace blocking reagents.

WARNINGS & PRECAUTIONS

Refer to MSDS.

STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. Product is stable for 24 months from the date of manufacture.

MICROBIOLOGICAL STATE

Product(s) not sterile.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

N/A

SPECIMEN & REAGENT PREPARATION

Refer to Procedure.

PROCEDURE

Dilute antibody directly in this reagent.

REFERENCES

N/A

TROUBLESHOOTING

Please contact Thermo Fisher Scientific Technical Support by phone (1-510-991-2800 or 1-800-828-1628) or by email (lab.reagents@thermofisher.com).

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826
http://www.thermo.com/labvision

CE IVD

Manufactured by:
LabVision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

Anexo F

RESEARCH USE ONLY DATA SHEET

Rev 090309L

Clinical customers please refer to IVD / ASR Data Sheet

Estrogen Receptor (Clone SP1)

Rabbit Monoclonal Antibody

Cat. #RM-9101-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml Supernatant)
Cat. #RM-9101-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)
Cat. #RM-9101-F0, -F1, or -F (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml) (FITC-Conjugated Antibody)
at. #RM-9101-PCL (0.1ml) (Positive Control for Western Blot)

Description:

Clone SP1 recognizes a protein of 67kDa, which is identified as estrogen receptor (ER) alpha. The ER gene consists of more than 140kb of genomic DNA divided into 8 exons, being translated into a protein with six functionally discrete domains, labeled A through F. This antibody strongly stains the nucleus of epithelial cells in breast carcinomas. The ER is an important regulator of growth and differentiation in the mammary gland. Presence of ER in breast tumors indicates an increased likelihood of response to anti-estrogen (e.g. tamoxifen) therapy.

Comments: Clone SP1 is excellent for staining of formalin/paraffin with no special pretreatment.

Mol. Wt. Of Antigen: 67kDa
Epitope: C-terminus
Ig Isotype: Rabbit IgG
Species Reactivity: Human, Mouse, and Hamster. Others not tested.
Clone Designation: SP1
Immunogen:
Synthetic peptide derived from C-terminal of human estrogen receptor.

Applications and Suggested Dilutions:

- Immunofluorescence (not verified)
- Flow Cytometery (not verified)
- Western Blotting (1:200-1:500)
- Immunohistology (Formalin/paraffin)

Use Ab 1:100 - 1:400 for 30 min with LV's UltraVision

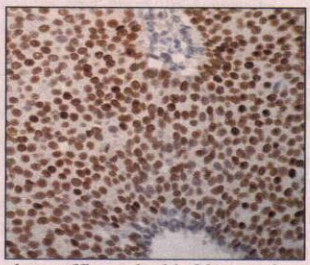
* Staining of formalin-fixed tissues REQUIRES boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0, (Cat. #AP-9003), for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Breast carcinomas, MCF-7
Cellular Localization: Nuclear
Supplied As:
Tissue culture supernatant with 15mM sodium azide.
or
Prediluted antibody which is ready-to-use for immunohistochemical staining.

Storage and Stability:

Store vial at 4^{0}C. When stored at 2-8^{0}C, this antibody is stable for 24 months. FITC-conjugated antibody is stable for 24 months when stored at below 0^{0}C.



Formalin-fixed, paraffin-embedded human breast carcinoma stained with **Estrogen Receptor** (Cat.#RM-9101-S) using peroxidase-conjugate and AEC. Note nuclear staining of tumor cells

References:

1. Cano G., et al. Estimation of Hormone Receptor Status in Fine-Needle Aspirates and Paraffin-embedded Sections from Breast Cancer Using the Novel Rabbit Monoclonal antibodies SP1 and SP2. Diagn Cytopathol, 2003 Oct; 29(4): 207 -11

2. Huang Z., et al. Novel Rabbit Monoclonal Antibody to Estrogen Receptor (Clone SP1): No Heat Pretreatment But Effective on Paraffin-embedded Tissue. (In press) Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, USA 2004

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Estrogen Receptor (Clone SP1)

Rabbit Monoclonal Antibody

Cat. #RM-9101-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml Supernatant)
Cat. #RM-9101-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)
Cat. #RM-9101-F0, -F1, or -F (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml) (FITC-Conjugated Antibody)
at. #RM-9101-PCL (0.1ml) (Positive Control for Western Blot)

completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

IVD DATA SHEET
Rev 090309E

Estrogen Receptor (SP1)

Catalog # RM-9101-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml)
Catalog # RM-9101-R7 (7.0ml)

INTENDED USE:

- ***For In Vitro Diagnostic Use:*** This product is intended for qualitative immunohistochemistry with normal and neoplastic formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, to be viewed by light microscopy.
- ***Description:*** Recognizes a protein of 67kDa, which is identified as estrogen receptor (ER) alpha. The ER gene consists of more than 140kb of genomic DNA divided into 8 exons, being translated into a protein with six functionally discrete domains, labeled A through F. This antibody strongly stains the nucleus of epithelial cells in breast carcinomas. The ER is an important regulator of growth and differentiation in the mammary gland. Presence of ER in breast tumors indicates an increased likelihood of response to anti-estrogen (e.g. tamoxifen) therapy.
- ***Expected Staining Pattern:*** Nuclear
- ***Positive Control:*** breast CA, MCF-7 cells

MATERIALS PROVIDED:

Estrogen Receptor (SP1) (refer to catalog number):

- #RM-9101-S (or -S0, -S1): Tissue culture supernatant, concentrated, with 0.09% Sodium Azide.
  or
- #RM-9101-R7: (7.0ml) of antibody prediluted in 0.05mol/L Tris-HCl, pH 7.6 containing stabilizing protein and 0.015mol/L sodium azide.

