

EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES PTEN Y
HER2/NEU EN ENDOMETRIOS NORMALES
DURANTE LAS FASES DEL CICLO MENSTRUAL.

DR. RICARDO GARCÍA PINO.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
BUCARAMANGA

2015

EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES PTEN Y HER2/NEU EN
ENDOMETRIOS NORMALES DURANTE LAS FASES DEL
CICLO MENSTRUAL.

DR. RICARDO GARCÍA PINO

Trabajo de Investigación presentado

Como requisito para optar al título de médico especialista en patología

Director

ERNESTO GARCIA AYALA

Médico Especialista en Patología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
BUCARAMANGA
2015

DEDICATORIA

*Le dedico esta investigación a todos los que me permitieron estudiar la excelente
especialización en patología.*

*Si no estuviera estudiando patología, estaría en algún oscuro laboratorio creando
un ejército de Zombis con el cual dominar el planeta.*

Aunque no prometo no hacerlo más adelante.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y ENFOQUE DEL PROYECTO	14
2. ASPECTOS ÉTICOS	19
3. OBJETIVOS	22
4. OBJETIVO GENERAL	23
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. HISTOLOGÍA DEL ENDOMETRIO	25
7. FISIOLÓGIA Y PATOLOGÍA MOLECULAR DEL HER2/NEU	28
8. EL HER2/NEU EN EL ENDOMETRIO	34
9. FISIOLÓGIA Y PATOLOGÍA MOLECULAR DEL PTEN	36
10. PTEN EN EL ENDOMETRIO	40
11. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	43
12. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	44
13. DETERMINACIÓN DE LA VARIABLE "FASE DEL CICLO MENSTRUAL" - EVALUACIÓN DE LA FASE DEL CICLO Y DE LA EDAD DEL ENDOMETRIO	46
14. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL HER2/NEU	52
15. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PTEN	58
16. MATERIALES Y MÉTODOS	61
17. RESULTADOS	63
18. DISCUSIÓN	73

19. CONCLUSIONES	75
CITAS BIBLIOGRAFICAS	77
BIBLIOGRAFIA	85

LISTA DE IMÁGENES, TABLAS Y ESQUEMAS.

	Pág.
FIGURA 1. MUCOSA DE COLON.....	16
FIGURA 2. PARTES FUNCIONALES DEL ENDOMETRIO.....	27
FIGURA 3: RECEPTORES DE TIPO HER.....	29
FIGURA 4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL HER2.....	32
FIGURA 5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL PTEN.....	38
FIGURA 6. EJEMPLOS DE CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	45
FIGURA 7. ENDOMETRIO PROLIFERATIVO.....	48
FIGURA 8: ENDOMETRIO SECRETOR Y MENSTRUAL.....	51
FIGURA 9: HER2/NEU EN TUMORES DE ENDOMETRIO.....	55
FIGURA 10. CONTROL DEL HER2/NEU.....	57
FIGURA 11. INTERPRETACIÓN DEL PTEN.....	60
FIGURA 12: FASES DE LAS MUESTRAS ENDOMETRIALES.....	65
FIGURA 13. REACTIVIDAD DEL HER2/NEU EN LAS MUESTRAS.....	66
FIGURA 14. REACTIVIDAD DEL PTEN EN LA FASE MENSTRUAL.....	66
FIGURA 15. REACTIVIDAD DEL PTEN EN LA FASE PROLIFERATIVA Y EN EL ESTROMA.....	67
FIGURA 16. AUSENCIA DE REACTIVIDAD DEL PTEN EN ENDOMETRIOS SECRETORES.....	68
FIGURA 17. REACTIVIDAD DEL PTEN EN ENDOMETRIO PROLIFERATIVO.....	69
TABLA 1: CICLO MENSTRUAL NORMAL CON CAMBIOS MORFOLÓGICOS.....	47
ESQUEMA 18.1. PROPORCIÓN DE FASES DEL CICLO MENSTRUAL EN LAS MUESTRAS INCLUIDAS.....	70
ESQUEMA 18.2. SITIOS DE EXPRESIÓN DEL PTEN.....	70

ESQUEMA 3. REACTIVIDAD DEL PTEN EN MUESTRAS EN FASE PROLIFERATIVA .	71
ESQUEMA 4. REACTIVIDAD DEL PTEN EN MUESTRAS EN FASE SECRETORA .	71
ESQUEMA 5. REACTIVIDAD DEL PTEN EN MUESTRAS EN LA FASE MENSTRUAL	72

RESUMEN

TÍTULO: EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES PTEN Y HER2/NEU EN
ENDOMETRIOS NORMALES DURANTE LAS FASES DEL CICLO MENSTRUAL *

AUTOR: RICARDO GARCÍA PINO **

PALABRAS CLAVE: PTEN, HER2/NEU, ENDOMETRIO, CICLO MENSTRUAL.

DESCRIPCIÓN: Se ha identificado el gen PTEN y el gen HER2/Neu como mutaciones importantes en los carcinomas endometrioides y serosos de endometrio respectivamente. En el presente estudio se investigó la expresión por medio de inmunohistoquímica de la porción funcional del PTEN y del HER2/Neu en endometrios normales en diferentes fases del ciclo menstrual para determinar los patrones normales de los mismos. Se obtuvieron 28 muestras de endometrios, 13 de las cuales eran proliferativos, 13 en la fase secretora y 2 en la fase menstrual y se realizó la técnica de inmunohistoquímica observando que no hubo expresión inmunofenotípica de HER2/Neu en ninguno de los endometrios normales y la mayor proporción de expresión inmunofenotípica de la fracción funcional del PTEN ocurrió en los endometrios secretores y menstruales. Esto se traduce en una expresión epitelial del 16.7% (n = 13) de los endometrios en fase proliferativa, en el 66.6% de los epitelios en la fase secretora (n = 13) y en el 100% de los epitelios en la fase menstrual (n = 2) Hubo dos muestras, una en fase proliferativa y otra en fase secretora (8.3% respectivamente), con expresión en el estroma endometrial, sin expresión concomitante en el epitelio. Estos hallazgos son sugestivos de que la expresión del HER2/Neu en endometrios normales es patológica y debe indicar la búsqueda de un carcinoma seroso intraepitelial de endometrio

* Trabajo de grado

** Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Patología. Director: Ernesto García Ayala, Médico Patólogo.

y que la expresión del PTEN está inhibida en la fase proliferativa de la menstruación para permitir la proliferación del endometrio.

ABSTRACT

TITLE: EXPRESION OF THE PTEN AND HER2/NEU ONCOGENES IN NORMAL ENDOMETRIA DURING THE MENSTRUAL PHASES.¹

AUTHOR: RICARDO GARCÍA PINO²

KEYWORDS: PTEN, HER2/NEU, ENDOMETRIUM, MENSTRUAL CYCLE.

DESCRIPTION: The genes PTEN and HER2/Neu had been identified as important mutations in the endometrioid and serous types of carcinomas of the endometrium, respectively. In the present study, a research was conducted through immunohistochemistry for the expression of the functional portion of PTEN and HER2/Neu in normal endometria during different menstrual cycles in order to determine their normal expression patterns. 28 endometrial samples were retrieved, 13 of those were proliferative, 13 were secretory and 2 were menstrual and the immunohistochemistry technique was performed, in which it was observed that there was no immunophenotypical expression of HER2/Neu in none the normal endometria and that the vast proportion of immunophenotypical expression of the functional fraction of PTEN occurred in the secretory and menstrual endometrium. This means an epithelial expression of 16.7% (n = 13) of the endometriums in the proliferative phase, in the 66.6% of the epithelium of the secretory phase (n = 13) and in 100% of the epithelium of the menstrual phase. There were two samples, one in the proliferative phase and another in the secretory phase (8.3% respectively), with expression in the endometrial stromal without concurrent expression in the epithelium. These findings suggest that the expression of HER2/Neu in normal endometria is pathological and must dictate a search for an intraepithelial serous carcinoma and that the PTEN expression is inhibited during the proliferative phase of the menstrual cycle to allow the endometrium to proliferate.

¹ Bachelor Thesis

² Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Patología. Director: Ernesto García Ayala, Médico Patólogo.

INTRODUCCIÓN

Este proyecto hace parte del grupo Patología estructural funcional y Clínica de la UIS PATUIS, liderado por el doctor Ernesto García Ayala y está dentro de la línea de patología quirúrgica en el área de patología quirúrgica del endometrio. Así como este proyecto tiene objetivos propios inherentes, también tiene el objetivo de aumentar la línea de investigación realizada hasta el momento por dicho grupo.

En torno al grupo de investigación, este proyecto es el primero en su tipo en el departamento de patología de la UIS, ya que su interés específico es adentrarse en el terreno de la patología molecular.

La presente investigación tiene como fin la observación de tejidos no patológicos. La patología siempre ha sido el puente que correlaciona la célula y el tejido sano con su enfermedad, es por esto que no puede limitarse solamente a los tejidos enfermos y debe extenderse también a los tejidos sanos, para poder realizar una correlación entre ambos.

Específicamente hablando, los dos tipos de carcinoma de endometrio más frecuentes son el adenocarcinoma endometriode de endometrio y el carcinoma seroso de endometrio. El primero tiene bien establecido la pérdida de la función del PTEN como un evento importante en la tumorigénesis y el segundo tiene igualmente establecida la mutación del p53 como el evento inicial de la

tumorigénesis y como segundo evento que desencadena una espiral sin freno al desarrollo del carcinoma seroso, la amplificación del HER2/Neu.

Por lo tanto, en este estudio se decidió estudiar por medio de la inmunohistoquímica la expresión del PTEN y del HER2/Neu en endometrios normales y establecer sus patrones. Estos patrones pueden correlacionarse en un futuro estudio con los endometrios que ya presentan hiperplasia endometrial y posteriormente en el carcinoma de endometrio. Esto permitirá observar si existen cambios tempranos solo expresados por el inmunofenotipo de las células que sean francamente premalignos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y ENFOQUE DEL PROYECTO

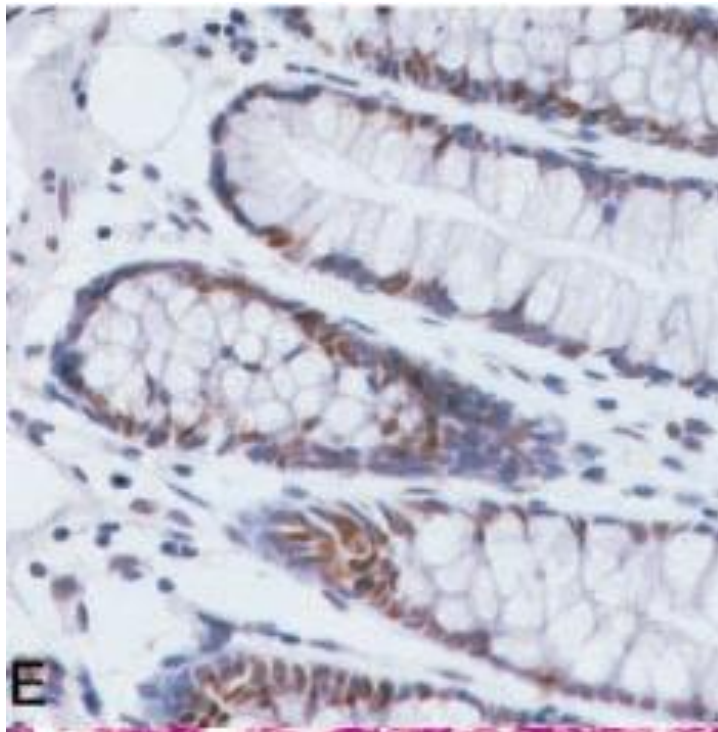
En el laboratorio de patología se han presentado avances tecnológicos muy útiles en cuanto al diagnóstico de las lesiones premalignas. Esto ocurrió inicialmente con el uso de la citología cérvico-uterina para demostrar cambios en las células escamosas que podían predecir con precisión la aparición de un carcinoma escamocelular de cérvix. Esto se ha podido extender a otros órganos, donde hay una adecuada correlación entre los hallazgos morfológicos de una lesión con su riesgo de transformarse en cáncer. En el colon, por ejemplo, está bien documentada la correlación entre los pólipos displásicos y su progresión al adenocarcinoma de colon. Más aún, se ha documentado la progresión genética por pasos¹ desde un epitelio normal hasta la transformación a un adenocarcinoma invasor.

Es así, como desde la descripción del cromosoma filadelfia en la leucemia mieloide crónica se ha observado una correlación del aspecto molecular del cáncer con su aspecto morfológico, pero esto no se ha extendido de manera consistente a las lesiones premalignas. Existen en la actualidad varios ejemplos de estudios sin que en este momento tengan aplicación clínica en los que se ha podido determinar cambios genéticos premalignos que pueden presentar cambios morfológicos muy sutiles o incluso no presentarlos en absoluto^{2,3,4} que requieren de estudios ancilares, entre ellos los de inmunohistoquímica. Entre estos estudios, el más promisorio actualmente y con mayor potencial de ser usado en la práctica clínica consiste en la detección de lesiones premalignas en las células escamosas del cérvix cuyos cambios morfológicos no alcanzan a cumplir los criterios de lesión intraepitelial de bajo grado (categoría ASCUS en citología), usando inmunohistoquímica contra el p16 y el Ki-67^{5,6}.

Entre los usos más importantes de la inmunohistoquímica se encuentra el de determinar el linaje de un tumor. Esto se basa en determinar un grupo de antígenos particulares que se encuentran distribuidos en el tejido que se quiere estudiar, así como aquellos antígenos que uno espera que no se encuentren en dicho tejido. Entre estos antígenos, es posible ubicar productos de la expresión de las mutaciones genéticas propias que llevaron a la carcinogénesis. Por ejemplo, el linfoma folicular tiene una expresión aberrante del BCL-2 que demuestra que existe una translocación entre el gen que codifica esta proteína y el gen que codifica las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Lo mismo ocurre en el carcinoma de mama, donde la expresión del HER2/Neu está demostrando la amplificación del gen.

Tomando estos dos últimos ejemplos, podemos observar que el tejido glandular mamario que es morfológicamente normal no presenta amplificación del HER2/Neu, mientras que dicha amplificación es posible de encontrar en casos de hiperplasia ductal atípica y carcinoma *in situ*, que ya presentan cambios morfológicos detectables⁷. En cambio, el linfoma folicular *in situ* puede no presentar cambios morfológicos que lo diferencie de un ganglio linfático normal y su alteración solo es detectable por inmunohistoquímica cuando los centros germinales presentan reactividad para el BCL-2. Esto también es posible con el epitelio normal de la mucosa colónica usando las proteínas MLH1 y MSH2 como los antígenos de inmunohistoquímica, determinando un frecuente primer paso de la tumorigénesis en el adenocarcinoma de colon que es la inestabilidad de los microsatélites⁸ (Figura 1). Estas proteínas se activan con frecuencia para arreglar errores del DNA en la mucosa colónica normal, y su presencia por inmunohistoquímica indica un intento fallido de reparar pares de bases de DNA erróneas que no han sido corregidos (mismatch repair).

FIGURA 1. MUCOSA DE COLON.



Tomado de Wahlberg et al. 2002⁸

Un fragmento de mucosa colónica normal, en la cual la inmunohistoquímica contra la proteína MLH1 demuestra que hay reactividad nuclear. Esto se traduce en que hay inestabilidad de microsatélites

Todo esto es para señalar que un tejido que morfológicamente es normal, puede tener evidencia por estudios ancilares de cambios premalignos. La importancia de esto radica en potenciales esquemas de detección temprana y tratamientos muy económicos que ayudan a reducir la carga de la población con cáncer.

En cuanto al adenocarcinoma de endometrio, se debe señalar que está muy bien correlacionada la hiperplasia de endometrio, en particular la que presenta atipias, con la progresión a adenocarcinoma⁹. Esto es un cambio morfológico con

parámetros bien establecidos para su clasificación. A su vez, existe buena evidencia como se demostrara más adelante sobre la presencia de mutaciones del gen PTEN como una base fundamental para el desarrollo del adenocarcinoma endometrioide de endometrio y la amplificación del gen c-erb2 que codifica el HER2/Neu en la aparición del carcinoma seroso de endometrio e incluso existen estudios que demuestran que es posible detectar lesiones precursoras de cáncer en las hiperplasias endometriales^{10, 11}.

Si estos dos tipos de tumores malignos, el adenocarcinoma endometrioide de endometrio y el carcinoma seroso de endometrio son los que contribuyen a la mayor proporción de tumores malignos del endometrio y se conoce bien dos genes fuertemente implicados en su aparición, se debe realizar la siguiente pregunta. ¿Es posible identificar la expresión inmunofenotípica de las mutaciones de estos genes en endometrios morfológicamente normales?

Esta inquietud sería fácil de responder si se conoce el estado normal de la expresión inmunofenotípica de ambos oncogenes en el endometrio morfológicamente normal. Entonces de esta primera inquietud, sale una segunda pregunta que es en la que se basa el presente proyecto de investigación la cuales, ¿Cómo es la expresión de los oncogenes PTEN y HER2/Neu en los endometrios normales?

Ahora, como también se explicará más adelante, el endometrio es un tejido con una estructura morfológica cambiante, ya que debe adaptarse a las condiciones propias de un embarazo. Estos cambios deben ser finamente regulados puesto que el tejido endometrial es muy sensible al influjo hormonal – es así que el principal factor desencadenante del adenocarcinoma endometrioide de endometrio es la exposición sostenida a los estrógenos. Es por esto que no se debe simplemente evaluar la expresión de los oncogenes HER2/Neu y PTEN en endometrios normales, debe observarse los cambios en dicha expresión dependiendo de la fase del ciclo menstrual.

Siendo así, se decidió que la presente investigación se basará en la búsqueda de la expresión morfológica de los marcadores HER2/Neu y PTEN en endometrios normales en las diferentes fases del ciclo menstrual.

2. ASPECTOS ÉTICOS

Desde el punto de vista ético, la presente investigación se fundamenta en los principios establecidos en la Declaración de Helsinki que la Asociación Médica Mundial ha promulgado¹². Dicha Declaración es una propuesta de principios éticos que sirven para orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigación médica en seres humanos, incluyendo la investigación del material humano o de información identificables.

De acuerdo a dicha declaración, el propósito principal de la investigación médica en seres humanos es mejorar los procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos y también comprender la etiología y patogenia de las enfermedades. Incluso, los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos disponibles deben ponerse a prueba continuamente a través de la investigación para que sean eficaces, efectivos, accesibles y de calidad. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del ser humano.

Es claro en el marco de estos principios que el protocolo de la investigación debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar que se han observado los principios enunciados en esta Declaración. Para tomar parte en un proyecto de investigación, los individuos deben ser participantes voluntarios e informados. Siempre debe respetarse el derecho de los participantes en la investigación a proteger su integridad y deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de los individuos, la confidencialidad de la información del paciente y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y su personalidad.

Menciona igualmente la Declaración de Helsinki que la investigación debe ejecutarse dentro del marco de la normatividad vigente en el país donde se realiza la investigación y que cada individuo participante debe recibir información adecuada

acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas. La persona debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Después de asegurarse que el individuo ha comprendido la información, el médico debe obtener entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona.

En el contexto establecido anteriormente, en el presente estudio se tendrá en cuenta, además de los principios contenidos en la Declaración de Helsinki, lo contemplado en la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de Colombia¹³, que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

En su Artículo 5° dice que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y su bienestar. Según, el Artículo 11° se clasifican las investigaciones en las siguientes categorías: investigación sin riesgo, investigación con riesgo mínimo e investigaciones con riesgo mayor que el mínimo.

En el Artículo 14° se 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.

En el contexto establecido anteriormente, en el presente estudio se tendrá en cuenta, además de los principios contenidos en la Declaración de Helsinki, lo contemplado en la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de Colombia, que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, y que clasifica este proyecto de investigación como sin riesgo.

3. OBJETIVOS

Los objetivos se ciñen a los descritos en la propuesta de investigación.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la expresión inmunofenotípica de las proteínas HER2/Neu y PTEN en endometrios normales durante las diferentes etapas del ciclo ovárico.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los cambios morfológicos del endometrio según su influjo hormonal.
- Establecer la base para comparar el endometrio normal con el endometrio hiperplásico y el endometrio neoplásico en la expresión de los marcadores tumorales.
- Establecer patrones de expresión del HER2/Neu y el P-TEN que puedan ser usados en estudios posteriores como posibles predictores a largo plazo de la malignización de un endometrio normal.
- Diferenciar la expresión fenotípica del P-TEN y HER2/Neu en las distintas capas del endometrio, así como en el estroma endometrial y el epitelio glandular del endometrio.
- Identificar las variaciones en la expresión de estos oncogenes en las capas funcional y basal del endometrio.

6. HISTOLOGÍA DEL ENDOMETRIO

En esta sección se va a realizar un breve recuento de las características histológicas del endometrio, sin adentrarse en los cambios morfológicos que ocurren durante las fases del ciclo menstrual, puesto que dichas características se abordaran al definir la variable "fase del ciclo menstrual".

Hay que iniciar señalando que aunque no han ocurridos avances significativos en la histología del endometrio, en contraste con lo que ocurre con el delicado balance hormonal y bioquímico que presenta.

Básicamente, el endometrio es un tejido glandular con secreción exocrina que consta de un componente epitelial y estromal. A su vez, consta de dos porciones funcionales y dos zonas anatómicas. Las dos porciones funcionales son la capa funcional y la capa basal, las dos zonas anatómicas son el endometrio corporal y el endometrio ístmico.

El endometrio en la capa basal es inmune a los cambios hormonales, por lo que su aspecto se mantiene a lo largo del ciclo menstrual y está representado por glándulas tubulares simples que están tapizadas por células columnares de núcleos pseudoestratificados en un estroma fusocelular. La característica más importante¹⁴ es la presencia de las arterias rectas ya que estas solo están presentes en la capa basal (Figura 2 - A) y estas se encuentran definidas por la presencia de una muscular propia de una o dos capas de espesor.