- ***Antibody Concentration:*** Not known
- ***Host:*** Rabbit
- ***Epitope:*** C-terminus
- ***Species Reactivity:*** Human, Mouse, and Hamster. Others not tested.
- ***Clone Designation:*** SP1
- ***Ig Isotype / Light Chain:*** Rabbit IgG
- ***Immunogen:*** Synthetic peptide derived from C-terminal of human estrogen receptor.
- ***Microbiological State:*** This product is not sterile.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED:

- ***Antibody Diluent:*** For concentrated antibodies, the antibody must be diluted before using. Use Lab Vision Antibody Diluent (catalog # TA-125-UD). Refer to diluent product instructions for use.
- ***Negative Control Reagent:*** Refer to the "General Protocol" instructions.
- ***Visualization System:*** Refer to the "General Protocol" instructions.

METHODS AND PROCEDURES:

Specimen Preparation	Refer to the "General Protocol" instructions.
Dilution of Concentrated Antibody	1:100 - 1:400 in antibody diluent
Tissue Section Pretreatment	Staining of formalin-fixed tissues REQUIRES boiling tissue sections in 10mM citrate buffer,pH 6.0, (Cat. #AP-9003), for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]
Primary Antibody Incubation Time	30 min at Room Temperature
Visualization	To detect antibody, follow the instructions provided with the visualization system.

STORAGE and STABILITY:

This product contains sodium azide and is stable for 24 months when stored at 2-8°C. Do not use after expiration date indicated on label of the product. If reagent is not stored as recommended, performance must be validated by the user.

REFERENCES:

1) Cano G., et al. Estimation of Hormone Receptor Status in Fine-Needle Aspirates and Paraffin-embedded Sections from Breast Cancer Using the Novel Rabbit Monoclonal antibodies SP1 and SP2. Diagn Cytopathol, 2003 Oct; 29(4): 207 -11
2) Huang Z., et al. Novel Rabbit Monoclonal Antibody to Estrogen Receptor (Clone SP1): No Heat Pretreatment But Effective on Paraffin-embedded Tissue. (In press) Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, USA 2004

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd..
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570

CE IVD

Manufactured by:
NeoMarkers
For

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627

Thermo SCIENTIFIC

Anexo G

RESEARCH USE ONLY DATA SHEET

Rev 090309J

Clinical customers please refer to IVD / ASR Data Sheet

Progesterone Receptor (Clone SP2)

Rabbit Monoclonal Antibody

Cat. #RM-9102-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml Supernatant)
Cat. #RM-9102-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)
at. #RM-9102-PCL (0.1ml) (Positive Control for Western Blot)

Description:

The progesterone receptor (PgR) is an estrogen-regulated protein. It has been proposed that expression of PgR determination indicates a responsive estrogen receptor (ER) pathway, and therefore, may predict likely response to endocrine therapy in human breast cancer. A number of studies have shown that PgR determination provides supplementary information to ER, both in predicting response to endocrine therapy and estimating survival. PgR has proved superior to ER as a prognostic indicator in some studies.

Comments: Clone SP2 is excellent for staining of formalin/paraffin with no special pretreatment.

Mol. Wt. Of Antigen: 116kDa+81kDa

Epitope: 412-526aa

Ig Isotype: Rabbit IgG

Species Reactivity: Human. Others not tested.

Clone Designation: SP2

Immunogen:

Recombinant protein encoding human progesterone receptor 412-526 aa.

Applications and Suggested Dilutions:

- Western Blotting (1:25)
- Immunohistology (Formalin/paraffin)

Use Ab 1:100 to 1:400 for 30 min with LV's UltraVision

* [Staining of formalin-fixed tissues is enhanced by boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0 for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Breast carcinomas, T47D cells

Cellular Localization: Nuclear

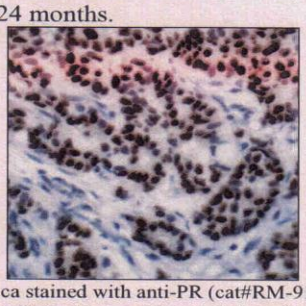
Supplied As: Tissue culture supernatant with 15mM sodium azide.

or

Prediluted antibody which is ready-to-use for immunohistochemical staining.

Storage and Stability:

Store vial at 4°C. When stored at 2-8°C, this antibody is stable for 24 months.



Human breast ca stained with anti-PR (cat#RM-9102) and DAB chromagen. Note strong nuclear staining of tumor cells.