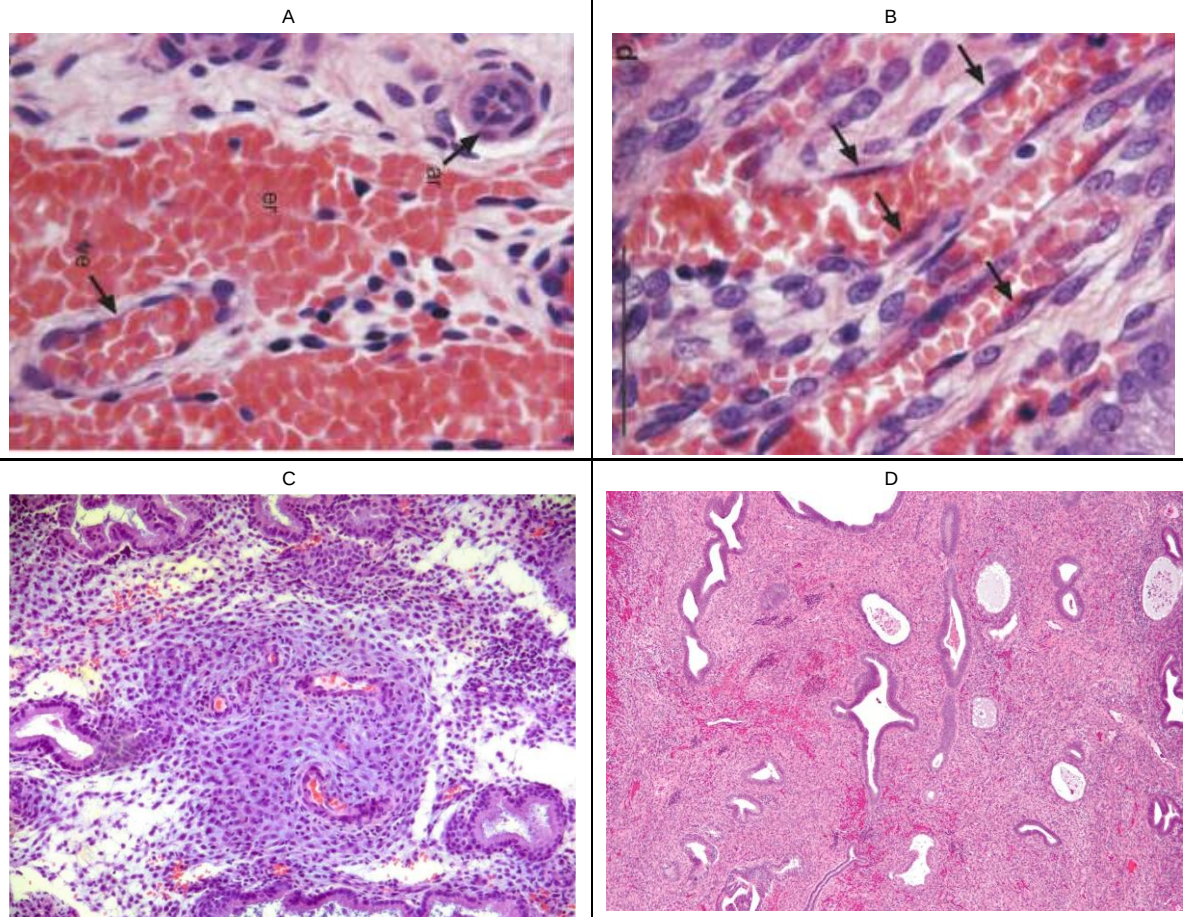
El endometrio de la capa funcional es en cambio fuertemente afectado por las variaciones del ambiente hormonal. Las glándulas son también tubulares simples pero cambian enormemente en su disposición arquitectural según la fase del ciclo menstrual, así como su citología individual. El estroma endometrial también es variable pero suele tener núcleos más redondos que fusiformes. Existe otra característica importante para definir que se trata de la capa funcional y es la presencia de las arterias espirales. Estas son arterias que tienen una arquitectura

helicoidal, la cual es difícil observar en los cortes de hematoxilina, pero es más fácil distinguirlas porque carecen de una túnica media (Figura 2 - B) y porque suelen tener una disposición concéntrica de las células del estroma endometrial (Figura 2 - C).

Para esta investigación se consideró importante observar si había diferencias en la expresión de los marcadores investigados en la capa funcional y en la basal.

En cuanto a las diferencias anatómicas, la descripción que se acaba de hacer corresponde al endometrio del cuerpo y del fondo del útero. Esta descripción no es adecuada para el endometrio ístmico, el cual difiere en que carece de capa funcional y en que el estroma es mucho más fibroso y fusocelular, siendo muy similar a la capa funcional del endometrio corporal (Figura 2 - D). Este endometrio también carece de cambios inducidos por el ambiente hormonal.

FIGURA 2. PARTES FUNCIONALES DEL ENDOMETRIO .



Tomado de Robertson. 1976¹⁴ y de Mills. 2012¹⁵.

A: Capa basal del endometrio donde se identifica una única arteria recta, rodeada de una única capa de células musculares lisas.

B: Capa funcional en la cual las arterias espirales carecen de túnica media y por lo tanto de células musculares lisas que la rodean.

C: En la fase progestacional, las células estromales suelen disponerse de forma concéntrica alrededor de las arterias espirales.

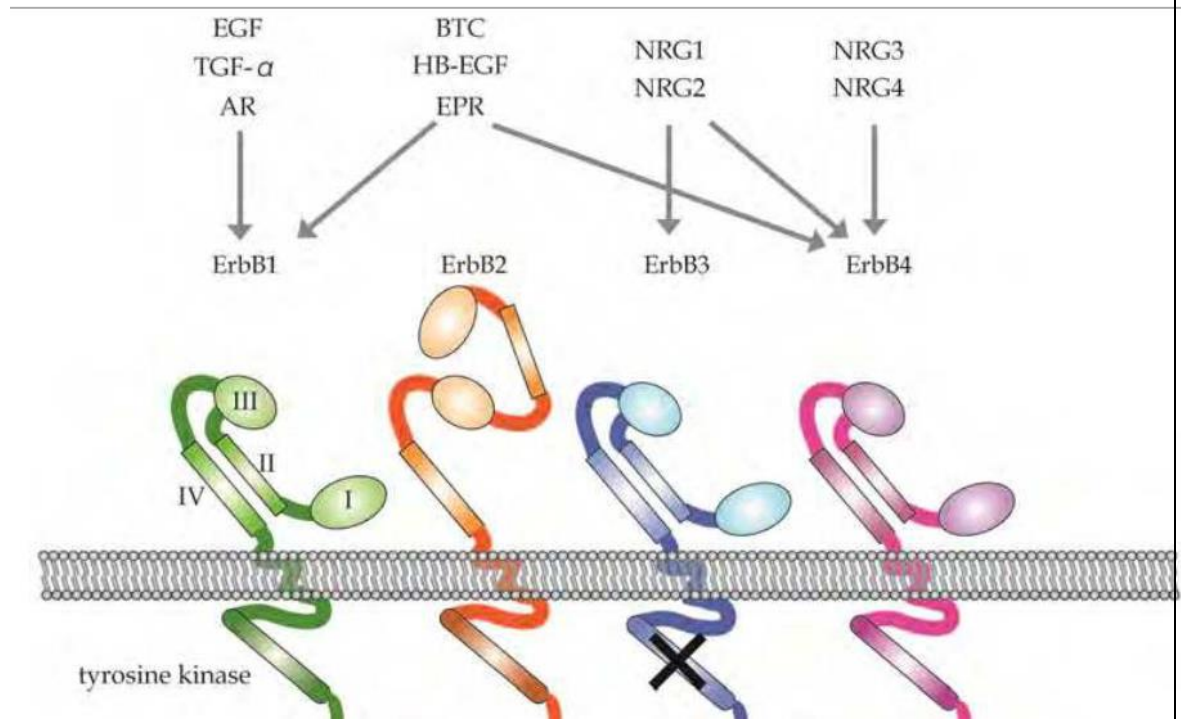
D: Endometrio ístmico, en el cual se resalta que es ligeramente proliferativo y que el estroma es más fusiforme y con más citoplasma, lo que le da un aspecto eosinofílico.

7. FISIOLÓGÍA Y PATOLOGÍA MOLECULAR DEL HER2/Neu

El HER2/Neu^{16,17,18} es una proteína transmembrana codificada por el Gen EERB2, el cual se ubica en el codón doce del brazo largo del cromosoma 17 (17q12). Esta proteína tiene una función de receptor transmembrana con actividad de tirosín-quinasa en su dominio intracelular y se considera que es muy similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico, por lo que recibió el nombre de HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2). En los mamíferos hay identificados cuatro receptores de factores de crecimiento que tienen en común un dominio de receptor con 50 a 55 aminoácidos iguales con seis residuos de cisteína muy similares, donde se considera que sus funciones son regular la diferenciación y el crecimiento de los tejidos¹⁹.

En su función fisiológica, se considera que el HER2/Neu es un correceptor, ya que se dimeriza, con alguno de los otros cuatro receptores cuando estos reciben un ligando, usualmente el factor de crecimiento epidérmico con el HER1 (HER1-HER2) y las neuroregulinas con el HER3 y el HER4 (HER3-HER2 Y HER4-HER2). No existe un ligando para la autodimerización del HER2 (HER2-HER2) (Figura 3.). Cuando esta dimerización ha ocurrido, los dominios intracelulares de estas proteínas presentan cambios estructurales que activan su función de tirosín-quinasa, fosforilando residuos de tirosina de varias proteínas y activándolas. Usualmente estas proteínas están en las vías PIK-3 y AKT, las cuales terminan teniendo un efecto anti-apoptótico al inhibir el p53 y la proteína Nk-FN, al tiempo que estimula la proliferación celular (esto se hará un poco más claro más adelante al hablar de la función patológica del PTEN)

FIGURA 3: RECEPTORES DE TIPO HER.



Tomado de Yamamoto et al. 2011¹⁶.

Varios ligandos que se unen a las cuatro proteínas descritas de HER. Ninguno de los ligandos se une al dominio extracelular del HER2/Neu, pero cuando el ligando se une a un HER distinto, cambia su estructura tridimensional favoreciendo la dimerización y heterodimerización con el HER2/Neu. Esta dimerización activa el dominio intracelular de ambas proteínas.

En cuanto a su función patológica, el descubrimiento de la proteína HER2/Neu se realizó en tumores neuroectodérmicos en ratones. El problema es que en estos modelos murinos la mutación era de tipo puntual V664E la cual ocurre en el dominio de transmembrana. Dicha mutación no se ha encontrado en ningún tumor humano, pero llevo a buscar dicho receptor en humanos y su mutación específica.

Esto llevo a la identificación de la amplificación del gen c-erbB2²⁰ (llamado así originalmente) y la consecuente sobreexpresión de la proteína que codifica, el

HER2/Neu. Los estudios de la función patológica de esta molécula están más estudiados en el cáncer de mama, donde básicamente se resumen en:

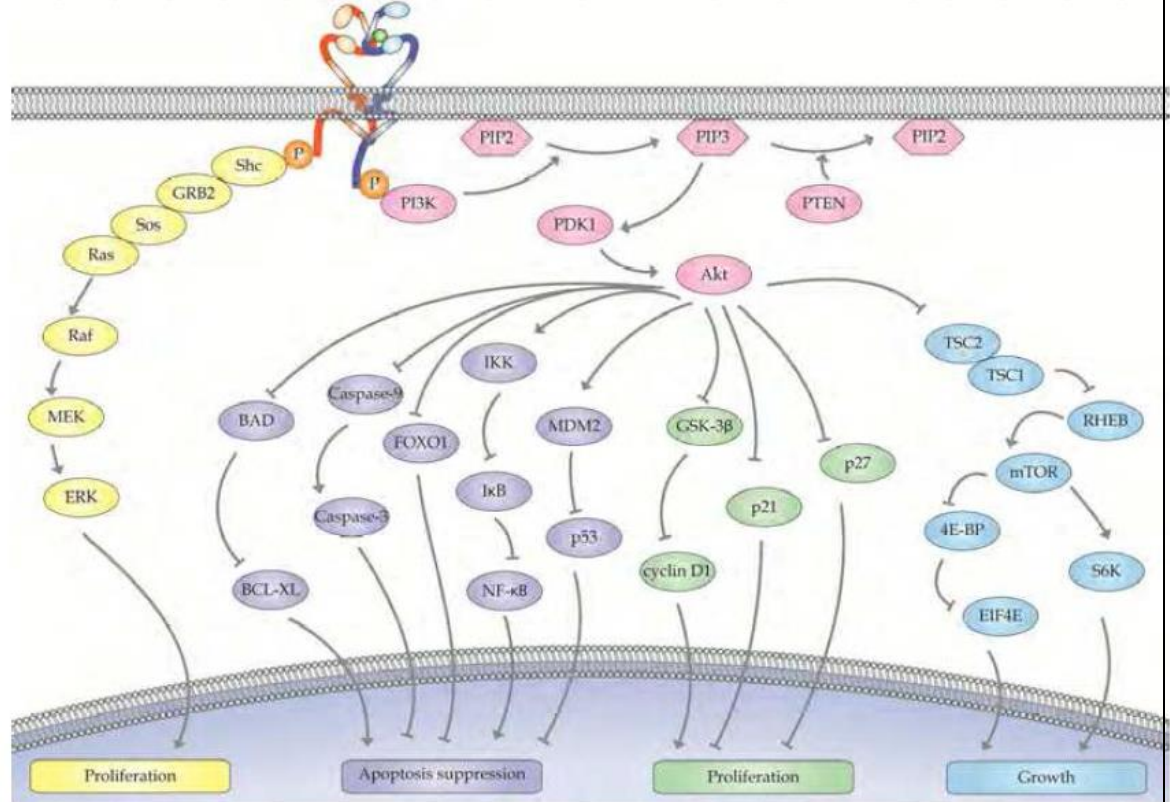
- La sobreexpresión de HER2/Neu produce heterodímeros. En condiciones fisiológicas el HER2 solo se une a los demás receptores si estos se encuentran activados por el ligando, pero esta sobreexpresión facilita la dimerización espontánea en ausencia de ligando y por consiguiente la activación permanente del receptor. Incluso, la sobreexpresión del HER2/Neu lleva a una mayor disponibilidad del mismo para que se una al otro receptor de EGF cuando este se ha activado por un ligando, amplificando una señal de un ligando débil.

- Los heterodímeros llevan a la independencia de la célula para el crecimiento celular. Como se mencionó, los heterodímeros producidos en la sobreexpresión del HER2/Neu no requieren de la unión con un ligando para la activación del receptor. El heterodímero más activo en esta función es el HER1-HER3, pero en las condiciones patológicas, el más oncogénico es el HER2-HER3. El HER2 siempre esta biológicamente activo y tiene la función de tirosínkinasa más fuerte de los cuatro monómeros a pesar de que no tenga ningún ligando unido, mientras que el HER3 tiene una pobre actividad de tirosínkinasa pero una afinidad muy fuerte a sus ligandos propios. La heterodimerización de estos dos amplifica la señal al interior de la célula.

- La función de tirosínkinasa del HER2 tiene una fuerte actividad que inhibe la apoptosis y de proliferación celular. Esto lo hace por medio de una función dependiente del PTEN y una función independiente del PTEN. La función dependiente del PTEN ocurre cuando el HER2 heterodimerizado defosforila la enzima intracelular PIK-3, activándola. Esta activación tiene como función fosforilar el inositol difosfato (PIP-2) a inositol trifosfato (PIP-3). El PIP-3, como se explicara más adelante es un cofactor para la actividad de la PDK-1, una enzima que fosforila la AKT usando precisamente el fosfato proveniente del PIP-3 y lo activa. Esta vía se explicara un poco más adelante, pero basta con decir que es una vía que inhibe

la apoptosis, activa el ciclo celular y la transcripción de factores de crecimiento. Esta vía en condiciones fisiológicas está regulada por el PTEN, ya que el PTEN defosforila nuevamente el PIP-3 a PIP-2, no permitiendo que la PDK-1 fosforile la AKT, pero en las condiciones patológicas de sobre-expresión de HER2/Neu, hay una abundancia de PIP-3 que satura la PDK-1 manteniéndola activada y que también por saturación, se salta el mecanismo de control del PTEN. En la segunda vía, que es la vía de las protein-kinasas asociadas a mitógenos (MAP-kinasas o sencillamente MAPK), el HER2 heterodimerizado se une a la proteína GRB y esta a su vez se une a la proteína Son of sevenless (SOS) y defosforilan la proteína RAS que inicia una cascada de activación de las proteínas RAF y MEK, que activan las MAPK, estas por último defosforilan el c-MYC y el CREB, iniciando la transcripción de factores de proliferación celular (Figura 4).

FIGURA 4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL HER2.



Tomado de Yamamoto et al. 2011¹⁶.

Esquema básico de las dos vías que activa el heterodímero del HER2/Neu. Más que indicar toda la cascada de eventos, hay que señalar que son dos vías las que se activan. La vía de las MAPK está dada principalmente por la fracción del HER2 y solo induce la proliferación celular, mientras que la vía del PI3K-3 está dada por la fracción HER3 y tiene como función además de la proliferación celular, la supresión de la apoptosis.

- El HER2/Neu puede formar homodímeros²¹. Esto se refiere a la formación de homodímeros de HER2-HER2 en las condiciones patológicas de la amplificación del HER2. Estos dímeros, aunque tienen una actividad biológica baja comparada con el heterodímero HER2-HER3, son clínicamente muy importantes, puesto que son los blancos predilectos del medicamento Trastuzumab²². Hay que recordar que la actividad de tirosínkinasa es más fuerte en el HER2, por lo que no hay que despreciar esta actividad. Tanto es así que por eso se creó el Lapatinib, un

medicamento que tiene la capacidad de inhibir la función de tirosínkinasa del HER2, ya sea como homodímeros o como heterodímeros.

8. EL HER2/Neu EN EL ENDOMETRIO

Los investigadores del presente estudio tuvieron gran dificultad en encontrar literatura^{23, 24, 25, 26, 27} que relacionara el HER2/Neu con el desarrollo del adenocarcinoma endometriode de endometrio (tipo 1 según la FIGO) pero en cambio hay un buen cuerpo de literatura que señalan el HER2/Neu como un paso necesario en la aparición del adenocarcinoma seroso de endometrio. Los puntos clave a tener en cuenta son en cuanto a la utilidad de la inmunohistoquímica con el marcador HER2/Neu los siguientes:

- La expresión del HER2/Neu es útil para diferenciar el carcinoma seroso de ovario del adenocarcinoma seroso del endometrio²⁸. Entre el 23 al 43% de los adenocarcinomas serosos de endometrio son reactivos para el HER2/Neu, menos del 1% de los carcinomas serosos de ovario son reactivos para el HER2/Neu.

- Entre el 2 al 4% de los adenocarcinomas endometrioides expresan el HER2/Neu, pero en un estudio, esta pobre proporción de expresión se dio en los adenocarcinomas endometrioides de alto grado histológico y en etapas más avanzadas en el momento del diagnóstico²⁴.

- Aunque ha sido extensamente estudiada la relación inversa que tiene la expresión de receptores de estrógenos con la expresión del HER2/Neu en el cáncer de mama, con una minoría como representantes de los carcinomas de mama triple negativos y triple positivos, esta relación no ha podido ser determinada en los carcinomas endometrioides de endometrio. Esta relación en cambio está muy clara si se asume de manera hipotética que el carcinoma seroso y endometriode en el endometrio, son una misma entidad patológica. En dicho caso, el adenocarcinoma seroso se caracteriza por ser negativo para los receptores hormonales de estrógenos y progesterona, mientras que es (entre el 23 al 43% de los casos) positivo para el HER2/Neu. El adenocarcinoma endometriode por el contrario es siempre positivo

para los receptores hormonales mientras que es muy frecuentemente negativo para el HER2/Neu²⁹.

9. FISIOLÓGIA Y PATOLOGÍA MOLECULAR DEL PTEN

El gen P-TEN^{30, 31, 32, 33, 34} se ubica en el cromosoma 10, en el codón 23 del brazo largo 10q23 y codifica una proteína cuyo nombre completo sería "Homologo de la fosfatasa y la tensina borrado en el cromosoma diez" (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten), una proteína con actividad enzimática de fosfatasa, relacionada con la familia de las fosfatasas de tirosina. En su morfología cabe destacar que tiene un peso de aproximadamente 43kD y que a pesar de tener actividad enzimática, su estructura es muy similar a la tensina, una proteína del citoesqueleto, pero varias proteínas con actividad de fosfatasa tienen este citoesqueleto similar, indicando que se trata solamente de una proteína que emergió a través de la evolución a partir de la tensina.

Las mutaciones del PTEN están presentes en los cánceres humanos esporádicos en una proporción que rivaliza el mismo p53. Se ha descrito que el 20% de los glioblastomas tienen mutaciones del P-TEN, así como el 50% de los carcinomas de próstata y en donde más se ha estudiado, en el carcinoma endometriode de endometrio, la proporción varía entre 33 a 80% de los tumores evaluados. Es en el endometrio donde se ha identificado una mutación del P-TEN en su precursor, la hiperplasia endometrial en el 20 a 55% de los casos, sugiriendo una causa-efecto en la progresión de la hiperplasia al cáncer de endometrio.

No solo ha sido estudiado como mutación esporádica en el desarrollo de cánceres, también ha sido estudiado en las mutaciones germinales heredadas, donde se han descrito dos síndromes:

- El síndrome de Cowden, el cual se caracteriza por presentar múltiples hamartomas que incluyen pólipos hamartomatosos intestinales, triquilemomas cutáneos y queratosis acrales. Estos pacientes tienen una predisposición a tumores en órganos

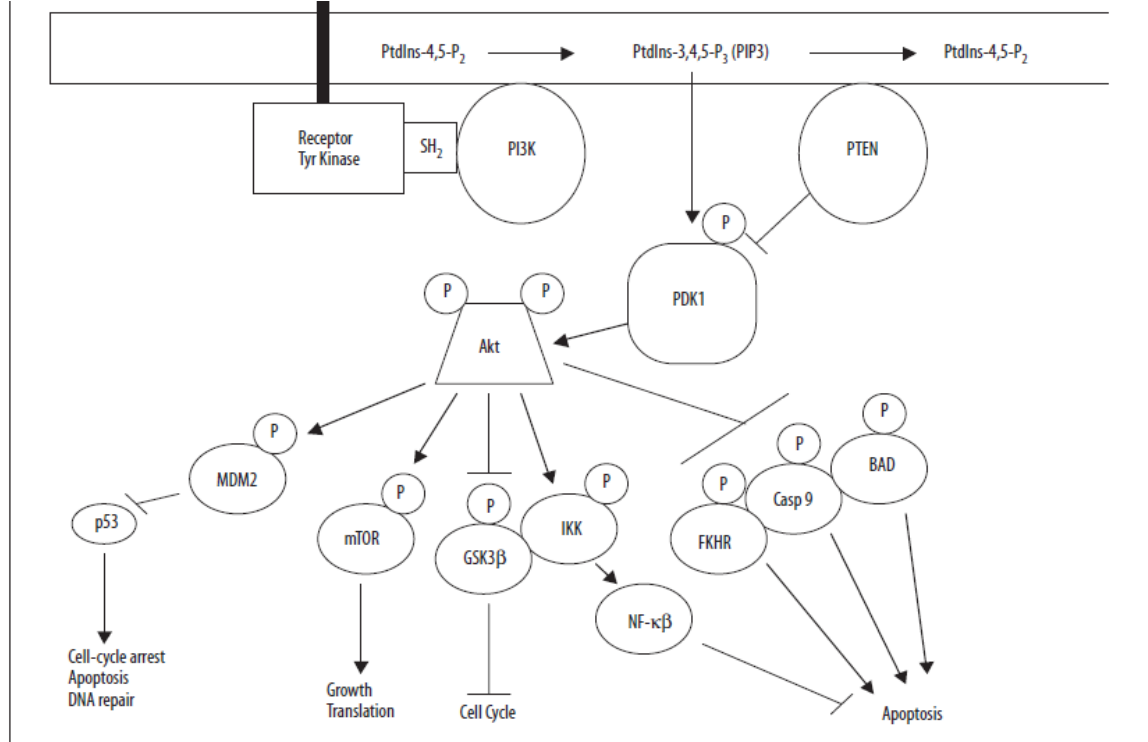
regulados por hormonas: Carcinoma de mama, carcinoma folicular de tiroides y carcinomas de endometrio.

- El síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, que se manifiesta a edad más temprana que el síndrome de Cowden, con hamartomas intestinales, lipomatosis, hemangiomas, nevus genitales y macrocefalia.

La proteína P-TEN es expresada en el citoplasma de las células, donde uno de sus tres dominios se ancla a la porción interna de la membrana celular y tiene actividad de fosfatasa. A diferencia de otras fosfatasas de tirosina, el P-TEN tiene una muy pobre afinidad a las fosfoproteínas y en cambio su principal sustrato es el inositol trifosfato (PIP-3, por sus siglas en inglés phosphoinositol triphosphate), donde le toma un ion fosfato reduciéndolo a inositol difosfato (PIP-2). La función biológica del P-TEN a pesar de estar prácticamente limitada a este paso, es crucial, puesto que las mutaciones que lo inactivan al interior de las células llevan a una acumulación de PIP-3.

Esta acumulación de PIP-3 induce la activación de la enzima PDK1, la cual también tiene actividad fosfatasa, tanto hacia el PIP-3 en una función de autorregulación como de defosforilar y activar la proteína AKT-1. En las condiciones patológicas, la acumulación de PIP-3 sobrepasa el mecanismo de autorregulación de la PDK1 y por lo tanto la activación de la AKT-1 es constante. La AKT-1 tiene actividad de fosforilasa y es en este punto donde se observa ya que intervienen múltiples proteínas, algunas posiblemente no descritas, que al fosforilarse tienen actividad de supresión de la apoptosis, supresión del p53 (y por consiguiente estimulación del ciclo de replicación celular) y activación de factores de transcripción. Entre los que más se destacan son el MDM2 que inhibe el p53, el NF-Kb que inhibe la apoptosis y el mTOR que induce la transcripción de factores de proliferación celular (Figura 5).

FIGURA 5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL PTEN.



Tomado de Chu EC, Tarnawski AS (October 2004). "PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology". *Med. Sci. Monit.* 10 (10): RA235-41. PMID 15448614.

Se ha observado como las células de una línea de glioblastoma en las que se demuestra mutación del PTEN, pero que lo expresan temporalmente, no tienen la capacidad de avanzar de la fase G1 a la fase S³¹. Esto se observó al confirmar una ausencia de la expresión de PTEN a través de Western-Blot en esta línea específica tumoral (U87MG). Luego, dos grupos de estas células fueron infectadas con un retrovirus, el primer grupo con un retrovirus que insertaba el PTEN y el segundo que no insertaba genes. La proliferación de colonias de células tumorales con expresión de PTEN fue mucho menor y la tinción del DNA con un marcador fluorescente (bromuro de propidio), junto con un estímulo mitogénico, demostró que las células se detuvieron en la fase G1, con mayor proporción de células en fase G0 que en G1 y S. En este estudio además se demostró que la supresión de la fase del ciclo celular

dependía de la actividad fosfatasa del PTEN, puesto que el mismo experimento no arrojó iguales resultados con la inserción de un PTEN catalíticamente inactivo en su actividad de fosfatasa. Después de analizar la actividad de quinasas de las ciclinas en las poblaciones tumorales con PTEN activo y PTEN inactivo, se observó mucha menor actividad quinasa en las células tumorales con PTEN activo, lo que producía un freno en el ciclo celular. Esto se considera que es debido a la actividad estimulante que tiene el MDM2 que cuando no se encuentra fosforilado por el AKT-1, no puede inhibir el p53 y este a su vez inhibe la transcripción de las dos ciclinas evaluadas, CDK2 y CDK6. Este mismo estudio se repitió en melanomas con iguales resultados³⁵.

Ahora, la función del PTEN puede demostrarse por medio de inmunohistoquímica³⁶. El residuo T366 es el usado por el PTEN para defosforilar el PIP-3 mientras que el S370 es el que es fosforilado por la Casein fosfoquinasa tipo 2 para anclar la proteína a la membrana celular. El ion fosfato proveniente del PIP-3 es el que el PTEN usa para fosforilar a la PDK1 cumpliendo con su labor de fosfatasa. Esto también está regulado por la PIK-3 puesto que esta es la que desdobla los fosfolípidos de membrana para producir el diacil-glicerol y el inositol trifosfato (PIP-3). Es por eso que para esta investigación se decidió utilizar el anticuerpo Ab109454 (ABCAM clon EP229) puesto que este es específico contra las porciones fosforiladas T366 y S370, indicando la presencia de la proteína PTEN que en el momento de la fijación con el formol se encontraba activamente defosforilando el PIP3.

10. PTEN EN EL ENDOMETRIO

Como ya se mencionó, uno de los tres dominios de la proteína PTEN sirve para anclarse a la parte interna de la membrana celular^{37, 38}. Si este dominio se encuentra fosforilado, el PTEN no puede anclarse a la membrana celular y pierde su actividad de fosfatasa³⁹. Se ha demostrado que el endometrio es un medidor muy confiable de los niveles circulantes de estrógenos y progesterona, ya que los cambios más sutiles en estas hormonas inducen cambios morfológicos que se pueden visualizar. Estos cambios morfológicos de proliferación y apoptosis durante el ciclo menstrual normal son regulados de manera muy cuidadosa por el PTEN, cuya función, más no su expresión inmunohistoquímica, es regulada por la fosforilación ya descrita. El estímulo de progestérogénos induce fuertemente la defosforilación y por lo tanto el aumento de la actividad biológica del PTEN mientras que el estímulo estrogénico lo inhibe. Esto puede en parte explicar por qué la administración de progestágenos puede inducir la regresión e incluso la ablación del endometrio hiperplásico. No es una explicación totalitaria, puesto que se ha demostrado, como ya se mencionó, que las hiperplasias endometriales pueden tener mutaciones de inactivación en el PTEN sin que esto las haga ser inmunes a la terapia con progestágenos. Por último, se debe señalar que la enzima que es inducida por la activación del receptor nuclear de estrógenos y que fosforila la porción terminal del PTEN es la fosfoquinasa de caseína tipo 2⁴⁰, refiriéndose al residuo S370 que permite anclar el PTEN a la membrana celular⁴¹.

En el cáncer de endometrio, la tumorigénesis es un evento complejo, que en el carcinoma tipo I (adenocarcinoma endometriode) inicia siempre con la inactivación del PTEN. Esta inactivación no es el único evento, se acompaña también de mutaciones del gen KRAS, de la B-Catenina y de inestabilidad de microsatélites. El carcinoma tipo II (Carcinoma seroso de endometrio) el evento tumorigénico principal es la mutación de desactivación del p53. En el carcinoma endometriode, la inactivación del PTEN ocurre por medio de tres mecanismos^{42, 43}:

- Mutaciones puntuales. Estas mutaciones son cambios puntuales en el 10q23 que producirían un PTEN sin actividad de fosfatasa. Este tipo de mutación se asocia fuertemente a inestabilidad de microsatélites, lo cual lleva a pensar que la mutación propia del PTEN ocurrió por inestabilidad de microsatélites.

- Pérdida de la heterozigocidad: Si la célula endometrial ha presentado un doble golpe de delección en el 10q23 hay pérdida suficiente de la función de fosfatasa³⁵. Esto demuestra que la mutación del PTEN en un solo cromosoma no es suficiente para inducir el cáncer de endometrio, puesto que en el síndrome de Cowden, la pérdida de heterozigocidad ya ha ocurrido y esto solo facilita la aparición del cáncer de endometrio.

- Hipermetilación: La hipermetilación sobre la región 10q23 produce una pérdida total de la expresión del PTEN y por lo tanto de su función, con un DNA integro.

En correlación con la expresión de inmunohistoquímica, la expresión del PTEN como proteína nativa solo se pierde en los casos de hipermetilación y pérdida de la heterozigocidad. Las mutaciones puntuales, solo detectables por PCR no permite que haya una pérdida de la expresión del PTEN. Si se usa un anticuerpo contra los residuos fosforilados T366 y S370 se puede demostrar la porción activa del PTEN sin importar el tipo de mutación puntual. Uno de las funciones de la AKT desfosforilada por la PDK1 es inducir la transcripción del PTEN, por lo cual en los casos de mutaciones puntuales del PTEN, el aumento de la función de la AKT induce una expresión fuerte del PTEN detectable por inmunohistoquímica⁴⁴.

Para medir la actividad del PTEN, también existe la expresión de fosfoAKT por medio de inmunohistoquímica, el cual es la porción fosforilada de la proteína AKT, que indica que el PTEN está funcionando. La pérdida de función del PTEN se manifiesta por una disminución del fosfoAKT a AKT por parte de la PDK1⁴⁵

11. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los criterios de inclusión nombrados a continuación tienen como objetivo asegurar de que la muestra sea representativa de la pared del útero en sus porciones del cuerpo o del fondo.

- Las muestras de endometrios deben provenir de mujeres en edad fértil como productos de histerectomía por razones distintas a enfermedades endometriales.

- Debe haber una representación adecuada del miometrio, para ser usado como control negativo en la expresión inmunohistológica de los marcadores HER2/Neu y P-TEN. No es necesario que el miometrio esté libre de patología, puesto que esto permitiría que se incluyan los úteros que fueron resecados por patología del miometrio. Durante el desarrollo del proyecto de grado no se presentó ningún útero resecado por probable que se podría predecir, es la miomatosis uterina.

- Debe haber una representación adecuada del endometrio, en el cual hubiera representación de la capa basal y la capa funcional del mismo, según la descripción hecha de la histología normal del endometrio.

- La histología del endometrio debía ser propia de una mujer en edad reproductiva. Esto se evaluaba en un primer tiempo con la historia clínica, en la cual solo se tomaban endometrios desde los 12 hasta los 45 años. No existe un consenso apropiado para definir la edad límite superior para la llegada del climaterio normal⁴⁶, por lo cual se definió arbitrariamente los 45 años como edad límite superior. En el segundo tiempo, después de procesado el útero, se definía que el endometrio presentaba influjo hormonal si se identificaba alguno de los patrones propios del ciclo menstrual, tal como se describió en la histología del ciclo menstrual.

12. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

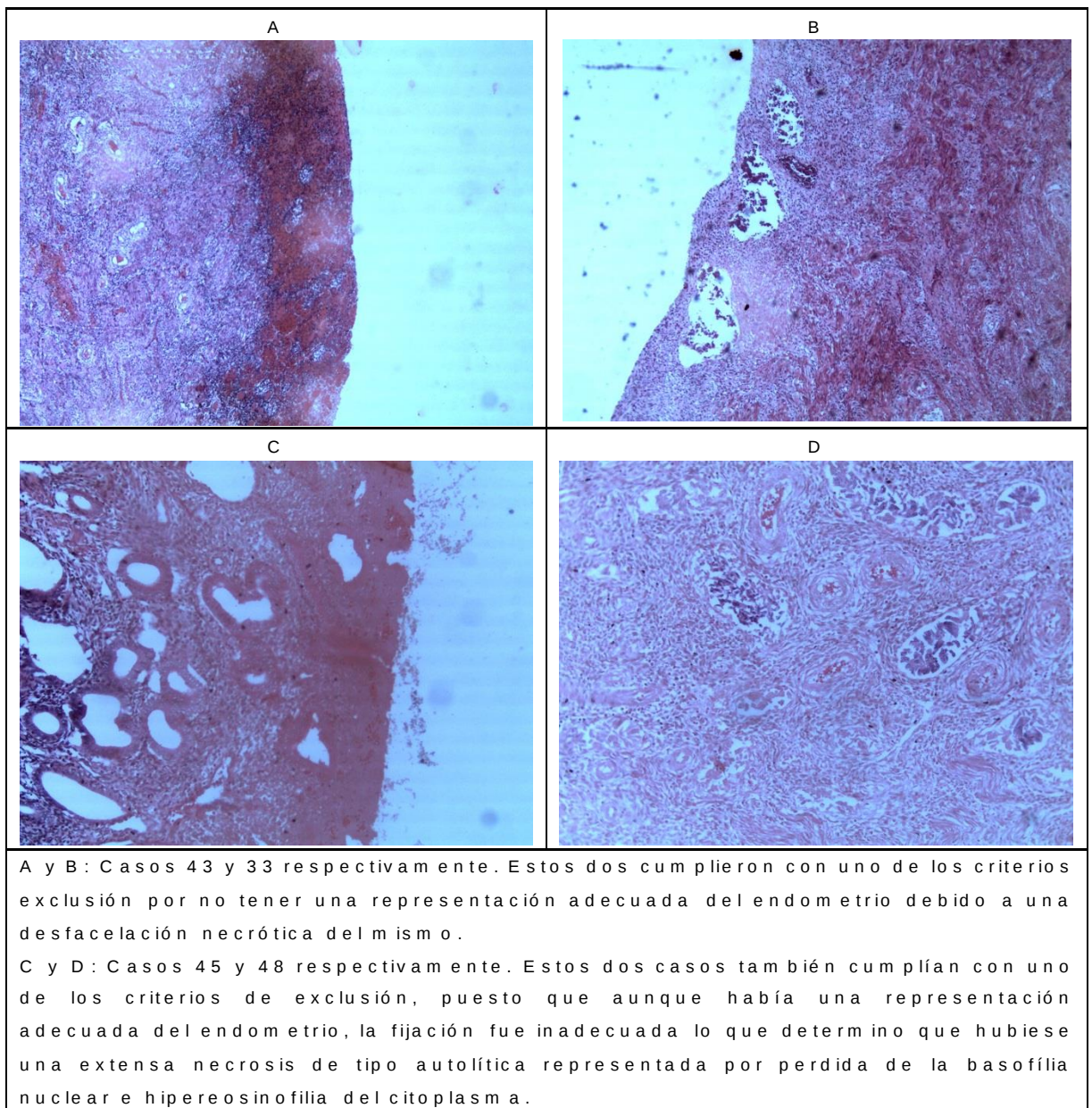
- La historia clínica indicaba una edad por fuera del rango establecido en los criterios de inclusión, o indicaba una sospecha clínica de una patología endometrial.

- La histología de la muestra evaluada demostraba que había alguna lesión endometrial de cualquier tipo. Ninguna de las muestras evaluadas fue excluida por este aspecto.

- La histología demostraba que no había una representación histológica adecuada del miometrio y del endometrio. Esto fue la principal causa de exclusión de muestras, ya que se identificaron varias que presentaban una desfacelación autolítica postquirúrgica del endometrio (Figura 6, A y B).

- La histología debía demostrar una preservación adecuada de la muestra de tal manera que los antígenos estuviesen adecuadamente preservados para la técnica de inmunohistoquímica. Hubo ocasionales muestras en la cual se identificaba necrosis de tipo autolítica del endometrio (Figura 6, C y D), representada por pérdida de la basofilia nuclear e hipereosinofilia del citoplasma. Aunque hay ocasiones en que la inmunohistoquímica puede demostrar reactividad en células necróticas⁴⁷, no se encontraba entre los objetivos de este estudio el de demostrar la reactividad de los marcadores en estudio en tejido necrótico.

FIGURA 6. EJEMPLOS DE CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.



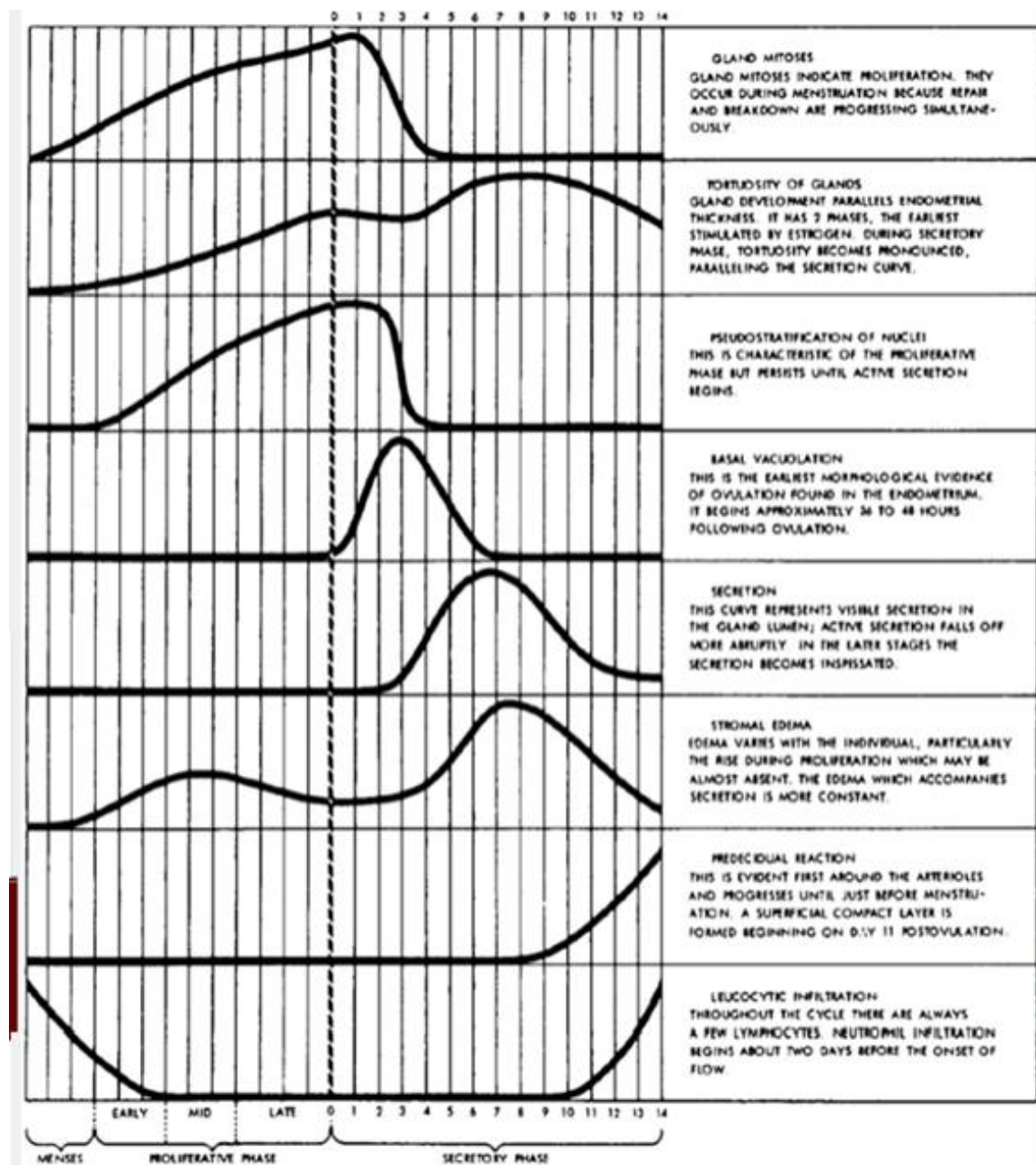
13. DETERMINACIÓN DE LA VARIABLE “FASE DEL CICLO MENSTRUAL” - EVALUACIÓN DE LA FASE DEL CICLO Y DE LA EDAD DEL ENDOMETRIO

La evaluación de la edad hormonal del endometrio hace referencia a la visualización de una biopsia endometrial con el fin de determinar en qué fase y en qué día se encuentra el endometrio en un ciclo menstrual normal. Esta herramienta ha caído en desuso en la medicina del manejo de la infertilidad debido a que se ha identificado marcadores hormonales mucho más precisos y menos invasivos, pero aún es útil en este caso, debido a que histológicamente el endometrio normal no tiene variaciones en la edad de la mujer, pero sí cambios muy precisos con el influjo hormonal ^{48, 49, 50}.

Esta evaluación se inicia con la determinación de la fase del ciclo menstrual. Básicamente se dividen en una fase proliferativa, una fase secretora y una fase menstrual.

Dependiendo de múltiples variables, puede evaluarse los rasgos histológicos del endometrio para determinar su edad aproximada. Entre estas variables se encuentran el conteo mitótico de la fracción glandular, la pseudoestratificación nuclear de la fracción glandular, la deciduización del estroma, la vacuolización y la secreción glandular, la tortuosidad de las glándulas, así como la infiltración por neutrófilos.

TABLA 1: CICLO MENSTRUAL NORMAL CON CAMBIOS MORFOLÓGICOS.