References:

1. Novel rabbit monoclonal antibody to progesterone receptor (Clone SP2): No heat pretreatment but effective on paraffin-embedded tissue. Huang Z., et al. (Submitted) Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology.
2. Cano, G., et. al. Estimation of Hormone Receptor Status in fine-Needle Aspirates and Paraffin-embedded sections from Breast Cancer Using the Novel Rabbit Monoclonal antibodies SP1 and SP2. Diagn Cytopathol, 2003 Oct; 29(4):207-211.

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627

Progesterone Receptor (Clone SP2)

Rabbit Monoclonal Antibody

Cat. #RM-9102-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml Supernatant)
Cat. #RM-9102-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)
at. #RM-9102-PCL (0.1ml) (Positive Control for Western Blot)

potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

IVD DATA SHEET
Rev 090309K

Progesterone Receptor (SP2)

Catalog # RM-9102-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml)
Catalog # RM-9102-R7 (7.0ml)

INTENDED USE:

- ***For In Vitro Diagnostic Use:*** This product is intended for qualitative immunohistochemistry with normal and neoplastic formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, to be viewed by light microscopy.
- ***Description:*** The progesterone receptor (PgR) is an estrogen-regulated protein. It has been proposed that expression of PgR determination indicates a responsive estrogen receptor (ER) pathway, and therefore, may predict likely response to endocrine therapy in human breast cancer. A number of studies have shown that PgR determination provides supplementary information to ER, both in predicting response to endocrine therapy and estimating survival. PgR has proved superior to ER as a prognostic indicator in some studies.
- ***Expected Staining Pattern:*** Nuclear
- ***Positive Control:*** breast CA, T47D cells

MATERIALS PROVIDED:

Progesterone Receptor (SP2) (refer to catalog number):

- #RM-9102-S (or -S0, -S1): Tissue culture supernatant, concentrated, with 0.09% Sodium Azide.
  or
- #RM-9102-R7: (7.0ml) of antibody prediluted in 0.05mol/L Tris-HCl, pH 7.6 containing stabilizing protein and 0.015mol/L sodium azide.

- ***Antibody Concentration:*** Not known
- ***Host:*** Rabbit
- ***Epitope:*** 412-526aa
- ***Species Reactivity:*** Human. Others not tested.
- ***Clone Designation:*** SP2
- ***Ig Isotype / Light Chain:*** Rabbit IgG
- ***Immunogen:*** Recombinant protein encoding human progesterone receptor 412-526 aa.
- ***Microbiological State:*** This product is not sterile.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED:

- ***Antibody Diluent:*** For concentrated antibodies, the antibody must be diluted before using. Use Lab Vision Antibody Diluent (catalog # TA-125-UD). Refer to diluent product instructions for use.
- ***Negative Control Reagent:*** Refer to the "General Protocol" instructions.
- ***Visualization System:*** Refer to the "General Protocol" instructions.

METHODS AND PROCEDURES:

Specimen Preparation	Refer to the "General Protocol" instructions.
Dilution of Concentrated Antibody	1:100-1:400 in antibody diluent
Tissue Section Pretreatment	Staining of formalin-fixed tissues is enhanced by boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0 for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.
Primary Antibody Incubation Time	30 minutes at Room Temperature
Visualization	To detect antibody, follow the instructions provided with the visualization system.

STORAGE and STABILITY:

This product contains sodium azide and is stable for 24 months when stored at 2-8°C. Do not use after expiration date indicated on label of the product. If reagent is not stored as recommended, performance must be validated by the user.

REFERENCES:

1) Novel rabbit monoclonal antibody to progesterone receptor (Clone SP2): No heat pretreatment but effective on paraffin-embedded tissue. Huang Z., et al. (Submitted) Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology.
2) Cano, G., et. al. Estimation of Hormone Receptor Status in fine-Needle Aspirates and Paraffin-embedded sections from Breast Cancer Using the Novel Rabbit Monoclonal antibodies SP1 and SP2. Diagn Cytopathol, 2003 Oct; 29(4):207-211.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd..
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570

CE IVD

Manufactured by:
NeoMarkers
For

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627

Thermo SCIENTIFIC

Anexo H

RESEARCH USE ONLY DATA SHEET

Rev 090309B

Clinical customers please refer to IVD / ASR Data Sheet

*c-erb*B-2 / *HER*-2 / *neu* (Clone SP3)

Rabbit Monoclonal Antibody

Cat. #RM-9103-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml Supernatant)
Cat. #RM-9103-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Description:

*c-erb*B-2 is a receptor tyrosine kinase of the *c-erb*B family. It is closely related instructure to the epidermal growth factor receptor. *c-erb*B-2 oncoprotein is detectable in a proportion of breast and other adenocarconomas, as well as transitional cell carcinomas. In the case of breast cancer, expression determined by immunohistochemistry has been shown to be associated with poor prognosis.

Comments: Clone SP3 is excellent for staining of formalin/paraffin.

Mol. Wt. Of Antigen: 185kDa

Epitope: Extracellular domain

Ig Isotype: Rabbit IgG

Species Reactivity: Human. Others not tested.