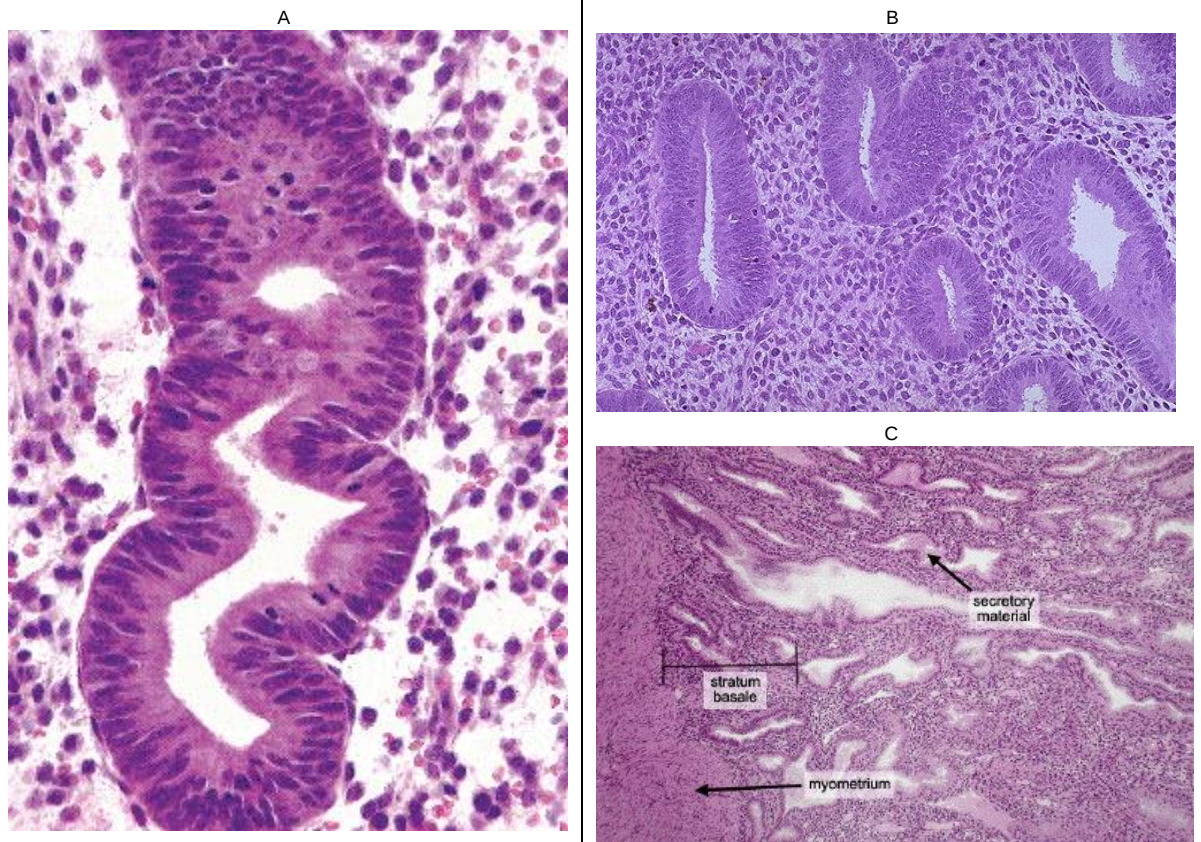


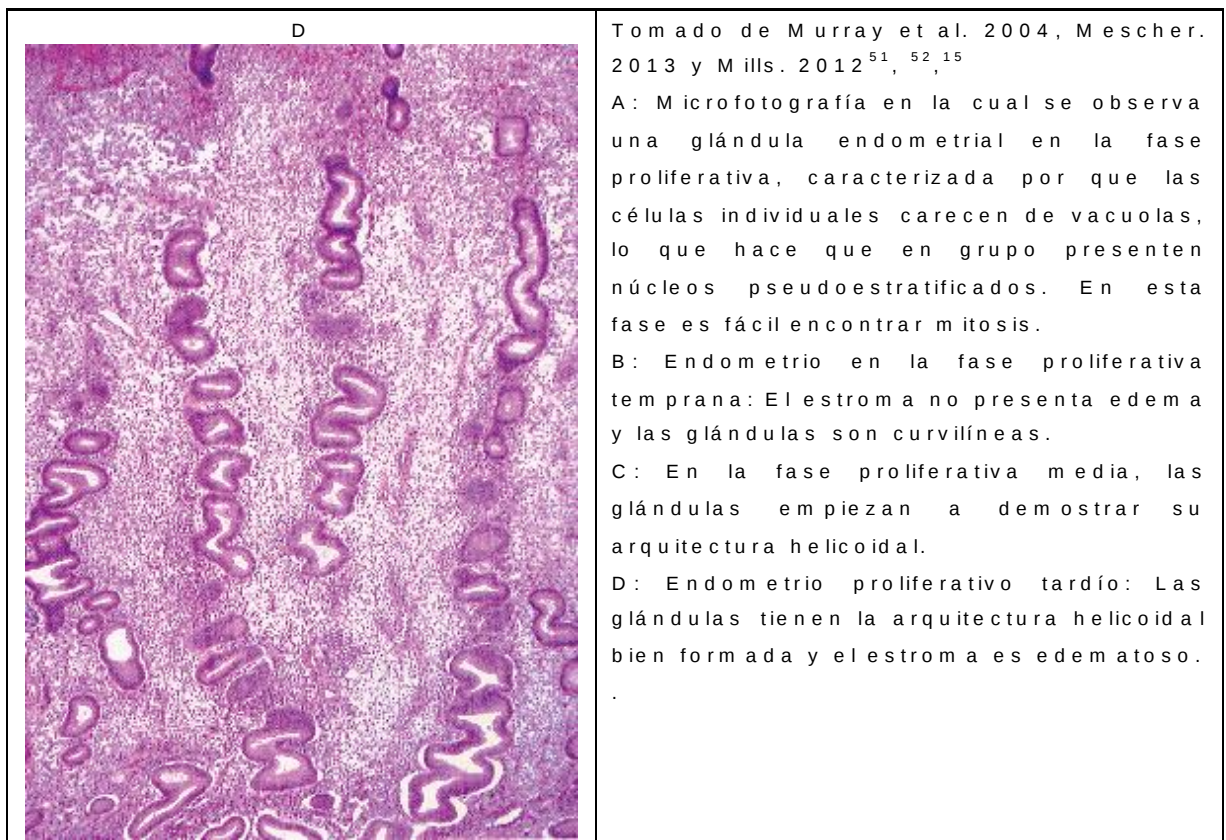
Hertig A, Norris H, Abell M, eds. The Uterus. Baltimore: Williams & Wilkins; 1973:110-135.

Cambios histológicos progresivos en el endometrio en comparación con el tiempo transcurrido del ciclo menstrual.

La fase proliferativa inicia desde el momento en el que finaliza la menstruación hasta el momento de la ovulación. En esta etapa, la proliferación del endometrio es estimulada en particular por los estrógenos. Los cambios morfológicos inician con unas glándulas endometriales rectas que se van volviendo progresivamente helicoidales y que se van acompañando de edema del estroma en fases más tardías. Las células glandulares son característicamente pseudoestratificadas. El día de la ovulación está marcado por una vacuolización basal del menos del 50% de las células glandulares endometriales (Figura 7).

FIGURA 7. ENDOMETRIO PROLIFERATIVO .





La fase secretora ocurre posterior a la ovulación, se caracteriza por que los núcleos de las glándulas pierden su pseudoestratificación debido a la vacuolización basal del citoplasma de las células lo que induce que los núcleos se dispongan a una altura uniforme. Esto y otros cambios son los que se usan para dar un rango de +/- 2 días (Figura 8, A hasta E).

Postovulación día 2: Hay una vacuolización basal del más del 50% de las células epiteliales endometriales, asociado a abundantes figuras mitóticas.

Postovulación día 3: Todas las células presentan vacuolización y las mitosis se han detenido.

Postovulación día 4: Las vacuolas se disponen en la porción luminal de las células.

Postovulación día 5: Hay una disminución en la vacuolización de las células y hay acumulación de secreción intraluminal.

Postovulación día 6: Ausencia de vacuolización. Máxima secreción intraluminal.

Postovulación día 7: Inicia el edema estromal.

Postovulación día 8: Máximo edema estromal.

Postovulación día 9: El edema estromal hace que las células estromales se aglomeren en islotes de células, usualmente alrededor de las arterias espirales, lo que las hace prominentes.

Postovulación día 10: Gruesos islotes de células estromales con cambios epitelioides iniciales (decidualización).

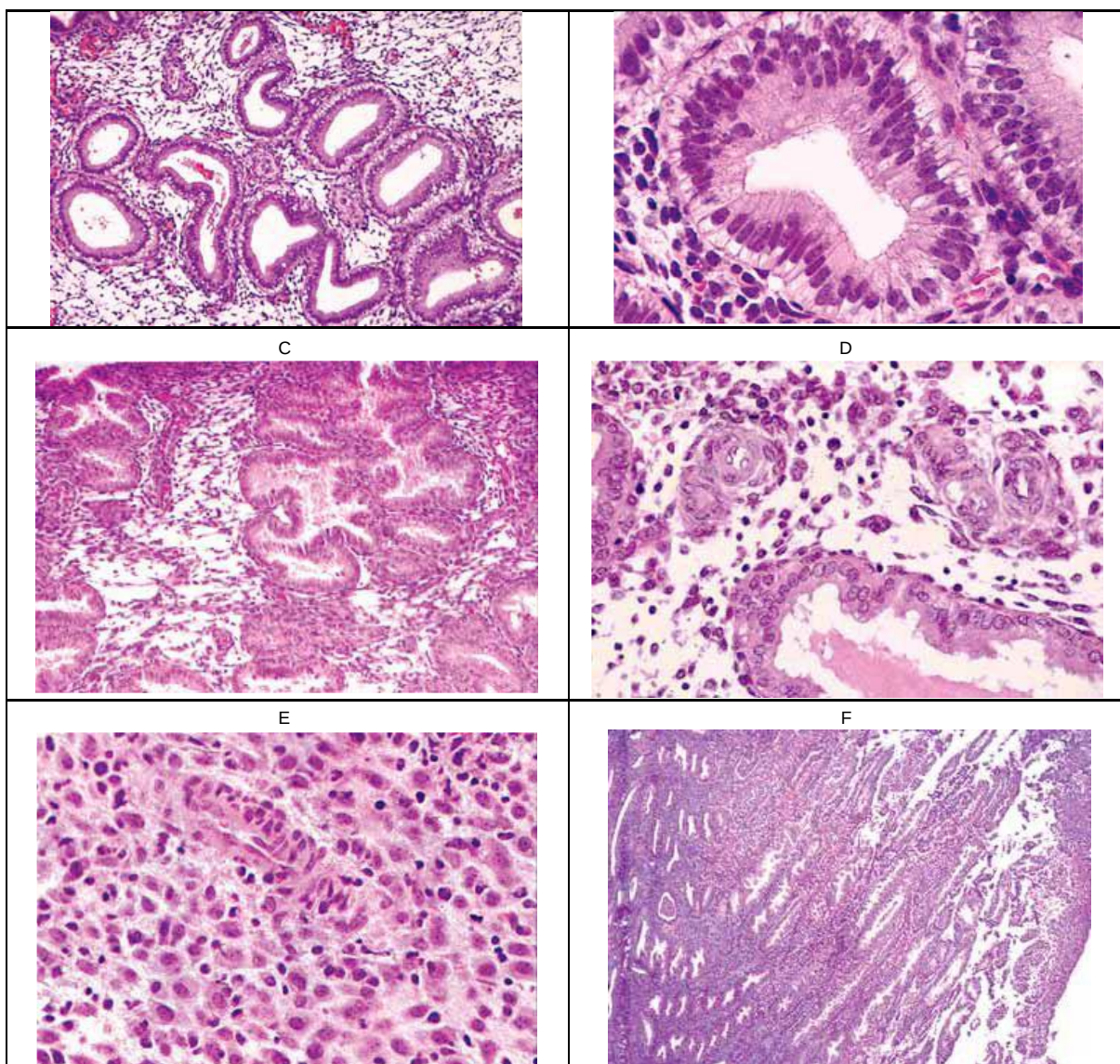
Postovulación día 11: Decidualización completa de los islotes.

Postovulación día 12: Los islotes deciduales comienzan a aglomerarse entre ellos.

Postovulación día 13: Inicio del infiltrado por polimorfonucleares.

Posterior del día 13, se inicia la menstruación en el día 14 después de la ovulación. Acá se observa cambios en el que predomina el infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares neutrófilos, sin que se identifique microabscesos. Los polimorfonucleares se acompañan de extravasación de eritrocitos, descamación y necrosis del endometrio, depósitos de fibrina y por último, de cambios regenerativos. Estos cambios se limitan a la capa funcional mas no a la basal, la encargada de regenerar el endometrio (Figura 8, F).

FIGURA 8: ENDOMETRIO SECRETOR Y MENSTRUAL.	
A	B



Tomado de Mills. 2012¹⁵

Figuras A y B: A bajo aumento se observa que las glándulas en la fase secretora presentan vacuolización de la porción basal celular, lo cual ha sido llamado en aspecto de "teclas de piano". Figura C: Del día 5 a 6, la morfología en sierra de las glándulas se asociada a secreción intraluminal. Acá se ha perdido la vacuolización de las células. Figura D: En el día 9, las células estromales se disponen alrededor de las arterias espirales, lo que las hace más notorias. Las glándulas presentan secreción intraluminal y los núcleos han perdido la pseudoestratificación. Figura E: Previo a la menstruación, las células estromales presentan decidualización completa y adquieren una morfología epitelióide. Figura F: En la menstruación hay necrosis y desprendimiento de la capa funcional, pero la capa basal es indemne a estos cambios.

14. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL HER2/Neu

La determinación de la expresión del HER2/Neu ha sido ampliamente estudiada^{53, 23}. en el cáncer de mama, con parámetros bien establecidos y con una adecuada correlación con los estudios genéticos, en los cuales, demostrar la amplificación por hibridación *in situ* es el estándar de oro mientras la inmunohistoquímica mide la expresión de la proteína en las células y tiene una adecuada correlación con el estudio genético⁵⁴. Una situación similar ocurre en el adenocarcinoma gástrico, el cual también está adecuadamente estudiado la sobreexpresión del HER2/Neu y su correlación con la amplificación del gen^{55, 56, 57}.

Pero los parámetros de determinación tanto del carcinoma de mama como del adenocarcinoma gástrico no pueden transportarse al adenocarcinoma de endometrio y al endometrio normal. De por sí, con los parámetros establecidos, es de esperar que no haya tejidos normales con expresión de inmunohistoquímica para el HER2/Neu.

Para empezar, no está bien determinado el patrón de expresión de inmunohistoquímica en el adenocarcinoma endometriode de endometrio, debido a que, como ya se comentó antes, no es frecuente que haya una amplificación del gen en este tipo de cáncer. Si empezamos desde la fuente más básica, que es la cuantificación del RNA que codifica el HER2/Neu por medio de PCR con retrotranscriptasa, lo cual fue hecho en un estudio de Magdalena Brys et al⁵³ en el cual se demostró que el HER1 fue sobreexpresado en el 48% de los carcinomas uterinos sin correlación con el tipo histológico, mientras que el HER2/Neu solo fue sobreexpresado por el 8% (n=25) de los carcinomas uterinos, que aunque fueron solo dos muestras, al contrario de lo comentado en previamente en un estudio²⁴ ocurrió en adenocarcinomas endometrioides de bajo grado histológico (FIGO I) pero con la falencia que no se incluyeron adenocarcinomas endometrioides de alto grado histológico. En cuanto a lo que se puede utilizar de dicho estudio en la presente

investigación, ninguno de los endometrios normales (n=12) demostró sobreexpresión del RNA.

Hay que aclarar que esto no es detrimento para este estudio, puesto lo que compete a este estudio la evaluación de la variable consiste en observar el patrón de expresión o no del HER2/Neu.

Un estudio de expresión del HER2/Neu en endometrios normales⁵⁸ demostró reactividad en el endometrio proliferativo en el 60% (n = 25) de los casos y en el 75% (n = 20) de los endometrios hiperplásicos. Desafortunadamente no explicaron que parámetros usaron para definir reactividad. Hay varios estudios que demuestran mejor correlación entre la amplificación y la expresión del HER2/Neu por medio de inmunohistoquímica e hibridación in situ. El puntaje usado en la valoración actual estándar del HER2/Neu en el cáncer de mama^{54, 59} usado en un estudio en correlación con el FISH para demostrar la amplificación²⁵ en cánceres de endometrio, demostró un resultado positivo en ambas pruebas del 88% y el 15% demostró reactividad por inmunohistoquímica pero sin amplificación del gen por medio de FISH. Los tumores en dicho estudio que demostraron dicha reactividad fueron principalmente los carcinomas serosos, los adenocarcinomas endometrioides de alto grado o los adenocarcinomas endometrioides con metástasis nodales o a distancia (Figura 9).

Ya se ha mencionado como el interés es más notorio en el carcinoma seroso de endometrio (tipo II), donde utilizando el puntaje de interpretación del HER2/Neu correlacionado con el FISH, un estudio⁶⁰ demostró una concordancia completa en 9 casos reportados como 3+ por inmunohistoquímica con la amplificación del gen por FISH y una concordancia en 11 casos de puntaje de inmunohistoquímica de 0 y +1 con la no amplificación del gen por FISH. En 7 casos con puntaje +2, dos presentaron amplificación del gen por FISH.

Otro estudio⁶¹ en cambio demostró una expresión heterogénea del HER2/Neu, refiriéndose a que mientras que un área histológica de un carcinoma seroso de

endometrio podría presentar una expresión negativa (0 a +1) de HER2/Neu, otras áreas podían tener una expresión positiva (3+) y que estas áreas heterogéneas presentaban una amplificación concordante al hacer el estudio de FISH.

Entonces, es por esto que en el presente estudio, debido a que no se identificó en la bibliografía evaluada un esquema de evaluación del HER2/Neu en endometrios normales, se decidió aplicar el mismo criterio que se usa en la actualidad en estudios no reconocidos para uso clínico del carcinoma seroso de endometrio, que es el mismo consenso usado para el carcinoma de mama y que se expone a continuación:

Negativo 0: Una tinción membranosa débil, incompleta o escasamente perceptible en el 10% o menos de las células evaluadas.

Negativo 1+: Una tinción membranosa débil, incompleta o escasamente perceptible en más del 10% de las células evaluadas.

Equivoco 2+: Una tinción completa de la membrana pero débil o escasamente perceptible en el mas del 10% de las células evaluadas o una tinción fuerte y completa de la membrana en el 10% o menos de las células evaluadas.

Positivo 3+: Una tinción completa y fuerte de la membrana en más del 10% de las células evaluadas.

Debido a que esto se ha usado es en tumores malignos, según el protocolo de HERCEPTEST⁶² la expresión del HER2/Neu equivoca en tejidos normales debe interpretarse como negativa, de tal manera que para este proyecto se va a usar una variable de tipo Boolean que indica si hay expresión (3+) o no la hay (0, 1+ y 2+).

El control para el HER2/Neu fue un bloque celular de células de un carcinoma ductal de mama, con un resultado 3+ con amplificación del gen demostrada por FISH, con otro bloque de resultado 2+ y otro bloque más de resultado 1+ en el cual el FISH demostró que no hubo amplificación del gen. Este control lo suministró el proveedor

del anticuerpo contra el HER2/Neu (clona K5204 de DAKO , figura 10), en el cual cabe aclarar que aunque la reactividad en la membrana celular está de acuerdo con los criterios del HERCEPTEST actuales, se identificó que hubo reactividad citoplasmática en los tres controles, incluyendo aquel que tenía demostrado que carecía de amplificación del gen. Es por esto, que aunque se demostró reactividad en el citoplasma de las glándulas en los tejidos a estudio, se hizo caso omiso de la misma para evaluarla según el puntaje del HER2/Neu.