Clone Designation: SP3

Immunogen:

Recombinant protein encoding extracellular domain of human *c-erb*B2

Applications and Suggested Dilutions:

- Immunohistology (Formalin/paraffin)

(Use Ab 1:100 for 30 min with LV's UltraVision)

[Staining of formalin-fixed tissues requires boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0 for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Breast carcinomas

Cellular Localization: Cell membrane

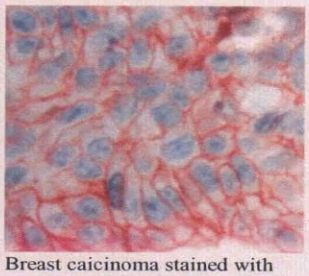
Supplied As:

Tissue culture supernatant with 15mM sodium adize.

or

Prediluted antibody which is ready-to-use for immunohistochemical staining.

Storage and Stability: Store vial at 4^0C. When stored at 2-8^0C, this antibody is stable for 24 months.



Breast caicinoma stained with anti-c-erbB2 (clone SP3) Cat#RM-9103-S

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

IVD DATA SHEET
Rev 090309(

c-erbB-2 / HER-2 / neu

Catalog # RM-9103-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml)
Catalog # RM-9103-R7 (7.0ml)

INTENDED USE:

- ***For In Vitro Diagnostic Use:*** This product is intended for qualitative immunohistochemistry with normal and neoplastic formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, to be viewed by light microscopy.
- ***Description:*** c-erbB-2 is a receptor tyrosine kinase of the c-erbB family. It is closely related instructure to the epidermal growth factor receptor. c-erbB-2 oncoprotein is detectable in a proportion of breast and other adenocarconomas, as well as transitional cell carcinomas. In the case of breast cancer, expression determined by immunohistochemistry has been shown to be associated with poor prognosis.
- ***Expected Staining Pattern:*** Cell membrane
- ***Positive Control:*** breast CA

MATERIALS PROVIDED:

c-erbB-2 / HER-2 / neu (refer to catalog number):

- #RM-9103-S (or -S0, -S1): Tissue culture supernatant, concentrated, with 0.09% Sodium Azide.
  or
- #RM-9103-R7: (7.0ml) of antibody prediluted in 0.05mol/L Tris-HCl, pH 7.6 containing stabilizing protein and 0.015mol/L sodium azide.

- ***Antibody Concentration:*** Not known
- ***Host:*** Rabbit
- ***Mol. Wt. of Antigen:*** 185kDa
- ***Epitope:*** Extracellular domain
- ***Species Reactivity:*** Human. Others not tested.
- ***Clone Designation:*** SP3
- ***Ig Isotype / Light Chain:*** Rabbit IgG
- ***Immunogen:*** Recombinant protein encoding extracellular domain of human c-erbB2
- ***Microbiological State:*** This product is not sterile.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED:

- ***Antibody Diluent:*** For concentrated antibodies, the antibody must be diluted before using. Use Lab Vision Antibody Diluent (catalog # TA-125-UD). Refer to diluent product instructions for use.
- ***Negative Control Reagent:*** Refer to the "General Protocol" instructions.
- ***Visualization System:*** Refer to the "General Protocol" instructions.

METHODS AND PROCEDURES:

Specimen Preparation	Refer to the "General Protocol" instructions.
Dilution of Concentrated Antibody	1:100 in antibody diluent
Tissue Section Pretreatment	Staining of formalin-fixed tissue sections requires treating the tissue sections in boiling 10mM citrate buffer, pH 6.0 (Lab Vision catalog # AP-9003), for 10-20 minutes followed by cooling at room temperature for 20 min.
Primary Antibody Incubation Time	30 minutes at Room Temperature
Visualization	To detect antibody, follow the instructions provided with the visualization system.

STORAGE and STABILITY:

This product contains sodium azide and is stable for 24 months when stored at 2-8°C. Do not use after expiration date indicated on label of the product. If reagent is not stored as recommended, performance must be validated by the user.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd..
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570

CE IVD

Manufactured by:
NeoMarkers
For

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627

Thermo SCIENTIFIC

Anexo I

UltraVision LPValue Large Volume Detection System HRP Polymer (Ready-To-Use)

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

AVAILABILITY:

Catalog #	Slide Volume
TL-060-HLS	300-600 slides
TL-125-HLS	625-1250 slides

SPECIFICITY: Anti-Mouse IgG (H+L), Anti-Rabbit IgG (H+L)
ENZYME: Peroxidase
CHROMOGEN/SUBSTRATE: None provided

REAGENTS

Qty.	Component	TL-060-HLS	TL-125-HLS
1	Ultra V Block	TA-060-UB	TA-125-UB
1	Value Primary Antibody Enhancer	TL-060-PBS	TL-125-PBS
1	Value HRP Polymer	TL-060-PHS	TL-125-PHS

(The three-digit number in the middle of each Catalog # designates the reagent volume in mL or number of tablets.)

DESCRIPTION

UltraVision LPValue is the latest technology in polymeric labeling. Polymer detection methods have been shown to provide increased sensitivity and detection simplicity. This third-generation polymer system is composed of smaller polymer subunits that minimize conflicts in binding the target protein. Decreased binding conflicts result in more consistent staining and better signal amplification.[1] Ultimately, this gives the user higher sensitivity and antibody efficiency.[2] With UltraVision LPValue, you use less antibody and obtain better signal-to-noise ratios. UltraVision LPValue is also biotin-free, which eliminates background staining found with traditional biotin-based detection methods.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

This UltraVision detection system detects a specific mouse IgG or rabbit IgG antibody bound to an antigen in tissue sections. The specific antibody is located by a universal secondary antibody formulation conjugated to an enzyme-labeled polymer that recognizes mouse and rabbit immunoglobulins. The polymer complex is then visualized with an appropriate substrate/chromogen.

WARNINGS & PRECAUTIONS

Refer to MSDS.

STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. Each component is stable for 18 months.

MICROBIOLOGICAL STATE

Product(s) not sterile.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Primary antibody. Diluent.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826
http://www.thermo.com/labvision

CE IVD

Manufactured by:
LabVision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

1. PRODUCT INFORMATION

Product: HRP Polymer

Catalog #: TL-XXX-PHS

Included in the following kits: TL-XXX-HAS, TL-XXX-HDS, TL-XXX-HLS

2. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Component	CAS No.	Percent
2-Methyl-4-isothiazolin-3-one	2682-20-4	<0.1%

Remainder of composition consists of non-hazardous ingredients.

3. HAZARDS IDENTIFICATION

Symptoms of overexposure to the preservative used in this product may include skin, eye, mucous membrane and upper respiratory tract irritation. Systemic allergic reactions are possible in sensitive individuals. Irritant to eyes, respiratory system, and skin.

4. FIRST AID MEASURES

Seek medical attention immediately.
Eye Contact: Flush eyes with copious amounts of water for at least 15 minutes. Assure adequate flushing by separating eyelids with fingers.
Skin Contact: Remove contaminated clothing and shoes. Flush skin with copious amounts of water for at least 15 minutes. Wash contaminated clothing before reuse.
Ingestion: Wash out mouth with water provided person is conscious. Do not give anything by mouth if victim is unconscious. Contact local poison control center.
Inhalation: Remove victim to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen.

5. FIREFIGHTING MEASURES

Extinguishing Media: Extinguish using suitable agents appropriate for surrounding areas as per user's firefighting prevention plan.
Fire and Explosion Hazards: Emits toxic fumes under fire conditions. Thermal decomposition, such as that in fire conditions, may produce toxic fumes of hydrogen chloride, oxides of nitrogen, and sulfur.
Firefighting Procedures: Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing. Move container from fire area if possible. Do not scatter spilled material with more water than needed for fire control. Avoid breathing hazardous vapors.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Wear personal protective equipment, such as rubber gloves and boots, respirators, and goggles to prevent contact with self and others. Use paper towels or absorbent materials to absorb spills.

7. HANDLING AND STORAGE

Handling: See Section 8.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Storage: See Instructions For Use.

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

Eye Protection: Wear goggles or safety glasses. Use eyewash if necessary.
Skin Protection: Wear latex or vinyl gloves. Wash hands thoroughly after handling.
Respiratory Protection: Wear respirator and avoid inhalation.
Ventilation: Use in well-ventilated laboratory.
Other Protective Equipment: Use lab coat to prevent contact with skin and clothing.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Appearance: Clear, light yellow liquid
Odor: No odor
pH: N/A
Boiling point: N/A
Flash point: N/A

10. STABILITY AND REACTIVITY

Stability: See Instructions For Use.
Conditions/Materials to avoid: Light; Oxidizing reagents; Bases; Avoid elevated temperatures, sparks, open flame, all ignition sources, and incompatible materials.
Hazardous decomposition: Carbon monoxide, Carbon dioxide, and Nitrogen oxides

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated.

12. ECOLOGICAL INFORMATION

No information available at this time.

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Dispose in accordance with all applicable federal, state, and local environmental regulations.

14. TRANSPORT INFORMATION

Please see product label to ensure proper transportation parameters such as temperature.

15. REGULATORY INFORMATION

No information available at this time.

16. OTHER INFORMATION

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties, or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. Lab Vision is not liable for any property damage, personal injury, time or effort, or economic loss caused by our products.

N/A = Not Available

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
47777 Warm Springs Blvd.
Fremont, CA 94539, USA
Tel: 1-510-991-2800
Fax: 1-510-991-2826

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Thermo SCIENTIFIC

Anexo J

DAB Plus Substrate System

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

AVAILABILITY:

Catalog #	Volume
TA-060-HDX (600 slides)	2 ml DAB Plus Chromogen (TA-002-HCX) 60 ml DAB Plus Substrate (TA-060-HSX)
TA-125-HDX (1250 slides)	4 ml DAB Plus Chromogen (TA-004-HCX) 125 ml DAB Plus Substrate (TA-125-HSX)

DESCRIPTION

3,3' Diaminobenzidine (DAB) is a widely used chromogen for immunohistochemical staining and immunoblotting. In the presence of peroxidase enzyme, DAB produces a brown precipitate that is insoluble in alcohol. This product is available in a two component form consisting of a liquid, refrigerator stable DAB Plus Chromogen and DAB Plus Substrate. The standard working dilution is 20 µl of DAB Plus Chromogen per 1ml of DAB Plus Substrate, although the ratio can be adjusted as desired. The use of liquid components reduces some risks associated with the handling of powders (i.e. dust inhalation) and eliminates waste, which often results from using tablets that require a predetermined final volume. Once the two components are combined, the reagent can be used for up to twenty-four hours, making it ideal for automated stainers.