FIGURA 9: HER2/NEU EN TUMORES DE ENDOMETRIO .	
A	B

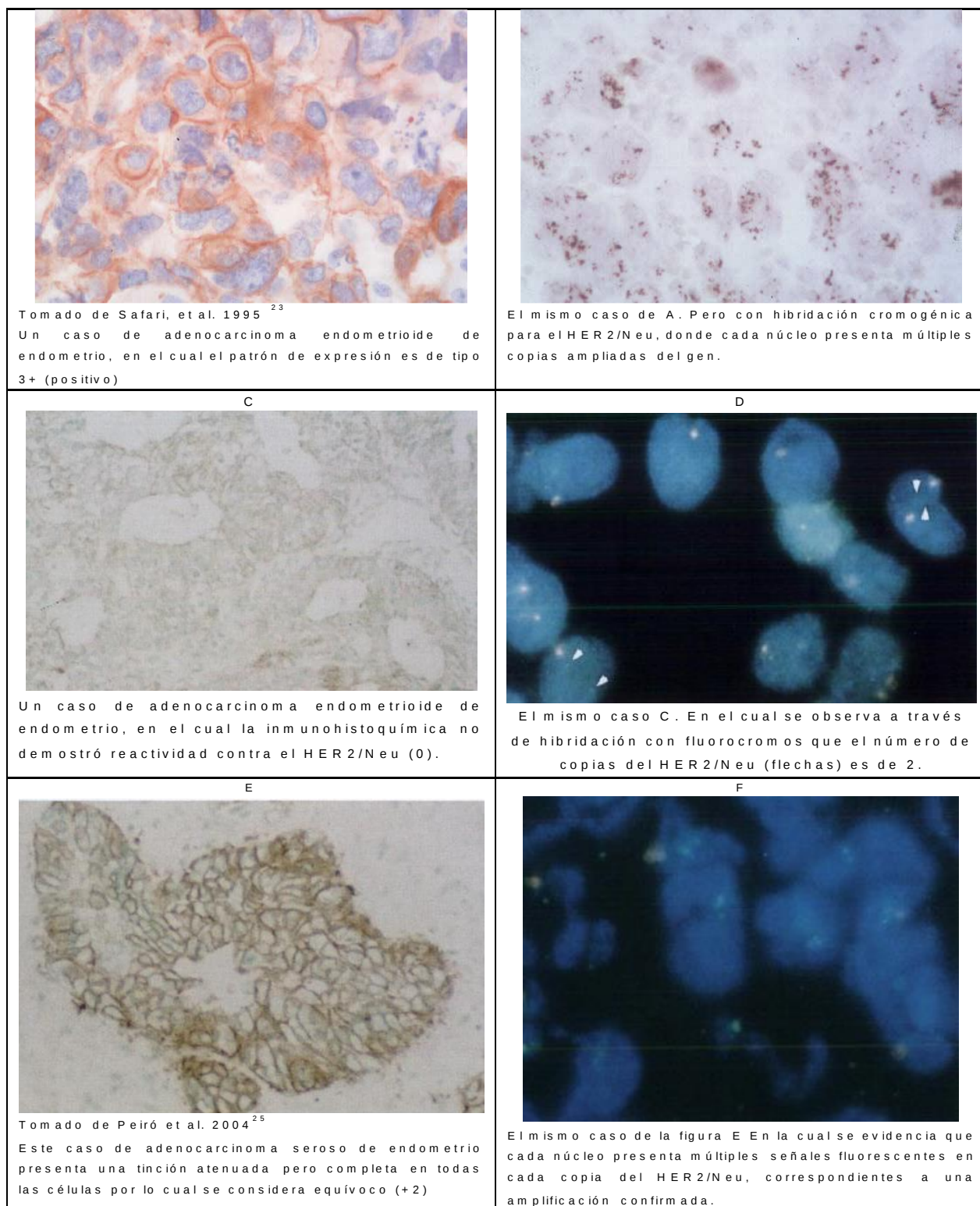
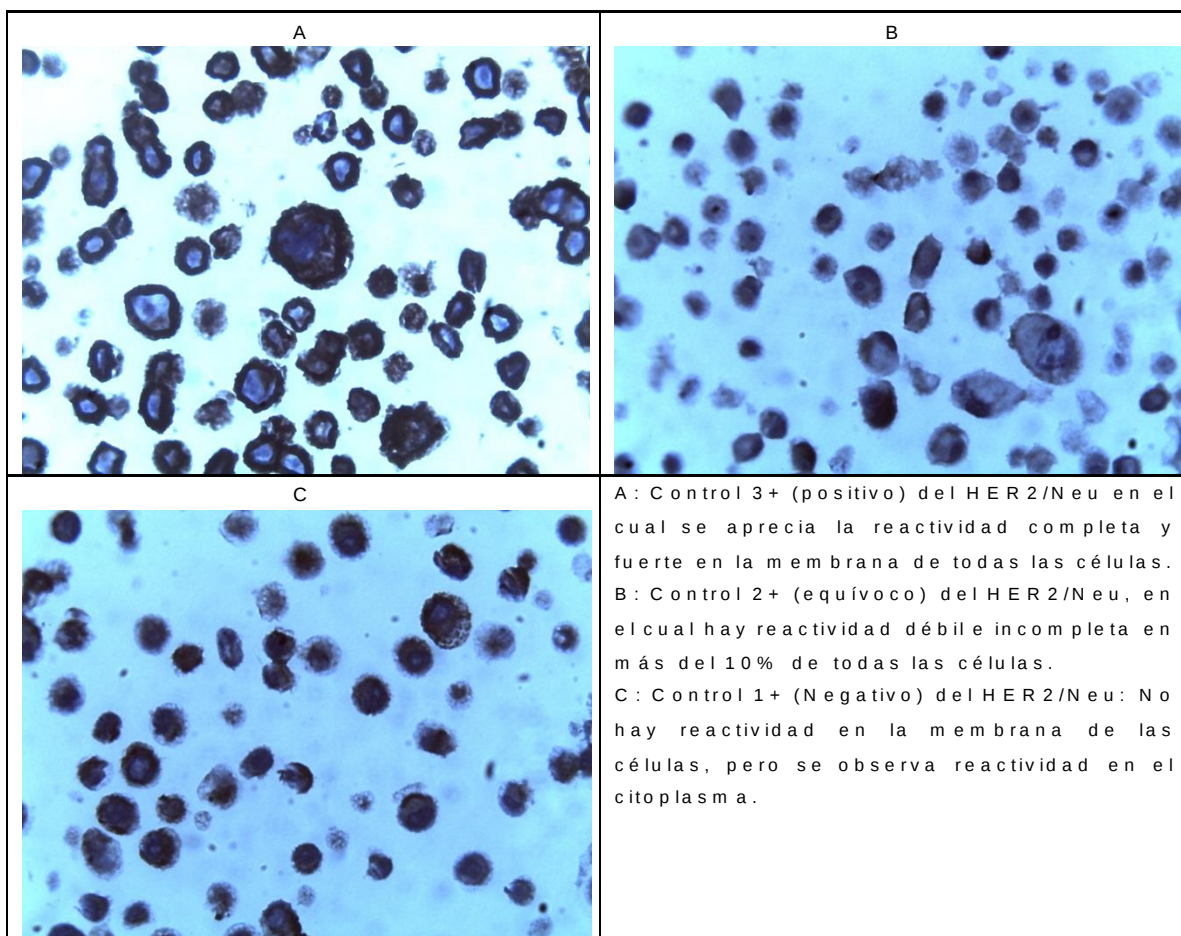


FIGURA 10. CONTROL DEL HER2/NEU.



15. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PTEN.

La expresión del PTEN ha sido evaluada en varios estudios^{37, 63, 64, 65}, del adenocarcinoma endometriode de endometrio, usando el puntaje histológico (histologic score o HSCORE).

Este es un puntaje que da una variable numérica de 1 a 300 y se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{HSCORE} = & 1 \times (\% \text{ porcentaje del tejido que se tiñe débilmente} + \\ & 2 \times (\% \text{ porcentaje del tejido que se tiñe de manera moderada}) + \\ & 3 \times (\% \text{ porcentaje del tejido que se tiñe fuertemente}). \end{aligned}$$

El porcentaje es teniendo en cuenta el total del tejido, por lo cual nunca sobrepasara 300. Esto ofrece las ventajas de que es altamente reproducible⁶⁵ y de que permite dar un puntaje en tejidos con expresión heterogénea del PTEN.

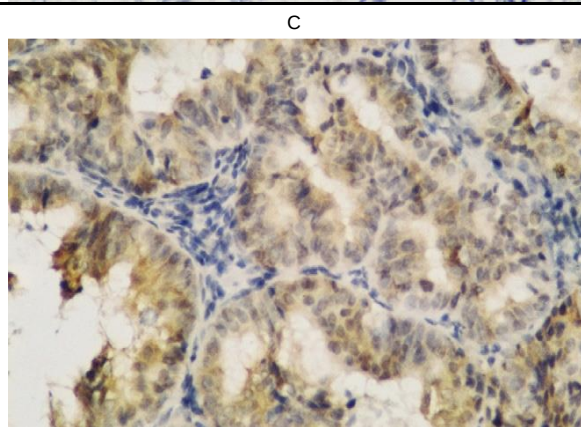
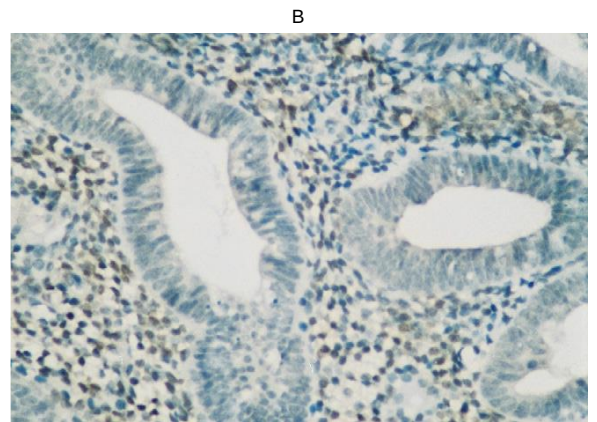
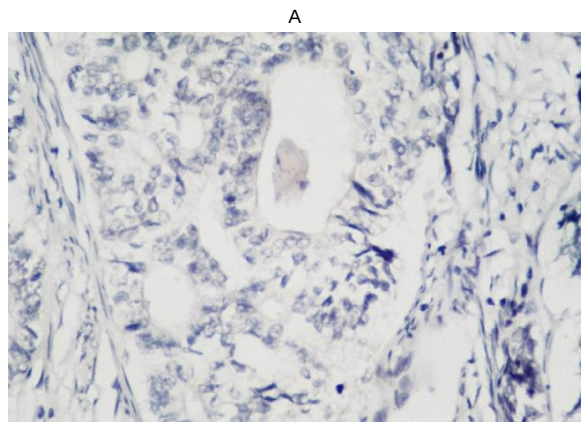
La expresión debe evaluarse en el citoplasma, que es el sitio activo del PTEN. La expresión del PTEN en el núcleo, aunque puede ocurrir, no se ha correlacionado con mutaciones ni con patologías malignas o premalignas⁶⁶, por lo cual se debe omitir.

Debido a que se considera positivo^{63, 65} si hay una expresión heterogénea superior a un puntaje de 200 en el HScore en carcinomas endometrioides indicaría que hay una expresión de la proteína mas no de su función y esto tiene una adecuada correlación⁶⁷ con las mutaciones genéticas de tipo delección e hipermetilación que se expresan inmunofenotípicamente como una pérdida de la expresión del PTEN. Las mutaciones puntuales con pérdida de la función del PTEN en cambio conservan la expresión del PTEN por inmunohistoquímica (figura 11). Esto ocurrió con el clon 6H2.1 el cual es un anticuerpo monoclonal contra la proteína en su forma activa o fosforilada y en su forma inactiva. Este anticuerpo carece de especificidad puesto que no demuestra actividad, solo demuestra la presencia de la proteína y solo es

útil para demostrar si hay una expresión como tal de la proteína y no de su función. En cambio el clon EP229 del PTEN, como ya se mencionó, indica la fracción activa del PTEN y su evaluación en pacientes con síndrome de Cowden es con un HSCORE de 30 o más para indicar su presencia⁶⁸ y se decidió utilizar por lo tanto este puntaje para definir la variable tipo booleano de expresión positiva o negativa del PTEN.

Hay que anotar que en los estudios evaluados^{38, 63, 66, 64} se consideró el estroma endometrial como control positivo interno.

FIGURA 11. INTERPRETACIÓN DEL PTEN.



Tomado de Kapucuoglu et al. 2007⁶⁴.

A: Inmunohistoquímica en un adenocarcinoma endometriode de endometrio que demuestra una expresión negativa del PTEN. El estudio citogenético demostró una mutación de tipo delección.

B: En un caso de hiperplasia endometrial simple sin atipias se demostró una pérdida de la reactividad del PTEN en las glándulas, pero conservada en las células estromales.

C: Reactividad del PTEN en las glándulas de una hiperplasia compleja con atipias, sin reactividad en el estroma.

16. MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo en total 80 muestras de productos de histerectomía de pacientes que clínicamente carecían de patología de endometrio y que aún presentaban ciclos menstruales. Los especímenes quirúrgicos fueron procesados de acuerdo a la guía institucional para el procesamiento de especímenes quirúrgicos de la UIS⁶⁹, teniendo la salvedad de tomar una muestra más de la pared endometrial. Estas muestras fueron fijadas en formol bufferado a un pH de 7.4 con fosfato de sodio monobásico y dibásico por lo menos por 6 horas y no más de 24 horas, para que luego fueran procesadas obteniendo el bloque de parafina respectivo y una lámina de histología teñida con hematoxilina y eosina. Esta lámina fue evaluada por dos observadores expertos de forma independiente. La primera revisión fue para determinar si las muestras tomadas cumplían con los criterios de inclusión y no cumplían con los criterios de exclusión. De esta manera, se excluyeron 54 muestras que cumplían con los criterios de exclusión dejando un total de 26 muestras. La segunda revisión fue para determinar la variable de la fase del ciclo menstrual en las 26 muestras restantes viables. En esta segunda revisión se programó un tercer observador en caso de que hubiese discrepancias entre los dos primeros observadores, pero no hubo necesidad del mismo pues no hubo discrepancias.

Luego se procedió a realizar la técnica de inmunohistoquímica. A cada uno de los bloques que cumplieron los criterios de inclusión se le tomaron dos cortes de un espesor de cuatro micras. Los cortes fueron colocados en láminas de vidrio cargadas con electricidad estática y se desparafinaron usando Xilol con posterior rehidratación usando grados cada vez más diluidos de alcohol. Luego se incubaron las láminas en un buffer ajustado a un pH de 6.5 conformado por una solución 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico con el fin de hacer recuperación de los antígenos fijados por el formol. Se procedió a bloquear la actividad de la enzima

peroxidasa que estuviese presente en los tejidos utilizando una solución al 3% de peróxido de hidrogeno en metanol.

Para la técnica de inmunohistoquímica se usó un anticuerpo monoclonal de conejo, el clon EP229 de ABCAM que tiene afinidad para las fracciones fosforiladas T366 y S370 del PTEN y otro anticuerpo monoclonal de conejo, el clon K5204 contra la proteína HER2/Neu. Una de las láminas de cada bloque fue destinada para el anticuerpo contra el PTEN y la otra fue destinada para el anticuerpo HER2/Neu. Cada lámina fue incubada con su respectivo anticuerpo monoclonal por 30 minutos y se usó una solución reveladora conformada por un polímero de dextrán pegado a una enzima peroxidasa y a anticuerpo monoclonal de cabro contra los anticuerpos monoclonales de conejo. Luego se indujo la coloración usando una solución de tetrahidrocloreto de diamonobenzidina la cual toma una coloración marrón al ser expuesta a la enzima peroxidasa asociada al complejo dextrán. El resto del tejido fue contrateñido usando la hematoxilina de Harris y las láminas fueron cubiertas con cubreobjetos adheridos con resina. Este procedimiento también se aplicó a las láminas de los controles positivos.

Posteriormente estas láminas fueron evaluadas por dos observadores expertos utilizando los criterios previamente definidos en la evaluación de la expresión del PTEN y del HER2/Neu. Los resultados fueron tabulados en una base de datos de EXCEL para ser valorados.

17. RESULTADOS

Se obtuvieron en total 26 muestras para ser valoradas por medio de inmunohistoquímica. Los evaluadores observaron que 12 de estas muestras (46.15%) correspondían a endometrios en la fase proliferativa, otras 12 (46.15%) a la fase secretora y las dos restantes (7.69%) se encontraban en la fase menstrual (Figura 12).

Lo primero que hay que señalar es que ninguna de las muestras tuvo reactividad para el HER2/Neu (Figura 13). Teniendo en cuenta que varias de las muestras presentaban reactividad citoplasmática, se evaluó el control negativo 1+ usado. Este control, que además de demostrarse que no había amplificación del HER2/Neu, se observó que también presentaba reactividad citoplasmática. Hay evidencia de que los carcinomas de mama con expresión citoplasmática del HER2/Neu sin expresión membranosa tienen diferenciación neuroendocrina⁷⁰, sin que esto se correlacionara con la amplificación del gen HER2/Neu. Esto sugiere la conclusión de que el patrón normal de expresión del HER2/Neu por medio de la inmunohistoquímica en una técnica diseñada para estudiar la amplificación del gen, es negativo.

En cuanto al PTEN, hubo reactividad en 13 muestras, 9 se encontraban en la fase secretora, 2 se encontraban en la fase menstrual y 2 en la fase proliferativa.

Hubo tres patrones prevalentes. El más frecuente de todos fue la expresión citoplasmática del PTEN en el epitelio de los endometrios en fase menstrual (dos en total, 100% de los menstruales, 15.38 del total de las reactivas), sin expresión en el estroma endometrial (Figura 14).

El siguiente patrón prevalente fue la ausencia de reactividad para el PTEN en el citoplasma de las células epiteliales y estromales del endometrio en fase proliferativa, que correspondía a 10 de 12 muestras de endometrios en la fase

proliferativa (83.3% de las proliferativas, 76.9% del total de las muestras no reactivas, figura 16).

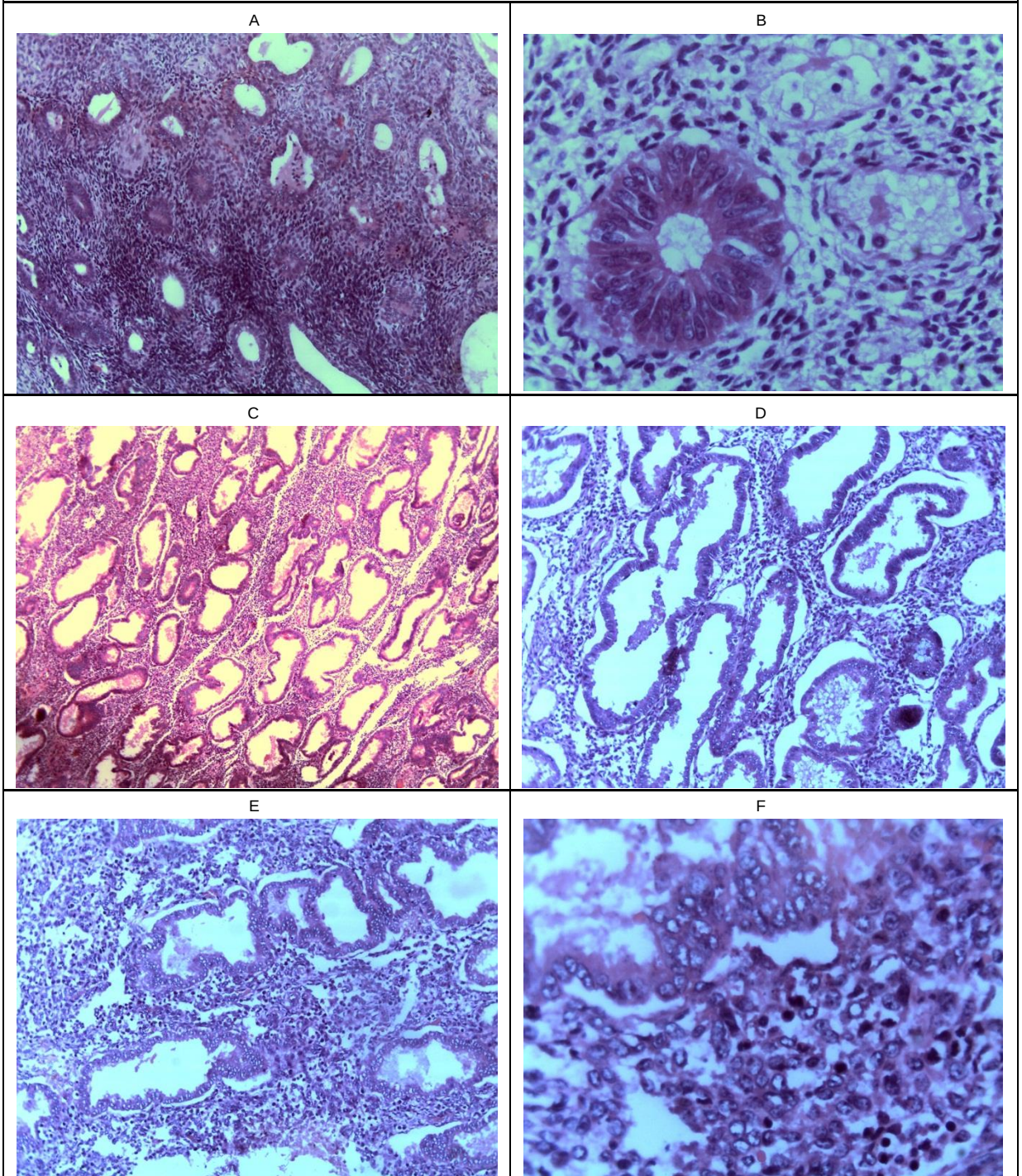
Y el tercer patrón prevalente fue la reactividad en el citoplasma de las células epiteliales en los endometrios en la fase secretora, sin reactividad en las células estromales, lo que ocurrió en 8 muestras (66.66% del total de las secretoras 61.53% de las muestras reactivas – Figura 17).

Quedan por evaluar los patrones menos prevalentes. Está el caso 48, que es secretor y el caso 71 que es proliferativo, los cuales carecían de reactividad en el epitelio, pero presentaban reactividad en el estroma endometrial (Figuras 15 D y E). Esta reactividad era difícil de evaluar debido a que las células estromales presentaban retracción del citoplasma. Correspondían a 7.69% de todas las muestras y al 15,3 % de las muestras que tuvieron reactividad para el PTEN. Estas muestras además son especiales en el hecho en que su reactividad se limitó al estroma endometrial y no tuvieron reactividad en el citoplasma de las células del epitelio endometrial.

Los otros patrones menos prevalentes fueron la ausencia de reactividad en el citoplasma de las células estromales y epiteliales en dos de los endometrios en fase proliferativa (15.3% de los endometrios proliferativos (figura 16) y la reactividad en el citoplasma de las células epiteliales en un endometrio secretor (7.69% de los secretores, figuras 15 A, B y C).

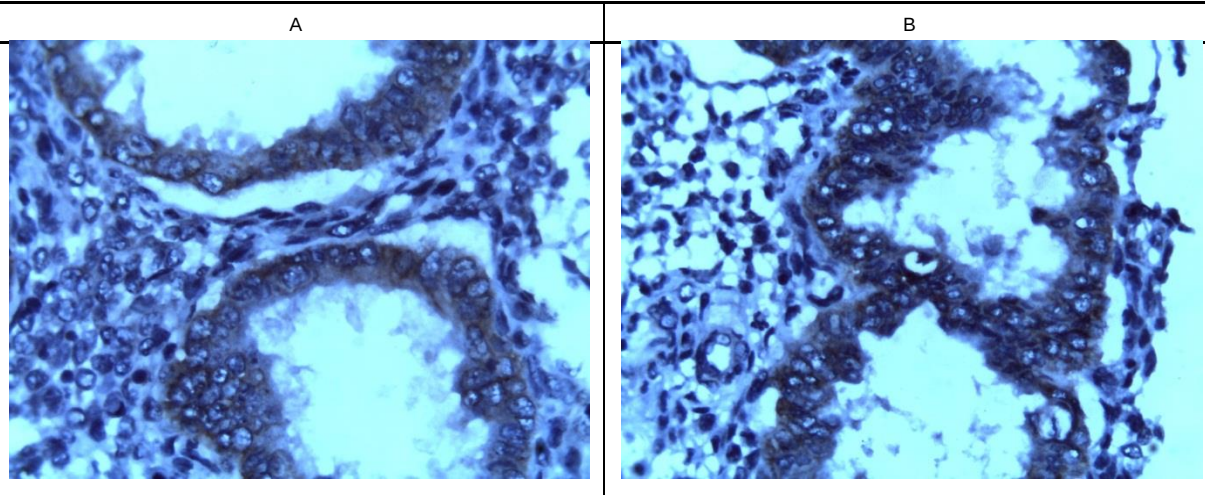
Cabe anotar que ningún caso presentó reactividad concomitante en el citoplasma de las células estromales y en el citoplasma de las células epiteliales. También que no hubo diferencias entre la expresión del PTEN en el endometrio de la capa basal y la funcional.

FIGURA 12: FASES DE LAS MUESTRAS ENDOMETRIALES.



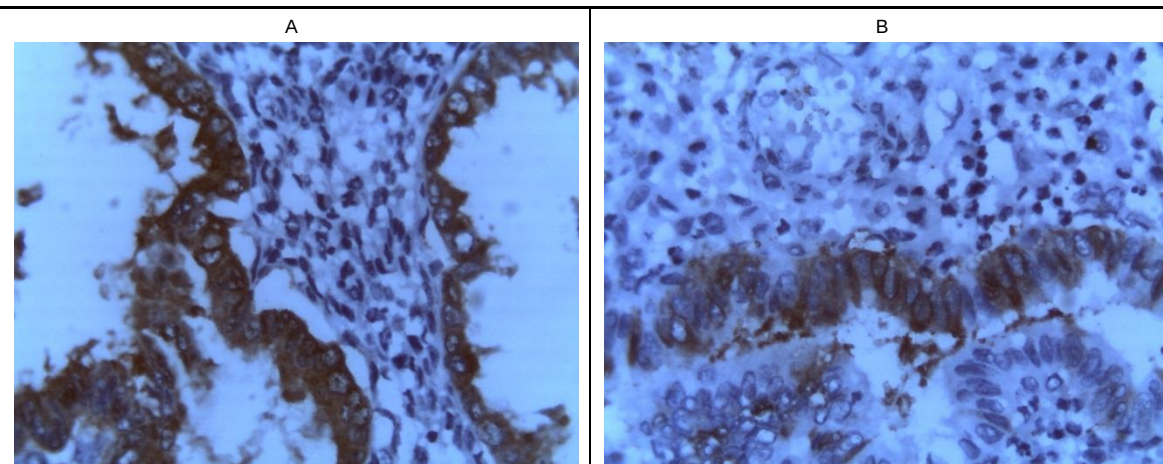
Figuras A y B: Casos 2 y 32 respectivamente, que demuestran escasos ductos glandulares de endometrio, cuyo epitelio es pseudoestratificado, corresponden a endometrios en fase proliferativa. Figuras C y D: Casos 19 y 31 respectivamente, en los que se observan glándulas dilatadas y con tortuosidades. Hay secreción intraluminal. Demuestran endometrios secretores. Figura E y F: Corresponden a un endometrio menstrual donde el estroma es edematoso con células redondas e infiltradas por neutrófilos. Hay focos de necrosis focal.

FIGURA 13. REACTIVIDAD DEL HER2/NEU EN LAS MUESTRAS.



A y B: casos 19 y 31 respectivamente. Hubo varios casos en los cuales las células epiteliales del endometrio presentaron reactividad citoplasmática contra el HER2/Neu, pero no hubo reactividad en un patrón de membrana. Esta reactividad se interpretó como negativa.

FIGURA 14. REACTIVIDAD DEL PTEN EN LA FASE MENSTRUAL.



A y B: Casos 35 y 78 respectivamente, las cuales corresponden a los dos únicos casos de endometrios en fase menstrual. Ambos presentaban el patrón de reactividad citoplasmática en las células epiteliales endometriales y corresponden al patrón más frecuente.

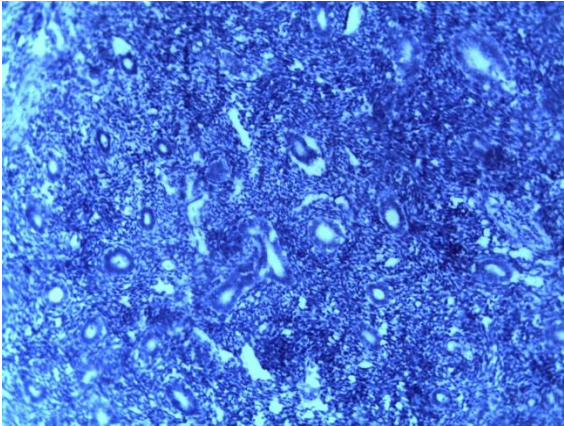
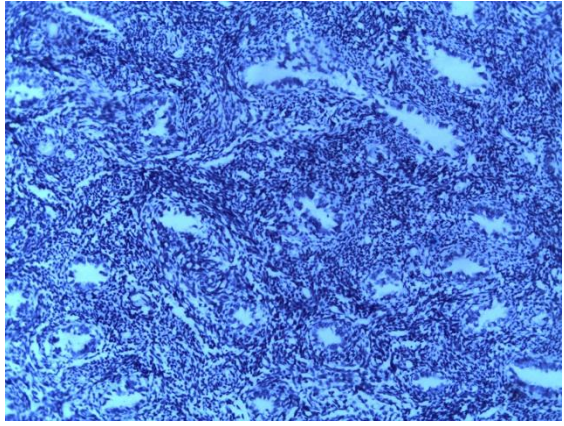
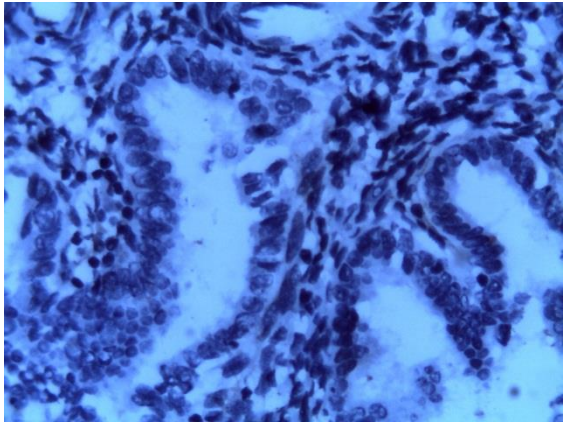
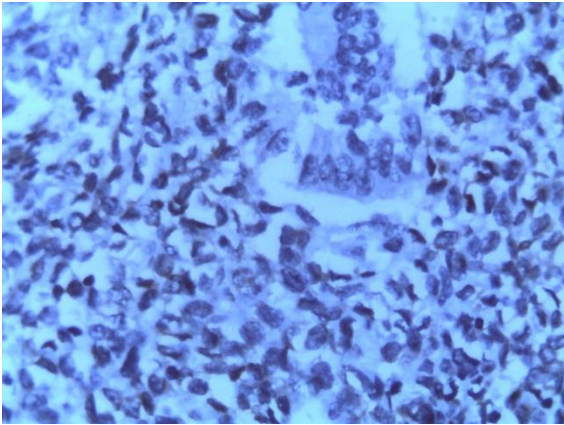
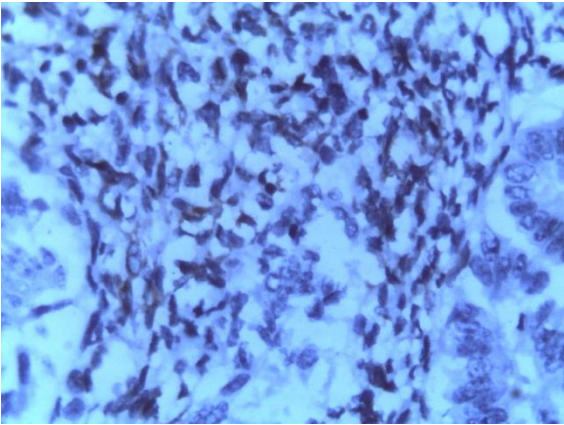
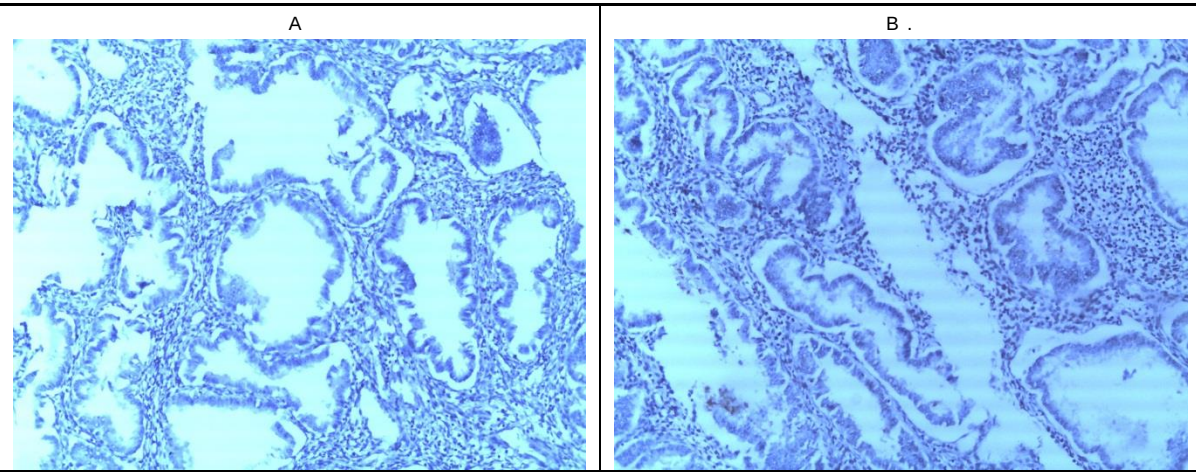
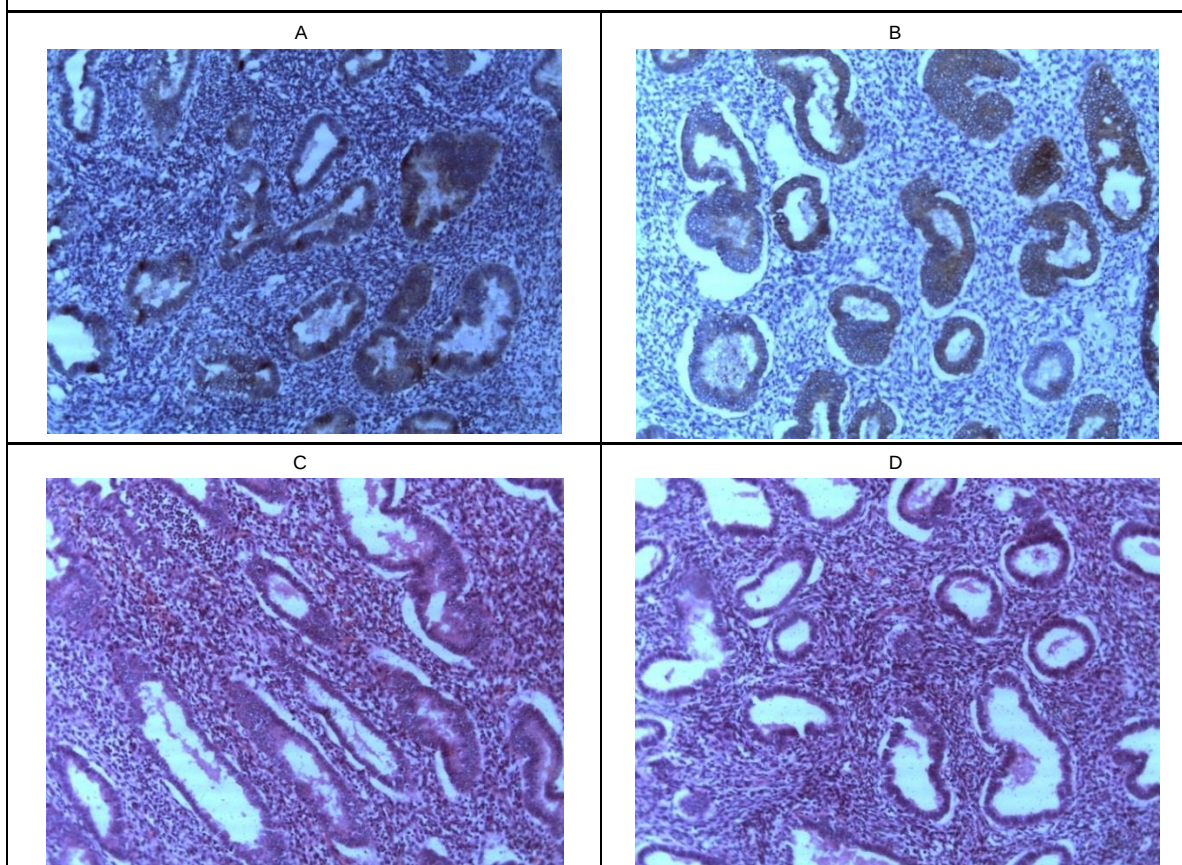
FIGURA 15. REACTIVIDAD DEL PTEN EN LA FASE PROLIFERATIVA Y EN EL ESTROMA	
A 	B 
C 	A, B y C: casos 53, 47 y 7, respectivamente. El segundo patrón más frecuente en la inmunohistoquímica del PTEN fue la ausencia de reactividad en el citoplasma tanto de las células estromales como de las células epiteliales endometriales (91.6%) de los endometrios en la fase proliferativa).
D 	E 
D y E: La figura D corresponde al caso 48, a un endometrio secretor y la figura E corresponde al caso 71, un endometrio proliferativo. En ambos se identifica reactividad para el PTEN en el citoplasma de las células del estroma endometrial, pero no hubo reactividad concomitante en el citoplasma de las células epiteliales. La interpretación es difícil debido al artefacto de retracción del citoplasma de las células estromales propio del proceso de preparación de los cortes histológicos.	

FIGURA 16. AUSENCIA DE REACTIVIDAD DEL PTEN EN ENDOMETRIOS SECRETORES.

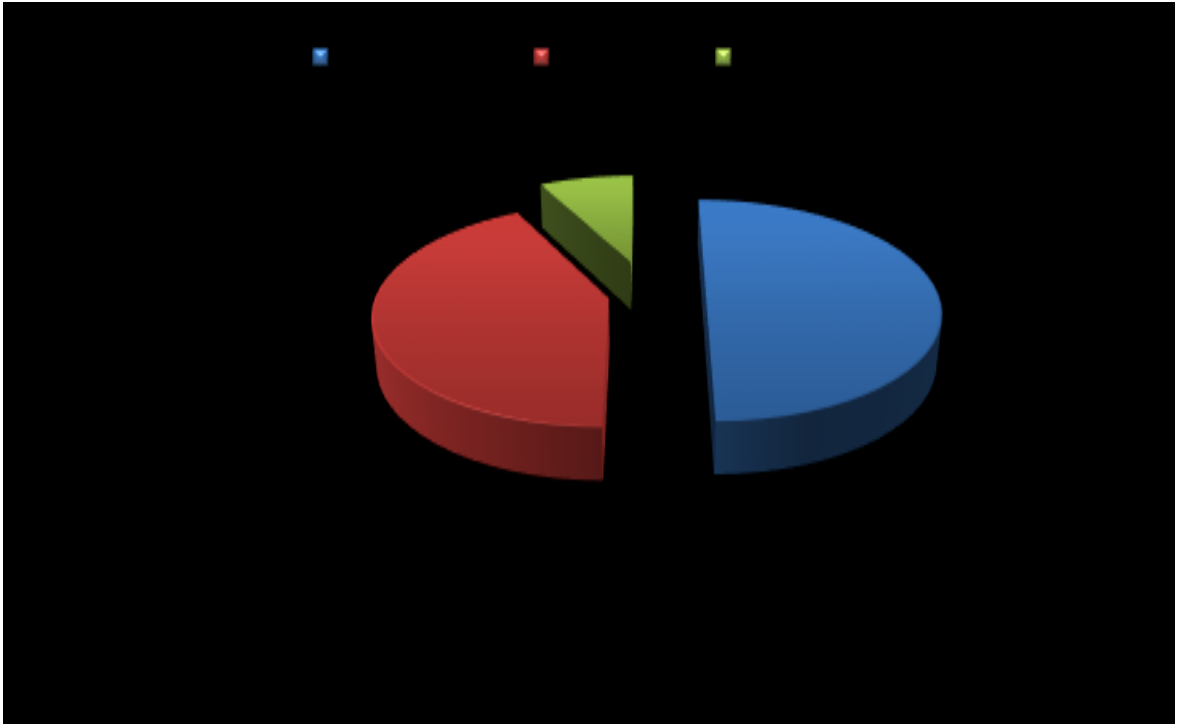
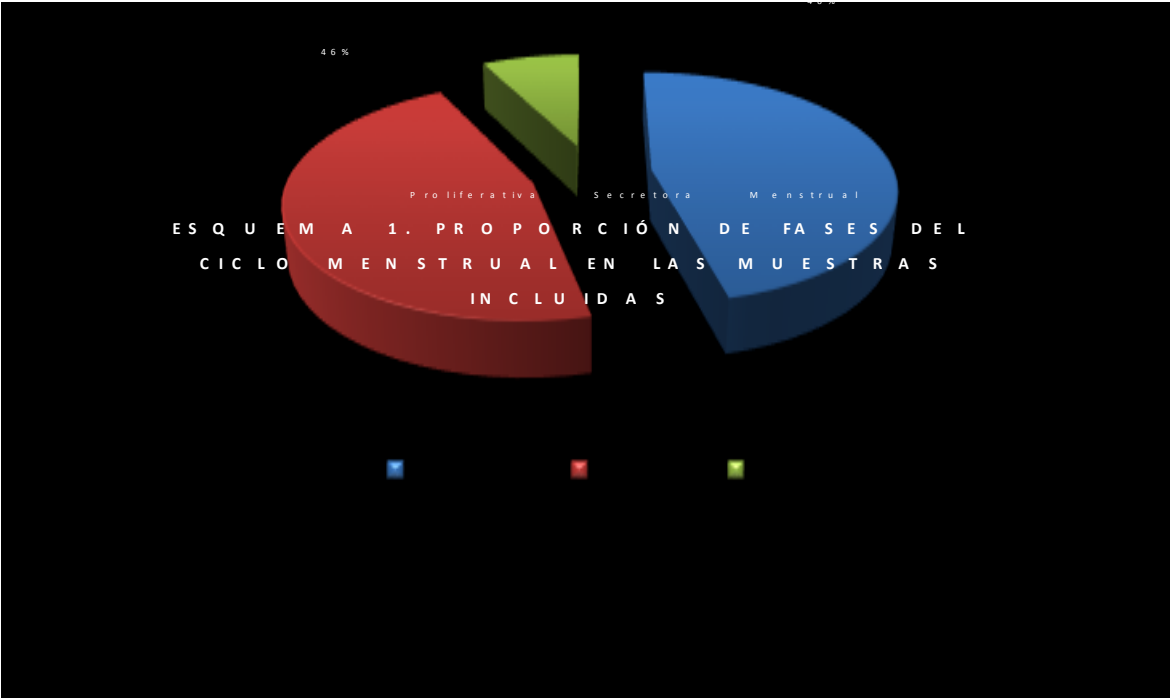


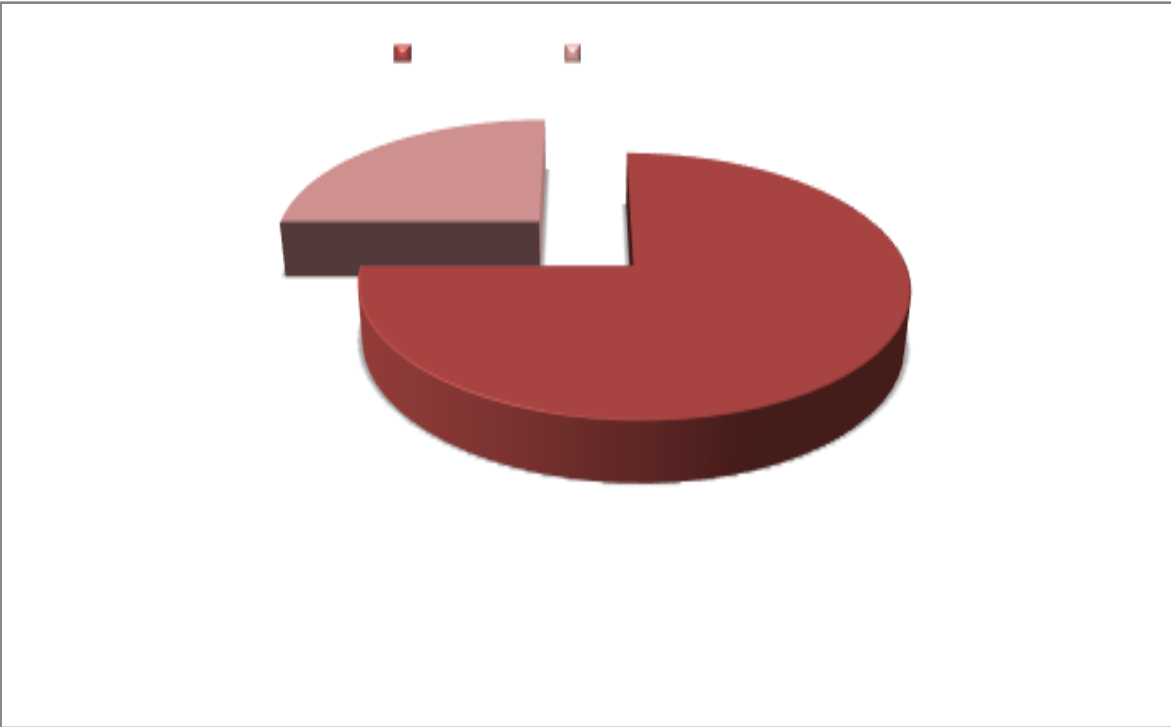
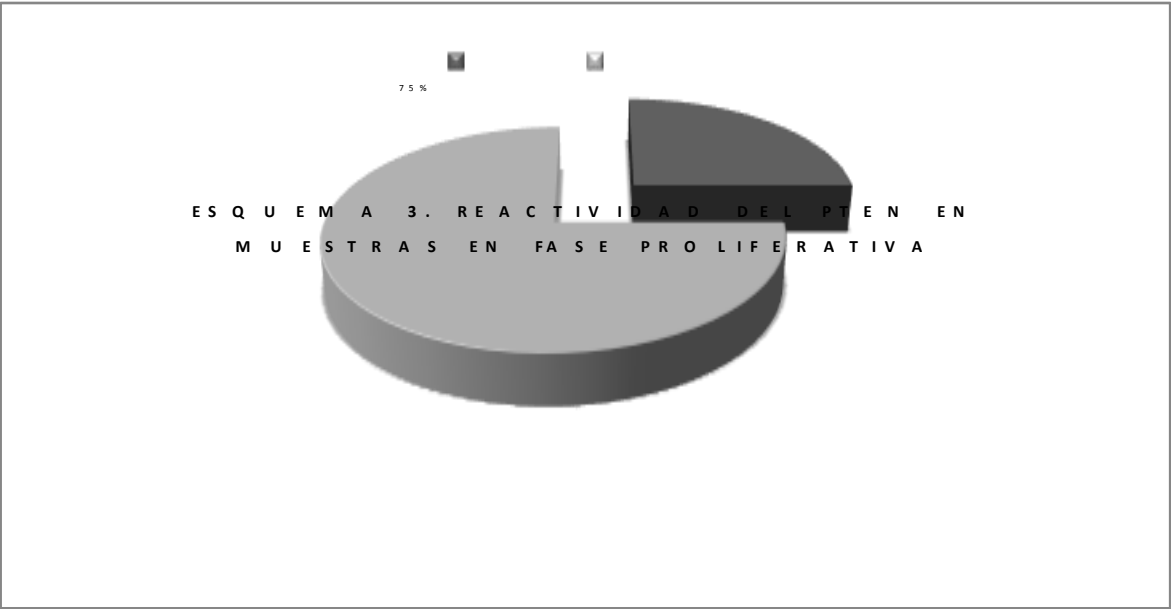
A y B: Casos 16 y 28 respectivamente. En estos dos endometrios el patrón fue de ausencia de reactividad para el PTEN en el citoplasma tanto de las células estromales como las epiteliales de estos dos endometrios en fase secretora.