WARNINGS & PRECAUTIONS

Refer to MSDS.

STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. Each component is stable for 18 months.

MICROBIOLOGICAL STATE

Product(s) not sterile.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

N/A

SPECIMEN & REAGENT PREPARATION

Refer to Procedure.

PROCEDURE

1. Combine 1 drop (40 µl) of DAB Plus Chromogen with each 2 ml of DAB Plus Substrate.
2. Apply mixture to tissue section.
3. Incubate tissue section for 5-15 minutes.
4. Rinse tissue, counterstain, dehydrate, clear in xylene or xylene substitute, and coverslip.

TROUBLESHOOTING

Please contact Thermo Fisher Scientific Technical Support by phone (1-510-991-2800 or 1-800-828-1628) or by email (lab.reagents@thermofisher.com).

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

CE IVD

Manufactured by:
LabVision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

1. PRODUCT INFORMATION

Product: DAB Plus Chromogen

Catalog #: TA-XXX-HCX

Included in the following kits: TA-XXX-HDX, TP-XXX-HDX, TL-XXX-HD, TL-XXX-HDS, TM-015-HD, TR-015-HD, TP-015-HD, TQ-015-HD, TL-XXX-HDJ

2. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Component	CAS No.	Percent
Propylene Glycol	57-55-6	

Remainder of composition consists of non-hazardous ingredients.

3. HAZARDS IDENTIFICATION

May cause irritation to skin and eyes.

4. FIRST AID MEASURES

Seek medical attention immediately.
Eye Contact: Flush eyes with copious amounts of water for at least 15 minutes. Assure adequate flushing by separating eyelids with fingers.
Skin Contact: Remove contaminated clothing and shoes. Flush skin with copious amounts of water for at least 15 minutes. Wash contaminated clothing before reuse.
Ingestion: Wash out mouth with water provided person is conscious. Do not give anything by mouth if victim is unconscious. Contact local poison control center.
Inhalation: Remove victim to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen.

5. FIREFIGHTING MEASURES

Extinguishing Media: Extinguish using suitable agents appropriate for surrounding areas as per user's firefighting prevention plan.
Fire and Explosion Hazards: N/A
Firefighting Procedures: Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing. Move container from fire area if possible. Do not scatter spilled material with more water than needed for fire control. Avoid breathing hazardous vapors.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Wear personal protective equipment, such as rubber gloves and boots, respirators, and goggles to prevent contact with self and others. Use paper towels or absorbent materials to absorb spills.

7. HANDLING AND STORAGE

Handling: See Section 8.
Storage: See Instructions For Use.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

Eye Protection: Wear goggles or safety glasses. Use eyewash if necessary.
Skin Protection: Wear latex or vinyl gloves. Wash hands thoroughly after handling.
Respiratory Protection: Wear respirator and avoid inhalation.
Ventilation: Use in well-ventilated laboratory.
Other Protective Equipment: Use lab coat to prevent contact with skin and clothing.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Appearance: Brown tint
Odor: No odor
pH: N/A
Boiling point: N/A
Flash point: N/A

10. STABILITY AND REACTIVITY

Stability: See Instructions For Use.
Conditions/Materials to avoid: Strong Oxidizers; Strong Acids; Avoid elevated temperatures, sparks, open flame, all ignition sources, and incompatible materials.
Hazardous decomposition: N/A

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated.

12. ECOLOGICAL INFORMATION

No information available at this time.

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Dispose in accordance with all applicable federal, state, and local environmental regulations.

14. TRANSPORT INFORMATION

Please see product label to ensure proper transportation parameters such as temperature.

15. REGULATORY INFORMATION

No information available at this time.

16. OTHER INFORMATION

No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties, or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

Our warranty is limited to the actual price paid for the product. Lab Vision is not liable for any property damage, personal injury, time or effort, or economic loss caused by our products.

N/A = Not Available

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

Manufactured by:
LabVision Corporation

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627

Thermo SCIENTIFIC

Anexo K

Large Volume Phosphate Buffered Saline (25X)

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

AVAILABILITY:

Catalog #	Volume
TA-125-PB	125 ml

DESCRIPTION

Phosphate Buffered Saline has been formulated in a 25X concentration for use as a wash buffer for immunolabeling techniques.

WARNINGS & PRECAUTIONS

Refer to MSDS.

STORAGE & SHELF LIFE

Store Phosphate Buffered Saline at room temperature.

- Concentrate is stable for 24 months from date of manufacture.
- Diluted solution should be used within one week. If solution becomes cloudy, discard and make fresh solution.

NOTE: The salts in the 25X solution are highly concentrated.

- Temperatures below 44 degrees F (6 degrees C) may cause the salts to precipitate.
- If this occurs, stir the solution at room temperature for about 30 minutes to re-dissolve the salts (use an alcohol-cleaned stir-bar to prevent bacterial contamination).