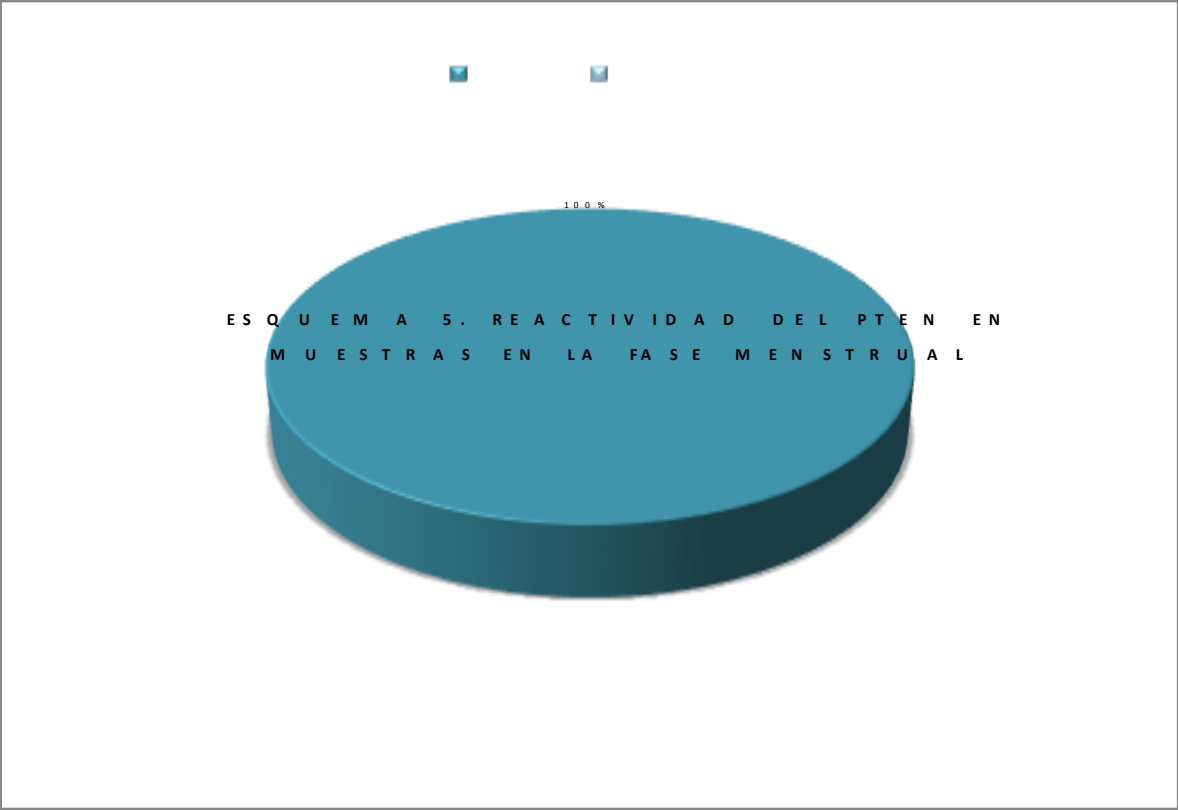
FIGURA 17. REACTIVIDAD DEL PTEN EN ENDOMETRIO PROLIFERATIVO .



A, B, C y D: Caso 43, se trata del único endometrio proliferativo con reactividad citoplasmática en las células endometriales para el PTEN. Las figuras 18.20 y 18.21 son los cortes en hematoxilina-eosina, en los cuales se observa edema del estroma y glándulas que carecen de tortuosidad cuyos núcleos son pseudoestratificados.







18. DISCUSIÓN

La función del PTEN es inhibir la proliferación de las células e inducir la apoptosis fisiológica, por lo tanto es el producto proteico de un gen supresor de tumor. Es bastante similar a la función de la proteína p53, exceptuando que la proteína p53 induce la apoptosis en las células con daños en su genoma⁷¹. En el endometrio, el microambiente hormonal induce primero una proliferación celular tanto del estroma como del epitelio endometrial durante la fase proliferativa, pero luego bajo el influjo progestacional, la proliferación celular queda inhibida en particular por que la activación del receptor Beta de la progesterona induce la síntesis de la proteína PTEN, demostrado por la medición del mRNA que lo codifica^{72,37}. Esto es un evento fisiológico que no depende de daños en el genoma como en el caso del p53, acompañado de otros eventos, tales como la isquemia inducida por la contractura de las arterias espirales en la capa funcional del endometrio, haciendo referencia que la actividad del PTEN hace parte pero no es el único de los mecanismos mediante los cuales la progesterona induce un freno en la proliferación del endometrio^{73,74}.

Por lo tanto, es de esperar que la forma activa del PTEN esté activa en el epitelio endometrial en fase secretora y menstrual. Esto está de acuerdo en los hallazgos de este estudio, donde los patrones más prevalentes fueron la ausencia de reactividad para el PTEN funcional en la fase proliferativa y reactividad para la fase secretora y la fase menstrual.

Queda por ampliar esta investigación para intentar determinar la razón por la cual puede haber patrones de reactividad de PTEN funcional en el epitelio de endometrios proliferativos y en el estroma de dos endometrios. En particular se recomienda investigar si los endometrios hiperplásicos y las lesiones estromales, como el nódulo del estroma endometrial tienen algún cambio en la expresión del

PTEN. En la bibliografía investigada, no había mención sobre mutaciones en el PTEN en lesiones estromales^{75, 76, 77}.

Se pudo observar una ausencia total de reactividad del HER2/Neu en todos los casos. Todas las células expresan el receptor HER2/Neu, pero el protocolo de inmunohistoquímica usando el HERCEPTEST está diseñado solo para determinar aquellos casos en los que hay amplificación del gen, pero incluye como categoría el puntaje 1+ en el cual hay una reactividad débil e incompleta alrededor de las células tumorales mamarias, pero en este estudio de endometrios normales no hubo en absoluto ningún tipo de reactividad en patrón membranoso. Como se discutió ya, la presencia de reactividad citoplasmática no es útil en determinar la reactividad contra el HER2/Neu. Como una nueva hipótesis se podría sugerir una correlación entre el carcinoma seroso intraepitelial de endometrio, la contraparte "in situ" del carcinoma seroso de endometrio⁷⁸ para identificar la proporción de reactividad en este tipo de lesión lo que podría establecer un patrón para una identificación muy temprana del carcinoma seroso de endometrio.

19. CONCLUSIONES

Usando el anticuerpo EP229 de ABCAM que tiene afinidad para las fracciones fosforiladas T366 y S370 en la proteína PTEN activada por la PIK3, los patrones de expresión más prevalentes fueron:

- La ausencia de reactividad en el epitelio y en el estroma de los endometrios de la fase proliferativa.

- La reactividad en el epitelio y ausencia de reactividad en el estroma de los endometrios en la fase secretora.

- La reactividad en el epitelio y ausencia de reactividad en el estroma de los endometrios en la fase menstrual.

Los patrones menores fueron la reactividad en el estroma de dos muestras, una en la fase proliferativa y otra en la fase secretora, junto con la reactividad epitelial de una muestra en la fase proliferativa y la ausencia de reactividad tanto en el estroma como en el epitelio de dos muestras en la fase proliferativa.

- Usando el clon K5204, el HER2/Neu no se observó expresión alguna en la membrana de las células epiteliales y estromales de los endometrios normales. Esto se correlaciona con la carencia de amplificación del gen en un endometrio normal.

- La expresión citoplasmática del HER2/Neu no tiene significado en determinar la amplificación del gen.

- El estroma endometrial no es útil como control interno negativo cuando se usa el clon EP229 de ABCAM, lo cual lo diferencia del clon 6H2.1 el cual presenta reactividad contra la proteína, sin importar si se trata de la porción activa, por lo que el estroma endometrial sirve de control interno.

- Los resultados de este estudio requieren una correlación con otro estudio de variables similares, pero usando lesiones premalignas, como la hiperplasia endometrial con atipias y el carcinoma seroso intraepitelial de endometrio.

- No hay diferencias en la expresión en la capa funcional y basal del endometrio para ninguno de los dos marcadores.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fearon ERVB. A genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759–767.
2. Tan DF, Huberman JA, Hyland A, et al. MCM2--a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer*. 2001;1:6. doi:10.1186/1471-2407-1-6.
3. Baweja P, Monappa V, Krishnanand G. P53 immunohistochemical staining patterns in benign , premalignant and malignant lesions of the oral cavity : A study of 68 cases. *J Interdiscip Histopathol*. 2013;1(3):113–120. doi:10.5455/jihp.20130121120725.
4. Anghelina F, Ioniță E, Popescu CF, et al. Clinical, morphological and immunohistochemical aspects in laryngeal premalignant lesions. *Rom J Morphol Embryol*. 2006;47(2):169–174.
5. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. P16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathol*. 2011;119:158–166. doi:10.1002/cncy.20140.
6. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res*. 2012;18(15):4154–4162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0270.
7. Xu R, Perle MA, Ph D, et al. Amplification of Her-2 / neu Gene in Her-2 / neu – Overexpressing and – Nonexpressing Breast Carcinomas and Their Synchronous Benign , Premalignant , and Metastatic Lesions Detected by FISH in Archival Material. *Mod Pathol*. 2002;15(2):116–124.
8. Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, et al. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ -line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res*. 2002;62:3485–3492.
9. Lacey J V., Chia VM. Endometrial hyperplasia and the risk of progression to carcinoma. *Maturitas*. 2009;63:39–44. doi:10.1016/j.maturitas.2009.02.005.
10. Mutter GL, Lin M, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(11).

11. Habeeb O , Goodglick L , Soslow R a , et al. Epithelial membrane protein-2 expression is an early predictor of endometrial cancer development. *Cancer*. 2010;116(20):4718–4726. doi:10.1002/cncr.25259.
12. Association W M . *W M A Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*.; 2013:1–8.
13. Salud M de. *Resolucion 8430 de 1993 - 1.*; 1993:1–12.
14. Robertson W B. Uteroplacental vasculature. *J Clin Pathol Suppl (Royal Coll Pathol)*. 1976;10:9–17. doi:10.1136/jcp.s3-10.1.9.
15. Mills S E. *Histology for Pathologists*. 3^a ed. Lippincott W illiam s & W ilkins; 2012:3rd Edition.
16. Yamamoto T , Saito M , Kumazawa K , et al. ErbB2 / HER2 : Its Contribution to Basic Cancer Biology and the Development of Molecular Targeted Therapy. En: *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways Edited.*; 2011:139–170. <http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-carcinogenesis-cell-growth-and-signalling-pathways/erbb2-her2-its-contribution-to-basic-cancer-biology-and-the-development-of-molecular-targeted-therap>.
17. Harari D , Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2 / HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 2000;6102–6114.
18. Rubin I , Yarden Y. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Ann Oncol*. 2001;12.
19. Casalini P , Iorio M V , G almozzi E , M énard S. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol*. 2004;200(October 2003):343–350. doi:10.1002/jcp.20007.
20. King CR , Kraus M H A S. Amplification of a novel v-erb-related gene in a human mammary carcinoma. *Science (80-)*. 1985;229:974-97.
21. O layioye M A , Neve R M , Lane H A , Hynes N E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000;19(13):3159–3167. doi:10.1093/emboj/19.13.3159.
22. Ghosh R , Narasanna A , Wang S E , et al. Trastuzum ab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Res*. 2011;71:1871–1882. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1872.

23. Saffari B, Jones LA, El-naggar A, Felix JC, George J, Press MF. Amplification and Overexpression of HER-2 / neu (c- erb B2) in Endometrial Cancers : Correlation with Overall Survival. *Cancer Res.* 1995;55:5693–5698.
24. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2376–2385. doi:10.1200/JCO.2005.03.4827.
25. Peiró G, Mayr D, Hillemanns P, Löhrs U, Diebold J. Analysis of HER-2/neu amplification in endometrial carcinoma by chromogenic in situ hybridization. Correlation with fluorescence in situ hybridization, HER-2/neu, p53 and Ki-67 protein expression, and outcome. *Mod Pathol.* 2004;17(3):227–287. doi:10.1038/modpathol.3800006.
26. English DP, Roque DM, Santin AD. HER2 expression beyond breast cancer: Therapeutic implications for gynecologic malignancies. *Mol Diagnosis Ther.* 2013;17(2):85–99. doi:10.1007/s40291-013-0024-9.
27. Buza N, Roque DM, Santin AD. HER2/neu in Endometrial Cancer: A Promising Therapeutic Target With Diagnostic Challenges. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(March):343–350. doi:10.5858/arpa.2012-0416-RA.
28. Santin AD, Zhan F, Bellone S, et al. Discrimination between uterine serous papillary carcinomas and ovarian serous papillary tumours by gene expression profiling. *Br J Cancer.* 2004;90:1814–1824. doi:10.1038/sj.bjc.6601791.
29. Srijaipracharoen S, Tangjitgamol S, Tanvanich S, et al. Expression of ER, PR, and Her-2/neu in endometrial cancer: A clinicopathological study. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2010;11:215–220. doi:10.4172/2155-9929.1000056.
30. Sun H, Lesche R, Li DM, et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(May):6199–6204. doi:10.1073/pnas.96.11.6199.
31. Li DM, Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(December):15406–15411. doi:10.1073/pnas.95.26.15406.
32. E. R, L. K, F. B, M.G. F, P.I. B, J. B. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res.* 1997;57:3657–3659.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed4&NEWS=N&AN=1997273684>.

33. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*. 1999;99(3):323–334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555148>.
34. Chu EC, Tarnawski AS. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit*. 2004;10(10):RA235–A241. doi:6275 [pii].
35. Robertson GP, Furnari FB, Miele ME, et al. In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(August):9418–9423. doi:10.1073/pnas.95.16.9418.
36. Xu D, Yao Y, Jiang X, Lu L, Dai W. Regulation of PTEN stability and activity by Plk3. *J Biol Chem*. 2010;285(285):39935–39942. doi:10.1074/jbc.M110.166462.
37. Guzeloglu-Kayisli O. Regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10) Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):5017–5026. doi:10.1210/jc.2003-030414.
38. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(6):2334–2338. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852473>.
39. Vazquez F, Ramaswamy S, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN Tail Regulates Protein Stability and Function Phosphorylation of the PTEN Tail Regulates Protein Stability and Function. *Mol Cell Biol*. 2000;20(14). doi:10.1128/MCB.20.14.5010-5018.2000.Updated.
40. Noh EM, Lee YR, Chay KO, et al. Estrogen receptor?? induces down-regulation of PTEN through PI3-kinase activation in breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2011;4:215–219. doi:10.3892/mmr.2011.412.
41. Al-khouri AM, Ma Y, Williams S, Mustelin T. Cooperative Phosphorylation of the Tumor Suppressor Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN) by Casein Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 *. *Coop Phosphorylation Tumor Suppressor Phosphatase Tensin Homol by Casein Kinases Glycogen Synthase Kinase 3*. 2005;280(42):35195–35202. doi:10.1074/jbc.M503045200.

42. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch.* 2004;444(3):213–223. doi:10.1007/s00428-003-0947-3.
43. Samarthai N, Hall K, Yeh I. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010:162363. doi:10.1155/2010/162363.
44. Pallares J, Bussaglia E, Martínez-Guitarte JL, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Mod Pathol.* 2004;18(5):719–727. doi:10.1038/modpathol.3800347.
45. Kim M, Shin MS, Lee JM, Cho HS. Inhibitory Effects of Isoquinoline Alkaloid Berberine on Ischemia-Induced Apoptosis via Activation of Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Signaling Pathway. *Int Neurol J.* 2014;18:115–125.
46. PROFAMILIA. Fecundidad de las mujeres. *ENCUESTA Nac Demogr Y SALUD - ENDS.* 2010;(2). http://www.profamilia.org.co/encuestas/Profamilia/Profamilia/documentos/bol-etines/prensa/Fecundidad_de_las_Mujeres.pdf.
47. Nonaka D, Laser J, Tucker R, Melamed J. Immunohistochemical evaluation of necrotic malignant melanomas. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(5):787–791. doi:10.1309/WKEN4ER9GXJ9GG31.
48. Acosta AA, Elberger L, Borghi M, Calamera JC. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril.* 2000;73(4):788–798. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731542>.
49. Speroff, L., & Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* lippincott Williams & wilkins.; 2005. <http://books.google.com.co/books?id=8slkqPT2gh4C&pg=PA3&ots=Cw1pRfiADv&dq=Speroff+L+Fritz+MA+Female+infertility+Clinical+Gynecologic+Endocrinology+and+Infertility.7th+ed&lr&hl=es&pg=PA3#v=onepage&q&f=false>.
50. Ferenczy, A, Mutter G. The Endometrial Cycle. *Glob Libr women's med.* 2008;DOI 10.384(ISSN: 1756-2228). doi:10.3843.
51. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril.* 2004;81(5):1333–1343. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.11.030.

52. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology*. 13^a ed. M c Graw Hill; 2013:462–467.
53. Brys M, Semczuk A, Rechberger T, Krajewska W M. Expression of erbB-1 and erbB-2 genes in normal and pathological human endometrium. *Oncol Rep*. 2007;18(19):261–265.
54. Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JM S. HER2 testing: Current status and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(2):276–284. doi:10.1016/j.ctrv.2013.09.001.
55. Shan L, Ying J, Lu N. HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population. *Diagn Pathol*. 2013;8:76. doi:10.1186/1746-1596-8-76.
56. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol*. 2012;25:637–650. doi:10.1038/modpathol.2011.198.
57. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*. 2008;19(April):1523–1529. doi:10.1093/annonc/mdn169.
58. Miturski R, Semczuk A, Jakowicki JA. c-erbB-2 expression in human proliferative and hyperplastic endometrium. *Gynecol Obstet*. 1998;61:73–74.
59. Cagle PT, Sholl LM, Lindeman NI, et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with non-small cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(December):171–174. doi:10.5858/arpa.2013-0232-CP.
60. Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, et al. Determination of HER2/neu status in uterine serous papillary carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Gynecol Oncol*. 2005;98:24–30. doi:10.1016/j.ygyno.2005.03.041.
61. Freier K, Knoepfle K, Flechtenmacher C, et al. Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(August):9–16. doi:10.1002/gcc.
62. Dako. *HercepTest Interpretation Manual*; 2014.

63. Maïques O, Santacana M, Valls J, et al. Optimal protocol for PTEN immunostaining; Role of analytical and preanalytical variables in PTEN staining in normal and neoplastic endometrial, breast, and prostatic tissues. *Hum Pathol*. 2014;45(3):522–532. doi:10.1016/j.humpath.2013.10.018.
64. Kapucuoglu N, Aktepe F, Kaya H, Bircan S, Karahan N, Ciriş M. Immunohistochemical expression of PTEN in normal, hyperplastic and malignant endometrium and its correlation with hormone receptors, bcl-2, bax, and apoptotic index. *Pathol Res Pract*. 2007;203(3):153–162. doi:10.1016/j.prp.2007.01.003.
65. Garg K, Broaddus RR, Soslow R a, Urbauer DL, Levine D a, Djordjevic B. Pathologic scoring of PTEN immunohistochemistry in endometrial carcinoma is highly reproducible. *Int J Gynecol Pathol*. 2012;31(1):48–56. doi:10.1097/PGP.0b013e3182230d00.
66. Lightbown A, Crosby K, Zeng Q, et al. *Evaluation of PTEN : Immunohistochemical Analysis of Tissues and Cells*.; :3167.
67. Hoang LN, McConechy MK, Köbel M, et al. Histotype-genotype correlation in 36 high-grade endometrial carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(9):1421–1432. doi:10.1097/PAS.0b013e31828c63ed.
68. Mahdi H, Mester JL, Nizialek EA, Ngeow J, Michener C, Eng C. Germline PTEN , SDHB-D , and KLLN alterations in endometrial cancer patients with Cowden and Cowden-like syndromes: An international, multicenter, prospective study. *Cancer*. 2014:n/a – n/a. doi:10.1002/cncr.29106.
69. Vera JAG, Monroy SCV. *Principios de procesamiento en patología quirúrgica*. (SANTANDER UIDE, ed.); 2008.
70. Horiguchi S, Hishima T, Hayashi Y, et al. HER-2 / neu cytoplasmic staining is correlated with neuroendocrine differentiation in breast carcinoma. *J Med Dent Sci*. 2010;57:155–163.
71. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006;12(9). doi:10.1016/j.molmed.2006.07.007.
72. Amicis F De, Guido C, Santoro M, et al. A novel functional interplay between Progesterone Receptor-B and PTEN , via AKT , modulates autophagy in breast cancer cells. *J Cell Mol Med*. 2014;18(11):2252–2265. doi:10.1111/jcmm.12363.