MICROBIOLOGICAL STATE

Product(s) not sterile.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

N/A

SPECIMEN & REAGENT PREPARATION

Refer to Procedure.

PROCEDURE

To make a 1X PBS solution dilute concentrate 25X with distilled water.

- Use 40 ml PBS concentrate per 960 ml distilled water
- Measure and pour appropriate volume of 25X PBS concentrate into a mixing flask and add DI water to final volume.
- Stir briefly.

The 1X solution should be pH 7.6 ± 0.2.

- The pH of the solution may require slight adjustment.
- Adjust pH with 1N HCl (if pH is high) or 1N NaOH (if pH is low).

Diluted solution should be used within one week. If solution becomes cloudy, discard and make fresh solution.

REFERENCES

N/A

TROUBLESHOOTING

Please contact Thermo Fisher Scientific Technical Support by phone (1-510-991-2800 or 1-800-828-1628) or by email (lab.reagents@thermofisher.com).

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
http://www.thermo.com/labvision

CE IVD

Manufactured by:
LabVision Corporation

EC REP

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

ANEXO L

CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA Y LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES (ER-PR) Y SOBRE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER2/NEU

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nº Sistema HUS
Nº Interno HUS
Nº Bloque externo

INFORMACIÓN DEL PACIENTE

1. 1er Apellido | 2º Apellido | Apellido de casada | 1er Nombre | 2º Nombre
2. (dd / mm / aaaa) Fecha de nacimiento | Municipio | Departamento | Edad cumplida (años) | Sin datos
3. Identificación 1 2 3 4 5 — CC CE TI Otro S/D | Número | Institución fuente de la información/IPS/MD

DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

4. Dirección | Barrio | Municipio | Departamento
5. Estrato 1 2 3 4 5 6 | Tel.Fijo | Celular
6. Talla de Brasier | Raza: Blanca 1 Mestiza 2 Negra 3 SD 4
7. Estado civil: S/D 0 Soltera 1 Casada 2 Divorciada 3 Unión Libre 4 Viuda 5
8. Escolaridad: S/D 0 Ninguna 1 Primaria 2 Bachiller 3 Universitaria 4
9. Ocupación | Salario SMLV ($433.699) 0-1 1 1-2 2 2-4 3 4-8 4 >8 5 D 6
10. Cobertura médica: Sisbén 1 | Nivel | EPS 2 | No tiene 3 | Otra 4
11. Clase de afiliación: Cotizante 1 Beneficiario 2 | Cuál

ANTECEDENTES

12. Menarquia ____ años | Gestación | Partos | Abortos | RN muerto
13. Edad 1er embarazo ____ años | Lactancia Materna: No 0 Si 1
Hijo 1 ____ meses | Hijo 2 ____ meses | Hijo 3 ____ meses | Hijo 4 ____ meses | Hijo 5 ____ meses
14. FUR dd / mm / aaaa | Ha recibido tratamiento hormonal para la menopausia: N 0 S 1 N/A 2
Medicamento: Estrógenos 1 Progestina 2 Otro 3 | Por cuánto tiempo

15. Familiares con cáncer	Padre	Madre	Abuelas	Tías	Hermanas	Primas	Observación
No	0	0	Mat 0 Pat 0	0	0	0	
Si	1	1	1 1	1	1	1	
Sin datos	2	2	2 2	2	2	2	
Cuántos							
Localización							
Edad (años) de Dx							

16. Antecedentes de Cáncer No 0 Si 1 | Ubicación: Mama 1 Ovario 2 Útero 3 Otro 4

AYUDAS DIAGNÓSTICAS Y ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

17. Estudio por mamografía: No 0 Si 1 | Último año 1 | Año anterior 2 | Más de 2 años 3
Resultado S/D 0 Normal 1 Alterada 2 | BIRADS 0 I II III IV V VI
18. Estudio Histopatológico | Material anatomopatológico: B. Trucut 1 B. Incisional 2 B. Excisional/Lumpectomía 3
Cuadrantectomía 4 Mastectomía simple 5 Mastectomía Radical Modificada + Vaciamiento axilar 6
Mama: Der 1 Izq 2 NR 3 | Lab. Patología | Fecha de solicitud
19. Clasificación general: CIS 1 CI 2 Tumor Filoides 3
20. Clasif. HP: Comedo 1 C.Cribiforme 2 C.Sólido 3 C.Papilar 4 C.Micropapilar 5 E.Paget 6 CLIS 7
CDI 8 CLI 9 C.Medular 10 C.Mucinoso 11 C.Tubular 12 C.Papilar 13 C.Metaplásico 14
C. Escamoso 15 C. Inflamatorio 16 C. Secretor 17
21. F. Túbulos 1 2 3 G. Nuclear 1 2 3 C.Mitótico 1 2 3 Scarf Bloom Richardson
GDT: Bien 1 Moderado 2 Mal 3 | Se observa cambios post tratamiento N 0 S 1 NR 2 SD 3
22. Estudios IHQ: ER 0 1 % CxI. NSO 1 No 2 Si 3 Her2 neu 0 1 2 3
PR 0 1 % CxI. NSO 1 No 2 Si 3 SS. FISH 0 1 SH 0 1
22. Otros estudios de IHQ | Resultados
23. Ha recibido tratamiento No 0 Si 1 SD 2
24. Tipo de tratamiento: Quimioterapia 1 QT neoadyuvante 2 Radioterapia 3 Cirugia 4
Fecha del tratamiento
25. Medicamento: Tamoxifen/Toremifen N 0 Si 1 SD 2 Herceptin No 0 Si 1 SD 2
26. Estado actual del paciente: Vivo 1 Fallecido 2 SD 3 Fecha de defunción