73. Zheng W , Baker HE , Mutter GL . Involution of PTEN -null endometrial glands with progestin therapy. *Gynecol Oncol.* 2004;92:1008–1013. doi:10.1016/j.ygyno.2003.11.026.
74. Brosens JJ, Gellersen B. Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol.* 2006;36:389–398. doi:10.1677/jme.1.02060.
75. Moirfar F, Kremser ML, Man YG, Zatloukal K, Tavassoli FA, Denk H. Allelic imbalances in endometrial stromal neoplasms: Frequent genetic alterations in the nontumorous normal-appearing endometrial and myometrial tissues. *Gynecol Oncol.* 2004;95:662–671. doi:10.1016/j.ygyno.2004.08.016.
76. Chiang S, Oliva E. Cytogenetic and molecular aberrations in endometrial stromal tumors. *Hum Pathol.* 2011;42(5):609–617. doi:10.1016/j.hum path.2010.12.005.
77. D'Angelo E, Spagnoli LG, Prat J. Comparative clinicopathologic and immunohistochemical analysis of uterine sarcomas diagnosed using the World Health Organization classification system. *Hum Pathol.* 2009;40(11):1571–1585. doi:10.1016/j.hum path.2009.03.018.
78. Pathiraja P, Dhar S, Haldar K. Serous endometrial intraepithelial carcinoma : a case series and literature review. *Cancer Manag Res.* 2013;5:117–122.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Anibal A. ELBERGER, Laura. BORGHI, Mario. et al. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. Fertility and sterility [en línea], 2000a. vol. 73, no. 4, p. 788–98. ISSN 0015-0282. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731542>.

AL-KHOURI, Anna Maria. MA, Yuliang. WILLIAMS, Scott. et al. Cooperative Phosphorylation of the Tumor Suppressor Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN) by Casein Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 ^α *. Cooperative Phosphorylation of the Tumor Suppressor Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN) by Casein Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3, 2005b. vol. 280, no. 42, p. 35195–35202. DOI 10.1074/jbc.M503045200.

AMICIS, Francesca De. GUIDO, Carmela. SANTORO, Marta. et al. A novel functional interplay between Progesterone Receptor-B and PTEN , via AKT , modulates autophagy in breast cancer cells. J. Cell. Mol. Med., 2014c. vol. 18, no. 11, p. 2252–2265. DOI 10.1111/jcmm.12363.

ANGHELINA, F. IONIȚĂ, Elena. POPESCU, Carmen Florina. et al. Clinical, morphological and immunohistochemical aspects in laryngeal premalignant lesions. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie, 2006d. vol. 47, no. 2, p. 169–174. ISSN 12200522.

BAWEJA, Pankaj. MONAPPA, Vidya y KRISHNANAND, Geetha. P53 immunohistochemical staining patterns in benign , premalignant and malignant lesions of the oral cavity: A study of 68 cases. Journal of Interdisciplinary Histopathology, 2013f. vol. 1, no. 3, p. 113–120. DOI 10.5455/jihp.20130121120725.

BROSENS, JJ y GELLERSEN, B. Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. Journal of molecular endocrinology, 2006g. vol. 36, p. 389–398. ISSN 0952-5041. DOI 10.1677/jme.1.02060.

BRYIS, Magdalena. SEMCZUK, Andrzej. RECHBERGER, Tomasz. et al. Expression of erbB-1 and erbB-2 genes in normal and pathological human endometrium. Oncology Reports, 2007h. vol. 18, no. 19, p. 261–265. ISSN 1021335X.

BUZA, Natalia. ROQUE, Dana M y SANTIN, Alessandro D. HER2/neu in Endometrial Cancer: A Promising Therapeutic Target With Diagnostic Challenges. Archives of pathology & laboratory medicine [en línea], 2014i. vol. 138, no. March, p. 343–50. ISSN 1543-2165. DOI 10.5858/arpa.2012-0416-RA. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24576030>.

CAGLE, Philip T. SHOLL, Lynette M. LINDEMAN, Neal I. et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with non-small cell carcinoma of the lung. Archives of pathology & laboratory medicine [en línea], 2014j.

vol. 138, no. December, p. 171–4. ISSN 1543-2165. DOI 10.5858/arpa.2013-0232-CP. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23808401>.

CASALINI, Patrizia. IORIO, Marilena V. GALMOZZI, Enrico. et al., 2004k. Role of HER receptors family in development and differentiation. 2004. S.l.: s.n.

CHIANG, Sarah y OLIVA, Esther. Cytogenetic and molecular aberrations in endometrial stromal tumors. Human Pathology [en línea], 2011l. vol. 42, no. 5, p. 609–617. ISSN 00468177. DOI 10.1016/j.humpath.2010.12.005. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.12.005>.

CHU, Eric C y TARNAWSKI, Andrzej S. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 2004m. vol. 10, no. 10, p. RA235–A241. ISSN 1234-1010. DOI 6275 [pii].

D'ANGELO, Emanuela. SPAGNOLI, Luigi G y PRAT, Jaime. Comparative clinicopathologic and immunohistochemical analysis of uterine sarcomas diagnosed using the World Health Organization classification system. Human Pathology [en línea], 2009n. vol. 40, no. 11, p. 1571–1585. ISSN 00468177. DOI 10.1016/j.humpath.2009.03.018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2009.03.018>.

DAKO. HercepTest Interpretation Manual. S.l.: s.n. 2014o.

E., Rhei. L., Kang. F., Bogomolny. et al., 1997p. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas [en línea]. 1997. S.l.: s.n. ISBN 0008-5472. Disponible en: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed4&NEWS=N&AN=1997273684>.

ENGLISH, Diana P. ROQUE, Dana M y SANTIN, Alessandro D. HER2 expression beyond breast cancer: Therapeutic implications for gynecologic malignancies. Molecular Diagnosis and Therapy [en línea], 2013q. vol. 17, no. 2, p. 85–99. ISSN 1177-1062. DOI 10.1007/s40291-013-0024-9. Disponible en: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L368880763>
<http://dx.doi.org/10.1007/s40291-013-0024-9>
<https://gsk.worldcat.org/openurlresolver?sid=EMBASE&issn=11771062&id=doi:10.1007/s40291-013-0024-9&atitle=HER2+expression+bey>.

FEARON, Eric R Vogelstein Bert. A genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. Cell, 1990r. vol. 61, p. 759–767.

FERENCZY, A, MUTTER, G. 2008s. The Endometrial Cycle. Glob. libr. women's med. [en línea]. Disponible en: http://www.glowm.com/section_view/item/292.

FREIER, Kolja. KNOEPFLE, Karl. FLECHTENMACHER, Christa. et al. Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma. Genes, chromosomes & cancer, 2010t. vol. 49, no. August, p. 9–16. ISSN 10452257. DOI 10.1002/gcc.

GARG, Karuna. BROADDUS, Russell R. SOSLOW, Robert a. et al. Pathologic scoring of PTEN immunohistochemistry in endometrial carcinoma is highly reproducible. International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists [en línea], 2012u. vol. 31, no. 1, p. 48–56. [Consulta: 14 marzo 2012]. ISSN 1538-7151. DOI 10.1097/PGP.0b013e3182230d00. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123723>.

GHOSH, Ritwik. NARASANNA, Archana. WANG, Shizhen Emily. et al. Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. Cancer Research, 2011v. vol. 71, p. 1871–1882. ISSN 00085472. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-10-1872.

GRAVALOS, C y JIMENO, A. , 2008w. HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target. 2008. S.l.: s.n. ISBN 3491390834.

GUZELOGLU-KAYISLI, O. Regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10) Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism [en línea], 2003x. vol. 88, no. 10, p. 5017–5026. [Consulta: 25 abril 2012]. ISSN 0021-972X. DOI 10.1210/jc.2003-030414. Disponible en: <http://jcem.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/jc.2003-030414>.

HABEEB, Omar. GOODGLICK, Lee. SOSLOW, Robert a. et al. Epithelial membrane protein-2 expression is an early predictor of endometrial cancer development. Cancer [en línea], 2010y. vol. 116, no. 20, p. 4718–26. [Consulta: 4 junio 2012]. ISSN 0008-543X. DOI 10.1002/cncr.25259. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2950887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

HARARI, Daniel y YARDEN, Yosef. Molecular mechanisms underlying ErbB2 / HER2 action in breast cancer. Oncogene, 2000z. p. 6102–6114.

HOANG, Lien N. MCCONECHY, Melissa K. KÖBEL, Martin. et al. Histotype-genotype correlation in 36 high-grade endometrial carcinomas. The American journal of surgical pathology [en línea], 2013aa. vol. 37, no. 9, p. 1421–32. ISSN

1532-0979. DOI 10.1097/PAS.0b013e31828c63ed. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076778>.

HORIGUCHI, Shin-ichiro. HISHIMA, Tsunekazu. HAYASHI, Yukiko. et al. HER-2 / neu cytoplasmic staining is correlated with neuroendocrine differentiation in breast carcinoma. J Med Dent Sci, 2010ab. vol. 57, p. 155–163.

KAPUCUOGLU, Nilgun. AKTEPE, Fatma. KAYA, Hakan. et al. Immunohistochemical expression of PTEN in normal, hyperplastic and malignant endometrium and its correlation with hormone receptors, bcl-2, bax, and apoptotic index. Pathology, research and practice [en línea], 2007ac. vol. 203, no. 3, p. 153–62. [Consulta: 17 mayo 2012]. ISSN 0344-0338. DOI 10.1016/j.prp.2007.01.003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17317031>.

KIM, Mia. SHIN, Mal Soon. LEE, Jae Min. et al. Inhibitory Effects of Isoquinoline Alkaloid Berberine on Ischemia- Induced Apoptosis via Activation of Phosphoinositide 3-Kinase/ Protein Kinase B Signaling Pathway. International Neurology Journal, 2014ad. vol. 18, p. 115–125.

KING CR, KRAUS MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. Science, 1985ae. vol. 229:974-97.

LACEY, James V. y CHIA, Victoria M. , 2009af. Endometrial hyperplasia and the risk of progression to carcinoma. 2009. S.l.: s.n. ISBN 1873-4111 (Electronic)r0378-5122 (Linking).

LAX, Sigurd F. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. Virchows Archiv : an international journal of pathology [en línea], 2004ag. vol. 444, no. 3, p. 213–23. [Consulta: 17 mayo 2012]. ISSN 0945-6317. DOI 10.1007/s00428-003-0947-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14747944>.

LEE, JO. YANG, H. GEORGESCU, MM. et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. Cell [en línea], 1999ah. vol. 99, no. 3, p. 323–34. ISSN 0092-8674. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555148>.

LI, DM y SUN, H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998ai. vol. 95, no. December, p. 15406–15411. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.95.26.15406.

LIGHTBOWN, Angela. CROSBY, Katherine. ZENG, Qingfu. et al. [sin fecha]. Evaluation of PTEN : Immunohistochemical Analysis of Tissues and Cells. . S.l.:

MAHDI, Haider. MESTER, Jessica L. NIZIALEK, Emily A. et al. Germline PTEN , SDHB-D , and KLLN alterations in endometrial cancer patients with Cowden and Cowden-like syndromes: An international, multicenter, prospective study. Cancer [en línea], 2014a. p. n/a-n/a. ISSN 0008543X. DOI 10.1002/cncr.29106. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.29106>.

MAIQUES, Oscar. SANTACANA, Maria. VALLS, Joan. et al. Optimal protocol for PTEN immunostaining; Role of analytical and preanalytical variables in PTEN staining in normal and neoplastic endometrial, breast, and prostatic tissues. Human Pathology [en línea], 2014a. vol. 45, no. 3, p. 522-532. ISSN 00468177. DOI 10.1016/j.humpath.2013.10.018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2013.10.018>.

MESCHER, Anthony L. Junqueira's Basic Histology. 13. S.L.: McGraw Hill. 2013a. p. 467-498. ISBN 9780071807203.

MILLS, Stacey E. Histology for Pathologists. 3. S.L.: Lippincott Williams & Wilkins. 2012a. p. 322-342.

MITURSKI, R. SEMCZUK, A y JAKOWICKI, JA. c-erbB-2 expression in human proliferative and hyperplastic endometrium. GYNECOLOGY & OBSTETRICS, 1998a. vol. 61, p. 73-74.

MOINFAR, Farid. KREMSER, Marie Luise. MAN, Yan Gao. et al. Allelic imbalances in endometrial stromal neoplasms: Frequent genetic alterations in the nontumorous normal-appearing endometrial and myometrial tissues. Gynecologic Oncology, 2004a. vol. 95, p. 662-671. ISSN 00908258. DOI 10.1016/j.ygyno.2004.08.016.

MORRISON, Carl. ZANAGNOLO, Vanna. RAMIREZ, Nilsa. et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology [en línea], 2006a. vol. 24, no. 15, p. 2376-85. [Consulta: 3 mayo 2012]. ISSN 1527-7755. DOI 10.1200/JCO.2005.03.4827. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710036>.

MURRAY, Michael J. MEYER, William R. ZAINO, Richard J. et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. Fertility and Sterility, 2004a. vol. 81, no. 5, p. 1333-1343. ISSN 00150282. DOI 10.1016/j.fertnstert.2003.11.030.

MUTTER, George L. LIN, Ming-chieh. FITZGERALD, Jeffrey T. et al. Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers. Journal of the National Cancer Institute, 2000a. vol. 92, no. 11.

MUTTER, George L. LIN, Ming-chieh. FITZGERALD, Jeffrey T. et al. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. The Journal of clinical endocrinology and metabolism [en línea], 2000at. vol. 85, no. 6, p. 2334–8. ISSN 0021-972X. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852473>.

NOH, Eun Mi. LEE, Young Rae. CHAY, Kee Oh. et al. Estrogen receptor induces down-regulation of PTEN through PI3-kinase activation in breast cancer cells. Molecular Medicine Reports, 2011au. vol. 4, p. 215–219. ISSN 17912997. DOI 10.3892/mm.r.2011.412.

NONAKA, Daisuke. LASER, Jordan. TUCKER, Rachel. et al. Immunohistochemical evaluation of necrotic malignant melanomas. American journal of clinical pathology [en línea], 2007av. vol. 127, no. 5, p. 787–91. [Consulta: 17 octubre 2014]. ISSN 0002-9173. DOI 10.1309/WKEN4ER9GXJ9GG31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439838>.

OLAYIOYE, Monilola A. NEVE, Richard M. LANE, Heidi A. et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. The EMBO journal, 2000aw. vol. 19, no. 13, p. 3159–3167. ISSN 0261-4189. DOI 10.1093/emboj/19.13.3159.

PALLARES, Judit. BUSSAGLIA, Elena. MARTÍNEZ-GUITARTE, Jose Luis. et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. Modern Pathology [en línea], 2004ax. vol. 18, no. 5, p. 719–727. [Consulta: 5 mayo 2012]. ISSN 0893-3952. DOI 10.1038/modpathol.3800347. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/modpathol.3800347>.

PATHIRAJA, P. DHAR, S y HALDAR, K. Serous endometrial intraepithelial carcinoma: a case series and literature review. Cancer Management and Research, 2013ay. vol. 5, p. 117–122.

PEIRÓ, G. MAYR, D. HILLEMANN, P. et al. Analysis of HER-2/neu amplification in endometrial carcinoma by chromogenic in situ hybridization. Correlation with fluorescence in situ hybridization, HER-2/neu, p53 and Ki-67 protein expression, and outcome. Modern Pathology [en línea], 2004az. vol. 17, no. 3, p. 227–287. [Consulta: 6 mayo 2012]. ISSN 0893-3952. DOI 10.1038/modpathol.3800006. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/modpathol.3800006>.

PEREZ, Edith A. CORTÉS, Javier. GONZALEZ-ANGULO, Ana Maria. et al. , 2014ba. HER2 testing: Current status and future directions [en línea]. 2014. S.l.: Elsevier Ltd. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.001>.

PROFAMILIA. 2010bb. Fecundidad de las mujeres. ENCUESTA NACIONAL DE DEMOGRAFIA Y SALUD - ENDS [en línea]. Disponible en: http://www.profamilia.org.co/encuestas/Profamilia/Profamilia/documentos/boletines/prensa/Fecundidad_de_las_Mujeres.pdf.

ROBERTSON, G.P. FURNARI, F.B. MIELE, M.E. et al. In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998bc. vol. 95, no. August, p. 9418–9423. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.95.16.9418.

ROBERTSON, W.B. Uteroplacental vasculature. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*, 1976bd. vol. 10, p. 9–17. ISSN 0021-9746. DOI 10.1136/jcp.s3-10.1.9.

ROOS, Wynand P y KAINA, Bernd. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*, 2006be. vol. 12, no. 9. DOI 10.1016/j.molmed.2006.07.007.

RUBIN, I y YARDEN, Y. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Annals of Oncology*, 2001bf. vol. 12.

RÜSCHOFF, Josef. HANNA, Wedad. BILOUS, Michael. et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Modern Pathology*, 2012bg. vol. 25, p. 637–650. ISSN 0893-3952. DOI 10.1038/modpathol.2011.198.

SAFFARI, Bahman. JONES, Lovell A. EL-NAGGAR, Adel. et al. Amplification and Overexpression of HER-2 / neu (c- erb B2) in Endometrial Cancers : Correlation with Overall Survival. *Cancer Research*, 1995bh. vol. 55, p. 5693–5698.

MINISTERIO DE SALUD. , 1993bi. Resolucion 8430 de 1993 - 1. 1993. S.l.: s.n.

SAMARNTHAI, Norasate. HALL, Kevin y YEH, I-tien. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstetrics and gynecology international*, 2010bj. vol. 2010, p. 162363. ISSN 1687-9589. DOI 10.1155/2010/162363.

SANTIN, AD. ZHAN, F. BELLONE, S. et al. Discrimination between uterine serous papillary carcinomas and ovarian serous papillary tumours by gene expression profiling. *British journal of cancer*, 2004bk. vol. 90, p. 1814–1824. ISSN 10779108. DOI 10.1038/sj.bjc.6601791.

SANTIN, Alessandro D. BELLONE, Stefania. VAN STEDUM, Sue. et al. Determination of HER2/neu status in uterine serous papillary carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ

hybridization. *Gynecologic Oncology*, 2005bl. vol. 98, p. 24–30. ISSN 00908258. DOI 10.1016/j.ygyno.2005.03.041.

SCHMIDT, Dietmar. BERGERON, Christine. DENTON, Karin J. et al. P16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathology*, 2011bm. vol. 119, p. 158–166. ISSN 19346638. DOI 10.1002/cncy.20140.

SHAN, Ling. YING, Jianming y LU, Ning. HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population. *Diagnostic pathology* [en línea], 2013bn. vol. 8, p. 76. ISSN 1746-1596. DOI 10.1186/1746-1596-8-76. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655831&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SPEROFF, L., & FRITZ, MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility* [en línea]. S.l.: lippincott Williams & wilkins. 2005bo. p. 176-179. Disponible en: <http://books.google.com.co/books?id=8slkqPT2gh4C&lpq=PA3&ots=Cw1pRfiADv&dq=Speroff L Fritz MA Female infertility Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7th ed&lr&hl=es&pg=PA3#v=onepage&q&f=false>.

SRIJAIPRACHAROEN, Sunamchok. TANGJITGAMOL, Siriwan. TANVANICH, Sujitra. et al. Expression of ER, PR, and Her-2/neu in endometrial cancer: A clinicopathological study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2010bp. vol. 11, p. 215–220. ISSN 15137368. DOI 10.4172/2155-9929.1000056.

SUN, H. LESCHE, R. LI, DM. et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999bq. vol. 96, no. May, p. 6199–6204. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.96.11.6199.

TAN, DF. HUBERMAN, Joel A. HYLAND, Andrew. et al. MCM2--a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC cancer*, 2001br. vol. 1, p. 6. ISSN 1471-2407. DOI 10.1186/1471-2407-1-6.

VAZQUEZ, Francisca. RAMASWAMY, Shivapriya y SELLERS, William R. Phosphorylation of the PTEN Tail Regulates Protein Stability and Function. *Molecular and Cellular Biology*, 2000bs. vol. 20, no. 14. DOI 10.1128/MCB.20.14.5010-5018.2000.Updated.

VERA, Jorge Andres Garcia y MONROY, Silvia Cristina Vecino. *Principios de procesamiento en patología quirúrgica*. S.l.: s.n. 2008bt. p. 376-397.

WAHLBERG, Siobhan S. SCHMEITS, James. THOMAS, George. et al. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Research*, 2002bu. vol. 62, p. 3485–3492. ISSN 00085472.

WENTZENSEN, Nicolas. SCHWARTZ, Lauren. ZUNA, Rosemary E. et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clinical Cancer Research*, 2012bv. vol. 18, no. 15, p. 4154–4162. ISSN 10780432. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-12-0270.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. , 2013e. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2013. S.l.: s.n.

XU, Dazhong. YAO, Yixin. JIANG, Xuejun. et al. Regulation of PTEN stability and activity by Plk3. *Journal of Biological Chemistry*, 2010bw. vol. 285, no. 285, p. 39935–39942. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M110.166462.

XU, Ruliang. PERLE, Mary Ann. PH, D. et al. Amplification of Her-2 / neu Gene in Her-2 / neu – Overexpressing and – Nonexpressing Breast Carcinomas and Their Synchronous Benign , Premalignant , and Metastatic Lesions Detected by FISH in Archival Material. *Modern Pathology*, 2002bx. vol. 15, no. 2, p. 116–124.

YAMAMOTO, Tadashi. SAITO, Makoto. KUMAZAWA, Kentaro. et al. 2011by. ErbB2 / HER2 : Its Contribution to Basic Cancer Biology and the Development of Molecular Targeted Therapy. *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways Edited* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 139–70. ISBN 978-953-307-714-7,. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-carcinogenesis-cell-growth-and-signalling-pathways/erbb2-her2-its-contribution-to-basic-cancer-biology-and-the-development-of-molecular-targeted-therapy>.

ZHENG, Wenxin. BAKER, Heather E y MUTTER, George L. Involution of PTEN -null endometrial glands with progestin therapy. *Gynecologic Oncology*, 2004bz. vol. 92, p. 1008–1013. ISSN 00908258. DOI 10.1016/j.ygyno.2003.11.026.