Diligenciado por *Olga Teresa Anteliz Beltrán* | Fecha diligenciamiento dd / mm / aaaa

ANEXO M

RELACIÓN ENTRE EL GRADO DE ANGIOGÉNESIS, PRESENCIA DE RECEPTORES HORMONALES Y SOBREEEXPRESIÓN DEL RECEPTOR HER-2 NEU, EN EL CARCINOMA INFILTRANTE DE GLÁNDULA MAMARIA DE BIOPSIAS ANALIZADAS EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Y EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada Paciente:

Los investigadores del proyecto de investigación *"Relación entre el Grado de Angiogénesis, Presencia de Receptores Hormonales y Sobreexpresión del Receptor Her-2 Neu, en el Carcinoma Infiltrante de Glándula Mamaria de Biopsias Analizadas en el Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander y el Hospital Universitario de Santander"* realizado por miembros del Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander (UIS), nos permitimos solicitarle su participación en esta investigación, la cual pretende establecer si el número de venas que hay en el cáncer que se detectó en su seno, tiene algo que ver con el hecho de que este mismo cáncer tenga o no receptores hormonales. Estos receptores hormonales, son pequeñas bocas en el tumor, a las cuales les llegan las hormonas que usted produce como mujer. También se quiere saber si esas venas, se relacionan con el hecho de que en su tumor haya o no otra boca adicional que podría ayudar al crecimiento de la masa, ésta se llama receptor Her 2 neu. Con lo anterior podríamos conocer el comportamiento del cáncer mamario en las pacientes de nuestra región. Su participación será de valiosa ayuda para una mejor comprensión de esta enfermedad.

El cáncer mamario es uno de los más frecuentes del mundo y en éste momento se tienen conocimientos avanzados sobre las alteraciones que se producen, éstas se identifican por medio de una técnica especial que se llama **imnunohistoquímica** con la que se detecta la presencia de los receptores hormonales, que son como bocas en el tumor que se comen las hormonas que normalmente producen las mujeres, provocando que el tumor se alimente y crezca. Además, se puede conocer si el crecimiento del tumor va a un ritmo lento o rápido y si hay aumento en el número de venas que alimentan el tumor. El hallazgo o ausencia de éstas características, tienen significado para elegir el tratamiento hormonal y de quimioterapia.

Al inicio de la participación en este estudio, se le realizará una encuesta con el fin de recolectar la información con respecto a su identificación, y antecedentes médicos y hereditarios orientada a la obtención de información sobre los factores de riesgo presentes y la valoración clínica de la enfermedad. Si usted decide participar en el estudio, se le realizarán las pruebas de inmunohistoquímica (pruebas especiales) al tejido que le extrajeron y con el cual hicieron el diagnóstico de cáncer. Si usted ya tiene los resultados de los estudios histopatológicos se le solicitará autorización para la utilización de los bloques de parafina al cual se le realizará los estudios de inmunohistoquímica.

La duración de este estudio es de 18 meses, su participación ocurre una sola vez al determinar si tiene pocas o muchas venas formadas en el tejido tumoral y si tiene las bocas mencionadas anteriormente. Su participación es completamente voluntaria y no implica ningún costo para usted, como tampoco habrá compensación económica alguna. Los miembros del grupo investigador están en disposición de brindarle ahora y en el futuro cualquier información o pregunta que le surja acerca del estudio y los procedimientos.

La información generada por este estudio es estrictamente confidencial y se mantendrá su privacidad. La información del estudio no será utilizada para generar beneficios económicos. Usted es libre de rehusar a participar en esta investigación en cualquier momento sin que esto conlleve a cambios en su futuro cuidado.

Usted tiene derecho a conocer los resultados de los análisis realizados cuando lo desee, así como solicitar que no sean incluidos en las conclusiones del trabajo. De igual forma el investigador podrá tomar la decisión de retirarla del estudio si lo considera conveniente.

PARTICIPANTE

Yo _____ Firma _____

Cédula No. _____ de _____

He leído y recibido copia del presente consentimiento informado. Habiendo comprendido el significado de la investigación declaro estar debidamente informada y consiento en participar en este el estudio. Además, si es necesario los resultados de mis pruebas serán entregados a mi médico personal

Ciudad: _____ Fecha: _____

TESTIGOS

Nombre _____ Firma _____

Nombre:_____ Firma _____

Ciudad: _____ Fecha: _____

INVESTIGADOR QUE BRINDA EL CONSENTIMIENTO.

Nombre:_____ Firma _____

Ciudad: _____ Fecha: _____